



HAL
open science

Etude du rôle de Condensine dans le contrôle de l'expression génique chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Clémence Hocquet

► **To cite this version:**

Clémence Hocquet. Etude du rôle de Condensine dans le contrôle de l'expression génique chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Génétique animale. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSEN037. tel-02951812

HAL Id: tel-02951812

<https://theses.hal.science/tel-02951812>

Submitted on 29 Sep 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.



Numéro National de Thèse : 2018LYSEN037

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée par

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340

Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire, Génétique

Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Soutenue publiquement le 28/09/2018, par :

Clémence HOCQUET

**Etude du rôle de Condensine dans le
contrôle de l'expression génique chez la
levure *Schizosaccharomyces pombe***

Devant le jury composé de :

Verdel, André / Chargé de recherche / Université Grenoble Alpes / Rapporteur
Watrin, Erwan / Chargé de recherche / Université de Rennes 1 / Rapporteur
Lengronne, Armelle / Directrice de recherche / Université de Montpellier / Examinatrice
Vaur, Sabine / Chargée de recherche / Université de Bordeaux / Examinatrice
Palladino, Francesca / Directrice de recherche / ENS de Lyon / Examinatrice
Bernard, Pascal / Directeur de recherche / ENS de Lyon / Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **André Verdel** et **Erwan Watrin** pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse, surtout en cette période estivale. Je remercie également **Armelle Lengronne**, **Sabine Vaur** et **Francesca Palladino** pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'en profite pour remercier également **Armelle Lengronne** et **Francesca Palladino**, pour leur participation à mon comité de suivi de thèse, qui m'a été d'une aide à la fois scientifique et personnelle. Je voudrais aussi remercier **Sabine Vaur** pour la discussion qu'on a eue au dernier Pombe club. J'ai beaucoup apprécié que tu partages ton expérience avec moi. 😊

Je voudrais remercier également la **Fondation pour la Recherche Médicale** qui a financé ma 4^{ème} année de thèse, et m'a permis de finir ce doctorat dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens à remercier vivement **Pascal Bernard**, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire dès mes stages de M2, et pour m'avoir soutenue et préparée au concours BMIC afin que je puisse continuer l'aventure en thèse. Merci beaucoup pour vos conseils, votre encadrement et votre temps, j'ai beaucoup appris à vos côtés pendant ces 4 années de thèse. Merci de m'avoir permis d'aller en congrès à l'étranger et de m'avoir toujours poussée à présenter mes travaux. Même si je traînais un peu des pieds au début, je suis vraiment contente que vous m'ayez donné ces occasions de me confronter à cet exercice. Merci enfin de m'avoir supportée tout ce temps, de m'avoir encouragée, fait confiance et d'avoir cru en moi.

Je remercie tout particulièrement **Xavier Robellet**, post-doctorant de l'équipe avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration dès ma 2^{ème} année de thèse, et qui a beaucoup apporté à ce projet. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi et je te remercie pour toutes les connaissances que tu as pu me transmettre. Je t'ai pas mal embêté pendant ma période de rédaction, merci d'avoir gardé patience ! Je te remercie également pour ta bonne humeur inébranlable, tes blagues (toujours de très bon goût) et ton soutien dans les moments difficiles. Je te suis également très reconnaissante de m'avoir permis d'aller au congrès SMC à ta place, rien ne t'y obligeais et pourtant tu l'as fait. Merci beaucoup pour ta générosité.

Je remercie également chaleureusement **Vincent Vanoosthuyse**, pour tous ses conseils avisés, à la fois scientifiques et personnels, qui m'ont été d'une grande aide au cours de ma thèse. Je retiendrai particulièrement ta grande rigueur scientifique, que j'essaie d'appliquer à mon tour. Je te remercie aussi pour toutes tes blagues (également de très bon goût), tes anecdotes et ton humeur parfois chantante ! Et réjouis-toi, après ces 10 ans de thèse (d'après toi), je m'en vais enfin ! ;)

Je tiens aussi à remercier **Julieta Rivosecchi**, doctorante de l'équipe, pour son enthousiasme, sa bonne humeur et sa générosité. Merci beaucoup de m'avoir écoutée à chaque fois que j'en avais besoin et pour m'avoir soutenue dans les moments de doute. Merci pour ton amitié de tous les jours. ☺ Merci aussi pour les sessions d'escalade avec Lucas et pour m'avoir appris à faire un nœud de huit ! Je ne dirai qu'une chose : A mi me gustan los crustáceos !

Je remercie également **Esther Toselli**, la maman du labo comme disent certains, sans qui le laboratoire aurait du mal à tourner ! C'est toi qui as initié mon projet de thèse, je t'en remercie beaucoup. Merci aussi pour ton aide, scientifique mais aussi personnelle, tes conseils et ta bonne humeur.

Je remercie aussi **Amélie Malapert et Pénélope Legros**, les deux boutes-en-train du laboratoire, qui ont malheureusement quitté l'équipe. Vos blagues (distinguées toujours) et vos nombreuses chansons ont mis une bonne humeur indéniable dans le labo. Ça me fait tout drôle de vous voir mamans toutes les deux !

Je remercie **Claire Burny et Laurent Modolo** qui ont beaucoup apporté à mon projet de thèse en réalisant toute la partie d'analyse bio-informatique du RNA seq. L'analyse des ARNs readthrough n'a pas été aisée et je vous suis reconnaissante pour tout le travail fourni. Merci également au pôle biocomputing et notamment **Hélène Polvèche et Sébastien Lemaire**, qui m'ont aidé lorsque je me suis essayée à l'analyse bio-informatique par Galaxy.

Je souhaite également remercier nos collaborateurs : **Samuel Marguerat et Xi-Ming Sun** pour les données de RNA FISH, **Sara Cuylen-Haering et Christian Haering** pour les données chez *S. cerevisiae*, et **André Verdel et Yohann Couté** pour l'analyse des interacteurs de Cut3 par spectrométrie de masse.

J'adresse également mes remerciements à **David Cluet et Martin Spichty**, qui nous ont permis de réaliser les tests d'interaction par double hybride. Une première fois lors de mon stage de M2 et plus tard lorsque Xavier a testé les interactions en détail.

Je remercie aussi tous les **amis rencontrés au labo** qui ont rendu ces 4 années plus drôles et me laissent la tête pleine de bons souvenirs : Jérôme, Flore, Marion, Manon, Sophie, Vincent, Claire, Delphine & Joe, Elodie, Ludo, Chloé, Anissa, Philippe, Steven, Julie, Séverin, Fabrice.

Merci aussi à tous **mes amis** qui m'ont soutenu et avec qui j'ai pu penser à autre chose que la thèse : Charlotte, Boris, François, Ivana, Lucie, Hélène, Meryl, Céline, Yannis, Angélique, Nico, Florian.

Enfin un grand merci à **ma famille** pour leur soutien inébranlable, mes quatre sœurs Agathe, Lou, Floriane et Aurélia, ainsi que mes parents. Mention spéciale à ma mère qui m'a beaucoup aidée dans cette dernière ligne droite qu'est la rédaction de thèse ! Merci également à mes parents pour la relecture de mon manuscrit, ce qui n'était pas une mince affaire. 😊

Table des matières

Liste des abréviations	4
Partie I - Introduction.....	5
Chapitre I- Les niveaux d'organisation de la chromatine.....	6
I. Le nucléosome.....	6
II. L'organisation de la chromatine à large échelle : euchromatine et hétérochromatine, territoires chromosomiques et compartiments A/B.....	7
III. L'organisation de la chromatine à échelle intermédiaire : les TADs.....	10
IV. Les interactions chromatiniennes à petite échelle : les boucles de chromatine	11
V. La réorganisation des chromosomes en mitose.....	11
VI. L'organisation nucléaire chez la levure à fission <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	15
Chapitre II – Les SMC : des organisateurs de la chromatine	20
I. Les complexes SMC	20
1) Architecture des complexes SMC.....	20
2) Les complexes SMC procaryotes	23
3) Les complexes SMC eucaryotes	24
a) Cohésines.....	24
b) SMC5/6	27
c) Le complexe MRX/MRN	28
II. Les complexes Condensines	28
1) Découverte des Condensines	28
2) Les complexes Condensines et leurs spécificités	30
3) Mode(s) d'association(s) des Condensines avec l'ADN	34
4) Les fonctions biochimiques des Condensines	37
5) Localisation des Condensines sur la chromatine.....	40
6) Chargement des Condensines sur la chromatine.....	43
7) Régulations des Condensines au cours du cycle cellulaire.....	45
Chapitre III – Rôles attribués aux complexes Cohésines et Condensines en interphase.....	48
I. Les Cohésines	48
1) Rôle dans l'organisation de la chromatine et l'expression génique en interphase.....	48
2) Rôle des Cohésines dans la réparation des dommages à l'ADN	53
II. Les Condensines	55
1) Rôle dans la réparation des dommages à l'ADN	55
2) Rôle des Condensines dans l'organisation de la chromatine en interphase.....	56
3) Rôle dans la régulation de l'expression génique	58
Chapitre IV- L'expression génique, focus sur le cycle de la transcription	61
I. Le cycle de la transcription.....	61
1) Initiation de la transcription.....	63
2) Elongation de la transcription	64
3) Terminaison de la transcription	65
Chapitre V- L'ARN-exosome, principale machinerie de dégradation 3'→5' des ARNs de la cellule	68
I. Composition et Structure	68
II. Localisation.....	69
III. Fonctions de l'exosome à ARN	70
IV. Régulateurs et co-facteurs de l'exosome	74
Chapitre VI- Question biologique	77

Partie II – Matériels et Méthodes des résultats non publiés.....	79
Matériel biologique	79
Méthodes.....	79
I. Méthodes et conditions de culture	79
II. Méthodes d’analyses génétiques.....	80
III. Techniques d’analyse des interactions protéiques	81
1) Test en double hybride.....	81
2) Co-Immunoprécipitation (ou Co-IP)	82
IV. Techniques d’analyse de protéines associées à la chromatine.....	84
1) Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)	84
2) Immunofluorescence sur étalement de la chromatine.....	86
Partie III - Résultats.....	89
Contexte des travaux de thèse	89
I. Analyse transcriptomique des mutants de Condensine <i>cut3-477</i> et <i>cut14-208</i>	89
1) Les mutants Condensine accumulent des ARNs non codants et des ARNm	89
2) Les mutants de Condensine accumulent des ARNs étendus en 3’	90
II. Interaction physique par double hybride entre Cut3 et Cti1/Rrp47.....	92
III. Conclusions et axes de travail	93
Axe 1 : Liens entre Condensine et des protéines liant les ARNs.....	95
I. Recherche d’interacteurs de Cut3 par spectrométrie de masse	95
II. Liens entre Condensine et Rrp6, et Dbp2.....	98
1) Interactions physiques	98
2) Analyse fonctionnelle de l’interaction de Condensine avec Rrp6.....	102
a) Interaction génétique négative entre <i>cut3-477</i> et <i>rrp6Δ</i>	102
b) La réduction de l’association de Condensine à la chromatine dans les mutants <i>cut3-477</i> et <i>cut14-208</i> n’est pas suffisante pour expliquer les dérégulations géniques	105
c) Maintien de l’interaction physique de Condensine/Rrp6 dans <i>cut3-477</i> et <i>cut14-208</i>	106
d) L’association globale de Rrp6 à la chromatine demeure inchangée chez le mutant <i>cut3-477</i>	107
e) L’occupation de l’ARNPII n’est pas modifiée aux gènes dérégulés dans les mutants <i>cut3-477</i> et <i>cut14-208</i>	109
III. Lien de Condensine avec Dhp1.....	110
1) Interaction physique	111
2) Analyse fonctionnelle de l’interaction de Condensine avec Dhp1.....	111
a) Interaction génétique de <i>cut3-477</i> avec <i>dhp1-154</i>	111
b) Tentatives d’analyse de l’association de Condensine à la chromatine chez les mutants de <i>dhp1</i>	114
114	
Axe 2 : Condensine impacte l’expression génique indirectement, en préservant la stabilité du	
génomme lors de la mitose chez <i>S. pombe</i>	116
I. Préambule	116
II. Ma contribution au manuscrit.....	117
III. Insertion du manuscrit	119
Partie IV - Discussion.....	179
Condensine contrôle le niveau des ARNs de manière indirecte chez <i>S. pombe</i>	180
I. Absence de rôle direct majeur pour Condensine (I) dans le contrôle de l’expression des gènes ?.....	182
II. Comment expliquer l’effet indirect de Condensine dans le contrôle du niveau global des ARNs chez <i>S. pombe</i> ?.....	187
III. Discussion de potentiels effets indirects additionnels.....	192

IV.	Non-disjonction de l'ADNr dans les mutants de Condensine : une spécificité des levures ?	194
	Interaction de Condensine avec des protéines liant les ARNs	196
I.	Quel rôle pour l'interaction de Condensine avec Rrp6 ?	197
II.	Quels liens entre Condensine et la ribonucléase <i>torpedo</i> Dhp1 ?	201
III.	De la difficulté d'étudier les interacteurs de Condensine	202
	Conclusion générale.....	205
	Annexe 1 - Tableau des souches utilisées.....	207
	Annexe 2 – Tableau des interacteurs potentiels de Cut3 obtenus par Spectrométrie de Masse	210
	Annexe 3- Participation à une publication	218
	Bibliographie	219

Liste des abréviations

3C : chromosome conformation capture

APC/C : anaphase-promoting complex/cyclosome

ARNPI/II/III : ARN polymérase I/II/III

ARNi : interférence à l'ARN

CAP : chromosome-associated polypeptide

CDK : cyclin dependent kinase

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation

Co- IP: Co-Immunoprecipitation

CTD : carboxy terminal domain

CUT : cell untimely torn

CUTs : cryptic unstable transcripts

DSBs : double strand breaks

ESCs : embryonic stem cells

FISH : fluorescence in situ hybridization

HP1 : heterochromatin protein 1

HR : recombinaison homologue

HU : hydroxyurée

NDRs : nucleosome depleted regions

NORs : nucleolar organiser regions

nmt1 : no message in thiamine

PAS : polyadenylation signal

Rrp : rRNA processing protein

SMC : structural maintenance of chromosomes

SPBs : spindle pole bodies

TADs : topological associated domains

TBP : TATA-binding protein

TF : transcription factor

TSS : transcription start site

TTS : transcription termination site

Partie I - Introduction

Un défi important de la biologie actuelle est de comprendre comment l'architecture des chromosomes impacte l'expression des gènes. Les rôles cruciaux joués par les modifications post-traductionnelles des nucléosomes, et des mécanismes basés sur l'ARN, dans la régulation de l'expression génique ont été mis en évidence. Cependant, des données s'accumulent qui montrent que l'organisation spatiale des fibres de chromatine dans le noyau impacte également l'expression des gènes. Une question importante est donc de comprendre le rôle joué par les facteurs nucléaires non-histones qui organisent la chromatine dans la régulation de l'expression génique.

Une famille de protéines essentielles à l'organisation de la chromatine est le groupe des complexes protéiques SMC. Les quatre types de complexes SMC sont les Cohésines, les Condensines, SMC5/6 et les SMC bactériennes. Les Cohésines ont été nommées d'après leur rôle dans la cohésion des chromatides sœurs, et les Condensines pour leur action de condensation des chromosomes mitotiques. Le complexe SMC5/6 n'a pas de nom relatif à sa fonction, laquelle semble principalement reliée aux réparations des dommages à l'ADN et à la réplication. Les SMC sont des complexes polyvalents impliqués dans de multiples fonctions. De nombreuses études montrent maintenant qu'en promouvant des structures d'ordre supérieur, les Cohésines régulent l'expression génique dans plusieurs espèces. Des changements d'expression génique ont également été observés après l'inactivation ou la déplétion des Condensines, depuis les levures jusque chez l'Homme. Dans le contexte du rôle plus établi des Cohésines dans la régulation de l'expression génique, il a été conclu que les Condensines partageaient aussi cette fonction de régulation de la transcription. Cependant, aucun mécanisme clair n'a été démontré et l'on ignore encore dans quelle mesure le rôle des Condensines dans le contrôle de l'expression génique est différent, ou proche, de son action d'organisation de l'architecture des chromosomes. Le but de ma thèse a donc été de chercher à comprendre si Condensine avait un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, et si ce rôle était lié à l'activité de condensation du complexe. J'ai adressé ces questions en utilisant l'organisme modèle *Schizosaccharomyces pombe*.

Chapitre I- Les niveaux d'organisation de la chromatine

Le terme chromatine (du grec « chroma » qui veut dire couleur) désigne l'ensemble nucléoprotéique complexe formé par l'ADN, les protéines histones et non-histones, ainsi que les ARNs associés. La chromatine a été décrite pour la première fois et nommée par Walther Flemming en 1882 (texte en version anglaise : (Flemming, 1965)). Il existe plusieurs niveaux d'organisation de la chromatine, depuis le nucléosome jusqu'au chromosome mitotique, lesquels seront présentés ci-après. L'évolution des techniques de microscopie, ainsi que le développement d'approches moléculaires basées sur la capture de la conformation des chromosomes ces dernières années, ont révolutionné notre vision de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine. Aujourd'hui il est bien établi que le génome est structuré en plusieurs niveaux au sein du noyau, dans une organisation spatiale multi-échelle dynamique qui reflète et module les multiples fonctions du génome.

I. Le nucléosome

Les protéines les plus nombreuses, étroitement associées avec l'ADN et qui permettent son empaquetage dans le noyau eucaryote, sont les protéines histones. Ces dernières forment l'unité de base de la chromatine qu'est le nucléosome : un octamère d'histones entouré d'environ 146 paires de bases d'ADN. Les histones qui composent cet octamère sont les histones dites « de cœur » : H2A, H2B, H3 et H4, et sont présentes en deux copies chacune. Les nucléosomes sont positionnés environ toutes les 200 pb le long de la fibre d'ADN et forment une structure primaire appelée « collier de perles » de 11 nm de diamètre (Locklear et al., 1990). C'est le premier niveau de compaction de l'ADN. Une histone additionnelle, l'histone H1 appelé histone *linker*, interagit avec l'ADN libre situé entre les nucléosomes et participe à l'organisation et à la compaction supérieure de la fibre de chromatine. Toutes les espèces ne possèdent pas l'histone H1, ce qui est le cas de *S. pombe* (Godde and Widom, 1992).

Il a été proposé que la fibre en collier de perles s'organise ensuite en une structure secondaire, dite fibre de 30 nm de diamètre. Plusieurs modèles ont essayé d'expliquer cette organisation, jusqu'à ce que son existence même soit remise en question (voir Figure 1) (Fussner et al., 2011; Grigoryev and Woodcock, 2012). La chromatine est compactée à différents niveaux

selon le moment du cycle cellulaire (en mitose ou en interphase), selon la région des chromosomes et selon le type cellulaire. Différents types d'organisation de la fibre chromatinienne sont alors observés.

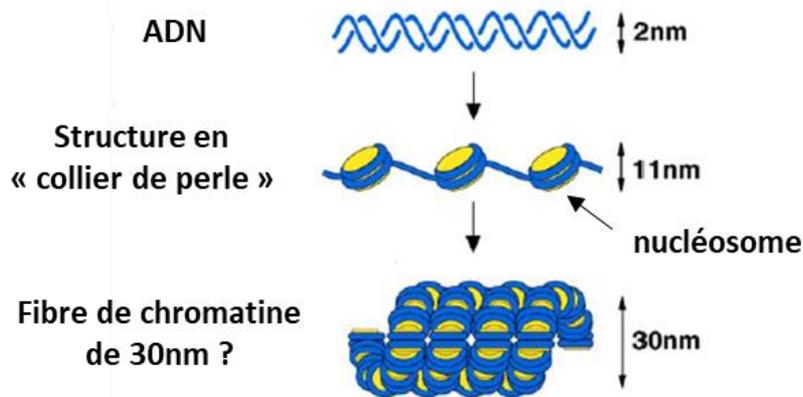


Figure 1 : Organisation de la fibre de chromatine. L'ADN s'enroule autour d'un octamère d'histones pour former une structure de base appelée « collier de perles ». D'après Maeshima *et al.* 2010.

II. L'organisation de la chromatine à large échelle : euchromatine et hétérochromatine, territoires chromosomiques et compartiments A/B

A large échelle, la chromatine d'un noyau en interphase est traditionnellement divisée en deux catégories : l'euchromatine et l'hétérochromatine. Ces termes désignent des états de compaction différents, visibles en microscopie électronique, et qui sont associés à des potentiels transcriptionnels différents. L'euchromatine est définie comme une structure chromatinienne de conformation « ouverte », peu compacte, riche en gènes, où l'ADN est considéré accessible pour la machinerie de transcription. A l'inverse, l'hétérochromatine est très compacte, se compose pour majorité de séquences répétées, et est considérée comme silencieuse du point de vue de l'expression génique. On dénote principalement deux types d'hétérochromatine, appelées hétérochromatine constitutive et facultative. Les télomères et les régions péri-centromériques sont les composants majeurs de l'hétérochromatine constitutive, riche en histones H3K9me2/3 et en protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Allshire and Madhani, 2018). Le maintien de l'état compacté de ces régions est essentiel à la ségrégation correcte des chromosomes dans les cellules filles en mitose. Malgré son état global silencieux, il est à noter que l'établissement des régions d'hétérochromatine péri-centromérique nécessite une transcription active (Allshire and Madhani, 2018; Verdell and Moazed, 2005). L'hétérochromatine est silencieuse pour l'expression génique car les ARN issus de l'hétérochromatine sont rapidement dégradés. L'hétérochromatine facultative pour

sa part, est souvent présente au niveau des gènes régulés au cours du développement, et son niveau de compaction varie en fonction de signaux développementaux et/ou environnementaux (Trojer and Reinberg, 2007). Elle est caractérisée par la marque H3K27me3 et le complexe répresseur PRC2. Chez les mammifères et certains eucaryotes, il a été observé que les régions d'hétérochromatine sont majoritairement positionnées en périphérie du noyau à proximité de l'enveloppe nucléaire, et l'euchromatine est en position centrale (Bank and Gruenbaum, 2011). Il est envisagé que les régions présentant des marques épigénétiques semblables se regroupent dans le noyau, tout en excluant les domaines portant des marques épigénétiques différentes (Huang et al., 2015; Prakash and Fournier, 2018).

En plus d'être séparés en euchromatine et hétérochromatine, il est admis que les chromosomes sont organisés en territoires chromosomiques dans le noyau durant l'interphase (Figure 2A et F) (pour revue voir (Cremer et al., 2006). Le terme de territoire chromosomique a été utilisé pour la première fois par Boveri en 1909, et les techniques de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) ont permis sa confirmation expérimentale dans les années 1980 (Schardin et al., 1985). L'idée sous-jacente aux territoires chromosomiques est que les régions d'un chromosome s'associent de manière préférentielle entre elles. Les techniques récentes d'analyse des interactions chromatiniennes par « *chromosome conformation capture* » (3C, 4C, Hi-C et autres dérivés), ont permis de confirmer ce point. En effet, un message clair qui ressort de ces analyses est qu'un locus donné interagira principalement avec les régions provenant du même chromosome que lui (Simonis et al., 2006). De plus, l'organisation de ces territoires chromosomiques dans le noyau semble loin d'être aléatoire, et pourrait ainsi impacter les différentes fonctions du génome, en particulier la régulation de l'expression génique (Bacher et al., 2006).

Plus récemment, les techniques d'analyses basées sur le 3C ont également révélé que les chromosomes interphasiques sont organisés en deux types majeurs de domaines structuraux, de l'ordre du mégabase, appelés les compartiments A et B (Figure 2B, C et G) (Lieberman-Aiden et al., 2009). Le compartiment A contient une chromatine accessible et active transcriptionnellement, riche en modifications H3K36me3 ; alors que le compartiment B plus compact est associé à une chromatine « inactive », riche en H3K27me3 et transcriptionnellement peu active (Lieberman-Aiden et al., 2009).

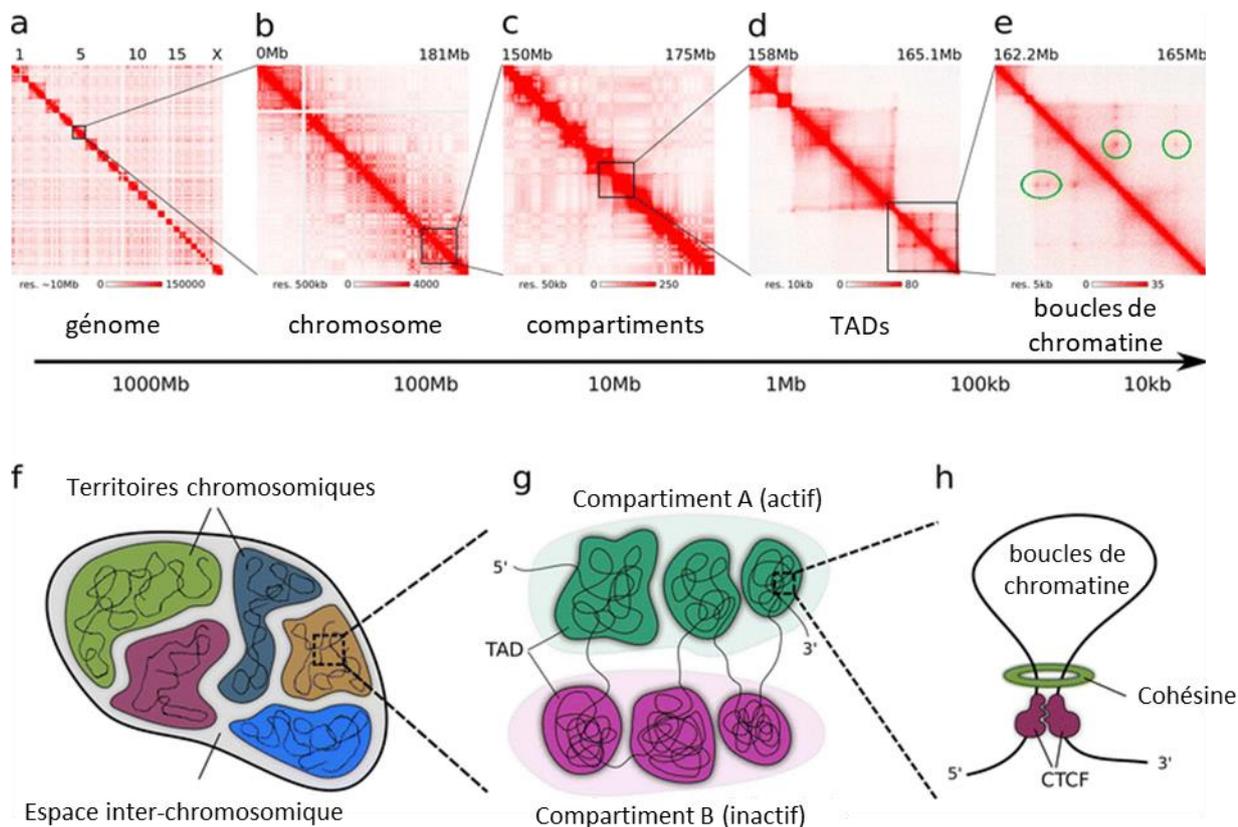


Figure 2 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine. Heatmap de données de Hi-C à différentes échelles : du génome entier (a), du chromosome entier (b), de l'ordre du mégabase (c, d) et de l'ordre du kilobase (e). Un modèle du repliement du génome à ces différentes échelles est montré (f-h). L'organisation du génome à chacun de ces niveaux est visible sur les données de Hi-C, où l'on distingue clairement les territoires chromosomiques (a, f), les compartiments A et B (b, c, g), les TADs (c, d, g). Des pics individuels correspondant aux boucles de chromatine (cercles vert) sont visibles sur les heatmaps de haute résolution (e, h). Adapté de Szalaj et Plewczynski, 2018.

Il a été observé que les interactions chromatiniennes sont plus fréquentes entre les régions d'un même compartiment. Bien que les relations entre les compartiments et leur activité transcriptionnelle soient bien établies, les mécanismes menant à leur formation et à leur fonction restent incompris. Les interactions entre les bordures qui délimitent les compartiments pourraient être rendues possibles par les protéines architecturales présentes en ces régions. Chez les mammifères par exemple, les bordures des compartiments contiennent beaucoup d'enhancers et de super-enhancers, et des interactions entre ces sites pourraient potentiellement former des centres (hubs) de transcription (Rao et al., 2017). Les compartiments A et B sont seulement observés en interphase, ils sont effacés lors de la mitose

puis ré-établis lors de l'interphase suivante par des mécanismes inconnus, qui dépendent vraisemblablement des Condensines (Gibcus et al., 2018).

III. L'organisation de la chromatine à échelle intermédiaire : les TADs

A une échelle encore plus locale, des domaines ont été décrits qui segmentent le génome en portions allant de 10 kilobases à quelques mégabases et contenant un petit nombre de gènes (Cremer and Cremer, 2010; Dixon et al., 2012). Ces domaines sont basés sur l'observation d'interactions plus fréquentes entre les régions qui le constituent, qu'avec les régions chromatiniennes adjacentes. Ces domaines sont appelés TADs pour *Topologically Associated Domains*, et sont supposés représenter des unités fonctionnelles du génome (Figure 2C, D et G). Chez les mammifères, les limites de ces TADs interagissent plus fréquemment entre elles qu'avec d'autres loci présents à l'intérieur du domaine. De manière intéressante, les gènes localisés dans un même TAD tendent à avoir une dynamique d'expression coordonnée au cours des processus de différenciation. Cela suggère un rôle pour les TADs dans la coordination de l'expression de gènes adjacents. Les bordures des TADs sont fréquemment enrichies de protéines ayant une fonction isolatrice. Chez les mammifères, on retrouve le facteur de liaison à l'ADN CTCF (pour *CCCTC-binding factor*) et le complexe SMC Cohésine (Rao et al., 2014). Les gènes d'ARNt et le facteur de transcription TFIIC sont également retrouvés enrichis aux bordures des TADs chez l'Homme, la souris et la drosophile (Bortle et al., 2014; Raab et al., 2012; Yuen et al., 2017). Chez les mammifères, l'absence de CTCF, de la sous-unité Rad21 de Cohésine ou du facteur d'association de Cohésine à la chromatine Nipbl, induit la perte de ces domaines TADs, mais n'efface pas la structure des compartiments A/B (Nora et al., 2017; Rao et al., 2017; Schwarzer et al., 2017). Le rôle des Cohésines dans l'organisation du génome sera présenté plus en détail au chapitre III de cette introduction. Il faut noter également que les facteurs impliqués dans la formation des TADs varient selon les espèces (Bortle et al., 2014) et que la structure même des TADs n'a pas été (encore ?) observée chez *C. elegans* et *A. thaliana* (Crane et al., 2015; Liu et al., 2016).

IV. Les interactions chromatiniennes à petite échelle : les boucles de chromatine

A plus petite échelle que les TADs, les interactions longues distances les plus étudiées entre séquences d'ADN sont les interactions entre les gènes et leurs séquences régulatrices, comme les enhancers. Le modèle le plus couramment accepté pour expliquer ces interactions met en jeu des boucles de chromatine. Dans ce modèle, les séquences régulatrices interagissent avec les promoteurs au travers d'interactions protéiques directes, tandis que la chromatine située entre ces deux séquences forme une boucle (pour revue voir (Bulger and Groudine, 2011)). Ces boucles de chromatine sont visibles dans les données de Hi-C à haute résolution (Figure 2E). Une analyse de ces interactions dans une portion de 30 Mb du génome humain, a montré que les boucles de chromatine entre les gènes et leurs séquences régulatrices sont un phénomène général (Sanyal et al., 2012). Plusieurs études montrent aussi que les gènes peuvent interagir avec plusieurs éléments régulateurs distaux. Réciproquement les éléments distaux peuvent former des boucles avec plusieurs gènes. Les mécanismes de formation de ces boucles restent peu clairs, tout comme le rôle de ces boucles dans la régulation de l'expression génique. Cependant, Deng *et al.* ont montré que la formation artificielle d'une boucle de chromatine entre l'enhancer et le promoteur de la β -globine, était suffisante pour induire la transcription du gène (Deng et al., 2012, 2014). Cela donne corps à l'idée d'une relation fonctionnelle (causale) dans la régulation de l'expression génique.

V. La réorganisation des chromosomes en mitose

Les chromosomes interphasiques ordonnés à différents niveaux sont globalement peu compactés dans le noyau. Lors de la progression des cellules en mitose, les chromosomes subissent une réorganisation drastique afin de permettre leur individualisation, leur condensation en objets mobilisables par le fuseau de microtubules, et leur transmission correcte dans les deux cellules filles. Les chromosomes vont alors apparaître sous la forme de « cylindres ou de bâtonnets » compacts et parfaitement individualisés (*rod-shaped chromosomes*).

Dans les années 1880, Walther Flemming publie des études pionnières de cytogénétique, où il identifie et nomme la chromatine. Il y décrit pour la première fois en détail les différents états par lesquels passe la chromatine lors de la division cellulaire. Il réalise des dessins précis qui illustrent les étapes de la mitose depuis la condensation des chromosomes en « fils » enroulés (prophase), jusqu'à la séparation de ces fils en deux « écheveaux », quand le noyau se reforme (Figure 3). Il a appelé le processus *karyomitosis* (« métamorphose filiforme du noyau ») et les arrangements des fils nucléaires *Mitosen*.

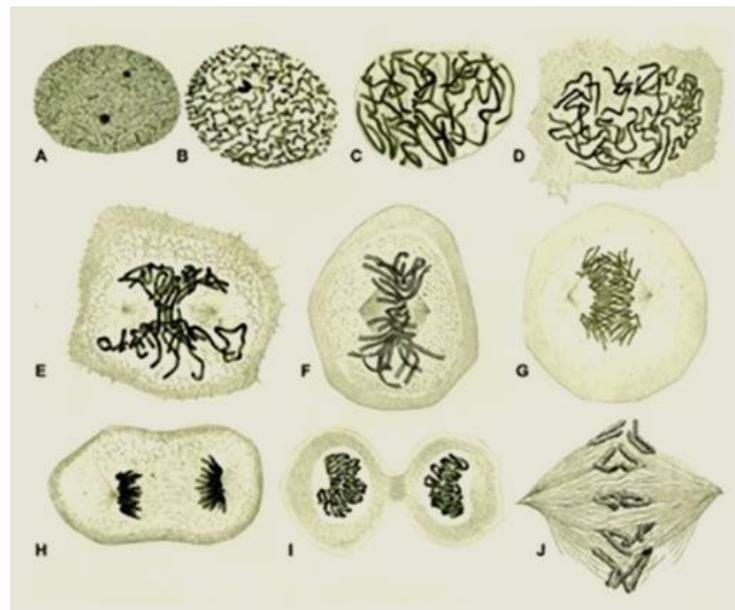


Figure 3 : Les étapes de la mitose décrites par W. Flemming. Dessin de Walther Flemming. A- Interphase. B- Prophase. C-D- Fin de prophase. E- Prométaphase. F- Métaphase. G- Anaphase. H- Télophase. I- Abscission. J- Ségrégation des chromosomes grâce aux microtubules. Adapté d'après *Zellsubstanz, Kern, und Zelltheilung* (Substance cellulaire, noyau et division cellulaire) Flemming, 1880.

Les termes utilisés par Flemming sont toujours utilisés aujourd'hui pour décrire les différentes étapes de la mitose. Lors de la prophase, première étape de la mitose, la chromatine se réorganise et se condense progressivement sous la forme de chromosomes longilignes et souples. Les chromatides sœurs, produits de la réplication, ne sont alors pas discernables. Le réseau de microtubules interphasiques est désassemblé et commence à former le fuseau mitotique émanant des deux centrosomes, ou *spindle pole bodies* chez les levures. La prométaphase est marquée par la rupture de l'enveloppe nucléaire, et le raccourcissement des chromosomes, qui s'épaississent. Cependant, chez les champignons et les levures, l'enveloppe nucléaire ne se rompt pas. On parle alors de mitose fermée. Les chromatides

sœurs apparaissent alors associées sur toute leur longueur. L'apparition des chromatides sœurs est décrite sous le nom de résolution. L'attachement des microtubules aux kinétochores assemblés au niveau de chaque centromère de chaque chromatide, s'opère par un processus de type recherche et capture, ce qui conduit à l'attachement bilatéral des chromosomes au fuseau mitotique. Après une série d'oscillations les chromosomes s'alignent selon l'axe équatorial du fuseau mitotique, formant la plaque métaphasique. Ces mouvements résultent vraisemblablement de l'opposition entre la cohésion des chromatides des sœurs et les forces de traction vers les pôles opposés du fuseau exercées par les microtubules sur les centromères. En métaphase, les chromosomes sont très organisés et hautement condensés.

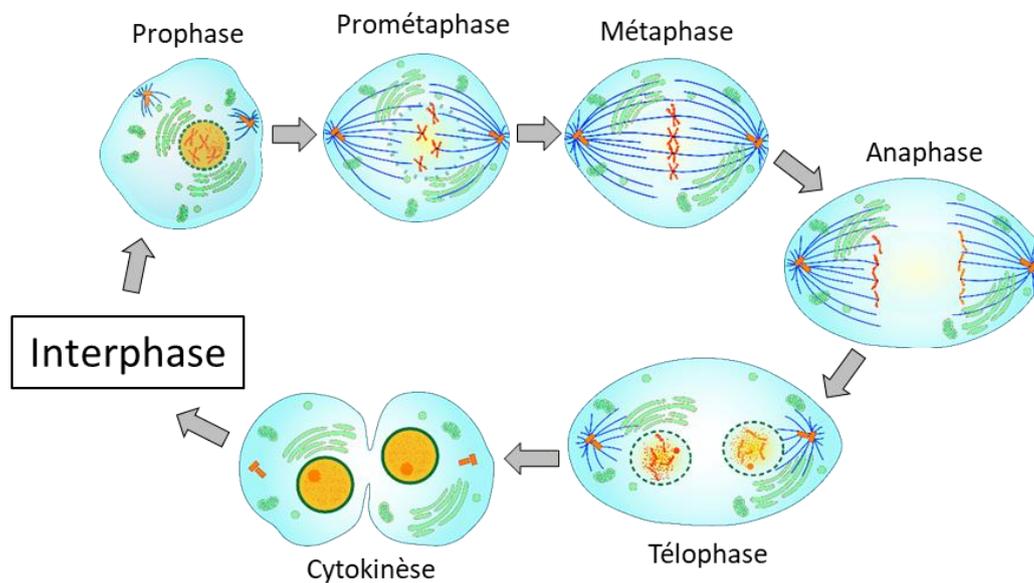


Figure 4 : Schéma des différentes étapes de la mitose. Voir texte pour détail.

Lors de la transition de la métaphase à l'anaphase, la cohésion entre les chromatides sœurs est éliminée, les chromatides sœurs se séparent et gagnent les pôles opposés du fuseau mitotique. En anaphase, l'axe des chromosomes se raccourcit et ces derniers acquièrent alors une condensation maximale (Mora-Bermúdez et al., 2007). La télophase marque la fin de la mitose, les chromosomes se décondensent et une enveloppe nucléaire se reforme autour de chaque lot de chromosomes, reconstituant le noyau. La cytokinèse qui se déroule en parallèle achève la séparation physique du cytoplasme et donne naissance à deux cellules filles (Figure 4).

Depuis les découvertes de Flemming en 1882, de nombreuses études se sont intéressées aux changements drastiques d'organisation subis par la chromatine entre l'interphase et la mitose. Plusieurs modèles ont été émis pour tenter d'expliquer l'organisation de la chromatine au sein du chromosome mitotique. Ces modèles peuvent être classés en deux grandes catégories : l'un imagine un repliement hiérarchique de la fibre de chromatine dans des structures secondaires de plus en plus complexes. Par exemple, la fibre de chromatine de 10 nm se replierait en une fibre de 30 nm, elle-même repliée en une autre structure de 100 nm de diamètre, et ainsi de suite. D'autres modèles de repliement hiérarchique imaginent la formation de boucles hiérarchiques de chromatine ou de rosettes. La pertinence de ces modèles est fortement mise en doute par le simple fait qu'ils n'expliquent en rien la structure en bâtonnets des chromosomes.

La deuxième catégorie de modèles explique la formation des chromosomes mitotiques par un ensemble de boucles de chromatine rattachées à un axe chromosomique central (pour revue voir (Maeshima and Eltsov, 2008; Swedlow and Hirano, 2003)). Ulrich Laemmli a le premier imaginé ce modèle, après avoir extraits les histones de chromosomes métaphasiques et visualisé les structures résultantes. Il a observé une structure protéique centrale en forme de X appelée *scaffold*, semblable à un chromosome métaphasique, de laquelle partaient des boucles d'ADN (Paulson and Laemmli, 1977). Ce modèle du *scaffold* a cependant été remis en cause par la suite, considérant le fort risque que la structure en X résultait de la précipitation des protéines non-histones présentes dans les chromosomes préalablement à la procédure de préparation, et aussi parce que la notion de rigidité implicitement associée au terme de squelette, s'accordait fort mal avec la souplesse et l'élasticité notoires des chromosomes. Cependant la protéine Topoisomérase II et la sous-unité SMC2 ont été trouvées enrichies dans le *scaffold* décrit par Laemmli.

Une étude récente propose un modèle de condensation des chromosomes qui unifie les différentes observations faites jusqu'à présent. En synchronisant des cellules de poulet DT40 en fin de phase G2 du cycle cellulaire, Gibcus *et al.* ont observé par des analyses de Hi-C, avec une haute résolution spatiale et temporelle, la réorganisation progressive de la structure des chromosomes lors de l'entrée en mitose (Gibcus et al., 2018). En prophase ils observent la perte rapide de l'organisation interphasique des chromosomes, et la création d'une série de boucles consécutives de chromatine par l'action des Condensines. Grâce à des modélisations

par polymères, les auteurs suggèrent que les chromosomes mitotiques sont organisés en un ensemble de larges boucles assemblées autour d'un axe central hélicoïdal en forme d'escalier en colimaçon (Figure 5) (Gibcus et al., 2018). Les Condensines sont des acteurs majeurs de cette condensation, Condensine II étant à la base de larges boucles de chromatine, davantage compactées en petites boucles par Condensine I (Gibcus et al., 2018; Walther et al., 2018). Les mécanismes seront présentés en détail dans le chapitre II de ce manuscrit. Finalement, cette étude confirme la notion d'un *scaffold* chromosomique duquel émerge des boucles de chromatine. Ce dernier serait hélicoïdal, dynamique et constitué des Condensines I et II (et possiblement aussi de la Topoisomérase II).

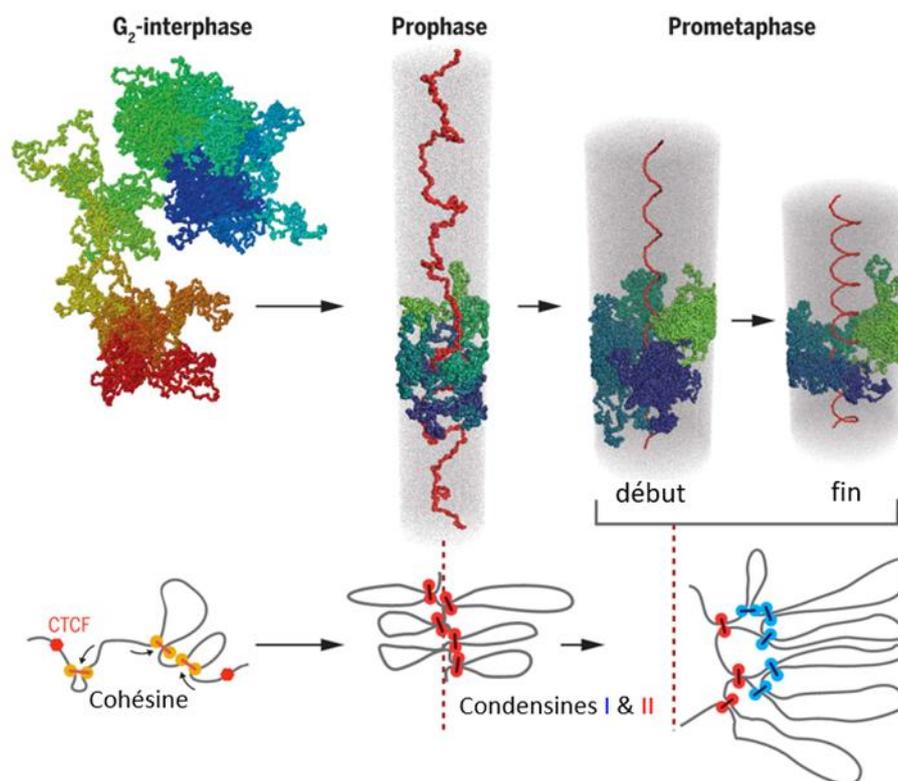


Figure 5 : Modèle de compaction des chromosomes autour d'un axe hélicoïdal central formé par les complexes Condensines. En prophase, les Condensines II « effacent » l'organisation interphasique de la chromatine, et des réseaux de boucles sont formés. En prometaphase, l'action combinée des Condensines I et II forme des réseaux de boucles imbriquées, agencées en hélice. D'après Gibcus *et al.* 2018.

VI. L'organisation nucléaire chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*

Parmi les différents organismes modèles, la levure *S. pombe* s'est révélée un très bon modèle pour étudier l'organisation tridimensionnelle des génomes. *S. pombe* a un cycle cellulaire

haplo-diplobiontisme à phase haploïde dominante. Elle se caractérise par une phase G₂ prédominante, et des phases G₁ et S rapides, qui ont lieu en parallèle des événements de cytokinèse. Cette levure est dite scissipare car elle se divise par septation, grâce à la formation d'un septum au milieu de la cellule une fois la ségrégation des chromosomes terminée. A la fin de la cytokinèse, lorsque les deux cellules filles sont individualisées, les cellules sont déjà en début de phase G₂ (voir figure 6).

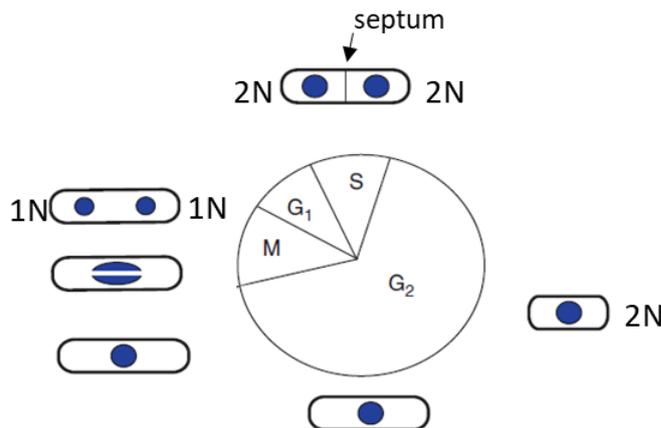


Figure 6 : Schéma représentatif du cycle cellulaire chez la levure *S. pombe*.

Cycle mitotique, à phase G₂ majoritaire. La réplication a lieu en parallèle des événements de cytokinèse. Lors de la séparation effective des cellules filles, la réplication est terminée. Le contenu en ADN est indiqué. Modifié d'après le livre « Fission yeast » édité par Hagan, Carr, Grallert et Nurse en 2016.

Cette levure possède un petit génome, qui montre cependant des caractéristiques clés des eucaryotes supérieurs. Son génome compact de 12,57 Mb est réparti sur trois « grands » chromosomes, à l'inverse de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui, pour un génome de taille semblable possède 16 chromosomes. Les trois centromères chez *S. pombe* sont de grande taille, allant de 35 à 110 kb et sont organisés en deux domaines : un domaine central lié par CENP-A et les protéines du kinétochore, et un domaine péri-centromérique constitué de répétitions hétérochromatiques liés par la protéine Swi6^{HP1}. L'organisation des centromères chez cette levure rappelle celle des organismes supérieurs, à l'inverse de la levure *S. cerevisiae*, qui possède des petits centromères d'environ 125 pb sans séquences répétées (Wood et al., 2002). Les télomères et la région chromosomique du type sexuel (locus mat) sont les deux autres domaines d'hétérochromatine constitutive chez *S. pombe*. Le chromosome III, le plus petit, a pour particularité de porter les séquences répétées d'ADN ribosomique à ses extrémités sub-télomériques. En interphase, les chromosomes de *S. pombe* montrent un arrangement spatial appelé *Rabl*, qui a été observé dès les années 1880 dans des cellules épithéliales de salamandre par Carl Rabl. Cette configuration chez *S. pombe* se caractérise par un regroupement des centromères des trois chromosomes à proximité du

spindle pole body, l'équivalent du centrosome chez les levures. Les télomères, à l'inverse, sont regroupés par chromosome et se localisent dans l'hémisphère opposé du noyau, proche de la membrane nucléaire. Les extrémités du chromosome III formé par les répétitions d'ADNr sont compartimentées dans le nucléole (voir Figure 7).

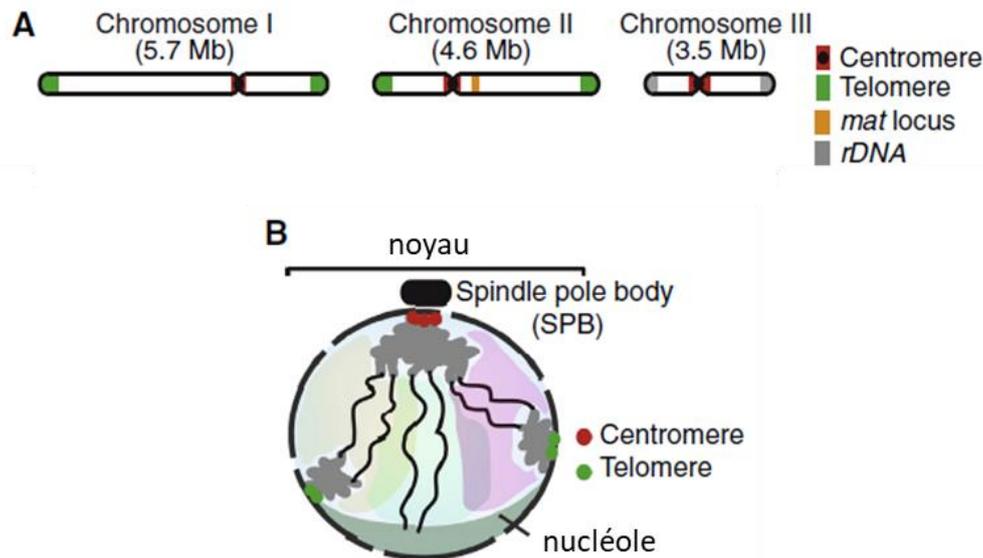


Figure 7 : Organisation du génome en 3D chez *Schizosaccharomyces pombe* A- Représentation schématique des trois chromosomes de *S. pombe*. B- Lors de l'interphase, les chromosomes sont organisés dans une configuration *Rab1*. Le « *spindle pole body* » est l'équivalent du centrosome des eucaryotes supérieurs. Adapté depuis Mizuguchi et al. 2015.

Des analyses de génétique et de microscopie indiquent assez tôt que le génome est organisé en territoires chromosomiques également chez la levure à fission (Molnar and Kleckner, 2008; Scherthan et al., 1994). Plus récemment, la méthode du Hi-C a confirmé cette organisation (Mizuguchi et al., 2014; Tanizawa et al., 2010). Des structures ressemblant aux TADs ont été observées chez *S. pombe*, et nommées globules (Mizuguchi et al., 2014). Ces domaines de 50 à 100 kb se caractérisent par des interactions plus fréquentes entre les séquences ADN qui les constituent qu'avec celles appartenant aux domaines adjacents. Les bordures de ces domaines montrent un enrichissement en gènes en position convergente et une fixation locale abondante du complexe Cohésine. Une mutation dans le gène *rad21* de Cohésine déstabilise les globules, suggérant que Cohésine est nécessaire à leur formation et/ou leur maintien (Mizuguchi et al., 2014). Cependant, à l'inverse des eucaryotes supérieurs, la levure

à fission ne possède pas d'homologue de la protéine CTCF pour délimiter l'action de Cohésine. Le mécanisme de formation de ces globules reste donc encore indéterminé.

Beaucoup d'études se sont attachées à mieux comprendre la formation des chromosomes mitotiques et leur migration chez *S. pombe*. En effet, le temps de génération court de cette levure (environ 2,5 h à 32°C), et sa génétique simple, permettent une analyse facilitée de ces processus. De plus, un défaut de formation des chromosomes mitotiques ou de leur migration en anaphase chez *S. pombe* mène souvent à l'apparition d'un phénotype particulier appelé phénotype « CUT » (pour *C*ell *U*ntimely *T*orn), qui a permis l'identification de nombreux facteurs impliqués dans le façonnement des chromosomes en mitose (Yanagida, 1998). Le phénotype CUT désigne les cellules dont les chromosomes incorrectement ségrégués en anaphase sont coupés par le septum lors de la cytokinèse (voir Figure 8). En effet, chez *S. pombe*, la cellule subira la cytokinèse en dépit d'une ségrégation incorrecte des chromosomes mitotiques.

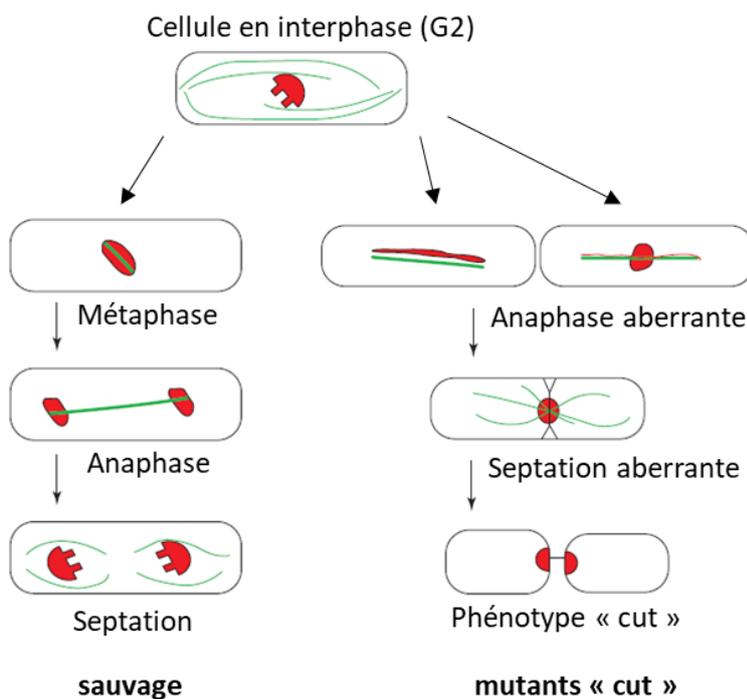


Figure 8 : Schéma du phénotype « CUT » chez *S. pombe*.

Schéma du phénotype de mutants « CUT » (*cell untimely torn*) à température restrictive. Dans ces mutants, la cytokinèse, ou septation survient en l'absence d'une ségrégation correcte des chromosomes en anaphase. Le noyau est coloré en rouge et les microtubules en vert. D'après Yanagida *et al.* 1998.

Il a été proposé l'existence d'un point de contrôle de la cytokinèse, appelé « NoCut » checkpoint chez la levure *S. cerevisiae*, et point de contrôle de l'abscission chez l'Homme, qui pourrait ralentir l'achèvement de la cytokinèse en présence de chromosomes mal ségrégués traînant dans l'axe de clivage de la cellule mère en fin d'anaphase (Mendoza *et al.*, 2009;

Norden et al., 2006; Steigemann et al., 2009). Plusieurs observations ont remis en cause l'existence de ce point de contrôle, à la fois chez *S. cerevisiae* et chez l'Homme (Cuylen et al., 2013; Hoffelder et al., 2004; Janssen et al., 2011). Une étude récente suggère que le checkpoint « NoCut » induirait un délai de l'abscission spécifiquement suite à la présence de ponts chromatiniens induits par un stress répliatif (Amaral et al., 2016). En tout état de cause, ce point de contrôle semble peu efficace, voire absent chez *S. pombe*. C'est ainsi que l'observation de mutants « CUT » chez la levure à fission en 1993 par Samejima *et al.* a constitué la première description *in vivo* de mutants affectés dans le complexe SMC Condensine (Samejima et al., 1993). Il est à noter que tous les mutants affectés pour la migration efficace des chromosomes en anaphase ne conduisent pas nécessairement à la formation du phénotype CUT.

Chapitre II – Les SMC : des organisateurs de la chromatine

I. Les complexes SMC

Les complexes SMC, pour *Structural Maintenance of Chromosomes*, sont des complexes protéiques conservés depuis les bactéries jusque chez l'Homme, qui jouent des rôles fondamentaux dans l'organisation, la réplication, la transmission et la préservation de l'intégrité structurale et fonctionnelle des génomes. Chez les eucaryotes, la famille SMC recouvre les Cohésines, les Condensines et le complexe SMC5/6. Les Cohésines assurent la cohésion des chromatides sœurs et l'organisation tridimensionnelle du génome en interphase, les Condensines conduisent la formation et la condensation des chromosomes lors des divisions cellulaires, et le complexe SMC5/6 participe à la réplication et la réparation du génome.

1) Architecture des complexes SMC

Les complexes SMC sont caractérisés par l'association de deux protéines SMC avec des protéines régulatrices non-SMC, formant une structure en anneau (Anderson et al., 2002; Haering et al., 2002). Les eucaryotes possèdent six protéines SMC, qui s'associent en hétéro-dimères pour former les Cohésines (SMC1/SMC3), les Condensines (SMC2/SMC4) et le complexe SMC5/6. Les procaryotes possèdent également des protéines SMC, qui s'associent en homo-dimères pour former les complexes bactériens SMC-ScpA-ScpB chez de nombreuses bactéries et archées-bactéries comme *B. subtilis*. D'autres complexes SMC appelés MukBEF et MksBEF sont retrouvés chez certaines γ -protéobactéries (Petrushenko et al., 2011).

Les protéines SMC partagent une même organisation. Chaque protéine SMC contient une région flexible appelée charnière (*hinge*), encadrée par deux longs domaines constitués de super-hélices α (*coiled-coil*), et longs de 50 nm (figure 9A). Les extrémités N- et C-terminales des protéines SMC sont pourvues de domaines globulaires qui contiennent des motifs de liaison de nucléotide appelés Walker A et Walker B, respectivement. La région charnière centrale des protéines SMC facilite le repliement de la molécule sur elle-même, ce qui permet une association intramoléculaire antiparallèle des domaines bras en super-hélice. Les motifs Walker A et Walker B se retrouvent alors à proximité, reconstituant une tête ATPase fonctionnelle (Haering et al., 2002; Hirano, 2002). Une protéine SMC ainsi repliée adopte une

structure en bâtonnet, avec le domaine charnière situé à une extrémité et le domaine ATPase à l'autre (voir Figure 9B).

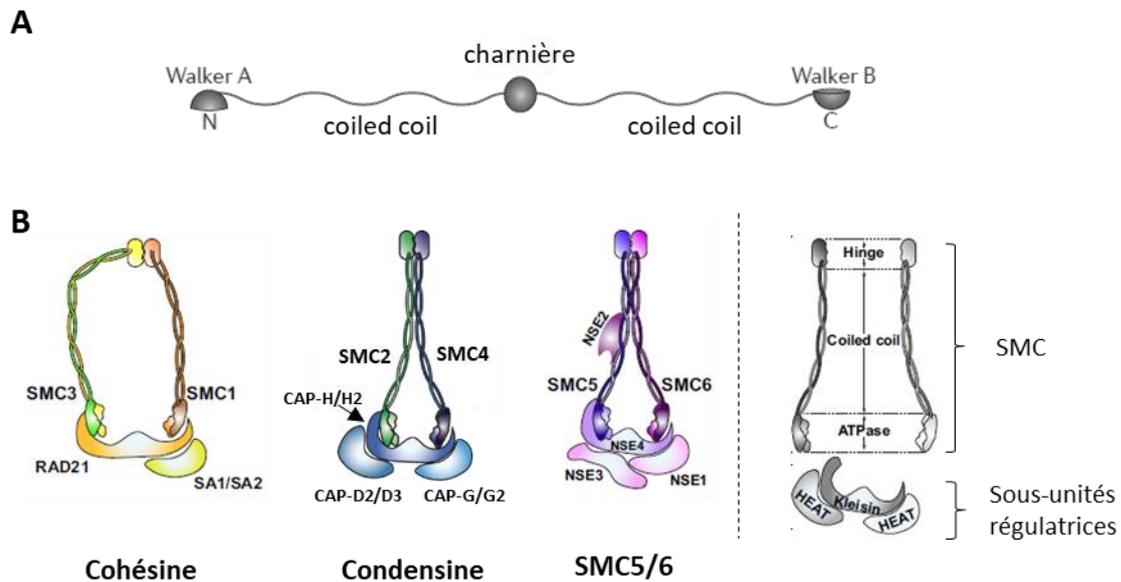


Figure 9 : Les complexes SMC. A- Domaines fonctionnels d'une protéine SMC. D'après Jeppsson *et al.* 2014. B- Schéma de l'architecture des complexes SMC eucaryotes : Cohésine, Condensine et SMC5/6. Une même organisation est observable pour les différents complexes. D'après Robellet *et al.* 2016.

L'interaction entre les domaines charnières de deux protéines SMC forme une structure en V, dans laquelle les deux têtes ATPases se font face aux sommets opposés du V. Les complexes SMC eucaryotes sont assemblés autour d'hétérodimères asymétriques, tandis que les homodimères SMC bactériens sont symétriques. La raison fonctionnelle de cette différence demeure inconnue. Les deux têtes ATPases situées en vis-à-vis s'associent lorsque chacune fixe une molécule d'ATP, et se désengagent après hydrolyse des molécules d'ATP. La fixation d'ATP entraîne la formation d'une structure protéique close en anneau, d'environ 30 nm de diamètre. La périphérie est principalement constituée des bras *coiled-coil*, et l'hydrolyse de l'ATP ouvre l'anneau (Hu *et al.*, 2011; Kinoshita *et al.*, 2015). La longueur de chaque bras est de 50 nm, ce qui équivaut à environ 150 pb d'ADN double brin. La conformation des complexes SMC est assez flexible, et plusieurs structures sont détectables par microscopie électronique : en forme de V ouvert ou fermé ou en forme d'anneau (Melby *et al.*, 1998). Plus récemment, Eeftens *et al.* ont observé par microscopie à force atomique (AFM) que les régions *coiled-coil* des dimères de SMC2-SMC4 (Condensines) sont des polymères très flexibles, qui adoptent en

solution des structures variables, au sein desquelles les domaines ATPase peuvent entrer en contact avec le domaine charnière par repliement (Eeftens et al., 2016).

Les protéines SMC ne sont jamais retrouvées seules, et s'associent à des sous-unités non-SMC régulatrices. Une sous-unité appelée kleisine (qui signifie fermeture en grec) s'associe avec les deux domaines ATPases des SMC, pour former un anneau tripartite. Une étude des SMC de *Bacillus subtilis* (SMC-ScpAB) a montré que l'association de la kleisine avec les protéines SMC est asymétrique. En effet, le domaine N-terminal de la kleisine interagit avec la région *coiled coil* proche de la tête ATPase de la protéine SMC, tandis que le domaine C-terminal contacte directement la tête ATPase de l'autre SMC (Bürmann et al., 2013). Le fait que la kleisine des Cohésines montre le même type d'interaction asymétrique avec l'hétérodimère SMC1/3, suggère que ce mode de liaison serait conservé également chez les Condensines, et qu'il jouerait un rôle central dans le fonctionnement des complexes SMC (Gligoris et al., 2014; Haering et al., 2004).

D'autres sous-unités régulatrices viennent contacter la kleisine des complexes SMC. Elles sont de deux types : Hawks (*HEAT proteins associated with kleisins*) et Kite (*Kleisin interacting winged-helix tandem elements*) (Palecek and Gruber, 2015; Wells et al., 2017). Les complexes Condensine et Cohésine sont constitués de protéines Hawks, contenant des répétitions HEAT pour *Huntingtin Elongation factor 3 Protein phosphatase 2A TOR1*. Dans les complexes Cohésine, une seule sous-unité Hawk, appelée SA1 ou SA2 selon les complexes, contacte la kleisine de manière stœchiométrique. Les protéines Pds5 et Rad61 (Wpl1 chez *S. pombe*) sont des protéines régulatrices qui s'associent de manière sub-stœchiométrique avec les Cohésines pour moduler leurs fonctions. Les Condensines possèdent deux protéines Hawks pourvues de répétitions HEAT, nommées CAP-D2 et CAP-G pour le complexe Condensine I, ou CAP-D3 et CAP-G2 pour un second complexe Condensine II. Le dimère SMC5/6 et les SMC bactériennes pour leur part, s'associent avec des protéines Kite, qui ne possèdent pas de domaines HEAT. Le dimère SMC5/6 peut s'associer avec un plus grand nombre de protéines régulatrices, pouvant aller jusqu'à six protéines non-SMC appelées « *non-Smc elements* » (Nse1 à Nse6). La protéine Nse4 étant de la famille des protéines kléisine. *Palecek et al.* suggèrent qu'un complexe SMC/ScpAB de bactéries ou d'archées, a évolué en un complexe SMC5/6-like qui serait l'ancêtre commun des SMC eucaryotes (Palecek and Gruber, 2015).

2) Les complexes SMC procaryotes

Les complexes SMC procaryotes ont une architecture globale similaire à leurs homologues eucaryotes. Ils compactent les chromosomes bactériens et facilitent la résolution des molécules d'ADN sœurs avant la division cellulaire, ce qui les rapproche fonctionnellement des Condensines (Britton et al., 1998; Mascarenhas et al., 2002; Niki et al., 1991). Comme cité précédemment, trois complexes SMC sont retrouvés chez les procaryotes : SMC-ScpA-ScpB, MukBEF et MksBEF (Petrushenko 2011). Il est à noter que l'architecture de MukBEF et MksBEF semble toutefois dévier de l'organisation canonique des complexes SMC (Gruber, 2011). Le domaine N-terminal de la kleisine MukF (et MksF) permet la formation de dimères et pourrait induire la création de multimères au sein des chromosomes (Figure 10) (Matoba et al., 2005).

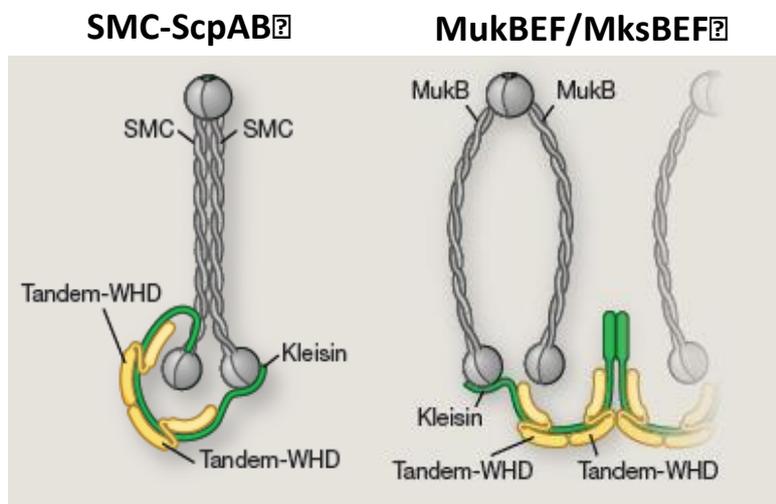


Figure 10 : Les complexes SMC procaryotes. Les cinq sous-unités des complexes sont indiquées. Les sous-unités accessoires de type Kite sont notées « Tandem-WHD » pour *Tandem winged helix domain*. D'après Haering & Gruber 2016.

Ces complexes sont cependant reliés structurellement et semblent accomplir des rôles redondants dans la ségrégation des chromosomes mitotiques. Chez *Bacillus subtilis* et *Streptococcus pneumoniae*, SMC-ScpAB est recruté à proximité de l'origine de réplication (*oriC*) par les protéines ParB liées aux sites *parS* (Gruber and Errington, 2009; Minnen et al., 2011). Après leur recrutement au niveau des origines de réplication, les complexes SMC-ScpAB promeuvent l'alignement des deux bras de chromosomes (Sullivan et al., 2009). Alors que la réplication se produit, les complexes se déplacent vers le site de terminaison de la réplication, maintenant de ce fait les bras des chromosomes ensemble et permettant leur résolution (Wang et al., 2017). Le complexe MukBEF présent chez *E. coli* semble fonctionner un peu différemment. Bien qu'enrichi dans des clusters à proximité de l'origine de réplication comme

SMC-ScpAB, il ne promeut pas l'alignement des bras de chromosomes (Badrinarayanan et al., 2012; Wang et al., 2006). Des données récentes de Hi-C montrent que MukBEF en lien avec la protéine HU, permet le contact entre des séquences d'ADN distantes de quelques mégabases (Lioy et al., 2018). Ces contacts sont distribués de manière relativement homogène le long du chromosome bactérien, à l'exclusion de la région de terminaison de la réplication. Comment MukBEF permet la résolution des chromosomes après la réplication reste incertain.

3) Les complexes SMC eucaryotes

a) Cohésines

Les Cohésines ont été découvertes pour leur rôle essentiel dans la cohésion des chromatides sœurs (Michaelis et al., 1997). D'autres travaux ont par la suite attribué un rôle important aux Cohésines dans l'organisation 3D du génome en interphase et dans la réparation des dommages à l'ADN. Ils seront abordés dans la partie suivante. La cohésion des chromatides sœurs est l'association physique, par paires, des molécules d'ADN sœurs, depuis leur synthèse en phase S jusqu'à leur séparation au déclenchement de l'anaphase. La cohésion des chromatides est essentielle à l'attachement bilatéral des chromosomes au fuseau en début de mitose et à la transmission fidèle des chromosomes en anaphase (Michaelis et al., 1997; Uhlmann and Nasmyth, 1998). La cohésion des chromatides sœurs repose sur la capacité des Cohésines à encercler l'ADN (Haering et al., 2008). Des isoformes des Cohésines ont été décrites qui varient par la nature des sous-unités non-SMC. Outre les sous-unités SA1 ou SA2 décrites chez les mammifères (Canudas and Smith, 2009; Remeseiro et al., 2012), il existe des variants méiotiques, tel que Rec8 qui remplace notamment Rad21, participant ainsi à la spécificité de cette phase de division cellulaire (McNicoll et al., 2013).

Les mécanismes mis en jeu dans l'association et la dissociation des Cohésines à la chromatine sont les mieux connus parmi les complexes SMC. Les Cohésines s'associent aux chromosomes dès la phase G1, par une réaction facilitée par l'hétérodimère Nipbl-Mau2 (nommé Scc2-Scc4 chez *S. cerevisiae* et Mis4-Ssl3 chez *S. pombe*). Ce complexe appelé *loader* des Cohésines, est associé à la chromatine et est essentiel pour la localisation du complexe SMC sur l'ADN (Ciosk et al., 2000). Le complexe *loader* fixe les Cohésines (Murayama and Uhlmann, 2014), ce qui promeut l'hydrolyse de l'ATP par les têtes ATPases et l'ouverture transitoire de l'anneau.

L'association du complexe *loader* à la chromatine permet à la réaction d'ouverture d'avoir lieu à proximité de l'ADN. Des expériences de reconstitution *in vitro* ont montré que l'association topologique des Cohésines avec l'ADN est possible en l'absence du complexe *loader*, mais inefficace (Murayama and Uhlmann, 2014). L'ouverture de l'anneau Cohésine est essentielle pour permettre la capture topologique de la fibre d'ADN.

Il a été proposé que l'entrée de l'ADN dans l'anneau des Cohésines se fasse par la dissociation des sous-unités SMC1 et SMC3 au niveau de leurs domaines charnières (Gruber et al., 2006). Cependant, cette étude a été remise en question par les données récentes de l'équipe de Franck Uhlmann, qui suggèrent que l'ingénierie protéique utilisée par Gruber *et al.* empêcherait le repliement correct des Cohésines, faussant leurs résultats. D'après Murayama et Uhlmann, l'association et la dissociation des Cohésines à la chromatine se ferait par une même voie qui passerait par deux « portes » : l'une située entre les têtes ATPases de SMC1 et SMC3 et l'autre entre SMC3 et la kleisine Rad21/Scc1 (Figure 10) (Murayama and Uhlmann, 2015).

Le modèle proposé est le suivant : aidé par le *loader*, le complexe Cohésine change de conformation et expose les résidus lysines senseurs de l'ADN sur SMC3. L'interaction de ces lysines avec l'ADN permet alors l'hydrolyse de l'ATP, le désengagement des têtes ATPases et le passage du brin d'ADN entre les têtes. C'est la première porte d'entrée. De manière séquentielle, la protéine Wapl déstabilise ensuite l'interaction entre le domaine N-terminal de SMC3 et la kleisine Rad21/Scc1, ouvrant la deuxième porte qui permet à l'ADN de se retrouver au centre de l'anneau de Cohésine (voir Figure 11). Le déchargement des Cohésines se ferait par les mêmes portes. Cependant aucun changement conformationnel ne serait requis à la dissociation, étant donné que les lysines senseurs de l'ADN seraient constitutivement positionnées à proximité de l'ADN lorsque celui-ci est piégé au cœur de l'anneau de Cohésines. Ce cycle de chargement/déchargement des Cohésines aurait lieu de manière dynamique en phase G1 et en phase G2. En revanche, lors de la réplication, une fraction des Cohésines serait fixée de manière plus durable aux chromosomes via l'acétylation des lysines senseurs, permettant la cohésion des chromatides sœurs. Les anneaux des Cohésines non concernés par cette association cohésive, semblent plutôt impliqués dans la formation de domaines topologiques (TADs) et le contrôle de l'expression des gènes (voir chapitre III).

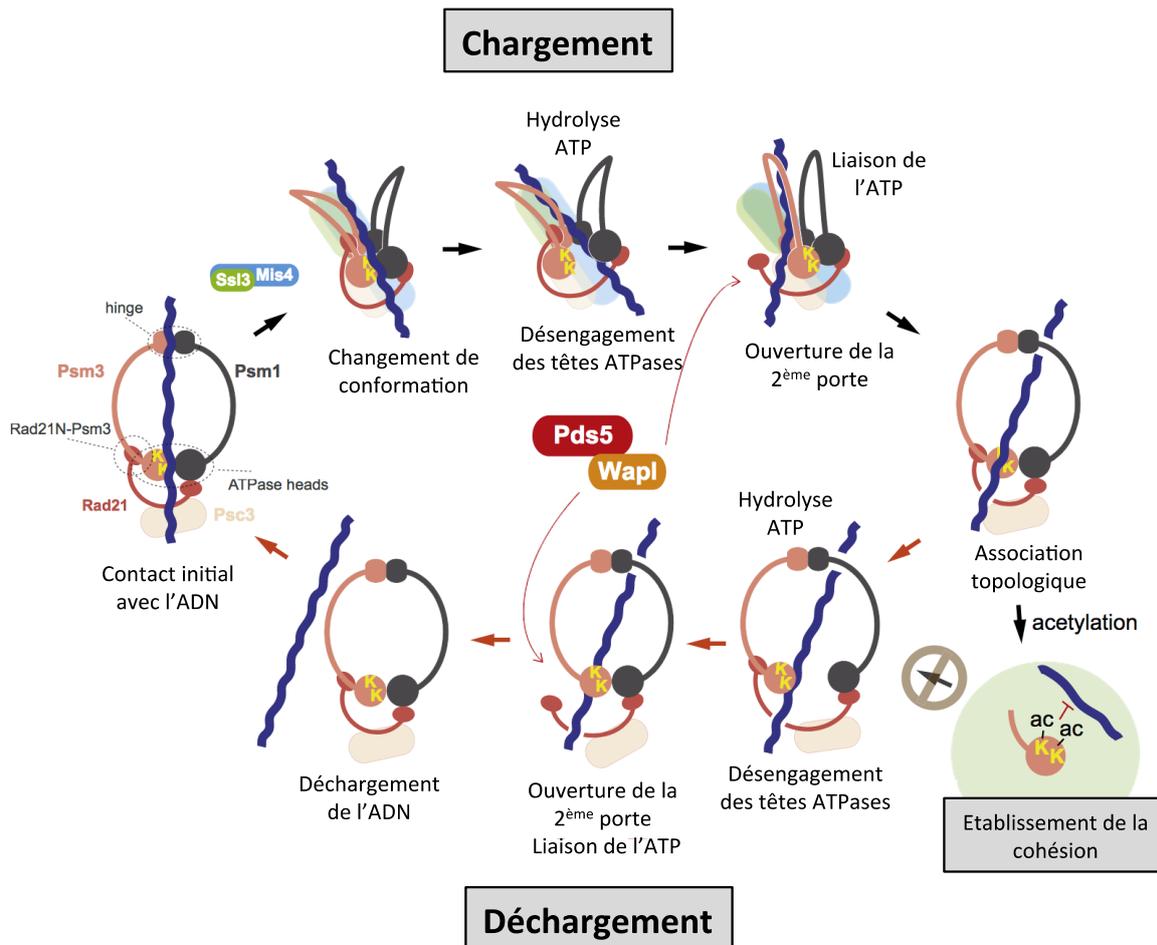


Figure 11 : Modèle d'association et de dissociation des Cohésines à la chromatine.
 Voir texte pour détail. Adapté d'après Murayama *et al.* 2015.

L'établissement de la cohésion des chromatides sœurs a lieu en phase S de façon couplée à la réplication de l'ADN. La rencontre entre les Cohésines dynamiques et la fourche de réplication entraîne l'acétylation des lysines senseurs de l'ADN de la sous-unité SMC3 par l'acétyltransférase Escp1 (Eco1 chez *S. cerevisiae* et Eso1 chez *S. pombe*) ainsi que Escp2 chez les vertébrés. Cette modification post-traductionnelle est nécessaire à l'établissement de la cohésion des chromatides sœurs (Rowland *et al.*, 2009; Ünal *et al.*, 2008). L'acétylation de SMC3 par Escp1/2 rend les Cohésines chromosomiques insensibles à l'activité de dissociation de la protéine Wapl, inhibant l'action des têtes ATPases, et stabilisant ainsi leur association à l'ADN (Lopez-Serra *et al.*, 2013). L'acétylation de SMC3 couplée à la réplication convertit les anneaux des Cohésines dynamiques et non-cohésifs en anneaux associés de façon stables à l'ADN et cohésifs. Chez les vertébrés, l'établissement de la cohésion fait également appel à la

protéine Sororine qui se lie à la protéine Pds5 et empêche directement l'action déstabilisatrice de Wapl-Pds5 (Nishiyama et al., 2010). Chez les levures, la protéine Sororine n'existe pas.

Afin de permettre la séparation des chromatides sœurs en anaphase, la cohésion doit être éliminée. Le mécanisme essentiel au cœur de la destruction de la cohésion des chromatides sœurs en mitose fait appel à une protéolyse contrôlée.

Chez les levures, l'ensemble des Cohésines cohésives sera clivé à la transition métaphase-anaphase, afin d'éliminer la cohésion (Uhlmann et al., 2000). Ce clivage est rendu possible par l'action du complexe APC (*Anaphase promoting complex*), qui va ubiquitiner une protéine appelée Sécurine et entrainer sa dégradation par le protéasome. La Sécurine se fixe à la Séparase et l'inhibe. La dégradation contrôlée de la Sécurine déclenchée par l'APC libère la Séparase active qui va alors cliver la kleisine Rad21/Scc1 des Cohésines (Uhlmann et al., 1999). La cohésion est alors éliminée et les Cohésines se dissocient de la chromatine.

Chez les vertébrés, la situation est sensiblement différente car l'élimination de la cohésion des chromatides sœurs débute en prophase, sans clivage des anneaux Cohésines, par une voie appelée PDP, pour *Prophase Dissolution Pathway*. Les Cohésines ainsi que Sororine sont phosphorylées en prophase par les kinases mitotiques (comme CDK1, PLK1 et Aurora B), et sont alors dissociées des chromosomes par l'action de Wapl (Tedeschi et al., 2013). Seule une fraction centromérique cohésive des Cohésines persiste jusqu'en anaphase grâce à l'action de la protéine Sgo1, qui recrute la phosphatase PP2A, laquelle élimine activement les phosphorylations promotrices du PDP des anneaux Cohésines (Liu et al., 2013). Lors de la transition métaphase-anaphase, la fraction centromérique des Cohésines, protégée du PDP grâce à l'action de Sgo1/PP2A, sera éliminée des chromosomes grâce au clivage de la kléisine par la protéine Séparase, après dégradation de la Sécurine (Waizenegger et al., 2000).

b) SMC5/6

Le complexe SMC5/6 est peut-être le moins bien caractérisé des complexes SMC eucaryotes (ce que traduit sans doute son absence de nom générique). La réparation des dommages à l'ADN représente la fonction canonique de SMC5/6, et une grande partie des sous-unités du complexe a été identifiée par des cribles génétiques de sensibilité aux stress génotoxiques. Des études chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* montrent que SMC5/6 fonctionne dans la réparation des lésions par recombinaison homologue (HR) (Piccoli et al., 2006; Potts et al., 2006).

Plusieurs données suggèrent que le complexe est notamment recruté au niveau des barrières des fourches de réplication situées dans l'ADNr et aux télomères, pour y contrôler la recombinaison homologue de ces séquences répétées (Menolfi et al., 2015; Torres-Rosell et al., 2005). Une fonction du complexe a aussi été découverte dans la résolution des structures de recombinaison toxiques dérivées de la réplication (Menolfi et al., 2015). L'association de SMC5/6 à l'ADN a lieu durant la phase S, au sein d'un processus lié à la réplication et qui dépend partiellement du complexe *loader* des Cohésines Scc2-Scc4 chez *S. cerevisiae* (Betts Lindroos et al., 2006). Après avoir atteint un niveau maximal d'association en phase G2, le complexe se dissocie des chromosomes lors de la mitose. En dépit d'un nombre croissant de publications à son sujet, les fonctions du complexe SMC5/6 restent relativement peu connues comparé à ce que l'on sait pour les Cohésines et les Condensines.

c) Le complexe MRX/MRN

Le complexe MRX/MRN est considéré comme un complexe *SMC-like*, en raison de la ressemblance de la protéine Rad50 qui le compose avec les protéines SMC. MRX/MRN est composé d'un dimère de Rad50, de la protéine Mre11, et de Xrs2 chez *S. cerevisiae* (complexe MRX) ou Nbs1 chez *S. pombe* et les eucaryotes supérieurs (complexe MRN). Ce complexe joue un rôle critique dans la détection et la réparation de dommages à l'ADN. Son fonctionnement ne sera pas détaillé dans ce manuscrit. Le lecteur intéressé est renvoyé vers plusieurs revues récentes (Gobbini et al., 2016; Paull and Deshpande, 2014).

II. Les complexes Condensines

1) Découverte des Condensines

En 1994, Tatsuya Hirano et Tim Mitchison ont été les premiers à isoler un dimère de protéines, purifié à partir d'extraits d'œufs de Xénope, capable d'assembler et de maintenir la structure de chromosomes mitotiques *in vitro* à partir de sperme (Hirano and Mitchison, 1994). Les protéines composant cet hétéro-dimère furent nommées XCAP-C et XCAP-E pour *Xenopus chromosome-associated polypeptides*, et identifiées par la suite comme les sous-unités SMC4 et SMC2 des Condensines. Cette étude pionnière fut suivie par la description en 1997 d'un

complexe pentamérique composé des sous-unités SMC XCAP-C et XCAP-E, ainsi que de trois sous-unités supplémentaires nommés CAP-D2, CAP-H et CAP-G (Hirano et al., 1997). Cette étude fut la première description du complexe Condensine et c'est là que la dénomination Condensine apparut. C'est également en 1997 que le laboratoire de Kim Nasmyth publia la découverte des Cohésines chez *S. cerevisiae* (Michaelis et al., 1997). D'autres travaux menés à la même époque ont conduit à l'identification des protéines SMC et des complexes Condensines. En 1994, le laboratoire de Bill Earnshaw identifia dans les squelettes protéiques de chromosomes mitotiques déplétés en histones la protéine ScII (*Scaffold protein II*), qui fut ensuite identifiée comme étant la protéine SMC2 (Saitoh et al., 1994). En parallèle, des analyses génétiques menées chez *S. pombe* ont identifié les sous unités SMC2 et SMC4. En effet, en 1993, le groupe de Mitsuhiro Yanagida décrivait un crible génétique visant à isoler de nouvelles mutations menant au phénotype CUT (*cell untimely torn* voir chapitre I), et la découverte d'une mutation dans le gène *cut14*, qui fut plus tard identifié comme codant la sous unité SMC2 de Condensine (Samejima et al., 1993). En 1994, les gènes *cut14*/SMC2 et *cut3*/SMC4 furent caractérisés chez *S. pombe* comme requis à la condensation des chromosomes et à leur ségrégation correcte en anaphase (Saka et al., 1994) ; la mutation thermosensible *cut14-208* entraînant l'apparition de chromatine en forme de ϕ (ou pont chromatinien) en anaphase à température restrictive (Figure 12).

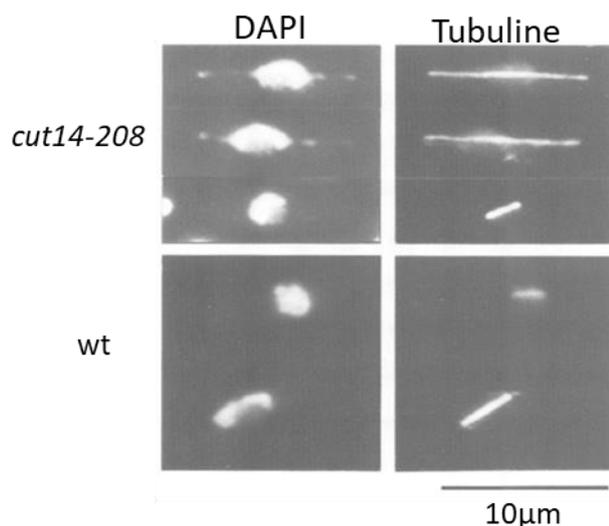


Figure 12 : Le phénotype des chromosomes en forme de ϕ dans le mutant *cut14-208*. Images de chromatine marquée au DAPI et de fuseau mitotique marqué par un anticorps anti-tubuline dans des cellules wt ou mutantes *cut14-208* après 2h à 36°C. Des portions de chromatine sont effectivement tirées aux pôles opposés par le fuseau mitotique, mais la majeure partie de la chromatine reste au milieu du fuseau sans signe apparent de condensation. Le signal DAPI est alors en forme de ϕ . D'après Saka et al. 1994.

En 1995, l'équipe de Douglas Koshland découvrait la protéine SMC2 de *S. cerevisiae* et l'impliquait dans la condensation des chromosomes (Strunnikov et al., 1995). Il est ensuite rapidement apparu (1) que le complexe Condensine est conservé au cours de l'évolution,

depuis les levures jusque chez l'Homme, et (2) que la formation de ponts chromatiniens est un phénotype typique de l'inactivation de Condensine chez la plupart, sinon tous les eucaryotes.

Près de dix ans après la découverte de Condensine, un deuxième complexe Condensine fut découvert (Ono et al., 2003, 2004). Le complexe Condensine initialement identifié fut alors rebaptisé Condensine I, et le nouveau nommé Condensine II.

Depuis leur découverte, de nombreuses études ont impliqué les Condensines dans la condensation et la ségrégation des chromosomes mitotiques. Le travail récent de Shintomi, Takahashi et Hirano renforce cette idée en montrant que Condensine I et la Topoisomérase II sont les deux seuls constituants structuraux nécessaires et suffisants à la reconstitution de chromatine mitotique *in vitro* (Shintomi et al., 2015).

2) Les complexes Condensines et leurs spécificités

Les Condensines sont des pentamères protéiques en forme d'anneau. La plupart des eucaryotes possèdent deux isoformes de Condensine, appelées Condensine I et Condensine II. Ces deux complexes partagent les mêmes sous-unités SMC2/4 mais diffèrent par leurs sous-unités régulatrices (voir Figure 13 et Tableau 1), lesquelles sont responsables de leurs différences de localisation, de dynamique et de fonction.

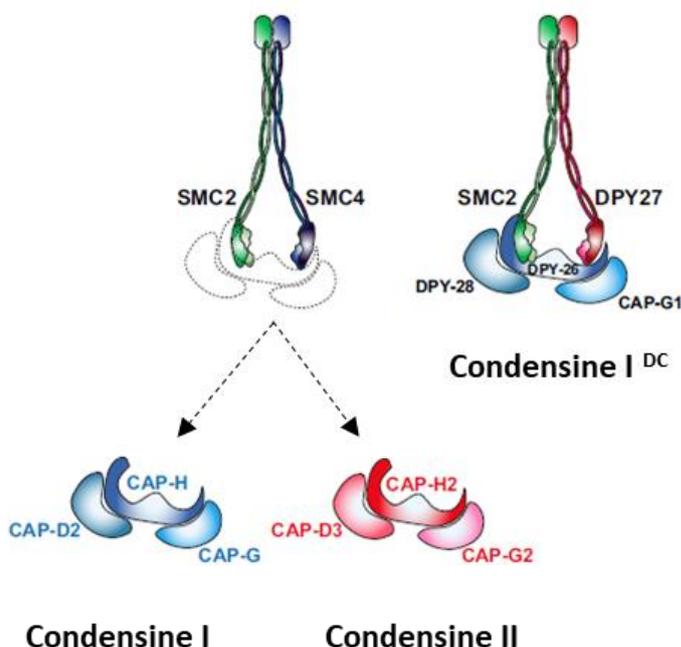


Figure 13 : Schéma des différents complexes Condensines. Les complexes Condensine I et II ne varient que par leurs sous-unités régulatrices kleisine et à répétitions HEAT. Le complexe Condensine I^{DC} diffère du complexe Condensine I par la sous-unité DPY27 qui remplace SMC4. Adapté d'après Robellet *et al.* 2016.

Tableau 1 : Tableau des sous-unités des Condensines et leurs correspondances entre espèces

Sous-unités	Homme	Xénope	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>
SMC	SMC2 (hCAP-E) SMC4 (hCAP-C)	XCAP-E XCAP-C	DmSMC2 DmSMC4	Cut14 Cut3	Smc2 Smc4	MIX-1 SMC-4
Non-SMC spécifiques à Condensine I	hCAP-H (kléisine) hCAP-D2 hCAP-G	XCAP-H XCAP-D2 XCAP-G	Barren CG1911 CG17054	Cnd2 Cnd1 Cnd3	Brn1 Ycs4 Ycg1	DPY-26 DPY-28 CAPG-1
Non-SMC spécifiques à Condensine II	hCAP-H2 hCAP-D3 hCAP-G2	XCAP-H2 XCAP-D3 XCAP-G2	CG144685 CG311989 -	- - -	- - -	KLE-2 HCP-6 CAPG-2

Chez les vertébrés, Condensine I est majoritairement cytoplasmique en interphase et est recrutée massivement sur les chromosomes en prométaphase après la rupture de l'enveloppe nucléaire (Gerlich et al., 2006; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004; Zhang et al., 2016). Les complexes commencent à quitter les chromosomes lors de la télophase. A l'inverse, Condensine II est nucléaire tout au long du cycle cellulaire, et se concentre sur les chromosomes lors de la prophase et ce jusqu'en télophase (Gerlich et al., 2006; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). Condensine II précède donc Condensine I sur les chromosomes en mitose, suggérant que Condensine II est importante pour initier la condensation mitotique. De manière cohérente avec ces différentes localisations sub-cellulaires, des déplétions par ARNs interférants indiquent que les deux isoformes de Condensine participent à différents aspects de la condensation des chromosomes mitotiques : Condensine II participerait au raccourcissement longitudinal des chromosomes en prophase et Condensine I compacterait les chromosomes latéralement dès la prométaphase (voir Figure 14) (Green et al., 2012; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2003, 2004). Il a été observé que les quantités relatives des deux isoformes de Condensine varient selon les organismes et peut-être aussi selon les types cellulaires. En effet, le ratio Condensine I/II est de 1:1 dans les cellules humaines HeLa, 5:1 dans les extraits d'œufs de Xénope et 10:1 dans des cellules de poulet DT40 (Ohta et al., 2010; Ono et al., 2003; Shintomi and Hirano, 2011). Changer ces ratios modifie la forme des chromosomes. Cependant, il n'est pas établi si ces particularités reflètent des besoins différents selon les espèces (ayant des tailles de génome variables), selon les types cellulaires, ou les deux. De plus, une étude récente visant à obtenir une représentation quantitative des isoformes de Condensine le long des chromosomes, durant la mitose, chez l'Homme, a mesuré un ratio Condensine I/II qui serait plus proche de 4:1 en (pro)-métaphase dans des cellules

HeLa Kyoto (Walther et al., 2018). Les rapports quantitatifs et fonctionnels entre Condensine I et II ne sont pas totalement établis.

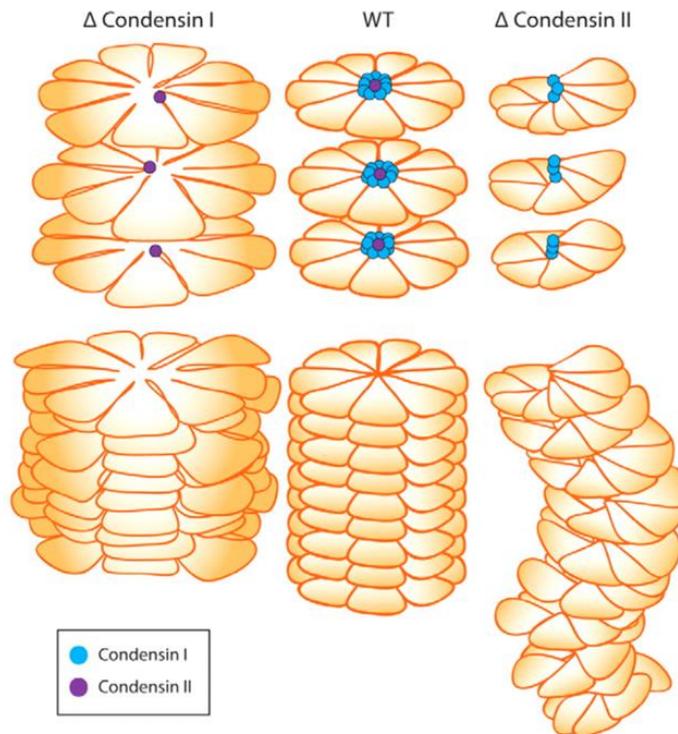


Figure 14 : Modèle figurant les contributions des isoformes de Condensine à l'architecture du chromosome métaphasique.

En l'absence de Condensine I, seule la compaction longitudinale est opérée par Condensine II. En l'absence de Condensine II, Condensine I assure une compaction latérale. D'après Green *et al.* 2012.

Cette étude ainsi que des précédentes indiquent que Condensine I et Condensine II sont positionnées différemment le long des chromosomes mitotiques. Les deux isoformes montrent une localisation en alternance le long de l'axe longitudinal des chromatides, et Condensine II semble localisée à proximité de l'axe central à l'inverse de Condensine I qui paraît occuper une position plus distale (Maeshima and Laemmli, 2003; Ono et al., 2003; Walther et al., 2018).

Par des expériences de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*), deux études observent que plus de 80% des complexes Condensine I s'associent aux chromosomes de manière dynamique, avec un temps de résidence assez court sur les chromosomes (environ 2 minutes) (Gerlich et al., 2006; Walther et al., 2018). Une étude chez *Drosophila melanogaster* par Raquel Olivera arrive à la même conclusion (Oliveira et al., 2007). A l'inverse, les complexes Condensine II sont plus stablement associés aux chromosomes mitotiques avec un temps de résidence supérieur à 5 minutes. 20% des complexes Condensine I et plus de 60% des complexes Condensine II semblent associés de manière très stable à la chromatine, suggérant que les deux isoformes pourraient s'associer aux chromosomes selon plusieurs

modes. Ces données renforcent l'idée que les deux complexes Condensines assurent des fonctions différentes dans la condensation des chromosomes mitotiques. Les sous-unités régulatrices des Condensines ont vraisemblablement un rôle clé dans la dynamique d'association et la localisation spécifique de chacun de ces deux complexes.

A l'inverse de la majorité des eucaryotes, les levures possèdent un seul complexe Condensine, similaire à Condensine I par sa séquence protéique. Chez la levure *S. pombe*, la localisation sub-cellulaire du complexe Condensine au cours du cycle est similaire à Condensine I : elle est majoritairement cytoplasmique en interphase et nucléaire en mitose (Sutani et al., 1999). La mitose étant fermée chez les levures (l'enveloppe nucléaire ne se rompt pas), Condensine doit être importée dans le noyau au début de la mitose. La phosphorylation du résidu T19 de Cut3/SMC4 par la kinase dépendante des cyclines Cdc2 est requise pour l'enrichissement nucléaire de Condensine en mitose (Sutani et al., 1999). Chez *S. cerevisiae* au contraire, Condensine est nucléaire tout au long du cycle cellulaire (Bhalla et al., 2002; D'Ambrosio et al., 2008a; Freeman et al., 2000). Ainsi, bien que les séquences peptidiques des sous-unités de Condensine chez *S. cerevisiae* demeurent proches de celles de Condensine I, la localisation sub-cellulaire du complexe ressemble plutôt à celle de Condensine II. Il est important de noter, cependant, que la Condensine de *S. cerevisiae* est liée aux chromosomes tout au long du cycle cellulaire, avec un enrichissement au niveau de l'ADN ribosomique en mitose. Cela indique que l'association de Condensine à la chromatine n'est pas suffisante pour déclencher la condensation des chromosomes chez cette levure, et que des mécanismes d'initiation de l'activité de condensation de Condensine par des enzymes liées au cycle cellulaire doivent exister.

Chez *C. elegans*, un troisième complexe Condensine est présent, qui est nommé Condensine I^{DC}. Il fait partie intégrante du complexe DCC (pour Dosage Compensation Complexe) avec un autre sous-complexe formé des trois protéines SDC, DPY30 et DPY21 (Csankovszki et al., 2009). Il participe essentiellement à la compensation de dosage génique mise en place chez le ver. Chez cet organisme, la stratégie retenue est de diminuer l'expression des gènes des chromosomes X par deux dans les vers hermaphrodites (XX), pour égaliser le niveau présent chez les mâles (XO) (Meyer, 2010). Condensine I^{DC} est composée des mêmes sous-unités que Condensine I, à la différence de la sous-unité SMC4 qui est remplacée par la sous-unité DPY27, spécifique du ver (Figure 13). A l'inverse de Condensine I et II qui se lient à tous les

chromosomes, Condensine I^{DC} s'associe spécifiquement aux chromosomes X chez les animaux hermaphrodites. Cette spécificité repose notamment sur l'existence de sites chromosomiques *rex* (recruitment elements on the X), qui recrutent le complexe DCC sur le chromosome X de manière séquence-dépendante (Ercan and Lieb, 2009; Ercan et al., 2007; Jans et al., 2009).

3) Mode(s) d'association(s) des Condensines avec l'ADN

L'interaction des Condensines avec l'ADN est un point essentiel du mécanisme par lequel ces anneaux protéiques promeuvent la condensation des chromosomes, et donc un sujet de grand intérêt. Je présenterai dans cette partie les principales données de la littérature à ce sujet.

Par leur structure, les complexes SMC ont été imaginés encercler l'ADN chromosomique. Cette association topologique avec l'ADN a été prouvée pour Cohésine. Il a également été prouvé que cette dimension topologique est essentielle à la cohésion des chromatides sœurs (Haering et al., 2008). Le modèle qui prévaut, propose que ce soit en encerclant deux brins d'ADN au sein de son anneau que Cohésine promeut la cohésion. Cependant ce mécanisme n'a pas été prouvé et des modèles alternatifs sont défendus par d'autres auteurs comme Douglas Koshland (Huang et al., 2005). Des expériences biochimiques ont montré que les Condensines s'associent aussi de manière topologique avec l'ADN (Cuylen et al., 2011). Cuylen *et al.* ont purifié un minichromosome circulaire de *S. cerevisiae* auquel se lie Condensine. Ils montrent que la linéarisation du minichromosome par digestion par une enzyme de restriction, tout comme l'ouverture de l'anneau de Condensine par clivage protéique, élimine leur interaction stable. Ces résultats suggèrent que Condensine encercle l'ADN de manière topologique. Ils montrent aussi que l'intégrité de l'anneau est nécessaire à la condensation des chromosomes mitotiques *in vivo*. En accord avec ce fait, toutes les études qui ont observé l'association des Condensines à la chromatine ont observé que la perte de fonction d'une sous-unité suffit à perturber la condensation des chromosomes. C'est donc l'holocomplexe des Condensines qui est requis à la condensation des chromosomes. En revanche, il faut dissocier la condensation de la seule fixation des Condensines à la chromatine. La fixation des Condensines à la chromatine est nécessaire à la condensation, mais elle n'est pas suffisante. La présence de Condensine sur les chromosomes en interphase chez *S. cerevisiae* illustre ce point. Plus

récemment des mutations ont été isolées dans les têtes ATPase des sous unités SMC qui altèrent la condensation sans empêcher la fixation (Palou et al., 2018; Thadani et al., 2018). Les mécanismes moléculaires menant à l'encerclement de la chromatine par les Condensines sont encore énigmatiques. Malgré ces zones d'ombre, il a été proposé que les Condensines (et les Cohésines) organisent les chromosomes en faisant des boucles de chromatine. Soit en encerclant deux séquences ADN se trouvant par hasard à proximité (*stochastic crosslink model*) (Cuylen et al., 2011), soit en capturant une petite boucle d'ADN qui sera progressivement élargie (*loop extrusion model*) (voir plus bas) (Nasmyth, 2001).

Les Condensines et les Cohésines apparaissent donc comme des concaténases capables de piéger l'ADN. Une différence fondamentale entre les deux types de complexes serait que les Condensines encercleraient l'ADN de façon intramoléculaire, alors que les Cohésines cohésives assureraient des interactions intermoléculaires. Les Cohésines dynamiques (non-cohésives) en revanche, organiseraient les domaines TADs par des interactions intramoléculaires.

A l'inverse des Cohésines, l'association des Condensines à l'ADN possède également une dimension électrostatique. En effet, des données récentes obtenues chez *S. cerevisiae* indiquent que l'interaction de la Condensine à l'ADN est partiellement sensible à une forte concentration en sel (Cuylen et al., 2011; Eeftens et al., 2017). Un point de contact entre les complexes Condensines et l'ADN a été montré il y a quelques années, lequel pourrait permettre cette interaction électrostatique. En effet, une étude a observé que les sous-unités régulatrices de la Condensine de *S. cerevisiae* contenant des répétitions HEAT peuvent interagir avec l'ADN double brin *in vitro* (Piazza et al., 2014). Cela pourrait représenter un mode d'association non topologique des Condensines avec l'ADN, qui pourrait être important au chargement des complexes et à la formation correcte d'un chromosome mitotique (Eeftens et al., 2017; Kinoshita et al., 2015; Piazza et al., 2014). Plusieurs données disponibles dans la littérature étayent cette idée. Il a été observé que l'hydrolyse de l'ATP par les têtes ATPase de SMC2 et SMC4 ne semble pas requise pour l'association initiale de Condensine avec les chromosomes *in vivo* dans des cellules DT40 de poulet et chez *S. cerevisiae* (Hudson et al., 2008; Thadani et al., 2018), ou dans des extraits d'œufs de Xénope (Kinoshita et al., 2015). De plus, Condensine est capable de lier l'ADN *in vitro* même en l'absence d'ATP (Kimura and Hirano, 1997; Strick et al., 2004). Cependant, l'ADN peut stimuler modérément l'hydrolyse de

l'ATP par les têtes ATPases (Kimura and Hirano, 2000; Piazza et al., 2014). Et l'hydrolyse continue de l'ATP est essentielle pour maintenir l'état condensé des chromosomes (Hudson et al., 2008; Kinoshita et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les Condensines pourraient fixer l'ADN en deux temps : dans un premier temps les Condensines s'associent à l'ADN via une interaction électrostatique au niveau d'un site formé par leurs sous-unités à répétitions HEAT par exemple. Une fois cette primo-association réalisée, les Condensines capturent l'ADN de manière topologique (à l'intérieur de leur anneau) par un processus qui consomme de l'ATP (figure 15) (Eeftens et al., 2017; Piazza et al., 2014). Cette hypothèse séduisante n'a néanmoins pas encore été confirmée.

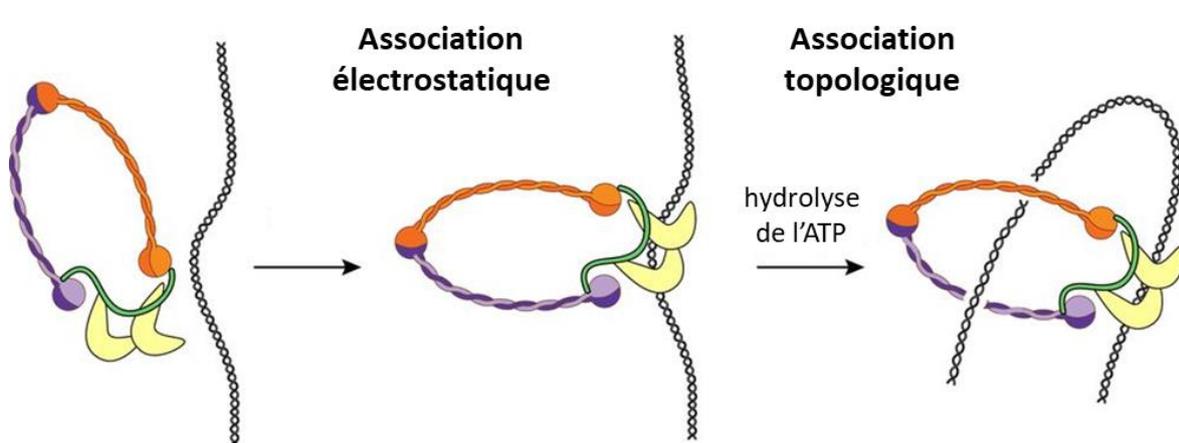


Figure 15 : Modèle d'association des Condensines avec l'ADN en deux temps. Voir texte pour détail. Adapté d'après Eeftens *et al.* 2017.

Récemment, les sous-unités kléisine (Brn1) et CAP-G (Ycg1) de la Condensine de *S. cerevisiae* ont été cristallisées en présence d'ADN double brin, révélant l'existence d'un sillon chargé positivement dans la protéine Ycg1 dans lequel va se loger l'ADN. Des interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement du sillon protéique et les résidus phosphates de l'ADN assurent une interaction indépendante de la séquence nucléotidique (Kschonsak et al., 2017). Une boucle peptidique formée par la kléisine Brn1 vient bloquer l'ADN dans le sillon à la manière d'une ceinture de sécurité ou *safety belt* (Figure 16) (Kschonsak et al., 2017). Les auteurs montrent que la mutation des résidus chargés positivement de Brn1^{CAP-H} affecte l'association de Condensine à l'ADN *in vitro* et *in vivo* chez *S. cerevisiae* et chez l'Homme. Cette *safety belt* semble essentielle à l'association du complexe à la chromatine, mais pourrait également jouer un rôle important dans l'extrusion des boucles d'ADN par les Condensines, car elle permet l'ancrage du complexe (voir section suivante).

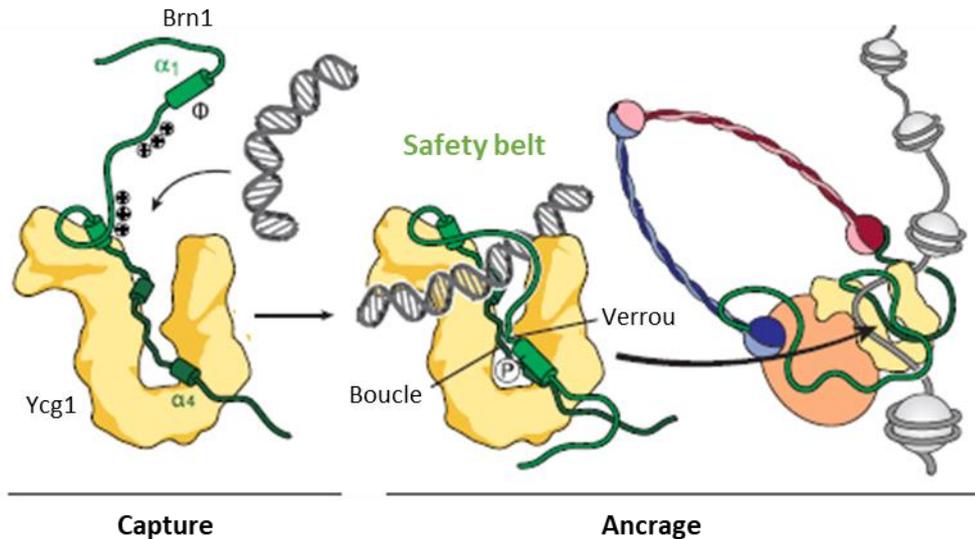


Figure 16 : Modèle de la *safety belt*. La fermeture de cette « ceinture de sécurité » est permise par l'association des régions « boucle » et « verrou » de Brn1, et ancre ainsi Condensine sur la chromatine. D'après Kshonsak *et al.* 2017

4) Les fonctions biochimiques des Condensines

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la condensation et la ségrégation correcte des chromosomes par les Condensines sont encore mal compris. Des études menées essentiellement *in vitro* ont attribué plusieurs activités biochimiques aux Condensines : une activité de surenroulement d'ADN double brin circulaire, une activité de renaturation de l'ADN et une activité d'extrusion de boucles d'ADN.

La capacité de l'holocomplexe Condensine I à introduire des surenroulements positifs dans un plasmide a été montrée *in vitro* en utilisant des complexes Condensine I purifiés à partir de levures bourgeonnantes ou d'extraits d'œufs de Xénope (Kimura and Hirano, 1997; St-Pierre et al., 2009). Cette activité de surenroulement *in vitro* est dépendante de l'activité ATPase de Condensine I et uniquement visible en présence de la topoisomérase I (Kimura and Hirano, 1997). La phosphorylation des sous-unités régulatrices de Condensine I par la kinase Cdc2 est nécessaire pour stimuler l'activité de surenroulement du complexe (Kimura et al., 1998). Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que la phosphorylation de Condensine I par la kinase Polo en anaphase augmente sa faculté de surenroulement, suggérant une possible relation causale avec la condensation des chromosomes (St-Pierre et al., 2009). Cette activité de surenroulement de Condensine a également été observée sur un plasmide *in vivo* chez *S. cerevisiae* (Baxter et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs proposent que le surenroulement

de l'ADN opéré par Condensine orienterait l'activité de coupure/ligation de l'ADN double-brin de la Topoisomérase II vers la décaténation. Toutefois, bien que le surenroulement et l'introduction d'une torsion dans un plasmide soient des effets bien visibles de Condensine I *in vitro*, leur pertinence vis-à-vis de la condensation des chromosomes mitotiques *in vivo* reste à établir. Il est formellement possible que le surenroulement ne soit que la conséquence indirecte de la fixation des Condensines à l'ADN ou de la formation de boucles. A ce titre, Eeftens *et al.* ont récemment mesuré *in vitro*, grâce à des pinces magnétiques (*magnetic tweezers*), l'impact de molécules uniques de Condensine sur l'organisation de fragments d'ADN linéaires greffés à une surface inerte. Leurs résultats suggèrent que Condensine condense l'ADN, mais sans y introduire de surenroulement (Eeftens *et al.*, 2017).

Une autre activité biochimique de Condensine qui a été observée *in vitro*, est sa capacité à accélérer la renaturation de fragments d'ADN simple-brin (Sakai *et al.*, 2003; Sutani and Yanagida, 1997). La renaturation de fragments d'ADN simple-brin complémentaires, *in vitro*, est accélérée en présence de l'hétérodimère SMC4^{Cut3}-SMC2^{Cut14} de la levure à fission. L'effet observé est indépendant de l'ATP. Ce résultat est à mettre en perspective avec la capacité du domaine charnière de Condensine à fixer l'ADN simple brin chez la levure *S. cerevisiae*, et chez la souris *in vitro* (Griese *et al.*, 2010; Piazza *et al.*, 2014). Il a aussi été rapporté que de l'ADN simple brin s'accumule dans la chromatine des mutants perte-de-fonction de Condensine *cut3-477* et *cut14-208* chez la levure *S. pombe* (Sutani and Yanagida, 1997). Plus récemment, Sutani *et al.* ont rapporté la présence d'ADN simple brin aux sites de fixation de Condensine le long des bras des chromosomes. Ces données ont conduit à l'hypothèse que Condensine s'associerait aux fragments d'ADN simple brin générés par la transcription, et promouvrait leur renaturation nécessaire à la compaction des chromosomes en mitose (Sutani *et al.*, 2015). Ce modèle fait écho à une hypothèse avancée par Mitsuhiro Yanagida en 2009, qui proposait que le rôle majeur de Condensine était de « nettoyer » la chromatine des enzymes et activités interphasiques qui pourraient interférer avec la condensation mitotique des chromosomes (Yanagida, 2009). Il a également été observé que le domaine charnière de SMC5/6 se lie préférentiellement à l'ADN simple brin (Alt *et al.*, 2017), et que la Cohésine lié à de l'ADN (double brin) peut capturer un second ADN seulement s'il est simple brin (Murayama *et al.*, 2018). Ces données suggèrent que la capacité à interagir avec l'ADN simple brin pourrait être un point commun des complexes SMC. La pertinence d'un lien entre Condensine et l'ADN

simple brin demeure cependant fragile et cet aspect nécessite des investigations complémentaires.

Un modèle alternatif et très en vogue, expliquant comment les Condensines pourraient organiser et compacter les chromosomes mitotiques, vient de l'idée de Kim Nasmyth que les complexes SMC organiseraient la chromatine en agrandissant de manière processive des boucles de chromatine à travers leur anneau : c'est le modèle « d'extrusion de boucle » (Nasmyth, 2001). Des simulations *in silico* de polymères mimant la chromatine ont confirmé qu'une activité d'extrusion de boucle, associée à une activité de passage de brin de type Topoisomérase II, sont suffisantes pour convertir de la chromatine interphasique en chromosome mitotique en forme de bâtonnet (Alipour and Marko, 2012; Goloborodko et al., 2016a, 2016b). Une étude *in vitro* employant la technique de « DNA curtain » a montré que Condensine possédait une activité de translocase de l'ADN et pouvait donc agir comme un moteur moléculaire capable de déplacer de l'ADN (Terakawa et al., 2017). Très récemment, une étude a pu observer en temps réel l'extrusion d'une boucle d'ADN par des complexes Condensines purifiés de *S. cerevisiae*, en présence d'ATP et de Mg^{2+} (Ganji et al., 2018). Dans les conditions expérimentales employées, Condensine est capable d'initier la formation de boucles d'ADN puis de les agrandir à une vitesse pouvant atteindre 1500 pb/sec. Le processus semble assuré par des molécules uniques de Condensine. L'hydrolyse de l'ATP est nécessaire à l'extrusion des boucles d'ADN car la présence d'un analogue d'ATP non hydrolysable (l'ATP γ S) bloque la réaction. De façon remarquable la capacité de Condensine à agrandir les boucles est entièrement dépendante de son domaine d'ancrage électrostatique « safety belt » (Ganji et al., 2018; Kschonsak et al., 2017). De plus, l'extrusion de l'ADN est asymétrique : seul un des bras de la boucle d'ADN croît en fonction du temps. Cette propriété peut être expliquée si un site de Condensine reste stablement associé à l'ADN formant une ancre, tandis que le site moteur de Condensine assure la translocation de l'autre brin d'ADN à travers l'anneau, formant ainsi une boucle de plus en plus grande (voir modèle en Figure 17). On peut imaginer que la « ceinture de sécurité » formé par le sillon de Ycg1/CAP-G et Brn1/kléisine pourrait être un bon candidat pour permettre l'ancrage de Condensine en un point donné sur l'ADN (Kschonsak et al., 2017). Les auteurs montrent de façon convaincante qu'une seule molécule de Condensine est présente à la base de la boucle pour permettre l'extrusion. Le modèle de l'extrusion de boucles pourrait fournir un principe universel d'organisation des génomes par

les complexes SMC. La force de ce modèle est qu'il prend en compte la dimension topologique observée pour les complexes SMC (Cuylen et al., 2011; Haering et al., 2008), l'action motrice de Condensine et sa translocation le long de l'ADN (Terakawa et al., 2017), et expliquerait comment les complexes SMC peuvent générer des boucles de chromatine qui constituent les chromosomes (Alipour and Marko, 2012; Earnshaw and Laemmli, 1983; Gibcus et al., 2018; Nasmyth, 2001; Naumova et al., 2013).

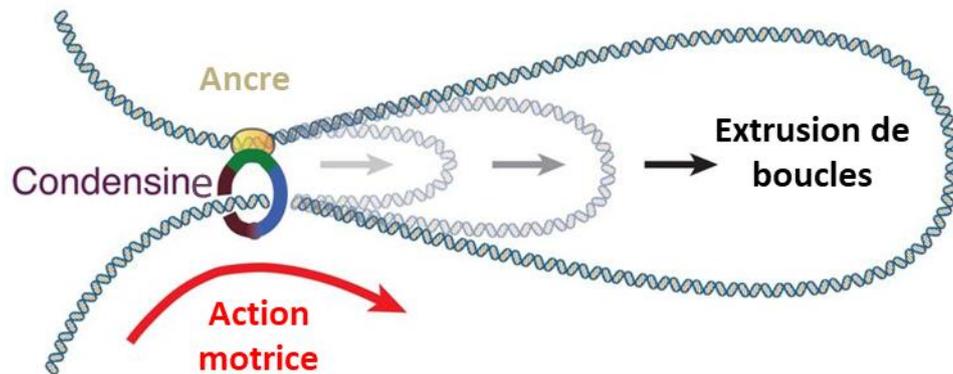


Figure 17 : Modèle d'extrusion de boucle par les Condensines. L'ancre de Condensine sur l'ADN est proposée être la *safety belt* et l'action motrice serait permise par l'hydrolyse de l'ATP. Adapté d'après Ganji et al. 2018.

5) Localisation des Condensines sur la chromatine

Si les Condensines se lient à l'ADN de façon électrostatique et topologique, puis façonnent des boucles de chromatine depuis leurs sites d'ancrage à l'ADN, la question se pose alors de savoir comment la liaison à l'ADN et l'extrusion de boucle s'accommodent de la chromatine. La taille de la ceinture de sécurité est trop petite pour laisser passer un nucléosome, suggérant que l'association électrostatique se produit en des régions où l'ADN génomique est accessible, comme aux gènes fortement transcrits et aux autres NDRs (*nucleosome-depleted regions*) (Robellet et al., 2017). Comprendre le fonctionnement des Condensines *in vivo* implique d'étudier leur localisation le long de la chromatine et d'intégrer l'encombrement que pourraient constituer les nucléosomes, quels que soient d'ailleurs les modes d'association et d'action des complexes Condensines.

Plusieurs études d'immunoprécipitation de la chromatine ont déterminé les sites d'association des Condensines le long des chromosomes chez plusieurs organismes (*S. pombe*,

S. cerevisiae, *C. elegans*, cellules DT40 de poulet, souris et chez l'Homme). Ces données ont révélé des patrons de localisation similaires entre ces espèces, suggérant que les mécanismes de chargement, et/ou les règles de positionnement des Condensines le long des chromosomes sont conservés. Les patrons de localisation remarquables des Condensines sont : les centromères, les régions sub-téломériques, l'ADNr, les gènes d'ARNt mais aussi plus généralement les gènes fortement transcrits quelle que soit la polymérase (D'Ambrosio et al., 2008a; Downen et al., 2013; Kim et al., 2013, 2016; Kranz et al., 2013; Nakazawa et al., 2015; Sutani et al., 2015). Les Cohésines sont également enrichies au niveau des centromères et de l'ADNr (Laloraya et al., 2000; Lengronne et al., 2004; Tanaka et al., 1999). Cependant, la localisation des Cohésines sur les bras des chromosomes varie selon les organismes, et les anneaux des Cohésines ne sont pas systématiquement colocalisés avec les Condensines (Nakazawa et al., 2015). Les Cohésines sont préférentiellement localisées aux gènes convergents chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* et aux barrières des TADs chez les eucaryotes supérieurs, en lien avec CTCF (Lengronne et al., 2004; Parelho et al., 2008; Schmidt et al., 2009).

Chez *S. pombe*, le profil d'association de Condensine le long du génome consiste en un faible niveau basal, ponctué par des pics de forte association qui coïncident avec les gènes fortement transcrits par l'ARN polymérase II en mitose (Kim et al., 2016; Nakazawa et al., 2015; Sutani et al., 2015). Le profil de localisation des Condensines aux gènes fortement transcrits suggère une légère accumulation au TSS (*transcription start site*) et plus fortement encore au TTS (*transcription termination site*) en 3'. L'enrichissement des Condensines corrèle avec le niveau de transcription des gènes. Il est important de noter que cet enrichissement n'est pas un artefact d'« hyper-Chipabilité » commun aux gènes fortement transcrits (Sutani et al., 2015; Toselli-Mollereau et al., 2016). Dans les cellules humaines, les pics d'association de Condensine I sont centrés sur les TSS des gènes fortement transcrits par l'ARN polymérase II (ARNPII) et l'ARN polymérase III (ARNPIII) (Sutani et al., 2015). Le même enrichissement aux TSS a été observé dans des cellules DT40 de poulet (Kim et al., 2013). Condensine II a aussi été observée aux promoteurs et aux enhancers des gènes transcrits par l'ARNPII chez *C. elegans*, dans des cellules ESCs de souris et dans des cellules humaines de cancer du sein (Downen et al., 2013; Kranz et al., 2013; Li et al., 2015b).

La différence de localisation entre les Condensines I chez *S. pombe* et chez l'Homme peut être expliquée par le fait que la transcription est partiellement réprimée en mitose chez l'Homme ainsi que chez la majorité des eucaryotes (Gottesfeld and Forbes, 1997; Palozola et al., 2017). Si Condensine s'associe au niveau du promoteur, elle pourrait être déplacée vers l'extrémité 3' des gènes par une transcription active chez *S. pombe*, rappelant ce qui a été observé pour Cohésine (Lengronne et al., 2004; Ocampo-Hafalla et al., 2016). Cependant, on peut se demander comment accorder l'ancrage de Condensine à l'ADN par la *safety belt* au déplacement du complexe proposé dans ce modèle.

La conservation évolutive du patron de localisation des Condensines suggère qu'il existe un lien positif fort entre la transcription (ou une propriété locale associée à la transcription, puisque la transcription est fortement diminuée en mitose chez les mammifères), et le chargement et/ou le positionnement des Condensines. Paradoxalement, plusieurs études ont rapporté l'existence d'un antagonisme entre la présence des Condensines et la transcription chez *S. cerevisiae* (Clemente-Blanco et al., 2009, 2011). Les auteurs montrent que l'inhibition de l'ARN polymérase I (ARNPI) par la phosphatase CDC14 en anaphase est nécessaire pour l'association de Condensine aux gènes de l'ARNr 35S ; et que la transcription des répétitions sub-télomériques par l'ARNPII empêche également l'association de Condensine en ces sites.

Des évidences génétiques étayant l'idée d'un antagonisme entre la fixation de Condensine et la transcription ont aussi observées chez la levure à fission. Réduire la transcription aux sites de fixation de Condensine réduit la quantité de Condensines présentes en ces sites. Mais, en même temps, réduire le niveau de transcription en mitose, améliore la ségrégation des chromosomes dans les mutants perte-de-fonction de Condensine *cut3-477* et *cut14-208* (Sutani et al., 2015). De même, une mutation perte de fonction dans le complexe Médiateur, pro-transcriptionnel, supprime le phénotype thermosensible du mutant *cut3-477* et améliore la migration des chromosomes (Robellet et al., 2014). Ces observations suggèrent que la transcription active est néfaste pour la ségrégation des chromosomes lorsque Condensine est altérée. Ainsi, il semblerait que des relations positives et négatives lient les Condensines à la transcription pour son association et possiblement son fonctionnement.

6) Chargement des Condensines sur la chromatine

Le recrutement des Condensines en certains sites chromosomiques peut être fondé sur leur interaction avec des protéines liant spécifiquement l'ADN. En effet, l'association de Condensine au niveau des centromères a été montrée dépendre du complexe Monopoline Pcs1/Mde4 chez *S. pombe* et de Sgo1 chez *S. cerevisiae* (Peplowska et al., 2014; Tada et al., 2011; Verzijlbergen et al., 2014). Pcs1/Mde4 participe également à la localisation de Condensine au niveau de l'ADNr chez *S. pombe* (Tada et al., 2011). En revanche Pcs1 et Mde4 ne sont pas requises à la localisation de Condensine le long des bras de chromosome, ce qui indique l'existence de mécanismes parallèles, indépendants.

De manière cohérente avec l'existence d'un lien positif entre Condensine et la transcription, les protéines Nuc1 et Acr1, respectivement une sous-unité de l'ARNPI et un membre du complexe activateur en amont de la transcription (*upstream activation factor*), sont nécessaires au positionnement de Condensine sur l'ADNr chez la levure à fission (Nakazawa et al., 2008). Chez la levure bourgeonnante, la protéine nucléolaire Fob1 se lie à la barrière de fourche de réplication (RFB) de l'ADNr, et attire Condensine au travers d'une cascade d'interactions protéiques qui incluent notamment le complexe Monopoline de *S. cerevisiae* Csm4/Lrs4 (Johzuka and Horiuchi, 2009). Plusieurs études chez les levures bourgeonnantes et à fission ont montré que la localisation de Condensine sur les bras des chromosomes fait intervenir des facteurs de transcription comme Tbp1, Ams2, Ace2 ou TFIIC (D'Ambrosio et al., 2008a; Iwasaki et al., 2015; Kim et al., 2016; Nakazawa et al., 2015). Condensine semble interagir physiquement avec ces facteurs, suggérant qu'ils pourraient directement recruter Condensine sur les chromosomes. Dans des cellules HeLa, le facteur de transcription TBP a aussi été observé interagir physiquement avec Condensine I (Iwasaki et al., 2015; Xing et al., 2008). La conservation évolutive de cette interaction laisse penser qu'elle pourrait avoir un rôle important dans le recrutement des Condensines sur les chromosomes.

Condensine II et Cohésine sont retrouvées aux enhancers et aux promoteurs des cellules ESCs de souris. La détection de Condensine II en ces sites dépend du facteur de chargement des Cohésines NIPBL (Downen et al., 2013). Chez *C. elegans* les sites d'associations de Condensine II se superposent avec ceux de SCC2, l'homologue de NIPBL (Kranz et al., 2013). Le complexe Condensine de *S. cerevisiae* qui reste associé aux chromosomes pendant l'interphase, d'une façon similaire à la Condensine II des eucaryotes supérieurs, montre également une

colocalisation avec Scc2 aux séquences ADNt (D'Ambrosio et al., 2008a). Il a été proposé que Condensine, soit en partie recrutée sur les chromosomes en lien avec le facteur de chargement des Cohésines, puisque la quantité des Condensines liées aux chromosomes diminue dans un mutant perte-de-fonction de *scc2* chez *S. cerevisiae* (D'Ambrosio et al., 2008a). En revanche aucune interaction physique n'a été observée entre Scc2 et Condensine. L'idée d'un rôle direct pour Scc2/Scc4 dans le recrutement de Condensine a été remise en cause (Kschonsak et al., 2017; Robellet et al., 2017).

En plus de recruteurs spécifiques comme ceux précédemment présentés, des recruteurs plus généraux des Condensines ont été proposés : les histones. En effet, la sous-unité hCAP-D2 humaine contient un motif d'interaction avec l'histone H1 et la queue de l'histone H3 (Ball et al., 2002), et la sous-unité hCAP-D3 de Condensine II se lie aux histones H4 mono-méthylées sur la lysine 20 (Liu et al., 2010). De même, la sous-unité kleisine de la levure à fission et la kleisine hCAP-H du complexe Condensine I humain, interagissent avec la queue de l'histone H2A.Z et avec H2A (Tada et al., 2011). Les auteurs montrent notamment que ces interactions sont stimulées par la phosphorylation de la kleisine de Condensine I par la kinase Aurora B, faisant écho au rôle bien établi de cette kinase dans la condensation des chromosomes et l'association de Condensine à la chromatine chez de nombreuses espèces (Giet and Glover, 2001; Lipp et al., 2007; Mora-Bermúdez et al., 2007; Petersen and Hagan, 2003; Takemoto et al., 2007). Ces données suggèrent que les nucléosomes pourraient agir comme des récepteurs chromosomiques pour les Condensines. Mais plusieurs données remettent en question cette conclusion. Tout d'abord, l'interaction des Condensines avec les nucléosomes rend difficilement compte du positionnement des Condensines. Les Condensines sont enrichies au niveau des régions pauvres en nucléosomes, suggérant que les nucléosomes sont des obstacles à l'association des complexes à la chromatine (Robellet et al., 2017; Toselli-Mollereau et al., 2016). Les zones pauvres en nucléosomes sont aussi suspectées d'être des sites d'intérêt pour l'interaction électrostatique de Condensine à l'ADN via la *safety belt* (Kschonsak et al., 2017). De plus, les expériences de reconstitution d'une chromatine mitotique *in vitro* ont montré que Condensine fixe l'ADN et façonne les chromosomes même en l'absence totale de nucléosomes (Shintomi et al., 2015). Chez la levure bourgeonnante, les sous-unités non-SMC de Condensine montrent une forte affinité pour l'ADN nu et une faible

affinité pour l'ADN nucléosomal *in vitro* (Piazza et al., 2014), soutenant l'idée que les histones ne sont certainement pas des récepteurs universels pour les Condensines.

Dans leur ensemble, ces données montrent que l'association des Condensines aux chromosomes fait intervenir des acteurs multiples, dont on ne comprend pas toujours les rôles exacts. Par analogie avec les Cohésines, on pourrait proposer que les Condensines soient chargées sur les chromosomes en deux temps : tout d'abord par un mode d'interaction non topologique (association électrostatique au niveau de la *safety belt*, interaction avec les nucléosomes, les facteurs de transcriptions), puis, dans un second temps, de façon topologique, en encerclant l'ADN pour permettre l'extrusion de boucles d'ADN et la condensation des chromosomes (voir Figure 18) (Robellet et al., 2017).

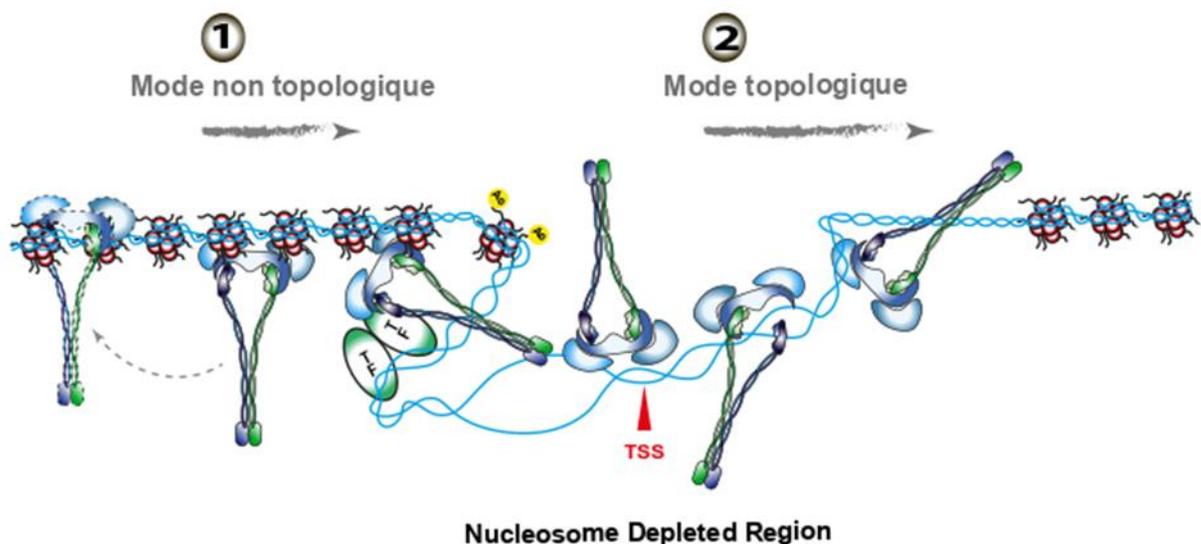


Figure 18 : Modèle de chargement des Condensines dans le contexte de la chromatine. Voir texte pour détail. Adapté d'après Robellet *et al.* 2017.

7) Régulations des Condensines au cours du cycle cellulaire

Comme en témoignent leurs profils d'association à la chromatine et leurs différentes fenêtres d'activité, les Condensines sont régulées au cours du cycle cellulaire. Leur régulation passe par des modifications post-traductionnelles, dont notamment des phosphorylations. Les sous-unités des Condensines ont également été trouvées acétylées chez l'Homme, et sumoylées chez *S. pombe*, *S. cerevisiae* et chez l'Homme (Bazile et al., 2010; D'Amours et al., 2004; Køhler et al., 2015). Il est donc possible que de multiples combinaisons de modifications soient la

base d'une régulation sophistiquée du recrutement et de l'activité des Condensines, au cours du cycle cellulaire, et le long des chromosomes.

Les kinases CDK1/Cdc2 et Polo PLK1/Cdc5 sont des régulateurs majeurs des Condensines au cours du cycle cellulaire. Des études menées chez la levure bourgeonnante ont établi que SMC4 est phosphorylée en de nombreux sites par CDK1, et que des cycles de phosphorylation-déphosphorylation sont nécessaires pour la condensation des chromosomes (Robellet et al., 2015; Thadani et al., 2018). De plus, par des tests de condensation réalisés *in vitro* avec un jeu minimum de facteurs, l'équipe de Tatsuya Hirano montre que la phosphorylation de Condensine I par CDK1 est la seule modification absolument requise pour déclencher la condensation des chromosomes dans ce contexte expérimental (Shintomi et al., 2015). Une autre étude montre que la phosphorylation de SMC4 par CDK1 amorce l'hyperphosphorylation des sous-unités régulatrices de Condensine par la kinase Polo PLK1 (St-Pierre et al., 2009). Dans les cellules HeLa, CDK1 a également été montrée phosphoryler la sous-unité hCAP-D3 de Condensine II pour amorcer l'hyperphosphorylation du complexe par PLK1 et permettre l'assemblage des chromosomes mitotiques (Abe et al., 2011). Chez *S. pombe* SMC4/Cut3 est aussi phosphorylée par Cdk1/Cdc2, ce qui permet l'import du complexe dans le noyau en mitose (Nakazawa et al., 2008; Sutani et al., 1999). Kshonsak *et al.* proposent également que l'interaction de Condensine avec l'ADN au niveau de la *safety belt* pourrait être régulée par la phosphorylation d'un site consensus de type CDK présent à proximité (Kschonsak et al., 2017).

La kinase Aurora B du complexe CPC (*chromosomal passenger complex*) a été impliquée dans la condensation des chromosomes chez de nombreuses espèces. Chez *S. pombe* la kinase Aurora B, nommée Ark1, est essentielle au recrutement de Condensine sur la chromatine et à la condensation des chromosomes (Nakazawa et al., 2011; Petersen and Hagan, 2003). Il a été montré qu'elle phosphoryle la sous-unité kleisine Cnd2 de Condensine (Nakazawa et al., 2011; Tada et al., 2011).

Chez la drosophile, dans des extraits d'œufs de Xénope et dans les cellules HeLa, Condensine I n'est plus recrutée correctement sur les chromosomes en l'absence d'Aurora B (Giet and Glover, 2001; Lipp et al., 2007; Takemoto et al., 2007). De plus, il a été montré que la compaction maximale des chromosomes, qui est atteinte en anaphase, est dépendante de la kinase Aurora B (Lavoie et al., 2004; Mora-Bermúdez et al., 2007). Ainsi Aurora B régule

l'association de Condensine avec la chromatine et la cinétique de condensation des chromosomes.

La phosphatase CDC14 participe aussi à la régulation de Condensine chez *S. cerevisiae*. L'activation de CDC14 en anaphase tardive promeut la localisation de Condensine dans le nucléole nécessaire à sa ségrégation correcte (D'Amours et al., 2004). Cependant, en fin de mitose CDC14 aurait aussi une action négative en déphosphorylant SMC4 (Kao et al., 2014; Varela et al., 2009). Dans les cellules humaines et les extraits d'œufs de Xénope, la phosphatase PP2A participe à la localisation de Condensine II sur les chromosomes, mais apparemment de manière indépendante de sa fonction de phosphatase (Takemoto et al., 2009). PP2A a aussi été observée déphosphoryler hCAP-D3 *in vitro* (Yeong et al., 2003).

Chez *S. pombe*, la protéine phosphatase Dis2 ainsi que les protéines Swd2.2 et Ppn1 forment un complexe ternaire DPS associé à la machinerie de terminaison de la transcription (Vanoosthuyse et al., 2014). Ces trois protéines ont été identifiées comme des suppresseurs phénotypiques de la thermosensibilité de *cut3-477*. Les mécanismes par lesquels les composants du DPS interagissent fonctionnellement avec Condensine demeurent inconnus. Une possibilité attrayante est que Dis2, dans le contexte du DPS, localisé en 3' des gènes, déphosphoryle Condensine.

La Caséine kinase II (CKII) a été montrée phosphoryler Condensine I en interphase dans des cellules humaines. Cette phosphorylation est la seule connue aujourd'hui qui régule négativement l'activité de surenroulement de l'ADN de Condensine I (Takemoto et al., 2006). Chez *S. pombe*, la CKII est retrouvée au sein du complexe NCT (Nrc1-CKII-TAFs), qui co-localise brièvement avec Condensine lors de la décondensation des chromosomes mitotiques (Kim et al., 2014). Cela suggère que l'inhibition de Condensine par CKII pourrait avoir un rôle dans le processus de décondensation au sortir de la mitose, et possiblement dans le maintien de l'état décondensé durant l'interphase.

Chapitre III – Rôles attribués aux complexes Cohésines et Condensines en interphase

En plus de leurs rôles dans la cohésion et la condensation des chromosomes, les Cohésines et les Condensines ont été impliquées dans l'organisation de la chromatine en interphase, la régulation de l'expression génique et la réparation des dommages à l'ADN. Ces observations suggèrent que les complexes SMC pourraient être des enzymes polyvalentes dotées de plusieurs fonctions. Cependant, ce point demeure partiellement ambigu car les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les multiples fonctions supposées des complexes Cohésines et Condensines ne sont pas tous connus, et il est parfois difficile de discriminer un rôle direct d'un potentiel effet indirect causé par une altération dans la structure des chromosomes et/ou leur transmission fidèle.

I. Les Cohésines

1) Rôle dans l'organisation de la chromatine et l'expression génique en interphase

Le rôle des Cohésines ainsi que du complexe de chargement NIPBL dans la régulation de l'expression génique a été suggéré pour la première fois chez *D. melanogaster*, où une réduction du dosage de *Nipped-B* (homologue de *NIPBL*) altère l'expression de gènes à *homeobox* lors du développement (Rollins et al., 1999). *NIPBL* est d'ailleurs le gène le plus souvent muté dans le Syndrome Cornelia de Lange, une maladie qui altère le développement physique et intellectuel (Krantz et al., 2004; Tonkin et al., 2004). Depuis les travaux de Rollins en 1999, de nombreuses études ont observé des défauts dans le niveau d'expression des gènes lorsque les Cohésines sont altérées (pour revue voir (Dorsett and Merkschlager, 2013; Merkschlager and Nora, 2016)). La diminution du niveau d'activité des Cohésines altère le niveau des ARNs aussi dans des cellules qui ne se divisent plus, indiquant par conséquent que les Cohésines jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique pendant l'interphase, indépendamment de la mitose (Schuldiner et al., 2008; Seitan et al., 2011).

Le rôle des Cohésines dans la régulation de l'expression génique est majoritairement supposé dépendre de la capacité de ces complexes à faire des boucles de chromatine, ou à rapprocher

des séquences d'ADN non adjacentes (Dorsett and Merkenschlager, 2013). Par exemple, les Cohésines pourraient favoriser le rapprochement d'un promoteur avec une séquence régulatrice, et la perte de cette interaction pourrait perturber l'expression du gène en aval. Il a en effet été décrit que les Cohésines sont importantes pour permettre des interactions en *cis*, entre des séquences d'ADN distantes, et, ce, à différentes échelles (Degner et al., 2011; Hadjur et al., 2009; Kagey et al., 2010; Seitan et al., 2011). Les Cohésines participent ainsi à la formation et/ou au maintien des domaines topologiques TADs, mais favorisent également des boucles d'ADN au sein de ces domaines (comme les boucles entre enhanceurs et promoteurs) (voir Figure 19).

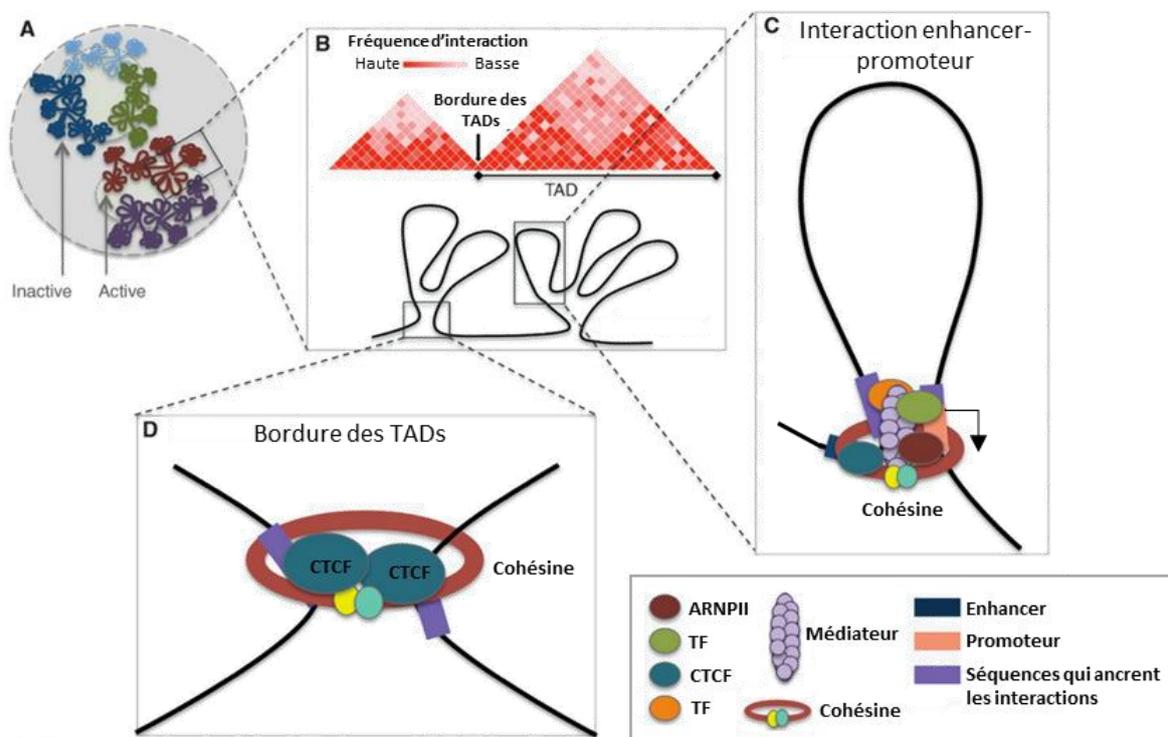


Figure 19 : Schéma des rôles des Cohésines dans l'organisation de la chromatine en interphase. **A-** Organisation des chromosomes dans l'espace nucléaire en territoires chromosomiques et domaines actifs et inactifs. **B-** Représentation virtuelle des interactions 3D du génome au niveau des TADs. **C-D-** Cohésine participe à la fois aux interactions enhanceurs/promoteurs à l'échelle du Kb (**C**), et à la formation et/ou au maintien des TADs à l'échelle du Mb. (**D**). Plusieurs protéines participent également à ces structures comme CTCF ou Médiateur par exemple. Adapté d'après Zhou *et al.* 2016.

Seuls les compartiments, dont l'organisation serait fondée plutôt sur des modifications des nucléosomes, ne semblent pas dépendre des Cohésines. Au contraire, la différenciation du génome en compartiments A et B est renforcée lorsque les Cohésines sont déficientes (Gassler et al., 2017; Rao et al., 2017; Schwarzer et al., 2017; Wutz et al., 2017). Il se pourrait que la

formation locale de boucles par les Cohésines limite la mobilité de l'ADN à l'échelle supérieure et contrebalance les forces de compartimentation du génome. Pratiquement toutes les boucles de chromatine présentes dans les génomes de mammifères disparaissent en l'absence de la sous-unité Scc1 des Cohésines (Gassler et al., 2017; Rao et al., 2017; Wutz et al., 2017). Chez *S. pombe*, des domaines de 50 à 100 kb appelés globules peuvent être comparés aux TADs des mammifères, et sont également dépendants des Cohésines (Mizuguchi et al., 2014). Les bordures des globules contiennent fréquemment des gènes convergents et sont enrichies en Cohésines. Chez *D. melanogaster* cependant, les bordures des TADs ne sont pas enrichies en complexe SMC, mais en protéines insultrices comme CP190 et BEAF, suggérant que le rôle des Cohésines aux TADs n'est pas conservé entre les insectes et les mammifères (Wang et al., 2018).

Les Cohésines sont donc essentielles à la formation et/ou au maintien de boucles de chromatine à différents niveaux, et ont de ce fait un rôle majeur dans l'organisation tridimensionnelle du génome en interphase. De manière frappante, la ré-introduction de Scc1 dans des cellules ayant un niveau réduit de cette protéine, permet la réapparition rapide des boucles de chromatine (Rao et al., 2017). Le processus actif d'extrusion de boucle d'ADN est proposé être le mécanisme par lequel les Cohésines structurent le génome. Récemment, des données sont venues renforcer ce modèle (voir Figure 20) (Gassler et al., 2017; Haarhuis et al., 2017; Vian et al., 2018; Wutz et al., 2017).

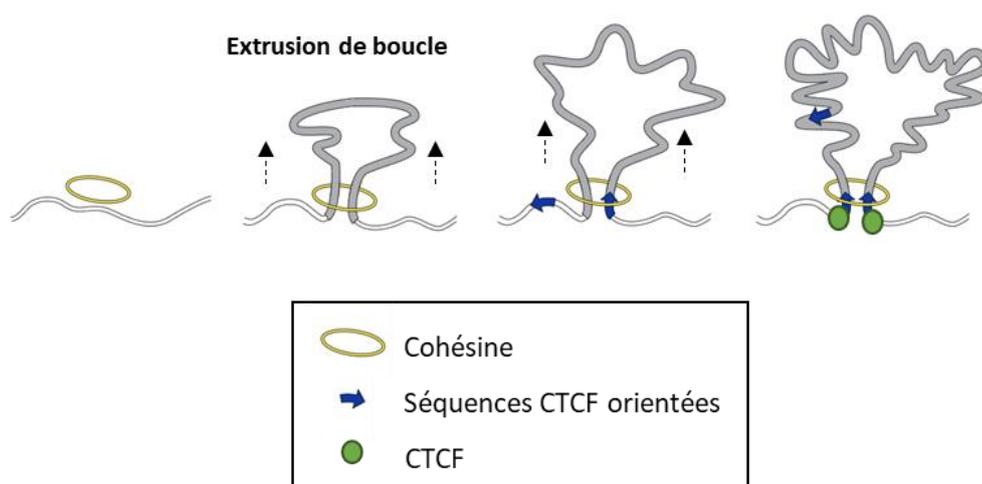


Figure 20 : Hypothèse de formation de boucles par les Cohésines et CTCF. Cohésine formerait une boucle par l'extrusion d'ADN à travers son anneau. L'extrusion continuerait jusqu'à ce que le complexe soit dissocié de l'ADN ou stoppé par CTCF, liée à un motif CCCTC pointant vers l'intérieur de la boucle. Adapté d'après Eagen *et al.* 2018.

En effet, l'absence des facteurs de déchargement WAPL et PDS5, allonge le temps de résidence des Cohésines sur les chromosomes et la taille des boucles de chromatine (Haarhuis et al., 2017; Wutz et al., 2017). Le temps de résidence des Cohésines sur la chromatine déterminerait donc la taille des boucles. Ce résultat est en accord avec la proposition que Cohésine organise le génome en élargissant progressivement des boucles de chromatine. Vian *et al.* précisent également que l'extrusion de boucle par les Cohésines nécessite de l'ATP et ne dépend ni de la réplication ni de la transcription (Vian et al., 2018).

Comment les Cohésines se positionnent-elles sur le génome pour former et maintenir ces boucles de chromatine ? Les Cohésines et le facteur de liaison à l'ADN CTCF (*CCCTC-binding factor*) ont été observés co-occuper des dizaines de milliers de sites le long du génome des mammifères (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Stedman et al., 2008), suggérant l'existence d'un lien fonctionnel entre ces protéines. En effet, il a été observé que CTCF affecte la distribution des Cohésines le long des chromosomes, et non son chargement (Parelho et al., 2008; Wang et al., 2012). Les Cohésines ne semblent pas, à l'inverse, influencer le positionnement de CTCF. Ce dernier se lie à une séquence consensus non palindromique (CCCTC), ce qui lui donne une orientation. Étonnamment, les boucles de chromatine sont pratiquement toutes observées entre des sites CTCF pointant l'un vers l'autre (Rao et al., 2014). Les données actuelles supportent l'idée que les Cohésines forment des boucles de chromatine, jusqu'à ce qu'elles rencontrent un site CTCF pointant vers l'intérieur de la boucle (voir Figure 14). Comment CTCF limite l'activité des Cohésines n'est pas bien connu. CTCF pourrait former une barrière physique, interagir directement avec les Cohésines ou ralentir localement l'activité d'extrusion de boucles d'ADN des Cohésines. Les sous-unités SA1 et SA2 des Cohésines peuvent interagir physiquement avec la partie C-terminale de CTCF *in vitro* et pourraient participer à leur positionnement *in vivo* (Xiao et al., 2011). Wutz *et al.* ont montré récemment que PDS5, à la différence de WAPL, est requise pour maintenir l'intégrité des barrières CTCF (Wutz et al., 2017). Bien que l'action de PDS5 dans ce processus ne soit pas démontrée, cette observation semble compatible avec une régulation de l'activité de Cohésine par une modulation locale de sa liaison à l'ADN.

Si les sites forts d'association des Cohésines à la chromatine coïncident souvent avec la présence de CTCF, des sites plus faibles de Cohésines coïncident souvent avec des enhanceurs ou des promoteurs actifs de gènes (Faure et al., 2012; Kagey et al., 2010; Schmidt et al., 2010).

En ces sites, les Cohésines co-localisent avec le facteur de chargement Nipbl, des facteurs de transcription et des composants du complexe Médiateur. Ce dernier est impliqué dans plusieurs étapes du processus d'initiation de la transcription, où il facilite notamment les interactions entre les enhanceurs et la machinerie de transcription (voir chapitre IV de cette introduction). Seule la moitié des sites liés par le Médiateur sont aussi liés par Nipbl, indiquant que le Médiateur, seul, n'est pas suffisant pour recruter Nipbl et les Cohésines (Kagey et al., 2010).

L'existence de sites occupés par les Cohésines en l'absence de CTCF suggère que ces dernières pourraient agir indépendamment de CTCF. Il a été montré dans des cellules MCF-7 de cancer du sein que les Cohésines occupent les gènes régulés par l'*Œstrogen Receptor alpha* (ER α), indépendamment de CTCF. De plus, en l'absence de Cohésine fonctionnelle, ces cellules rentrent de manière aberrante dans le cycle cellulaire après induction par des œstrogènes, suggérant une transcription anormale des gènes régulés par les ER (Schmidt et al., 2010). Une autre étude conclue également à une contribution de Cohésine à l'activation de la transcription des gènes régulés par les œstrogènes, au moins en partie en stabilisant la boucle liant les enhanceurs aux promoteurs (Li et al., 2013). Un article de l'équipe d'Ana Losada, actuellement dans bioRxiv, propose que les Cohésines SA1 et SA2 jouent des rôles distincts dans l'organisation tridimensionnelle du génome. Cohésine-SA1 participerait à la stabilisation et la préservation des TADs en lien avec CTCF, tandis que Cohésine-SA2, plus dynamique, serait importante pour les contacts enhanceurs-promoteurs intra-TADs, indépendamment de CTCF (Kojic et al., 2017).

Indépendamment de toute considération quant à la formation de boucles de chromatine, une étude menée chez *S. pombe* a proposé un rôle pour Cohésine dans la terminaison de la transcription au niveau de gènes convergents (Gullerova and Proudfoot, 2008). Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, Cohésine est enrichie au niveau de régions intergéniques flanquées par des gènes convergents. Les auteurs proposent que Cohésine agisse en ces sites comme un butoir pour l'ARN polymérase II, favorisant ainsi la terminaison de la transcription. Le mécanisme proposé met également en jeu la formation transitoire d'hétérochromatine, en phase G2, menant au recrutement de la protéine Swi6^{HP1} et finalement de Cohésine (Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002). Une autre étude a observé l'accumulation d'ARN étendus en 3' au niveau de gènes convergents dans un mutant *rad21-k1* de cohésine, rappelant un

défaut de terminaison de la transcription (Mizuguchi et al., 2014). A ma connaissance, les Cohésines n'ont pas été impliquées dans la terminaison de la transcription chez d'autres organismes jusqu'à présent. La conservation évolutive ou non de ce rôle de Cohésine demeure donc une question ouverte.

2) Rôle des Cohésines dans la réparation des dommages à l'ADN

Les Cohésines ont aussi été impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN. La première observation impliquant les Cohésines dans le maintien de l'intégrité du génome en réponse aux dommages à l'ADN a été réalisée chez *S. pombe* (Birkenbihl and Subramani, 1992). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'un mutant de la sous-unité Rad21 de Cohésine est hypersensible aux irradiations γ qui induisent des cassures doubles brin dans l'ADN (DSBs). Le nom de cette sous-unité Rad21 de Cohésine est d'ailleurs dérivé de cette sensibilité aux radiations. Depuis, d'autres publications ont renforcé cette observation et permis d'établir que les Cohésines ont un rôle important dans la réparation des dommages à l'ADN. En assurant la proximité physique entre les molécules d'ADN sœurs, les Cohésines, tout comme le facteur Eco1 qui établit la cohésion, permettent la réparation des DSBs par recombinaison homologue. En l'absence de dommages à l'ADN, les Cohésines chargées sur la chromatine en phase G2 ne sont pas cohésives. Cependant, il a été observé que les Cohésines peuvent devenir cohésives après la phase de réplication dans le cas d'un dommage à l'ADN, dans un processus appelé néo-cohésion (voir figure 21) (Ström et al., 2004).

De manière étonnante, cette nouvelle cohésion ne serait pas établie seulement aux sites de dommages à l'ADN, mais tout le long du génome et de manière dépendante d'Eco1 (Ünal et al., 2007). La réparation des dommages à l'ADN requiert à la fois la cohésion établie en phase S, mais aussi cette nouvelle cohésion dépendante des DSBs. En renforçant la cohésion au niveau du site de dommage, les Cohésines sont supposées faciliter la recombinaison homologue entre les deux chromatides sœurs. Comment les Cohésines sont-elles ciblées aux sites du dommage et comment la cohésion « non-canonique » est-elle établie en dehors de la phase S ? Le chargement des Cohésines aux DSBs a été observé dépendre de Scc2/Scc4 mais aussi de la phosphorylation de l'histone H2AX (γ -H2AX) par les kinases Mec1 et Tel1 (Ünal et al., 2004). Le complexe SMC-like MRX qui reconnaît les DSBs, promeut également le

recrutement des Cohésines en ces sites, de manière indépendante de la voie Mec1/Tel1 (Ünal et al., 2004).

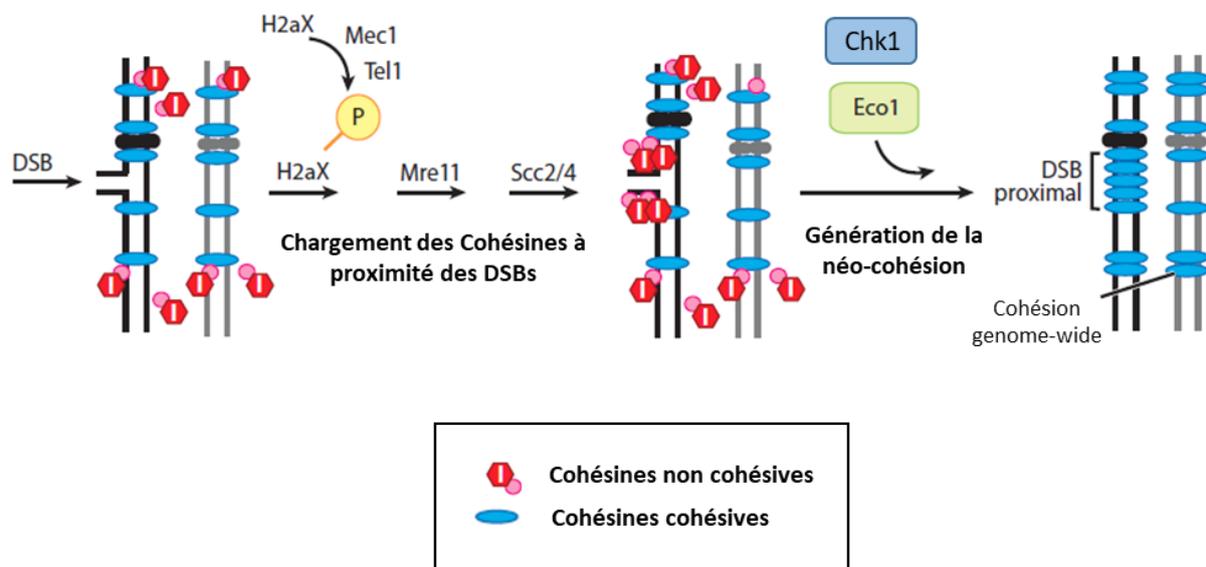


Figure 21 : Schéma du rôle des Cohésines dans la réparation des dommages à l'ADN. Lors d'un DSBs, les Cohésines sont recrutées au site du dommage et rendues cohésives par Eco1 de manière non canonique. Voir texte pour détail. Adapté d'après Onn *et al.* 2008.

Concernant la néo-cohésion, il a été montré chez *S. cerevisiae* que la phosphorylation de Scc1 sur la serine Ser83 par la kinase Chk1 (*Checkpoint kinase 1*) est essentielle pour établir cette nouvelle cohésion dépendant des DSBs, en dehors de la réplication (Heidinger-Pauli et al., 2008). Cette phosphorylation semble amorcer ensuite l'acétylation de Scc1 par Eco1 sur les lysines K84 et K210, ce qui rend les Cohésines cohésives (Heidinger-Pauli et al., 2009). La néo-cohésion déclenchée en réponse à un dommage dans l'ADN est donc établie par le biais d'une voie non-canonique, distincte de celle observée en phase S.

En plus de ce rôle dans la réparation des DSBs, les Cohésines ont également été impliquées dans la protection des fourches de réplication bloquées. Le mécanisme d'action des Cohésines aux fourches de réplication est décrit dans la revue rédigée par Villa-Hernández en 2018 (Villa-Hernández and Bermejo, 2018).

II. Les Condensines

Plusieurs études ont impliqué les Condensines dans l'organisation de la chromatine en interphase, dans la régulation de l'expression génique et dans la réparation des dommages à l'ADN. Ces résultats laissent penser que ce sont des complexes polyvalents, comme les Cohésines. Cependant, à l'inverse des cohésines, les études sur les rôles interphasiques des Condensines sont peu nombreuses et les mécanismes beaucoup moins clairs.

1) Rôle dans la réparation des dommages à l'ADN

Plusieurs études ont impliqué les Condensines dans la réponse aux lésions de l'ADN. Chez *S. pombe*, Aono *et al.* ont isolé un mutant thermosensible de la sous-unité kleisine de Condensine, appelé *cond2-1*, qui présente des défauts de ségrégation des chromosomes mitotiques à température restrictive, mais est également sensible à des agents génotoxiques à température permissive (Aono *et al.*, 2002). Dans ce mutant, les lésions à l'ADN induites par les UVs ne sont pas réparées. De même, les cellules cultivées en présence de 2 mM d'hydroxyurée (HU) subissent une perte de viabilité. Lors d'un traitement à l'HU, la kinase Cds1 du point de contrôle de la réplication est normalement activée (Lindsay *et al.*, 1998). Or dans les cellules *cond2-1*, l'activation de cette kinase est sensiblement réduite, suggérant que Condensine est requise à son activation en présence d'HU. De la même manière, la mutation *cut14-Y1* de la sous-unité Cut14/SMC2 induit des défauts de réparation des dommages à l'ADN à température permissive, ainsi que des défauts de condensation des chromosomes à température restrictive chez *S. pombe* (Akai *et al.*, 2011). Ces défauts sont allégés par une mutation de la protéine RPA (*replication protein A*) liant l'ADN simple brin, et les analyses *in vitro* montrent que Condensine et RPA se lient de manière antagoniste à l'ADN simple brin. Les auteurs proposent que les Condensines aient pour fonction de réhybrider l'ADN double brin après la réparation d'un dommage à l'ADN, en vue de la mitose. Cette hypothèse reprend l'idée avancée par Mitsuhiro Yanagida que, par son action de renaturation de l'ADN, Condensine permettrait l'élimination des protéines et des structures chromatiniennes qui bloqueraient la compaction des chromosomes en mitose (Yanagida, 2009).

Chez les vertébrés, Condensine I est recrutée au niveau des dommages à l'ADN de type simple brin, où elle interagit avec la poly (ADP-ribose) polymérase I PARP-1 (Heale *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2011). Il a aussi été observé que Condensine II maintient l'intégrité structurale des

chromosomes après un stress répliatif (Ono et al., 2013), et que Condensine est recrutée aux fourches de réplication bloquées chez *S. cerevisiae* (D'Ambrosio et al., 2008a). Cependant, le mécanisme de recrutement des Condensines aux fourches arrêtées ainsi que leur rôle en ces sites demeurent flous. De manière similaire aux Cohésines, Condensine pourrait stabiliser les fourches de réplication bloquées, et faciliter leur redémarrage.

Le rôle exact des Condensines dans la réparation des dommages à l'ADN reste énigmatique. Il sera intéressant de savoir dans quelle mesure l'activité d'extrusion de boucles d'ADN des Condensines est pertinente, ou non, vis-à-vis de la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN.

2) Rôle des Condensines dans l'organisation de la chromatine en interphase

A l'exception de la Condensine de la levure bourgeonnante, les complexes Condensine I sont majoritairement exclus du noyau en interphase. Condensine II qui est nucléaire tout au long du cycle cellulaire pourrait par contre organiser le génome en 3D en interphase, à l'instar des Cohésines. Chez *D. melanogaster*, il a été suggéré que Condensine II pourrait promouvoir la formation des territoires chromosomiques des chromosomes polytènes en interphase en compactant la chromatine (Bauer et al., 2012). Il est à noter que l'existence d'un complexe Condensine II à proprement parlé n'est pas prouvée chez *D. melanogaster*, chez laquelle une protéine à HEAT repeats du complexe II est semble-t-il manquante (Herzog et al., 2013). Chez *S. pombe*, bien que Condensine soit très majoritairement cytoplasmique en interphase, le complexe a aussi été impliqué dans l'association intra-chromosomique de gènes en interphase, ce qui d'ailleurs favoriserait l'organisation de territoires chromosomiques (Iwasaki et al., 2016). Il a aussi été observé que la réduction du niveau de SMC2 (commun aux complexes Condensine I et II) dans des cellules ESCs (*embryonic stem cells*) de souris diminue le volume occupé par la chromatine en interphase, suggérant un rôle pour les Condensines dans l'organisation du génome à cette phase du cycle cellulaire (Fazio and Panning, 2010).

Les Condensines ne sont pas enrichies aux sites de liaison de CTCF (Downen et al., 2013). En revanche, Condensine II co-localise avec le facteur de transcription TFIIIC au niveau des bordures des TADs chez la mouche *D. melanogaster*, chez la souris et dans des cellules humaines (Bortle et al., 2014; Yuen et al., 2017). De façon cohérente avec un rôle pour

Condensine II dans l'organisation des domaines topologiques, la déplétion de la kleisine CAP-H2 fragilise les bordures des TADs et corrèle avec une augmentation de la fréquence des interactions entre enhanceurs et promoteurs chez *D. melanogaster* (Li et al., 2015a). Dans les cellules ESCs murines, les clusters de gènes histones sont trouvés en bordure de TADs et ces clusters interagissent fréquemment d'une manière dépendante du Condensine II. De façon concordante avec un rôle local, TFIIC et Condensine II sont enrichies au niveau des clusters de gènes histones, et la réduction du dosage de NCAPH2 par siARN induit la diminution du niveau des ARN histones (Yuen et al., 2017). Condensine II pourrait donc favoriser l'interaction et aussi l'expression correcte des clusters de gènes histones chez les mammifères. Cette étude laisse penser que Condensine II pourrait fonctionner dans l'organisation spatiale du génome en interphase, mais aussi dans le contrôle de l'expression génique, à la manière des Cohésines. Chez les levures aussi les Condensines ont été supposées participer à l'organisation spatiale du génome, notamment par leur action de regroupement de sites chromosomiques distants (Haeusler et al., 2008; Iwasaki et al., 2010). Les gènes qui fonctionnent dans un même processus sont souvent trouvés regroupés dans le volume du noyau, même s'ils sont dispersés le long du génome (Schoenfelder et al., 2010). L'exemple le plus frappant est celui des nucléoles qui s'assemblent à partir de régions chromosomiques appelées NORs (*Nucleolus organiser regions*) dispersées sur cinq chromosomes chez l'Homme. Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, les nombreux gènes codant les ARNt sont dispersés dans le génome et regroupés dans le volume nucléaire ; à proximité du nucléole chez la levure bourgeonnante et à proximité des centromères chez la levure à fission. Ce regroupement, qui a été montré dépendre de Condensine dans ces deux espèces, participerait à l'organisation globale du génome dans le noyau (Haeusler et al., 2008; Iwasaki et al., 2010). Chez *S. cerevisiae*, l'interaction physique de Condensine avec le facteur de transcription de l'ARNPIII, TFIIC, est pensée permettre la localisation de Condensine aux gènes ADNt, et par extension promouvoir leur regroupement dans le noyau. Une étude récente chez cette levure n'a cependant pas pu observer de contact préférentiel entre des paires d'ADNt par la méthode du Hi-C (Schalbetter et al., 2017). Ce point nécessite donc vérification. Chez *S. pombe*, l'interaction de Condensine avec une sous-unité de l'ARNPIII est supposée permettre la localisation de Condensine au niveau des séquences ADNt, et faciliter leur regroupement dans le volume nucléaire. Dans cette étude, les auteurs rapportent aussi que le mutant de Condensine *cut3-477* (muté pour la sous-unité SMC4) montre une légère augmentation du niveau d'expression d'ARNt

rapporteurs, suggérant que le regroupement des ADNt à proximité des centromères grâce à Condensine pourrait réguler leur niveau d'expression (Iwasaki et al., 2010). Les rétrotransposons *Tf* à LTRs (Long terminal repeats) ont aussi été montrés se regrouper à proximité des centromères de façon dépendante de Condensine chez *S. pombe* (Tanaka et al., 2012). La protéine Abp1 (aussi appelé Cbp1) de type CENP-B permettrait le recrutement du complexe Ku au niveau des rétrotransposons *Tf*, lequel recruterait ensuite Condensine, promouvant ainsi le regroupement des rétro-transposons à proximité des centromères. Cependant, chez *S. pombe*, Condensine est très majoritairement cytoplasmique en interphase, et son activité est régulée au cours du cycle cellulaire, notamment via des phosphorylations activatrices en mitose par les kinases CDK1 et Aurora-B, ce qui pose la question des mécanismes par lesquels Condensine assurerait les regroupements des séquences répétées d'ADN en interphase.

3) Rôle dans la régulation de l'expression génique

L'évidence la plus forte et la plus ancienne liant un complexe Condensine à la régulation de l'expression génique, est celle impliquant Condensine I^{DC} dans la compensation de dosage génique chez le ver *C. elegans* (Ercan and Lieb, 2009; Meyer, 2010). Condensine I^{DC} au sein du complexe DCC, réduit par deux l'expression des gènes situés sur les chromosomes X des vers hermaphrodites (XX). Le mécanisme de cette répression tient en la réduction du recrutement de l'ARNPII aux promoteurs des gènes liés au X, en lien avec une restructuration des chromosomes X (Kruesi et al., 2013). Suite à cette observation, de nombreuses autres études effectuées chez un grand nombre d'espèces, ont cherché à déterminer si, à l'instar de Condensine I^{DC}, et des Cohésines, les complexes canoniques Condensines I et II jouaient également un rôle dans le contrôle de l'expression génique. Des changements dans les niveaux à l'équilibre des ARNs cellulaires après inactivation ou déplétion des Condensines I et/ou II ont été observés depuis la levure *S. cerevisiae* jusque chez l'Homme, suggérant un rôle important, conservé au cours de l'évolution, pour les Condensines canoniques dans le contrôle de l'expression génique. Ces multiples études sont résumées ci-dessous.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les mutants thermosensibles *yca4-1* et *yca4-2*, affectés pour une sous unité régulatrice HEAT de Condensine, montrent une dé-répression de l'expression des

cassettes silencieuses du type sexuel, ainsi qu'une dé-répression de certaines répétitions d'ADNr lors de la constriction du nucléole en condition de privation de nutriments (Bhalla et al., 2002; Wang et al., 2016). Chez *S. pombe*, la mutation *cut3-477* augmente l'expression d'ARNt (Iwasaki et al., 2010). Toujours chez *S. pombe*, Condensine a été impliquée dans la réduction au silence (*silencing*) de gènes rapporteurs insérés dans les répétitions hétérochromatiques qui flanquent les centromères (He et al., 2016). Une dé-répression du *silencing* imposée par l'environnement hétérochromatique est observée chez le mutant *cut3-477*. Chez *C. elegans*, Condensine II aurait également un rôle important dans la répression de l'expression des gènes. Un mutant nul de la kleisine de Condensine II (*kle-2*) montre une augmentation du niveau des ARNs d'environ 250 gènes et une diminution du niveau des ARNs d'une centaine de gènes (Kranz et al., 2013). Cependant, la localisation de Condensine II sur les chromosomes ne corrèle pas avec celle des gènes dérégulés. Chez *D. melanogaster*, la sous-unité Barren de Condensine I a été impliquée dans la répression du gène homéotique *fab-7* (Lupo et al., 2001), et la sous-unité dCAP-D3 de Condensine II, à l'inverse, favoriserait l'expression de gènes codant des peptides anti-microbiens (Longworth et al., 2012). Les mécanismes exacts de régulation de l'expression des gènes par les Condensines dans ces différents contextes chromatiniens ne sont cependant pas élucidés.

Dans les lymphocytes T de souris portant un allèle défectueux de la sous-unité CAP-H2 de Condensine II, il a été observé une décompaction de la chromatine qui corrèle avec une augmentation de l'accessibilité du facteur de transcription STAT5 aux gènes de prolifération et l'augmentation de leur expression (Rawlings et al., 2011). Cette étude suggère que Condensine II pourrait réprimer l'expression des gènes activés par STAT5 par son activité de condensation des chromosomes. La démonstration de ce mécanisme n'a cependant pas été fournie.

Plusieurs publications impliquent également les Condensines dans l'activation de la transcription. Dans les cellules DT40 de poulet, Condensine I a été observée associée aux promoteurs des gènes fortement transcrits en mitose, en accord avec ce qui est observé dans d'autres espèces. Kim *et al.* ont identifié plus de 2000 sites d'association chromosomique de Condensine I (Kim et al., 2013). Les auteurs ont également observé qu'une déplétion de la sous-unité régulatrice CAP-H de Condensine I, préalablement à la progression des cellules en mitose, s'accompagne lors de la phase G1 suivante d'une diminution du niveau d'expression

de 17 gènes dont les promoteurs sont occupés par Condensine I en mitose. Chez les vertébrés, la transcription est globalement réduite lors de la mitose, et doit être réactivée en interphase. Les auteurs proposent que Condensine I, fixée aux promoteurs de ces gènes, pourrait contribuer à leur réactivation rapide en sortie de mitose, et ainsi contribuer à préserver la mémoire de la transcription durant la mitose (*bookmarking*). Dans le cadre de ce modèle, on peut toutefois s'interroger quant au faible nombre de gènes affectés par la perte de Condensine I en regard du nombre de sites occupés en mitose.

Dans des cellules embryonnaires de souris (mESCs), Condensine II ainsi que Cohésine sont retrouvées enrichies au niveau de super-enhancers (larges clusters d'enhancers), où elles stimuleraient l'expression de gènes identitaires, *i.e.* responsable de la définition du type cellulaire, placés sous le contrôle de ces régions régulatrices (Downen et al., 2013). Dans des cellules humaines de cancer du sein (MCF7), Condensine II, mais aussi Condensine I, sont retrouvées, en interphase, associées aux enhancers des gènes induit par le β -oestradiol, où elles permettraient la formation de boucle enhancer-promoteur pour induire l'expression des gènes en aval (Li et al., 2015b). Ce mécanisme fait penser à ce qui a été décrit pour les Cohésines et la régulation de l'expression génique. Une étude précédente du même groupe a d'ailleurs montré un comportement similaire pour Cohésine, qui est également trouvée enrichie aux enhancers de gènes induits par le β -oestradiol et permet l'activation de la transcription des mêmes gènes en stabilisant la boucle enhancer-promoteur (Li et al., 2013). Pour finir, comme évoqué dans le paragraphe précédent, Condensine II semble nécessaire à la transcription correcte de cluster de gènes d'histones à la bordure des TADs, chez la souris et chez l'Homme (Yuen et al., 2017).

Ainsi, plusieurs études réalisées depuis les levures jusque chez l'Homme impliquent les Condensines canoniques (Condensine I et II) dans le contrôle de l'expression génique, suggérant la possibilité d'un rôle conservé au cours de l'évolution. Cependant, à l'inverse des Cohésines, les mécanismes moléculaires par lesquels les Condensines prennent part au contrôle de l'expression des gènes restent vagues, sinon totalement énigmatiques.

Chapitre IV- L'expression génique, focus sur le cycle de la transcription

Afin d'aborder la question du rôle des Condensines dans le contrôle de l'expression des gènes, il est nécessaire de rappeler au préalable les grands principes de l'expression génique. L'expression génique désigne l'ensemble des processus complexes qui permettent à l'information contenue dans une séquence d'ADN d'être lue pour donner lieu à la synthèse d'une molécule biochimique qui peut être soit un ARN, soit une protéine, selon le type de gène concerné (codant ou non-codant). Les grandes étapes de l'expression d'un gène codant sont la transcription de l'ADN en ARN pré-messager (pré-ARNm), la maturation en ARNm, l'export de l'ARNm dans le cytoplasme et la traduction en protéines. Ces étapes forment un continuum, chacune d'elle étant liée aux suivantes et pouvant les influencer. Plusieurs processus ont d'ailleurs lieu de manière simultanée. Ces différentes étapes fondamentales et très conservées, sont régulées de manière fine pour permettre l'adaptation du programme génétique aux besoins de chaque cellule, et pour éviter la conséquence délétère d'une dérégulation de l'expression génique. En effet, la dérégulation de l'expression génique peut être toxique pour la cellule et mener à de nombreuses maladies dont le cancer.

Dans un souci de parcimonie et de pertinence, cette partie de l'introduction sera restreinte à une présentation générale des concepts de base de la transcription.

I. Le cycle de la transcription

Le cycle de la transcription est composé de trois phases séquentielles connectées que sont l'initiation, l'élongation et la terminaison de la transcription (Figure 22). Le facteur central du processus transcriptionnel est l'ARN polymérase ADN-dépendante, laquelle fonctionne entourée de nombreux cofacteurs, essentiels à la progression de la transcription dans le temps (initiation, élongation et terminaison) et dans l'espace (promoteur, corps du gène et terminateur). Cette complexité est, sans surprise, fondée sur de multiples régulations.

Les ARN polymérases. Chez les eucaryotes, trois ARN polymérases participent à la transcription. L'ARN polymérase I (ARNPI) transcrit la plupart des ARNs ribosomiaux (ARNr 5.8S, 18S, 28S), l'ARN polymérase III (ARNPIII) transcrit les ARNs de transfert (ARNt), l'ARNr 5S

et des petits ARNs comme le snARN U6. L'ARN polymérase II dont il sera question ici, transcrit les ARN messagers (ARNm) codant les protéines, mais aussi de nombreux ARNs non codants tels que les petits ARNs nucléaires et nucléolaires, ainsi que des ARNs cryptiques. En effet, les récentes avancées du séquençage des ARNs ont permis la détection de nouveaux transcrits de l'ARNPII, qui sont présents en faible quantité, notamment à cause d'une rapide dégradation par le complexe de l'ARN-exosome. Ce complexe sera présenté en détail dans la partie V de ce manuscrit.

L'ARNPII est constituée de douze sous-unités (Rpb1 à Rpb12) et présente la particularité de posséder un domaine carboxy-terminal (CTD) flexible au niveau de sa sous-unité Rpb1. Ce domaine est composé de répétitions de l'heptapeptide YSPTSPS, qui peuvent être modifiées par phosphorylation et déphosphorylation sur différents résidus de manière dynamique et régulée. La grande combinatoire des modifications post-traductionnelles du CTD génère un code très complexe, qui rappelle le code histone, et sous-tend le recrutement de cofacteurs spécifiques à différents temps du cycle transcriptionnel (Buratowski, 2003; Harlen and Churchman, 2017).

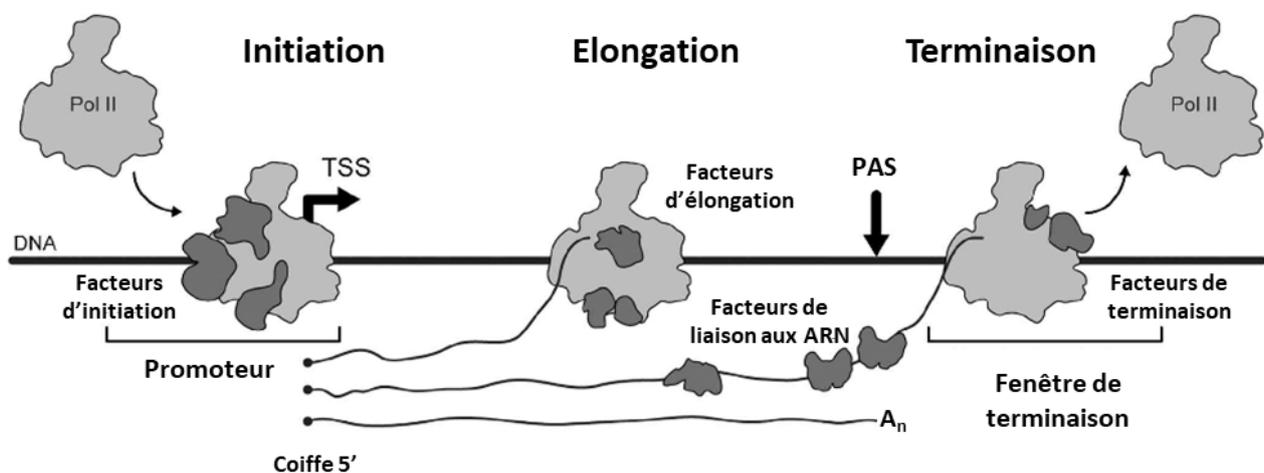


Figure 22 : Représentation schématique du cycle de la transcription. L'ARNPII (Pol II) se lie au promoteur d'un gène au niveau du TSS (Transcription Start Site), à l'aide de facteurs d'initiation de la transcription. Le tout, forme le complexe de Pré-initiation (PIC). Lors de l'élongation, l'ARN naissant est étendu. Le site de polyadénylation (PAS) marque le site de fin de l'unité transcriptionnelle où l'ARN est clivé. L'ARNPII est dissociée de l'ADN en aval du PAS et recyclée pour un nouveau cycle de transcription. Simultanément à sa transcription, l'ARN naissant subit une maturation et s'associe à des protéines de liaison aux ARNs pour former une particule ribonucléique qui sera exportée vers le cytoplasme. Adapté d'après Hantsche *et al.* 2016.

1) Initiation de la transcription

L'initiation de la transcription est un processus en plusieurs étapes qui nécessite le recrutement de l'ARNPII au promoteur d'un gène, l'ouverture du duplex d'ADN au niveau du site d'initiation de la transcription ou TSS (*Transcription Start Site*), et la formation des premiers liens phosphodiester entre les ribonucléotides qui composeront la molécule d'ARN. L'initiation de la transcription est un processus complexe, très régulé. Elle requiert la présence de facteurs généraux de la transcription (GTFs) qui vont positionner l'ARNPII au promoteur des gènes, l'assister pour trouver le site TSS, et faciliter l'ouverture du duplex d'ADN et le début de la synthèse de l'ARN. Le modèle classique est que le facteur de transcription II D (TFIID) ou sa sous-unité liant la boîte TATA (TBP) se lie à la séquence promotrice, et à TFIIIB qui recrutera l'ARNPII et TFIIIF (Buratowski et al., 1989). TFIIIE et TFIIH s'associent ensuite à l'assemblage pour former le Complexe de Pré-Initiation ou PIC au promoteur. Le duplex d'ADN situé au niveau du promoteur est ensuite ouvert de manière ATP-dépendante, menant à la formation d'une « bulle » transcriptionnelle et permettant l'initiation de la synthèse de l'ARN.

En plus des facteurs généraux de transcription, le recrutement de l'ARNPII aux promoteurs des gènes est grandement influencé par la présence d'activateurs ou de répresseurs de la transcription. Ces facteurs modulent l'assemblage et l'activité de la machinerie de transcription soit par interaction protéique directe, soit au travers d'effets sur la chromatine (remodelage de la structure, modifications d'histones). En effet, les facteurs de transcription sont incapables de se lier aux promoteurs des gènes si l'ADN est enroulé autour de nucléosomes. Des complexes de remodelage de la chromatine comme SWI/SNF et RSC permettent de déplacer ou d'enlever les nucléosomes des régions promotrices, pour former les NDRs et y permettre la fixation des facteurs de transcription et l'initiation de la transcription (pour revue voir (Lorch and Kornberg, 2015)).

Des régions régulatrices proximales ou plus distales (les enhanceurs) permettent l'association de facteurs de transcription spécifiques activateurs ou répresseurs. Les fonctions de ces facteurs de transcription sont modulées plus en profondeur par des co-régulateurs comme le Médiateur. Le Médiateur est un co-activateur central, nécessaire à la transcription de la majorité des gènes. Il permet notamment de lier fonctionnellement les facteurs de transcriptions situés sur les séquences régulatrices avec la machinerie de la transcription

(l'ARNPII et les GTFs) et promeut l'assemblage du PIC au promoteur cœur (Figure 23) (pour revue voir (Eychenne et al., 2017)).

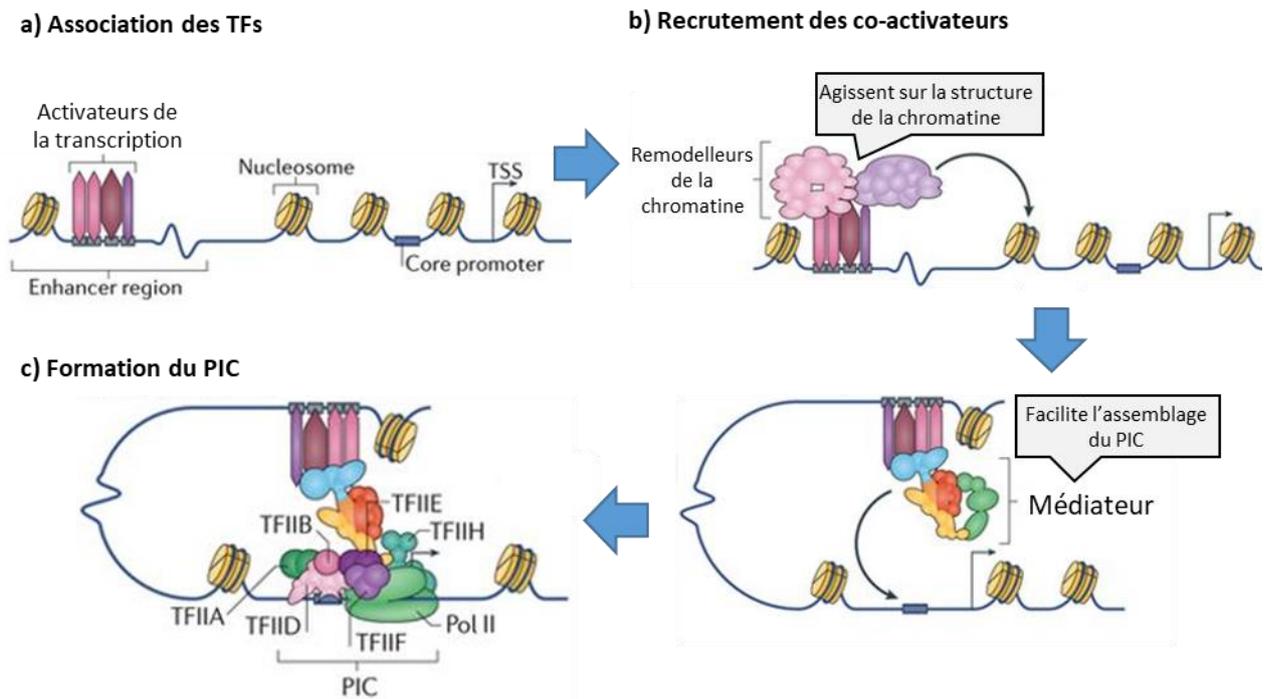


Figure 23 : Schéma des principales étapes de l'initiation de la transcription par l'ARNPII dans le contexte de la chromatine. La taille des facteurs ne reflète pas les dimensions réelles. Adapté d'après Soutourina *et al.* 2018.

2) Elongation de la transcription

Même après que les premiers ribonucléotides ont été incorporés, le PIC demeure fonctionnellement instable et n'est pas encore engagé dans la phase processive d'élongation. Pour cela, l'ARNPII doit quitter (échapper) le promoteur. Le CTD de l'ARNPII joue un rôle central dans l'échappement du promoteur et l'élongation. Le CTD est majoritairement déphosphorylé préalablement à l'association de l'ARNPII au promoteur. En phase d'initiation, il est phosphorylé sur la serine 5 par la sous-unité Cdk7 de TFIIH, ce qui favoriserait l'échappement du promoteur par l'ARNPII. Après la synthèse d'un ARN d'environ 20 ribonucléotides, l'extrémité 5' de l'ARN naissant va être modifiée par l'ajout d'une coiffe 7-methyl-guanosine. Cette étape co-transcriptionnelle est la première réaction de maturation de l'ARN. Elle est cruciale à la stabilité du transcrit et est donc régulée. Après l'échappement du promoteur, l'ARNPII stoppe généralement sa progression à proximité du site TSS dans de

nombreux gènes dans les cellules de mammifères, entrant dans un état dit de « pause » (Core and Lis, 2008). Cette pause proche du promoteur a lieu principalement chez les métazoaires, mais a également été observée chez *S. pombe* (Booth et al., 2016). En permettant un contrôle du passage de l'initiation à l'élongation, la pause des polymérases permet un niveau de régulation supplémentaire de l'expression génique. L'élongation processive sera ensuite atteinte grâce à la phosphorylation de la serine 2 du CTD de l'ARNPII, notamment par la kinase PTEF-b/Cdk9. La phosphorylation des Ser2 du CTD augmente progressivement du site d'initiation jusqu'au site de terminaison de la transcription où cette modification atteint son point culminant. L'ARNPII en cours d'élongation va interagir avec des facteurs additionnels d'élongation, qui augmentent sa processivité, modifient le paysage chromatinien et régulent les processus concomitants de maturation des ARNs (pour revue voir (Chen et al., 2018)). Un événement de maturation qui a lieu principalement de manière co-transcriptionnelle, lors de l'élongation, est l'épissage des ARN (Brugiolo et al., 2013). La machinerie d'épissage est recrutée sur l'ARN naissant, et il a été montré que la vitesse d'élongation (ainsi que la pause de l'ARNPII) influencent ce recrutement et donc l'épissage. Il existe également un couplage avec les événements de maturation 5' et 3' (pour revue voir (Herzel et al., 2017)). L'image qui émerge est donc celle d'une régulation complexe, achevée tant au niveau de l'initiation que de l'élongation de la transcription, laquelle impacte la dynamique de l'enzyme ARNPII et, par extension, les activités de modifications co-transcriptionnelles des ARNs naissants, qui lui sont associées.

3) Terminaison de la transcription

La dernière étape de la transcription est celle de la terminaison. Il s'agit du processus par lequel l'ARNPII libère l'ARN transcrit, et quitte la matrice ADN à la fin de la séquence transcriptionnelle. La terminaison de la transcription est essentielle, elle permet le recyclage de la polymérase et prévient l'interférence avec les unités transcriptionnelles situées en aval du terminateur transcrit. En effet, un défaut de terminaison de la transcription induit la production d'ARN étendus en 3' ou ARN *read-through*, qui peuvent envahir le gène situé en aval dans la molécule d'ADN, et perturber sa transcription (Proudfoot 1986). De plus, les ARN étendus en 3' peuvent être toxiques pour la cellule. La terminaison doit donc être précise dans le temps et dans l'espace. C'est pourquoi cette ultime étape est la cible de régulations

importantes (Proudfoot, 2016). La terminaison de la transcription est fonctionnellement liée à une étape de maturation de l'ARN qui permet le clivage de l'ARN pré-messager naissant par une endonucléase, ce qui libère une extrémité 3'OH libre à laquelle s'ajoute une queue poly(A) synthétisée par une poly(A) polymérase (PAP).

Chez les mammifères, quatre complexes forment l'unité de base de la machinerie de clivage et de polyadénylation : les complexes CPSF, CstF, CFI et CFII. Le clivage et la polyadénylation ont lieu suite à la reconnaissance de séquences spécifiques situées en 3' des gènes, appelée PAS pour *polyadenylation signal*. La séquence PAS transcrite dans l'ARN naissant est directement reconnue par la machinerie de clivage et de polyadénylation. Le clivage apparaît comme une réaction bruitée qui peut générer plusieurs isoformes de transcrits. Beaucoup de gènes possèdent plusieurs séquences PAS en position 3', et l'on observe la transcription d'isoformes de polyadénylation alternatives (APA) de tailles variables (Tian and Manley, 2017).

La terminaison de la transcription, c'est-à-dire l'arrêt de l'ARNPII active, a lieu en aval du signal PAS. Deux mécanismes ont été proposés pour rendre compte de la terminaison de la transcription aux gènes codants : le modèle *torpedo* et le modèle allostérique (Figure 24).

Terminaison de la transcription

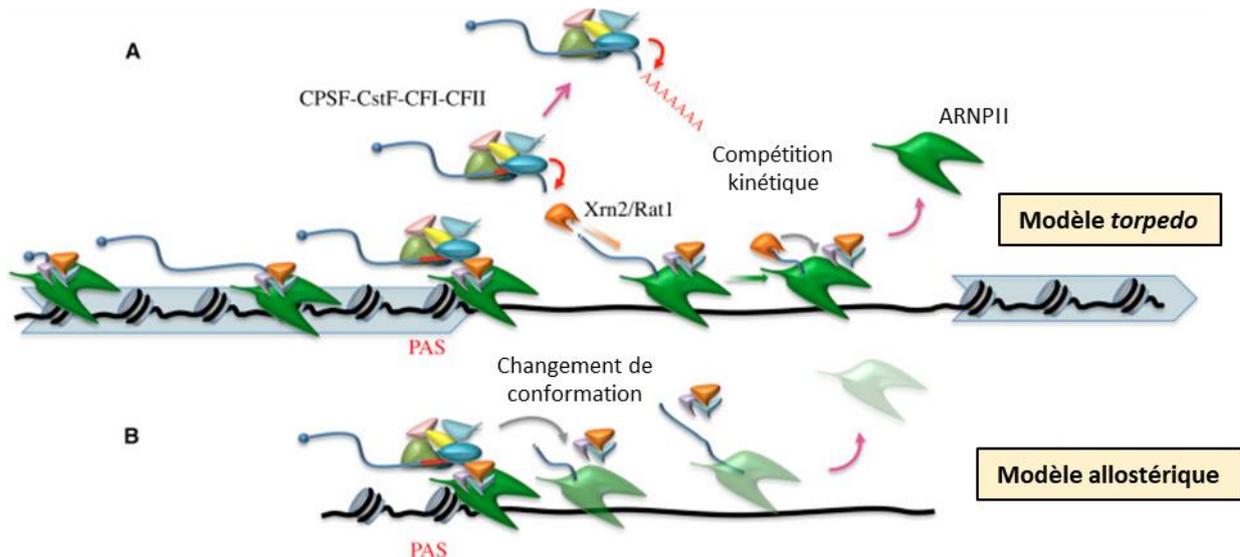


Figure 24 : Représentation schématique des modèles de terminaison de la transcription. **A-** Modèle *torpedo* impliquant l'exonucléase RAT1/Dhp1/Xrn2. **B-** Modèle allostérique faisant intervenir un changement de conformation de l'ARNPII. Voir texte pour détail. Adapté d'après Libri 2015.

Le modèle *torpedo* postule que des facteurs de maturation de l'extrémité 3' de l'ARN, interagissent avec le domaine CTD de l'ARNPII lors de l'élongation et soient transférés de manière co-transcriptionnelle sur l'ARN pré-messager naissant lors de la transcription du PAS, induisant le clivage de l'ARN en ce site (Xiang et al., 2014). Le clivage endonucléolytique libère une extrémité 3'OH qui est polyadénylée, et génère un court transcrit non coiffé à son extrémité 5' libre sortante, connecté à l'ARNPII. Cette extrémité serait reconnue par une exoribonucléase 5'→3' appelée RAT1 chez *S. cerevisiae*, Dhp1 chez *S. pombe* et XRN2 chez les métazoaires. La dégradation 5'→3' de l'ARN qui s'ensuivrait, rattraperait l'ARNPII et la chasserait de sa matrice ADN à la manière d'une torpille (d'où le nom de torpedo) (Kim et al., 2004; West et al., 2004). Un autre modèle, dit allostérique, propose que la transcription du PAS entraîne un changement de conformation de l'ARNPII et/ou la dissociation de facteurs d'élongation et le gain de facteurs de terminaison. Ces changements induiraient une diminution de la processivité de l'ARNPII et la terminaison subséquente en aval du PAS (pour revue voir (Richard and Manley, 2009)). Des évidences expérimentales supportent chacun de ces deux modèles, et comme ils ne sont pas mutuellement exclusifs, il se pourrait fort bien que la terminaison efficace de la transcription résulte de ces deux mécanismes (Libri, 2015; Luo et al., 2006; Rosonina et al., 2006; Zhang et al., 2015).

Chez la levure bourgeonnante, des mécanismes non-conventionnels de terminaison de la transcription ont été mis en évidence. Il existe par exemple un mécanisme de blocage (ou *road-block*) de l'ARNPII par un effet de butoir de la protéine Reb1 qui se lie à l'ADN. Un autre mécanisme de terminaison spécifique aux ARN non codants met en jeu le complexe protéique NNS, constitué des protéines Nrd1, Nab3, Sen1 ; ou encore un mécanisme de terminaison qui fait suite à un clivage du transcrit naissant par l'enzyme RNase III Rnt1 (Colin et al., 2014; Porrua and Libri, 2015; Rondón et al., 2009). Récemment, un mécanisme dit de « *torpedo-reverse* » a été proposé chez la levure *S. pombe*, qui met en jeu le complexe ARN-exosome. Il sera détaillé dans la partie suivante de l'introduction dédiée à l'exosome (Lemay et al., 2014). Ces mécanismes non-conventionnels de terminaison sont considérés comme des mécanismes de sécurité, qui agissent lorsque l'ARNPII ne termine pas correctement au PAS, dans le but de protéger les gènes voisins d'interférences transcriptionnelles.

Chapitre V- L'ARN-exosome, principale machinerie de dégradation 3'→5' des ARNs de la cellule

En théorie, toutes les étapes de la transcription peuvent être régulées, pour permettre l'augmentation ou la diminution du niveau d'un ARN. Cependant, le niveau à l'équilibre d'un ARN dans le noyau dépend aussi de son taux de dégradation par des ribonucléases. Un complexe majeur de dégradation des ARNs dans la cellule est le complexe ribonucléasique de l'ARN-exosome.

L'ARN-exosome ou exosome est essentiel à la viabilité des cellules et très conservé depuis les archées jusqu'aux eucaryotes multicellulaires. Il est la principale machinerie de dégradation des ARNs de 3' en 5' dans la cellule, et participe à la maturation et à la surveillance (contrôle qualité) de très nombreux, si ce n'est de tous les ARNs de la cellule. L'exosome a un rôle central dans le contrôle de presque tous les types de transcrits produits par les ARN polymérases I, II et III. La régulation fine des processus de maturation et de surveillance est cruciale pour permettre l'expression correcte des gènes. L'exosome est présent dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme. Je me cantonnerai ici à la description de sa version nucléaire. Le lecteur intéressé par la version cytoplasmique est renvoyé vers la revue suivante (Schaeffer et al., 2010).

I. Composition et Structure

L'exosome nucléaire eucaryote est composé de 11 sous-unités : 9 sous-unités « cœurs » catalytiquement inactives, qui forment une structure en forme de tonneau, et deux sous-unités catalytiques que sont Rrp6 (aussi connu sous le nom PM/Scl-100 ou EXOSC10) et Dis3 (Rrp44 ou EXOSC11) (représentation en Figure 25). La protéine Dis3 est considérée comme le support catalytique majeur de l'exosome. La charpente de l'exosome (appelé également EXO9) est la somme de 6 ribonucléases PH-like (pour *Pleckstrin Homolgy*), nommées Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 et Mtr3, agencées en anneau, et de 3 protéines S1/KH, nommées Rrp4, Rrp40 et Csl4, qui forment une « coiffe ». Les sous unités catalytiques Rrp6 et Dis3 sont situées chacune à l'une des extrémités du tonneau. Rrp6 est positionnée sur le dessus de la coiffe, et Dis3 au bas du complexe (voir Figure 18). La majeure partie des substrats de l'exosome passe au travers de ce tonneau, entrant par un pore situé au centre de la coiffe

pour atteindre Dis3 (Makino et al., 2013, 2015; Wasmuth et al., 2014). Certains ARNs peuvent être ciblés directement à Rrp6 ou à Dis3 par différentes routes, suggérant l'existence de plusieurs mécanismes de régulation (Liu et al., 2014; Makino et al., 2015; Wasmuth et al., 2014). Rrp6 et Dis3 ont toutes deux une action 3' → 5' exo-ribonucléasique, mais Dis3 possède également une activité 3' → 5' endo-ribonucléasique, qui facilite le processus de dégradation des ARNs (Schaeffer et al., 2009; Schneider et al., 2012). De plus, Dis3 possède une activité ribonucléase processive, à l'inverse de celle de Rrp6 qui est distributive. Des études récentes chez *S. cerevisiae* ont révélé que les différents substrats ARNs de l'exosome montrent des préférences dans leurs voies d'accès à l'exosome, entre le passage à travers le canal central et l'accès direct aux ribonucléases (Delan-Forino et al., 2017; Han and van Hoof, 2016).

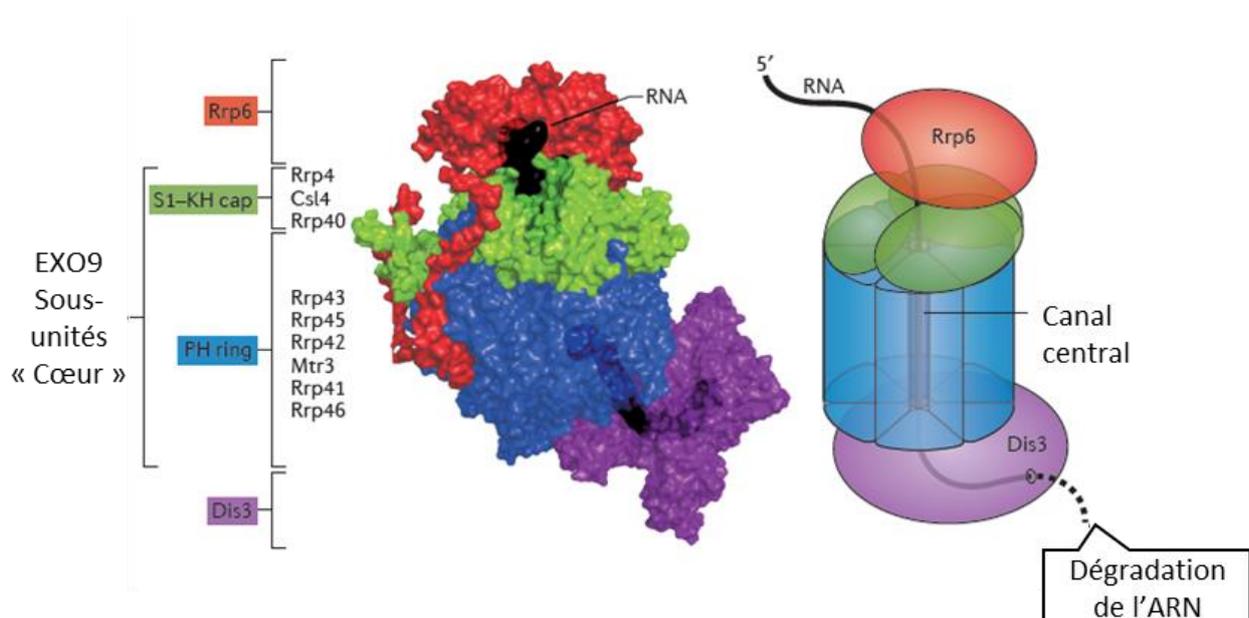


Figure 25 : Structure du complexe de l'ARN-exosome. Un modèle de la structure de l'exosome est représenté à gauche, basé sur les structures obtenues chez *S. cerevisiae*. Droite : schéma d'une molécule d'ARN passant dans le canal central du complexe pour atteindre le centre exonucleolytique Dis3, où elle sera dégradée. Figure adaptée de Kilchert *et al.* 2016.

II. Localisation

Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, Rrp6 est restreinte au noyau des cellules, à l'inverse de Dis3 qui est aussi cytoplasmique. Chez l'Homme, Rrp6 et Dis3 sont surtout présentes dans le noyau, mais on les retrouve également en faible quantité dans le cytoplasme (Gelpi et al., 1990). Des homologues de Dis3, nommés Dis3L et Dis3L2 (pour Dis3-like), sont aussi présents chez l'Homme et se localisent dans le cytoplasme. Dans le noyau, Rrp6 est fortement enrichie

dans le nucléole, que ce soit chez *S. cerevisiae* ou chez l'Homme (Allmang et al., 1999a; Salvetti et al., 2016). Dis3 est également enrichie dans le nucléole chez cette levure, cependant elle en est exclue chez l'Homme (Shiomi et al., 1998; Tomecki et al., 2010). Chez *S. pombe*, des observations par microscopie sur cellules vivantes indiquent que Rrp6 et Dis3 sont enrichies dans le nucléole, mais aussi présentes dans des foci nucléaires avec les protéines Red1 et Mmi1 (Sugiyama and Sugioka-Sugiyama, 2011; Yamanaka et al., 2010).

III. Fonctions de l'exosome à ARN

Rôle dans la maturation de petits ARNnc. A l'origine, l'exosome a été identifié comme étant un facteur essentiel de la maturation des ARN ribosomiques chez *S. cerevisiae* (Mitchell et al., 1997). Cela a d'ailleurs donné leurs noms à de nombreuses protéines de l'exosome, appelées RRP pour « *rRNA processing proteins* ». L'exosome a ensuite été également impliqué dans la maturation d'autres petits ARN non codants comme les snARN et de snoARN (Allmang et al., 1999b; Lemay et al., 2010).

Rôle dans le contrôle qualité des ARNm. Pour devenir des transcrits fonctionnels, les ARNs pré-messagers ont également besoin de subir une maturation importante. Les étapes complexes qui sous-tendent la maturation des ARNs pré-messagers sont susceptibles d'induire des erreurs et d'aboutir à la production d'ARNs aberrants potentiellement toxiques pour la cellule. C'est vraisemblablement pourquoi la cellule a établi un système de surveillance, qui implique l'exosome, pour les éliminer. Une catégorie importante d'ARNs ciblés par l'exosome est constituée des ARNs pré-messagers qui ont retenu un intron (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Gudipati et al., 2012; Lemieux et al., 2011; Schneider et al., 2012). Chez *S. pombe*, Dis3, Rrp6 mais aussi la ribonucléase Dhp1 (Rat1/XRN2 chez *S. cerevisiae* et chez l'Homme) masquent aussi les sauts d'exon, supposément en dégradant les transcrits aberrants qui en résultent (Bitton et al., 2015). L'exosome est aussi impliqué dans la dégradation des ARNs *readthrough*. Chez *S. cerevisiae* les ARNs terminés par les mécanismes non-conventionnels Reb1 ou NNS sont dégradés par l'exosome (pour revue voir (Porrua and Libri, 2015)). Chez *S. pombe*, une étude suggère que des ARN *readthrough* naturellement produits dans une souche sauvage sont rapidement dégradés par l'exosome, en lien avec H2A.Z, et les protéines Clr4 et Ago1 (Zofall et al., 2009). D'autres processus de maturation en

3' sont également sous la surveillance de l'exosome, comme la formation des particules ribonucléoprotéiques mRNP. Par exemple, chez *S. cerevisiae* des mutations du complexe THO/Sub2, impliqué dans la biogénèse des particules mRNP et l'export nucléaire, induisent l'accumulation des ARNm *heat-shock HSP104* et *SSA4* à leurs sites de transcription. L'accumulation résulterait d'une défaillance de dégradation. Rrp6 serait nécessaire à la fois à la rétention de ces ARNm aberrants à leurs sites de transcription, mais aussi à leur dégradation (Libri et al., 2002; Rougemaille et al., 2007; Saguez et al., 2008). La rétention des transcrits aberrants en leurs sites de transcription a été observée suite à de nombreux défauts de maturation des ARNs chez l'Homme également (de Almeida et al., 2010). Dans tous les cas, cette rétention semble dépendante de Rrp6. Cependant les mécanismes moléculaires sous-jacents restent mal compris.

Rôle dans la dégradation des ARNnc. Une fonction importante de l'exosome est de dégrader les ARNs non codants qui résultent de la transcription invasive des génomes. Cette transcription est dite « cryptique » car les ARNnc qui en découlent sont hautement instables dans les cellules sauvages, et ne sont visibles que dans des mutants de l'exosome (Neil et al., 2009; Wyers et al., 2005; Xu et al., 2009). Ces ARNs non codants longs sont appelés CUTs chez les levures pour « *Cryptic Unstable Transcripts* ». D'autres catégories d'ARNs non-codants appelés SUTs pour *Stable Unannotated Transcripts* ont été décrits qui ne semblaient pas à l'origine s'accumuler en l'absence de Rrp6 (Xu et al., 2009). Cependant les SUTs ont ensuite été découverts la cible d'une dégradation par l'exosome (Schneider et al., 2012). Leur pendant chez l'Homme sont les PROMPTs pour « *promoter upstream transcripts* » ou les uaARN pour « *upstream antisense RNA* », qui résultent d'une transcription en anti-sens de promoteurs divergents (Flynn et al., 2011; Preker et al., 2008), et sont ciblés par l'exosome pour dégradation (Lubas et al., 2011). Les enhanceurs actifs sont aussi transcrits de façon bi-directionnelle, produisant une classe d'ARNs non codants longs appelés eARN. Une étude rapporte que des eARNs sensibles à l'exosome émergent à de nombreux enhanceurs actifs chez l'Homme (Andersson et al., 2014). De plus, les ARN non codants longs intergénomiques (lincARN) sont également des cibles de l'exosome, bien qu'ils soient en général plus stables que les uARN et eARN (Schlackow et al., 2017). L'image qui se dégage de ces travaux est que de très nombreux ARNs non-codants peuvent émerger de la chromatine (probablement dès que

l'ARNPII a accès à l'ADN génomique nu) et sont les cibles d'une dégradation active par l'exosome.

Rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Un exemple frappant du rôle de l'exosome dans la régulation de l'expression génique est celui de la dégradation contrôlée d'ARNm méiotiques durant le cycle végétatif chez *S. pombe*. L'élimination sélective des ARNm méiotiques transcrits pendant le cycle végétatif permet d'éviter un déclenchement inopiné de la méiose (Yamamoto, 2010). En effet chez la levure à fission, plusieurs ARNm méiotiques sont transcrits au cours du cycle mitotique, mais des motifs DSR (Determinant of Selective Removal) contenus dans leur séquence, permettent leur dégradation rapide par l'exosome en dehors de la méiose (Harigaya et al., 2006; Yamashita et al., 2012). La protéine Mmi1 est un acteur essentiel de cette régulation. C'est elle qui reconnaît les motifs DSR des ARNs de manière co-transcriptionnelle (Harigaya et al., 2006; Hiriart et al., 2012), et permet le recrutement de plusieurs facteurs, comme le complexe MTREC (voir ci-dessous) et l'exosome (Egan et al., 2014). Lors de la méiose, Mmi1 est séquestrée dans des foci nucléaires. Cela l'empêche d'induire l'élimination des ARNm méiotiques, qui sont alors stabilisés et participent au bon déroulé de la méiose. Un autre exemple a été observé chez *S. cerevisiae*, où Rrp6 dégrade les ARNm d'histones au sortir de la phase S (Canavan and Bond, 2007; Reis and Campbell, 2007). D'autres études impliquent l'exosome dans la régulation de l'expression génique, en lien avec la maturation des ARN (Arigo et al., 2006; Volanakis et al., 2013).

Rôle de l'exosome dans la terminaison de la transcription. L'exosome a aussi été impliqué dans la terminaison de la transcription chez *S. pombe* (Lemay et al., 2014). En effet, la déplétion de Dis3 induit l'accumulation d'ARNm étendus en 3', ainsi qu'une augmentation de l'association de l'ARNPII en aval du site de polyadénylation. Les auteurs proposent que l'exosome participe à la terminaison de la transcription aux sites où l'ARNPII a fait une pause puis reculé, de manière à laisser libre une extrémité 3' de l'ARN. Les auteurs proposent que l'exosome pourrait alors dégrader l'extrémité ARN 3' sortante de l'ARNPII pour induire le désengagement de la polymérase par un mécanisme de torpedo-inverse. Ce mécanisme ne semble pas être constitutif mais plutôt constituer une sécurité de la terminaison. Le rôle de Rrp6 dans ce mécanisme n'a pas été clairement défini dans cette étude. En effet, les auteurs n'observent pas d'accumulation massive d'ARN étendus en 3' dans le mutant *rrp6Δ* aux gènes rapporteurs étudiés (comparé au mutant de *dis3*), et concluent que Rrp6 ne serait pas essentielle à

l'activité de terminaison de la transcription de l'exosome. Rrp6 et Dis3 pourraient donc avoir des rôles différents dans le contrôle de l'accumulation des ARNs readthrough dans la cellule : Rrp6 pourrait avoir un rôle de surveillance et de dégradation des ARN étendus en 3' produit naturellement par la fuite des ARN polymérases (comme suggéré par (Zofall et al., 2009)), tandis que Dis3 agirait directement dans la terminaison de la transcription pour prévenir la synthèse d'ARN readthrough (Lemay et al., 2014).

Rôle au niveau de l'hétérochromatine. Chez la levure *S. pombe*, l'hétérochromatine est réduite au silence par un mécanisme dépendant de la voie de l'interférence à ARN (ARNi), qui induit le dépôt de la marque chromatinienne répressive H3K9me3 (Allshire and Madhani, 2018; Martienssen and Moazed, 2015). Les régions péri-centromériques sont une cible majeure de *silencing* par l'hétérochromatine et la voie de l'ARNi, qui est dite co-transcriptionnelle car elle induit des modifications de la chromatine mais participe aussi à la dégradation des transcripts naissants (pour revue voir (Lejeune et al., 2010)). En complément de la voie de l'ARNi, l'exosome et son co-facteur TRAMP (voir ci-après), contribuent à l'élimination des ARNs non codants produits au niveau de ces régions, afin de maintenir l'état silencieux de l'hétérochromatine péri-centromérique (Bühler et al., 2007; Reyes-Turcu et al., 2011; Wang et al., 2008a). L'absence de l'acteur Ago1 de la voie de l'ARNi dans un mutant *rrp6Δ*, a un effet synergique sur la perte de chromatine silencieuse comparé aux simples mutants, indiquant que l'exosome agit en parallèle de la voie de l'ARNi dans ce processus (Reyes-Turcu et al., 2011). En l'absence de Rrp6, on peut aussi observer la formation de nouveaux domaines hétérochromatiques absents chez le sauvage, qui semblent dépendre de la voie de l'ARNi. Cela suggère que l'exosome en dégradant certains ARNs, pourrait empêcher leur entrée dans la voie de l'ARNi (Yamanaka et al., 2013). Cependant, le rôle exact de l'exosome dans la mise en place ou le maintien de la chromatine silencieuse reste à éclaircir.

Rôle dans la réparation des dommages à l'ADN. Plusieurs études impliquent également l'exosome dans la réparation des dommages à l'ADN. Par exemple, chez l'Homme, la protéine RBM7 appartenant au complexe cofacteur de l'exosome NEXT (voir paragraphe suivant), est phosphorylée à la suite d'un dommage à l'ADN induit par les UVs. RBM7 interagit alors avec la protéine 14-3-3 et réduit son interaction avec ses substrats tels que les ARNnc PROMPTs, ce qui la rend potentiellement plus disponible pour participer à des tâches en lien avec les dommages à l'ADN (Blasius et al., 2014). Rrp47, le cofacteur essentiel de Rrp6, serait requis à

la réparation des lésions induites par les UVs chez *S. cerevisiae* (Erdemir et al., 2002; Hieronymus et al., 2004). Chez *D. melanogaster*, la réparation des DSBs est compromise en l'absence de Rrp6 (Marin-Vicente et al., 2015). De plus, de manière assez inattendue, l'hypersensibilité du mutant de Condensine *cnd2-1* aux agents de dommages à l'ADN peut être supprimée par la surexpression de la protéine Cti1/Rrp47, qui est un cofacteur de Rrp6, et qui semble interagir avec Cut3 (*condensin subunit Cut3 Interacting protein 1*) (Chen et al., 2004).

IV. Régulateurs et co-facteurs de l'exosome

L'activité intrinsèque de dégradation des ARNs de l'exosome est relativement faible. Trois co-facteurs, Mtr4, Rrp47 et Mpp6, sont requis pour que l'exosome soit pleinement actif. Rrp47, aussi connue sous le nom de Cti1 chez *S. pombe* et C1D chez l'Homme, est un cofacteur essentiel de Rrp6 (Feigenbutz et al., 2013a). Rrp6 et Rrp47 forment une plateforme d'ancrage pour Mtr4, une ARN hélicase à boîte DExH (Schuch et al., 2014). Mpp6 se lie à la sous-unité Rrp40 du domaine coiffe de l'exosome, pour stimuler l'activité hélicase de Mtr4 (Falk et al., 2017; Wasmuth et al., 2017) ; voir la Figure 26 pour illustration). L'activité hélicase de Mtr4 est requise pour relaxer les structures secondaires formées en 3' des ARNs et pour permettre l'entrée des transcrits dans le canal central de l'exosome pour dégradation (Schneider and Tollervey, 2013).

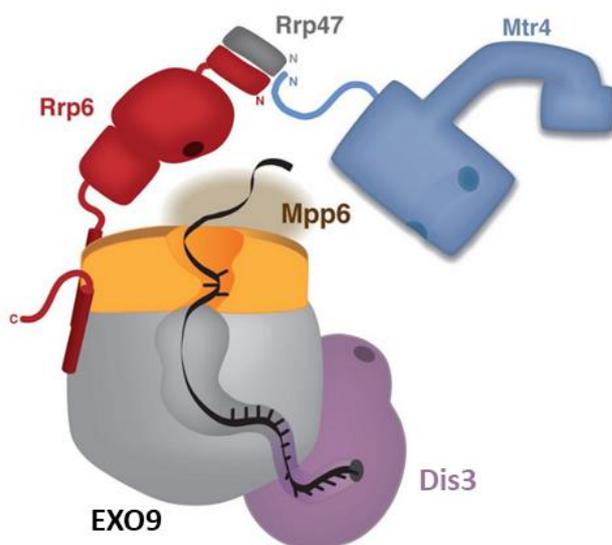


Figure 26 : Représentation schématique de l'exosome et de ses co-facteurs. L'ARN est représenté en noir, traversant le canal central de l'exosome jusqu'au site catalytique de Dis3 (violet). Mpp6 est représenté en marron, en interaction avec la structure coiffe de l'exosome (orange). Les extrémités N-terminales de Rrp6 (rouge), Rrp47 (gris) et Mtr4 (bleu) sont représentées par des N. Figure adaptée de Schuch *et al.* 2017.

Le simple fait que l'exosome cible une grande variété de transcrits pose la question fondamentale de sa spécificité. Comment l'exosome reconnaît-il ses substrats, discriminant les ARNs à maturer de ceux à dégrader ? De nombreuses études ont identifié des co-facteurs qui aident l'association de l'exosome avec ses multiples substrats.

Les complexes TRAMP/MTREC/NEXT. Le complexe de polyadénylation TRAMP est composé des poly(A) polymérases Trf4/5 chez *S. cerevisiae* (Cid14 chez *S. pombe* et PAPD5/PAPD7 chez l'Homme), des protéines de liaison aux ARNs Air1/2 (ZCCHC7 chez l'Homme) et de l'hélicase Mtr4. TRAMP a été décrit pour la première fois chez *S. cerevisiae*, et est maintenant le co-facteur le mieux décrit de l'exosome chez cette levure. TRAMP reconnaît une grande variété de transcrits chez *S. cerevisiae*, comme les ARNt, les ARNr, les sn/snoARN, les CUTs, et les ARN pré-messagers, qui seront polyadénylés par Trf4/5 et déstructurés par Mtr4 pour faciliter leur dégradation par l'exosome (Jia et al., 2011). Chez *S. pombe* et chez l'Homme, il semble qu'il y ait eu une division du travail entre plusieurs complexes. L'un est nucléolaire, (TRAMP), contient une poly(A) polymérase et cible les ARNr, tandis que l'autre est nucléoplasmique (MTREC chez la levure à fission, ou NEXT chez l'Homme), ne contient pas de polymérase et cible les transcrits cryptiques et mal maturés (Lubas et al., 2011; Norbury, 2011; Wang et al., 2008a; Zhou et al., 2015).

Le complexe NNS. Chez *S. cerevisiae*, le complexe NNS composé des protéines Nrd1, Nab3 et Sen1, est important pour la terminaison de la transcription de nombreux ARNs non codants, et les ciblera pour dégradation par l'exosome. Nrd1 et Nab3 sont des protéines de liaison aux ARNs, tandis que Sen1 est une hélicase à ADN/ARN qui permet la dissociation de l'ARNPII de l'ADN (Arigo et al., 2006; Steinmetz et al., 2001; Thiebaut et al., 2006). Le complexe NNS voyage avec l'ARNPII, car Nrd1 interagit avec la Serine 5 phosphorylée du domaine CTD. NNS induit la terminaison de la transcription s'il reconnaît un motif court dans le transcrit. Nrd1 interagit ensuite de manière séquentielle avec l'hélicase Mtr4 du complexe TRAMP, et permet la dégradation ciblée ou la maturation de ces ARNnc par l'exosome (pour revue voir (Porrua and Libri, 2015)). Des homologues de Nrd1, Nab3 et Sen1 ont été identifiés à la fois chez *S. pombe* et chez l'Homme. Cependant aucune activité de type NNS n'a été observée pour les homologues de ces protéines. Cette machinerie spécialisée dans la terminaison de la transcription couplée à la dégradation des ARN, semble donc unique à la levure bourgeonnante.

L'ARN-exosome est donc une machinerie de dégradation 3' → 5' des ARNs qui participe à la maturation et la dégradation d'une grande variété de transcrits dans la cellule. L'association de l'exosome avec plusieurs types de protéines régulatrices et plusieurs complexes co-facteurs soutient ses diverses fonctions primordiales au maintien de l'expression génique.

Chapitre VI- Question biologique

Outre l'organisation et la transmission des chromosomes, de nombreuses études impliquent les Cohésines et les Condensines également dans des fonctions de contrôle de l'expression génique. Des changements dans les niveaux des ARNs cellulaires ont été observés après l'inactivation ou la déplétion de sous-unités de ces complexes, suggérant qu'ils participent au contrôle de l'expression des gènes. Comment expliquer cette apparente polyvalence des complexes SMCs ?

Les Cohésines sont fortement soupçonnées de réguler l'expression génique via leur capacité à faire des boucles de chromatine, ou à rapprocher des séquences d'ADN non-adjacentes (Dorsett and Merckenschlager, 2013; Merckenschlager and Nora, 2016). Les Condensines possèdent la faculté d'initier et d'agrandir des boucles d'ADN, *in vitro* (Ganji et al., 2018). Dans le contexte des connaissances acquises sur les Cohésines, il a été proposé que les Condensines pourraient réguler l'expression génique en liant le contrôle de la transcription à l'organisation tridimensionnelle du génome en interphase (Downen et al., 2013; Iwasaki et al., 2010; Li et al., 2015b). Dans le cas de Condensine I^{DC}, il a été clairement établi que ce complexe régule l'expression des gènes portés par les chromosomes X en réduisant l'occupation par l'ARN polymérase II (Kruesi et al., 2013). En revanche la situation est beaucoup moins claire en ce qui concerne les complexes canoniques Condensine I et Condensine II. A ma connaissance, il n'existe à ce jour aucune évidence expérimentale solide qui montre sans ambiguïté que Condensine I ou Condensine II régule l'expression génique en contrôlant l'organisation du génome.

Des études ont proposé que les complexes Condensine I et II puissent réprimer la transcription en condensant la chromatine (Rawlings et al., 2011; Swygert et al., 2018). Ces interprétations se fondent sur le fonctionnement de Condensine I^{DC} chez *C. elegans* et sur l'idée que la chromatine condensée serait moins permissive pour la transcription, car l'ADN serait moins accessible aux polymérases. Cependant, il a été montré que la dynamique des nucléosomes dans les chromosomes mitotiques condensés n'est pas différente de celle observée en interphase (Hihara et al., 2012), et que les facteurs de transcription peuvent accéder à l'ADN au cœur des chromosomes mitotiques (Chen et al., 2005), alors même que Condensine I et Condensine II sont actives. Dans ce contexte, il est difficile d'imaginer que la condensation des

chromosomes par les Condensines canoniques puisse être suffisante à la répression de la transcription.

Ainsi, à l'exception notable de Condensine I^{DC}, aucune preuve irréfutable n'a été apportée quant aux mécanismes par lesquels Condensine I et Condensine II régulent l'expression génique, et l'on ignore dans quelle mesure les mécanismes mis en jeu dans le contrôle de l'expression des gènes par les Condensines canoniques sont directs, ou indirects.

C'est pour ces raisons que j'ai décidé d'étudier le rôle de Condensine dans le contrôle de l'expression génique au cours de ma thèse, en utilisant la levure *Schizosaccharomyces pombe* comme organisme modèle. Cette levure a pour avantage de posséder un complexe Condensine I qui montre une dynamique et un schéma d'association aux chromosomes similaires à ceux observés chez l'homme. De plus, la structure chromatinienne de *S. pombe* est proche des eucaryotes supérieurs et de nombreux outils sont établis qui facilitent l'analyse du cycle cellulaire.

Partie II – Matériels et Méthodes des résultats non publiés

Matériel biologique

L'organisme modèle utilisé dans cette étude est *Schizosaccharomyces pombe*, aussi appelée levure à fission. C'est une levure ascomycète de 7 à 15 µm de long et 3 à 4 µm de diamètre. Elle a été isolée par Paul Lindner en 1893, à partir d'une bière africaine de millet. Le nom d'espèce « pombe » veut dire bière en Swahili. Cette levure est haplo-diplobiontique à phase haploïde dominante. Le temps de génération varie entre 2h et 4h, selon les conditions de culture. Le génome haploïde fait 12,57 Mpb d'ADN réparties en trois chromosomes. Les souches utilisées en laboratoire sont des versions hétérothalliques qui présentent deux types sexuels stables h⁺ et h⁻. En condition de carence nutritionnelle, deux cellules haploïdes de types sexuels opposés (h⁺ et h⁻) conjuguent : les cellules fusionnent par une extrémité et la caryogamie est réalisée (16-24h). La méiose est alors déclenchée (>24h), suivie par la genèse d'un asque contenant 4 spores haploïdes. L'asque se rompt et, en conditions nutritives favorables, les spores germent et le cycle cellulaire haploïde recommence. Il s'ensuit la méiose et la formation des spores regroupées dans des asques. La liste des souches utilisées par Figure est à trouver en Annexe 1.

Méthodes

I. Méthodes et conditions de culture

Milieus de culture : Les milieux de cultures utilisés pour *S. pombe* sont le milieu complet YES+A (Yeast Extract with Supplements + Adenine) à base d'extrait de levures, et le milieu minimum synthétique PMG (Pombe Minimum Glutamate) (Forsburg and Rhind, 2006; Moreno et al., 1991). Les milieux sélectifs utilisés lors des croisements sont soit des milieux PMG carencés pour un acide aminé donné, soit des milieux YES+A additionnées de drogues comme le Clonaz (100 µg/L), le G418 (100 mg/L) ou l'Hygromycine B (100 mg/L). La phloxine B est un colorant vital ajouté dans les milieux solides à 2,5 mg/L. Un milieu carencé en azote appelé SPA (*sporulation agar medium*) est utilisé pour induire les croisements.

Conditions de culture : Les cellules sont striées sur une boîte de Pétri contenant le milieu solide approprié et incubées jusqu'à apparition de colonies. La température d'incubation varie entre 20°C et 36°C. Les cultures en milieu liquide sont effectuées dans des fioles d'Erlenmeyer d'une capacité 5 fois supérieure au volume de culture et sous agitation constante à 200 rpm. Les densités cellulaires sont déterminées par comptage grâce à une cellule de Thoma. Toutes les expériences sont réalisées sur des cellules en phase exponentielle de croissance (entre $2 \cdot 10^6$ cellules/ml et $2 \cdot 10^7$ cellules/ml).

Arrêt du cycle cellulaire : L'arrêt réversible des cellules en prométaphase a été réalisé à 19°C pendant 7h, par le biais de la mutation cryo-sensible *nda3-KM311* qui empêche la polymérisation de microtubules à température restrictive. L'arrêt non réversible des cellules en métaphase est obtenu à 28°C en milieu PMG supplémenté avec de la thiamine à 20 µM, afin de réprimer l'expression du gène *slp1* (orthologue de *CDC20* chez l'homme) placé sous le contrôle du promoteur P_{nmt1} (*no message in thiamine*) (Petrova et al., 2013). Le 3-Br-PP1 est un analogue de l'ATP, qui, ajouté à 2 µM dans le milieu de croissance d'un mutant *cdc2-asM17* va induire son arrêt en fin de phase G2 (Aoi et al., 2014). L'index mitotique a été déterminé par la mesure du nombre de cellules en mitose, qui accumulent un signal Cnd2-GFP dans le noyau (Sutani et al., 1999).

II. Méthodes d'analyses génétiques

Croisements : Les croisements sont réalisés sur milieu solide SPA carencé en azote, en mélangeant une quantité égale d'une souche h+ avec une souche h-. Dans ces conditions, une cellule h+ va se conjuguer avec une cellule h-, pour donner un diploïde qui subira rapidement la méiose, et formera un asque constitué de 4 spores haploïdes. La présence de spores peut être observée sous le microscope ou grâce à une coloration à la vapeur d'iode, colorant les spores riches en amidon en marron.

Analyse des spores en vrac : Une fois la réussite du croisement vérifiée, une pointe du croisement est digérée par la cytohélécasse (0,5% v/v) dans 200 µl d'eau stérile pendant quelques heures. La cytohélécasse permet la digestion des cellules végétatives restantes, et libère les spores des asques. La lyse des cellules est complétée par l'ajout de SDS à 0,1%. La densité des spores est ensuite déterminée par comptage à la cellule de Thoma, et 500 et 1000

spores seront étalées sur milieu solide non sélectif grâce à des billes. Après croissance des colonies, les boîtes seront répliquées sur des milieux sélectifs par empreinte sur du velour. Les colonies qui présentent l'association de marqueurs voulus seront ensuite sélectionnées et répliquées une deuxième fois pour vérification.

Analyse des spores par dissection d'asque : Afin d'analyser précisément la ségrégation des marqueurs lors d'un croisement, ou pour déterminer leur co-létalité, il est possible de disséquer des asques. J'ai réalisé des dissections d'asques pour obtenir les doubles mutants *cdc15-140 cut14-208* et *cdc12-122 cut14-208*, qui sont toutes des mutations thermosensibles. Après 24h à 36h de croisements, les asques sont striés sur milieu solide YES+A et isolés grâce à un micro-manipulateur. Après quelques heures d'incubation à température permissive, les asques vont se rompre et on pourra alors disséminer de façon ordonnée les 4 spores qu'ils contenaient à l'aide du micro-manipulateur. Le phénotype des colonies issues de ces spores sera ensuite déterminé par répliques velour. Cette méthode de croisement a été utilisée uniquement pour la construction de souches avec des conflits de marqueurs. C'était le cas notamment pour la construction des doubles mutants *cut14-208 cdc15-140/cdc12-112/sid2-250*, qui sont toutes des mutations thermosensibles.

Test en gouttes : Les souches sont cultivées sur milieu solide complet (YES+A) pendant quelques jours, puis mises en suspension dans 500 µl d'eau stérile. La densité cellulaire est établie par comptage à la cellule de Thoma. Des dilutions sériées au 1/5^{ème} sont préparées sur une microplaque et 7 µl de chaque dilution sont déposées en gouttes sur milieu solide YES+A supplémenté de phloxine B. Les boîtes de milieux solides seront ensuite incubées à différentes températures pendant 3 à 4 jours.

III. Techniques d'analyse des interactions protéiques

1) Test en double hybride

Construction des plasmides. Les plasmides utilisés pour l'expression des protéines de fusion au domaine de liaison à l'ADN (ou DBD/protéine appât) et au domaine d'activation (ou AD/protéine proie) sont dérivés du vecteur pEG202 (Clontech, Genbank Accession Number U89960) et pJG4-5 (Clontech, Genbank Accession Number U89961) respectivement (Golemis and Brent, 1992). Les constructions ont été générées par le clonage des ADNc pleine taille ou

tronqués des gènes d'intérêts par recombinaison homologue dans la levure, après digestion des vecteurs par XhoI (Ma et al., 1987; Oldenburg et al., 1997). Tous les clonages ont été vérifiés par séquençage. Le plasmide pSH18–34, contenant le gène de la β -Galactosidase sous le contrôle de quatre opérateurs LexA a été utilisé comme plasmide rapporteur (Estojak et al., 1995).

Test en double hybride. Le test est basé sur le système LexA (domaine de liaison à l'ADN)/B42 (domaine d'activation de la transcription) (Golemis and Brent, 1992). Des cellules haploïdes compétentes EGY42a ont été co-transformées avec 1 μ g du vecteur rapporteur pSH18–34 et 1 μ g du vecteur DBD et des cellules compétentes TB50 α ont été transformées avec 1 μ g du vecteur AD. Les levures ont été sélectionnées pendant 3 jours à 30°C sur un milieu SD-UH pour les souches DBD et SD-W pour les souches AD. Les croisements ont été réalisés sur la nuit à 30°C en milieu YPAD en phase liquide (Ito et al., 2001; Kolonin et al., 2000). Les levures diploïdes ont ensuite été amplifiées en milieu liquide sélectif SD-UHW. Pour le test d'expression de la β -Galactosidase, 50 μ l de chaque culture diploïde a été inoculée (OD 595nm = 6) dans 1 ml de milieu SGR-UHW pré-chauffé à 25°C et supplémenté avec du X-Gal (Thermo Scientific, ref R0404) dans une plaque 96 puits. Les cultures sont ensuite incubées pour 48h à 25°C, centrifugés 5min à 192g, resuspendues dans 300 μ l et transférées dans des plaques à fond plat μ Clear Cellstar® (Greiner Bio one) pour scanner et observer le phénotype.

2) Co-Immuno-précipitation (ou Co-IP)

Les co-immuno-précipitations ont été réalisées sur 2.10^8 cellules, récoltées en phase exponentielle de croissance et lavées en eau ultrapure.

Clarification : Le culot des cellules est ensuite pesé et resuspendu dans un volume correspondant à 5 μ l/mg de culot de cellules, en tampon de lyse (50 mM Hepes-KOH pH7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (w/v) sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 pastille d'inhibiteurs de protéases EDTA free Roche (1 pour 10 ml)). Un volume de billes de verres est ensuite ajouté (*Glass beads -acid washed* de Sigma). Les cellules sont cassées à l'aide d'un *Precellys-24*® (Bertin instruments) : 4 fois 10 secondes à 6800 rpm. Le lysat est récupéré après 2 clarifications de 5 min (14 krpm/ 4°C), puis ré-équilibré à 300 μ l en tampon de lyse.

Préparation des billes : Un volume de 15 µl de billes électromagnétiques *Dynabeads* (Thermo Fisher) est prélevé par immunoprécipitation (IP). Elles sont lavées 3 fois dans 500 µl de tampon PBS-T, puis reprises dans leur volume initial. L'anticorps est ensuite ajouté à hauteur de 4 µg/IP (anti GFP A111-22 Life technologies, anti-myc 9E10 Thermo et anti-Cnd2 ab188277 Abcam). Le mix billes-AC est incubé 1 h sur la roue 30 rpm, à 4°C.

Co-IP sur lysats clarifiés : A partir du lysat clarifié, 15 µl constitueront l'extrait total et le reste subira l'immunoprécipitation. Aux 285 µl sont ajoutés 15 µl de billes-Ac, le tout est incubé sur une roue à 30 rpm pendant une heure à 4°C. Après l'incubation, les billes sont lavées une fois par le tampon de lyse et deux fois en tampon de digestion (MgCl₂ 2mM, Tris pH8 50 mM, Triton 1% final, BSA 0,1 mg/ml). Afin d'éliminer les ADNs et ARNs susceptibles de médier des interactions indirectes, les complexes immunoprécipités sur les billes seront soumis à une digestion à la Benzonase de 100U (réf 70664-3 Milipore) de 10 min sur la glace en tampon de digestion. Les billes subiront deux lavages supplémentaires en tampon de lyse. Les billes sont ensuite reprises dans 50 µl de tampon de charge (62,5 mM Tris pH6.8, 5% SDS, 10% glycérol, 5% β mercaptoéthanol, 0,01% bleu de bromophénol, 1 pastille d'inhibiteurs de protéases EDTA free Roche (1 pour 10 ml)) et mis à 95°C pendant 5 min. Les IP sont récoltées dans de nouveaux tubes après centrifugation, et peuvent être conservée à -20°C.

Analyse des protéines co-immunoprécipitées : 5 µl de chaque IP sont ensuite déposés sur un gel polyacrylamide de 10% pour analyse. Les protéines subiront une migration selon leur poids moléculaire, pendant environ 1h à 150 Volts et 300 mA. Une fois la migration terminée, le gel est rincé dans du tampon de transfert (25 mM Tris 190 mM glycine 20% éthanol 3,7% SDS), et assemblé dans un montage pour permettre le transfert semi-sec des protéines sur une membrane. Le montage contient 3 papiers Whatman, une membrane de nitrocellulose, le gel puis 3 papiers Whatman, humidifiés au préalable dans le tampon de transfert. Le courant appliqué pour transférer les protéines est de 0,8 mA par cm², soit environ 42 mA, pendant 1h30. Le bon transfert des protéines sur la membrane est vérifié par rouge ponceau. La membrane sera ensuite rincée puis saturée 30 min dans du lait 5%-PBS-T. La membrane sera incubée avec l'anticorps primaire dilué au 1/1000^{ème} (anti-GFP A111-22 Life technologies, anti-MYC 9E10 Thermo Fisher, anti-Dis3 ab64289, anti-Cnd2 ab188277 Abcam) dans du lait 5%-PBS-T pendant la nuit à 4°C, sur un plateau agitant. L'anticorps secondaire couplé à une HRP sera ajouté au 1/10 000^{ème} après 3 lavages de 5 min en PBS-T. Après 2h d'incubation avec

l'anticorps secondaire, la membrane sera lavée en PBS-T (3 fois 5 min). L'activité peroxydase de l'anticorps secondaire sera révélée par un kit *SuperSignal West Chemiluminescent FEMTO* pour les protéines peu abondantes ou PICO pour les protéines abondantes (Thermo Fischer). Le signal sera révélé sur un film (Fuji Medical X rays films) grâce à une développeuse en chambre noire.

IV. Techniques d'analyse de protéines associées à la chromatine

1) Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

Fixation et récolte des cellules. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 1% (w/v) dans de but de créer des pontages (liaisons covalentes) entre protéines et ADN. Les cellules sont cultivées en phase exponentielle de croissance à 28°C puis shiftées à 36°C pendant 2h30, et sont fixées par ajout de 1/10^{ème} de solution fixatrice (50 mM Tris pH 8, 11% formaldéhyde, 1 mM EDTA pH 8, 0,5 mM EGTA pH 8, 100mM NaCl), 5 min à 36°C puis 25 min à 17°C. Après la fixation, les cellules sont récoltées et subissent 2 lavages en PBS froid (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2) de façon à obtenir 2.10⁸ cellules par échantillon.

Préparation de la chromatine. La lyse des cellules est ensuite réalisée dans 400 µl de tampon de lyse (50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100, 0,1 % w/v sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 pastille d'inhibiteurs de protéases EDTA-free Roche et 1 pastille PhosSTOP de Roche pour les ChIP contre l'ARNPII), un volume de billes de verre (acid washed Sigma) et à l'aide du Precellys (Bertin instruments), 3 fois 10 sec à 6800 rpm. La lyse est vérifiée au microscope, le lysat est récolté dans de nouveaux tubes et le volume est réajusté à 500 µl final en tampon de lyse. La chromatine est alors fragmentée par sonication à l'aide du Diagenode Bioruptor préalablement refroidi à 4°C pendant 10 cycles 30 s ON/ 30 s OFF à vitesse maximale. Le lysat est ensuite clarifié par 2 centrifugations, 1 fois 10 min et 1 fois 5 min à 14 krpm 4°C.

Préparation des billes magnétiques. Après remise en suspension sur la roue des billes, un volume de 15 µl est prélevé par immunoprécipitation (IP). Elles sont lavées 3 fois dans 500 µl de tampon d'IP (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 1% v/v triton X-100), puis reprises dans ce tampon dans 5 fois leur volume initial moins le volume de l'anticorps

(AC). L'anticorps est ensuite ajouté : 4 µg/IP d'anti GFP (A11122 Life technologies) pour le ChIP Condensine, 4 µl/IP d'anti-ARNPII CTD ser2P pour le ChIP ARNPII (ab5095 Abcam). Le mix billes-anticorps est incubé 40 min sur la roue à 30 rpm, à température ambiante. Les billes-AC subissent ensuite 2 lavages de 500 µl de tampon d'IP et sont reprises dans le volume initial.

Les immunoprécipitations. A partir de la chromatine clarifiée (environ 400 µl), 70 µl est utilisé pour la vérification de la sonication (*Shearing*), 60 µl est gardé à 4°C pour constituer la partie de l'extraction totale (*Totaux*) et 300 µl subissent l'immunoprécipitation (*IPs*).

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

IPs. Les IPs sont divisées en deux, 15 µl de billes-AC sont ajoutés à 150 µl de chromatine clarifiée + 150 µl de tampon de lyse. Les tubes sont incubés sur la roue 30 rpm à 4°C sur la nuit. Le lendemain, les IPs sont lavées dans 500 µl de tampons de lavages (1^{er} tampon de lavage : 20 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH8, 1% v/v triton X-100 et 0,1% w/v SDS ; 2^{ème} tampon de lavage : 20 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA pH8, 1% v/v triton X-100 et 0,1% w/v SDS ; 3^{ème} tampon de lavage: 10 mM Tris/HCl pH 8, 1mM EDTA pH8, 0,5% w/v déoxycholate, 1% v/v Igepal, 250 mM LiCl ; 4^{ème} et 5^{ème} tampon : TE pH 8). Pour les 3 premiers lavages, les tubes sont incubés 5 min sur la roue à 30 rpm à température ambiante, les 2 derniers sont réalisés sans étape d'incubation. Finalement, à chaque culot (complexe immun) sont ajoutés 130 µl de tampon d'élution (TE pH 8, 0,5% w/v SDS, 0,35 mg/ml protéinase K). Le tout est incubé 4 h à 65°C dans le but de reverser les pontages protéines/ADN. Après incubation, l'ADN est purifié sur colonne du kit NucleoSpin Gel et PCR Clean-up de Macherey Nagel.

Totaux. Les 60 µl de chromatine clarifiée sont également divisés en deux tubes de 30 µl et sont gardés à 4°C sur la nuit. Ils sont ensuite traités en même temps que les IPs : incubés pendant 4h à 65°C après l'ajout de 100 µl de tampon d'élution (TE pH8, 0,5% SDS, 0,35 mg/ml

protéinase K) et l'extrait est purifié sur colonne du kit NucleoSpin Gel et PCR Clean-up de Macherey Nagel.

Les ADN totaux et co-immunoprécipités sont ensuite analysés par qPCR en présence de SyberGreen (amplifast Qiagen) dans un thermocycler de type Rotor Gene (Qiagen). La quantification a été réalisée par régression linéaire en utilisant une gamme d'ADN, amplifiée en parallèle.

2) Immunofluorescence sur étalement de la chromatine

Les cellules cultivées en milieu liquide en phase exponentielle de croissance à 28°C ont été placées à 36°C pendant 2h30 afin d'inactiver Condensine, puis arrêtées par ajout d'azide de sodium à 1 mM final pendant 5 min.

Préparation des sphéroplast. $5 \cdot 10^7$ cellules sont récoltées après lavage en eau milipore PMSF 1 mM. Les cellules sont reprises dans 900 µl de Sorbitol 1,2 M froid. La paroi des cellules est ensuite lysée par 6,7 mg/mL d'enzymes « *Trichoderma harzianum* lysing enzymes » (Sigma L1412) en tampon SP2 (1,2 M Sorbitol; Tri-sodium citrate 50mM; Na₂HPO₄ 50mM, pH 5.6). Après 30 min d'incubation à 37°C, la lyse des cellules est vérifiée sous microscope. Les sphéroplast sont ensuite déposés sur 1 ml de coussin de Sucrose froid (15% sucrose, 1,2M sorbitol, 10mM Tris-HCl, pH 7.5). Après deux centrifugations de 2 min à 4000 g à 4°C, deux lavages se succèdent : le premier avec une solution de Sorb/Tris froid (1,2 M Sorbitol 10 mM Tris-HCl, pH 7.5), et le deuxième de Sorb/MES froid (0,1 M MES, 1 mM EDTA, 0,5 mM MgCl₂, 1M Sorbitol, pH 6.4). Le culot est resuspendu dans 400 µl de Sorbitol/MES froid.

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

Immunofluorescence indirecte. Les étalements de chromosomes fixés sur les lames sont ensuite réhydratés et lavés dans 3 bains de PBS (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2) de 10 min, et mis à agiter doucement sur un plateau à 20 rpm. Les lames sont saturées par ajout de 100 µl d'une solution de blocage (25 mg BSA, 385 µl de gélatine de poisson 13%, en PBS) entre lame et lamelle. Après l'étape de blocage, la lamelle est retirée et l'excédent de liquide est drainé sur du papier Wathman. Une solution d'anticorps primaires anti-MYC (9E10) et anti-GFP (A111-22), (dilués au 1/400^{ème} et au 1/800^{ème} respectivement dans la solution de blocage) est déposée sur la lame (100 µl), et le tout est recouvert d'une lamelle. Les anticorps primaires incubent sur les lames 2 h à température ambiante sous agitation douce (plateau agitant à 20 rpm). Après incubation, la lamelle est retirée, la lame est soumise à 3 bains de lavages en PBS de 10 min, l'excédent de liquide est drainé par du papier Wathman. Une solution d'anticorps secondaires (anti-souris-CY3.5 (SIGMA) et anti-lapin-FITC (SIGMA)) sont dilués au 1/400^{ème} dans la solution de blocage est déposée sur la lame (100 µl), et le tout est recouvert d'une lamelle. Les anticorps secondaires incubent sur les lames sur la nuit à 4°C sous agitation douce (plateau agitant 20 rpm). Le lendemain la lame est soumise à 3 lavages de 10 min en PBS. L'excès de liquide est drainé complètement sur du papier absorbant. 50 µl de milieu de montage (0,3 µl DAPI 100 µg/ml, 150 µl de solution de blocage, 300 µl d'antifading Vectashield) est déposé sur la lame puis recouvert délicatement d'une lamelle. Les bords sont séchés avec du papier absorbant puis scellés au vernis ongle.

Détection et quantification du signal. Les cellules sont observées sous un microscope à fluorescence Axiolmager (Zeiss) à l'objectif 63X. Pour chaque longueur d'onde, des empilements de 8-10 images espacées de 0,2 µm en Z ont été acquis. L'acquisition se fait au format 12 bit, sans autoscale (4096 niveaux de gris allant de noir à blanc). La gamme linéaire de la caméra CCD est située entre 0 et 3000. Pour chaque filtre, on détermine la durée d'exposition permettant d'obtenir un signal max proche de 2000. Les réglages d'acquisition se font sur les noyaux sauvages, pour chaque longueur d'ondes et ces réglages seront sauvegardés sur les trois répliqués. Les images sont traitées avec le logiciel Image J (NIH). L'intensité des signaux Cy3 (correspondant aux protéines d'intérêts) est mesurée sur un carré de surface constante (70x70 pixels) contenant le noyau mitotique ou non mitotique. Le bruit de fond du signal de fluorescence est mesuré sur un carré d'une zone adjacente et sans noyau.

Le signal correspondant au bruit de fond est soustrait pour chaque noyau. L'intensité des signaux est mesurée sur 50 noyaux mitotiques et 100 noyaux interphasiques par échantillon.

Partie III - Résultats

Contexte des travaux de thèse

Cette partie présente les résultats préliminaires sur lesquels je me suis basée pour commencer mes travaux de thèse, et auxquels j'avais contribué lors de mon stage de M2.

I. Analyse transcriptomique des mutants de Condensine *cut3-477* et *cut14-208*

1) Les mutants Condensine accumulent des ARNs non codants et des ARNm

Pour déterminer si Condensine jouait un rôle dans le contrôle de l'expression génique, nous avons tout d'abord recherché si la quantité de certains transcrits variait dans un mutant déficient pour Condensine comparativement au sauvage. Avant mon arrivée au laboratoire, une analyse transcriptomique par puce à ADN de type Affymetrix Tilling Array 2.0 avait été réalisée pour tenter de répondre à cette question.

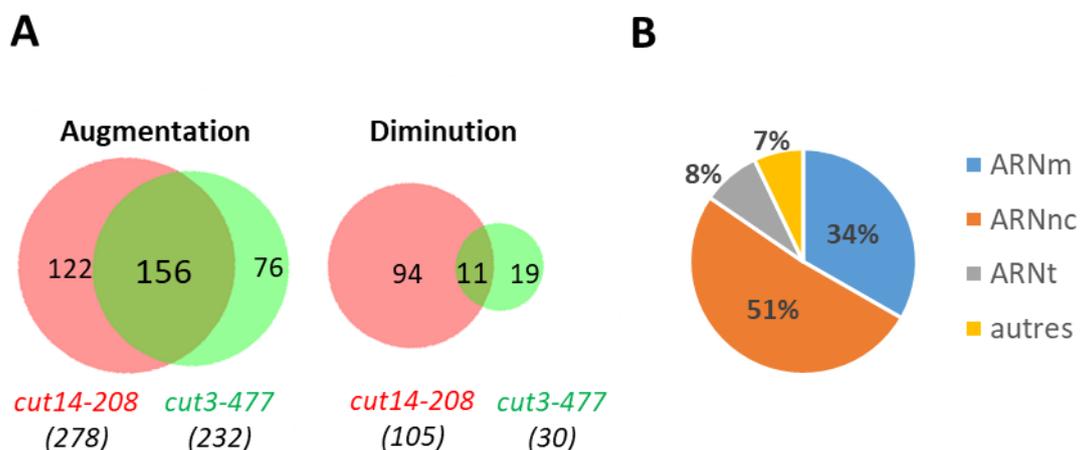


Figure 1 : Les mutants Condensine *cut3-477* et *cut14-208* accumulent des ARNnc et des ARNm.
A- Distribution des ARNs dont le niveau à l'équilibre est augmenté ou diminué d'au moins un facteur deux chez les mutants *cut3-477* et *cut14-208*. Figure basée sur l'analyse transcriptomique par microarray. **B-** Catégories des ARNs qui s'accumulent chez les deux mutants de Condensine *cut3-477* et *cut14-208*.

Deux souches mutantes thermosensibles *cut3-477* (SMC4) et *cut14-208* (SMC2) ont été cultivées à la température restrictive de 34°C pendant deux heures, pour inactiver Condensine pendant un cycle cellulaire. Afin d'identifier les potentielles cibles authentiques

du complexe Condensine, seuls les ARNs dont les niveaux à l'équilibre étaient modifiés au minimum par un facteur deux, dans les deux mutants *cut3-477* et *cut14-208* par rapport au contrôle sauvage, ont été recherchés. Par l'analyse des données de transcriptomique, il a été observé que 156 ARNs voient leur niveau à l'équilibre augmenter d'au moins un facteur deux dans les deux mutants Condensine, alors que 11 ARNs voient leur niveau diminuer (Figure 1A). Ainsi, 93% des ARNs différentiellement exprimés en l'absence d'un complexe Condensine pleinement fonctionnel, sont augmentés. Ce résultat suggère un rôle de répression de l'expression génique pour Condensine chez *S. pombe*.

Les transcrits régulés négativement par Condensine sont pour moitié des ARNs non codants (ARNnc) (51%), 34% sont des ARNm, et 8% des ARNt (Figure 1B). L'analyse des ARNm qui voient leur niveau augmenter dans les mutants Condensine ne montre pas d'enrichissement particulier pour un terme d'ontologie de gènes. Cependant, nous pouvons observer un enrichissement pour les ARNs non codants, qui sont présents aux alentours de seulement 22% (1522/6948) dans le génome de *S. pombe*. Les ARNs non codants sont des cibles de l'exosome, et de nombreux ARNnc s'accumulent dans des mutants de *dis3* ou *rrp6* (Houseley et al., 2006). L'accumulation d'ARNnc chez les mutants *cut3-477* et *cut14-208* suggère que l'exosome pourrait être en partie défectueux en l'absence de Condensine fonctionnelle. Condensine pourrait donc, de façon inattendue, réguler l'expression génique en lien avec la machinerie de dégradation des ARNs.

2) Les mutants de Condensine accumulent des ARNs étendus en 3'

La terminaison de la transcription est un phénomène bruité, qui produit naturellement des ARNs étendus en 3', dits *readthrough* (Zofall et al., 2009). Rrp6 a été mise en cause dans la dégradation des ARNs *readthrough* (Zofall et al., 2009), et plus récemment Dis3 a été impliquée dans la terminaison de la transcription (Lemay et al., 2014). En accord avec l'idée d'une possible défaillance de l'exosome, une inspection visuelle des données de transcriptomique des mutants *cut3-477* et *cut14-208* a révélé que l'expression de nombreux gènes semble se poursuivre après le site canonique de terminaison de la transcription dans les mutants Condensine comparé au sauvage (Figure 2A). Nous avons constaté que dans une souche sauvage, le niveau d'expression mesuré par puce à ADN chute dès la fin du CDS, pour

décroître dans la zone 3'UTR. En revanche, si un gène produit des ARNs étendus en 3', la décroissance du niveau des transcrits observée après le CDS est alors moindre (Fig. 2A). Ainsi, la production d'ARN étendus en 3' s'accompagne souvent d'une augmentation du signal d'hybridation mesuré dans la partie 3' UTR des gènes concernés. Pour tenter d'estimer le nombre de gènes présentant ce défaut chez les mutants *cut3-477* et *cut14-208*, la stratégie adoptée a été de calculer, pour chaque gène, le ratio du niveau d'expression dans la zone 3'UTR, sur le niveau d'expression du CDS (voir Figure 2A). Ce calcul ne permet d'obtenir qu'une estimation grossière du nombre d'ARNs readthrough potentiels, le mieux étant de regarder le niveau des transcrits en aval du site de terminaison de la transcription, dans les séquences intergéniques. Cependant, comme nous ne nous attendions pas à observer ce défaut en 3' des gènes dans les mutants Condensine, nous n'avions pas demandé au prestataire de quantifier le niveau d'expression dans ces zones. Les ratios 3'UTR/CDS obtenus dans la souche sauvage et dans les mutants ont ensuite été comparés. Un total de 321 gènes montrent une augmentation d'au moins un facteur deux de la valeur de ce ratio 3'UTR/CDS dans les mutants Condensine comparé au sauvage. Cela suggère que de nombreux ARNs étendus en 3' s'accumulent dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*.

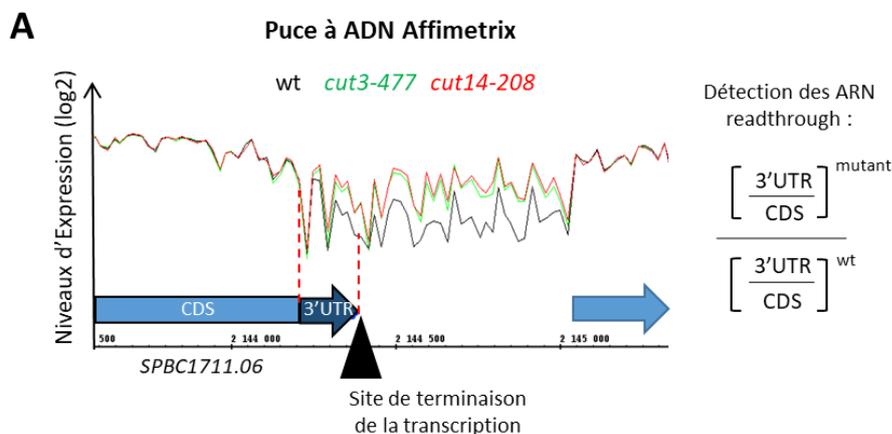
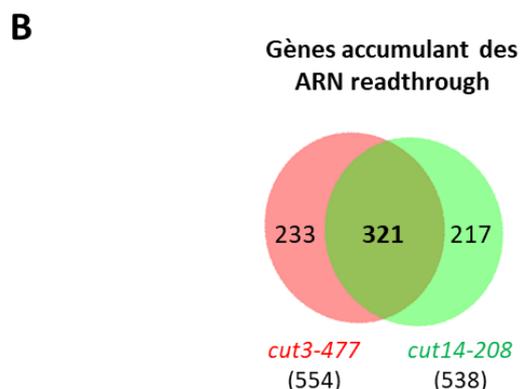


Figure 2 : Les mutants de Condensine *cut3-477* et *cut14-208* semblent accumuler des ARNs readthrough. A- Profil transcriptomique d'un gène qui semble être le site de production d'ARN étendus en 3' ou ARN readthrough. Le niveau d'expression dans le sauvage est en noir et dans *cut3-477* et *cut14-208* en vert et rouge respectivement. B- Diagramme de Venn recoupant les gènes dont le ratio 3'UTR/CDS est augmenté au moins 2 fois dans les deux mutants de Condensine comparé au sauvage.



Cette observation conforte notre hypothèse d'une défaillance de l'exosome chez les mutants Condensine. Cependant l'analyse fine des gènes produisant des ARNs readthrough chez les mutants *cut3-477* et *cut14-208*, et la comparaison précise des transcriptomes des mutants de Condensine et des mutants de l'exosome, restent à faire.

II. Interaction physique par double hybride entre Cut3 et Cti1/Rrp47

L'analyse transcriptomique par microarray, montre l'existence de similitudes phénotypiques entre les mutants Condensine et des mutants de l'exosome, suggérant que Condensine pourrait peut-être agir avec l'exosome dans une même voie de régulation de l'expression génique. En 2004, le groupe de M. Yanagida a détecté par double hybride une interaction physique entre la sous-unité Cut3 de Condensine et la protéine Cti1/Rrp47 (Chen et al., 2004). Rrp47 est un co-facteur essentiel de Rrp6, nécessaire à la stabilité de Rrp6 chez *S. cerevisiae* (Feigenbutz et al., 2013b; Schuch et al., 2014). Au cours de mon stage de master 2 réalisé dans

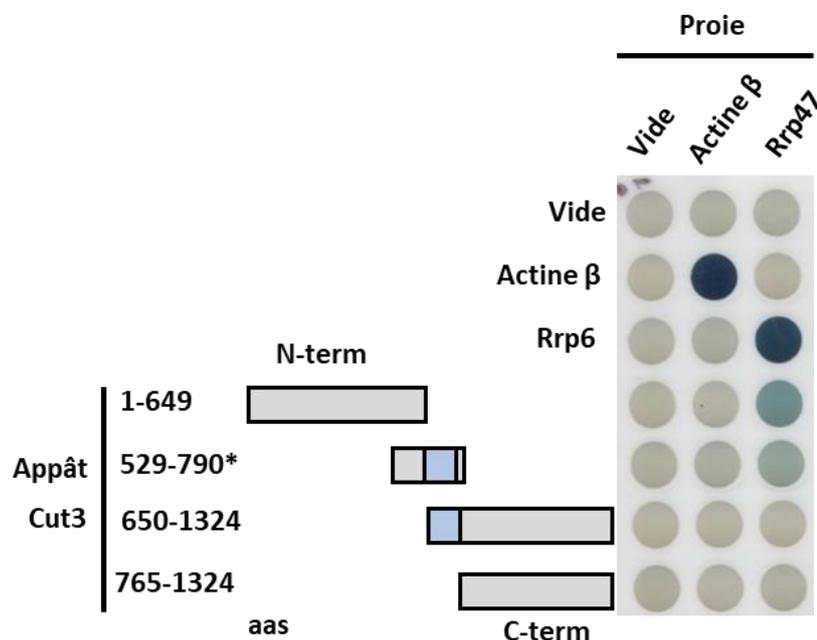


Figure 3 : La partie N-terminale de Cut3 interagit par double hybride avec Rrp47/Cti1. Test par double hybride de l'interaction entre Cut3 et Rrp47. L'ADNc de Rrp6, Rrp47 et des troncations de Cut3 ont été clonés dans des vecteurs pour exprimer des protéines fusions avec un domaine de liaison à l'ADN (constructions appâts) et un domaine d'activation de la transcription (constructions proies). Le signal bleu marque une interaction entre les protéines appât et proie. Les constructions de Cut3 sont représentées schématiquement et le domaine est précisé en acides aminés. La zone bleue correspond au domaine charnière de Cut3. L'étoile marque la construction utilisée par Chen *et al.* 2004.

l'équipe, j'ai reproduit la détection de l'interaction par double hybride entre Cut3 et Cti1/Rrp47.

On peut observer en Figure 3, que les protéines Rrp6 et Rrp47/Cti1 de *S. pombe* interagissent fortement, de manière cohérente avec la littérature (Feigenbutz et al., 2013b). Comme décrit par Chen *et al* (Chen et al., 2004), on observe une interaction assez faible entre Rrp47/Cti1 et le domaine charnière de Cut3 (domaine 529-790). J'ai également testé d'autres constructions de Cut3. La partie N-terminale de Cut3 (1-649) montre une interaction par double hybride avec Rrp47/Cti1 sensiblement plus forte que celle observée avec le domaine charnière de Cut3. Les autres constructions étudiées ne montrent aucune interaction par double hybride avec Rrp47. Nous avons vérifié que tous les peptides testés sont bien produits dans les levures *S. cerevisiae* (non-montré). Cela suggère l'existence d'un domaine d'interaction avec Rrp47 situé dans la partie N-terminale de la sous-unité Cut3/Smc4 de Condensine.

On sait, par la littérature, que l'exosome a besoin de nombreux co-facteurs pour fonctionner correctement (pour revue voir (Kilchert et al., 2016)). Nous avons alors fait l'hypothèse que Condensine pourrait agir comme un co-facteur de l'exosome, possiblement au sein d'un complexe ternaire Condensine/Rrp47/Rrp6, en ciblant la ribonucléase à proximité de la chromatine. Cette hypothèse était cohérente avec les rôles décrits de Rrp6 dans une régulation co-transcriptionnelle de l'expression génique, et avec l'accumulation d'ARNs sensibles à l'activité de l'exosome chez les mutants de Condensine *cut3-477* et *cut14-208*.

III. Conclusions et axes de travail

Au début de ma thèse, les résultats préliminaires présentés ci-dessus suggéraient un effet inattendu de Condensine dans la régulation de l'expression génique, possiblement en lien avec la dégradation contrôlée des ARNs par Rrp6. J'ai donc investigué plus en détail cette hypothèse par la suite. Dans un premier temps, je vous présenterai les résultats non publiés que j'ai obtenus au cours de ma thèse. Ils sont basés sur une recherche par protéomique des interacteurs de la sous-unité Cut3 de Condensine. Cette analyse avait pour but (1) de confirmer l'interaction de Condensine avec Rrp6 observée par test double hybride, et (2) de nous permettre de progresser dans la compréhension du rôle de Condensine dans le contrôle de l'expression génique en identifiant ses partenaires physiques impliqués dans ce processus.

En effet, nous avons imaginé que si Condensine et Rrp6 fonctionnaient ensemble dans une même voie de régulation de l'expression des gènes, il était possible qu'elles partagent des partenaires physiques. Enfin, cette analyse protéomique était aussi pertinente en soi, pour rechercher les interacteurs physiques et fonctionnels de Condensine. Les résultats de cette première partie ont mis en lumière un lien potentiel entre Condensine et des protéines liant les ARNs, parmi lesquelles Rrp6, ce qui renforçait fortement notre hypothèse de départ.

Je vous présenterai, dans un deuxième temps, mes résultats concernant l'étude des mécanismes par lesquels Condensine contrôle l'expression génique, ainsi que ceux du post-doctorant Xavier Robellet travaillant avec moi sur ce projet, qui ont donné lieu à un manuscrit en révision pour publication dans le journal E-life.

Ces résultats, basés sur l'analyse transcriptomique des mutants de Condensine et de *rrp6Δ*, nous ont permis de comprendre le lien fonctionnel qui relie Condensine à Rrp6 et l'exosome. Dans ce manuscrit, nous montrons que Condensine contrôle l'expression génique, et la répartition de l'exosome de la cellule mère aux cellules filles, en assurant la transmission fidèle des chromosomes au cours des divisions cellulaires.

Axe 1 : Liens entre Condensine et des protéines liant les ARNs

Au début de ma thèse nous avons donc réalisé une recherche globale des partenaires physiques de Condensine par protéomique, pour identifier de façon non-biaisée les partenaires physiques potentiels de Condensine, et incidemment progresser dans l'hypothèse que Condensine pourrait agir comme un co-facteur de l'exosome dans le contrôle de l'expression de certains gènes. La préparation des échantillons d'IP a été réalisée par l'équipe de notre collaborateur André Verdel (IAB-Grenoble) et la spectrométrie de masse par Yohann Couté (Laboratoire de Biologie à Grande Echelle–CEA-Grenoble). J'ai ensuite analysé plus en détail certains partenaires protéiques.

I. Recherche d'interacteurs de Cut3 par spectrométrie de masse

J'ai tout d'abord construit une version de la protéine Cut3 fusionnée avec une étiquette TAP positionnée à son extrémité 3'. Le gène *cut3* a été fusionné en position 3', à son locus, avec la séquence codante TAP. L'intégration a été vérifiée par PCR et par séquençage de la zone de fusion des séquences ADN. La souche de levure *cut3-TAP* est viable et ne montre pas de phénotype de croissance, indiquant que la protéine Cut3-TAP est fonctionnelle. La purification de Cut3-TAP suivie de la spectrométrie de masse, ont ensuite été réalisées par les équipes d'André Verdel et Yohann Couté. Une souche dépourvue de l'étiquette TAP a été utilisée comme contrôle pour éliminer les interacteurs aspécifiques. Ces expériences ont été réalisées sur de très larges cultures asynchrones de cellules de *S. pombe*, obtenues en fermenteur, qui contenaient environ 10% de cellules en mitose. Un traitement à la benzonase (nucléase) a été réalisé afin d'éliminer les interactions indirectes médiées par l'ADN ou les ARNs. L'entièreté du complexe Condensine a bien été purifiée, comme on peut le voir sur le gel d'argent en Figure 4A. Les cinq sous-unités de Condensine ont été retrouvées comme attendu dans la liste des interacteurs de Cut3, et elles se trouvent parmi les six premières protéines de la liste, classées selon leur abondance comparativement à la purification contrôle. Cela confirme la bonne précipitation du complexe Condensine avec Cut3 et valide l'analyse par spectrométrie de masse.

Un total de 713 protéines a été observé après l'analyse des résultats. Parmi cette liste, nous avons observé environ 200 protéines ribosomales, impliquées dans la biogénèse des ribosomes, des ribonucléoprotéines ou encore des protéines nucléolaires. Cette représentation importante de protéines du nucléole fait sens avec l'enrichissement de Condensine à l'ADNr (Nakazawa et al., 2008; Sutani et al., 2015), mais suggère qu'en immunoprécipitant Cut3, nous avons également purifié de manière indirecte une fraction non-négligeable du nucléole, ce qui jette un doute sur l'efficacité de la digestion par la Benzonase des fractions purifiées avec Cut3-TAP. Nous avons éliminé ces protéines de la liste des interacteurs potentiels de Condensine. Des 492 protéines restantes, nous avons gardé pour analyse les 308 protéines qui montrent une couverture protéique de plus de 10%. Cette liste de 308 protéines a été réduite à 238, par soustraction des protéines présentes dans le cytoplasme. Seules ces 238 protéines ont été considérées par la suite.

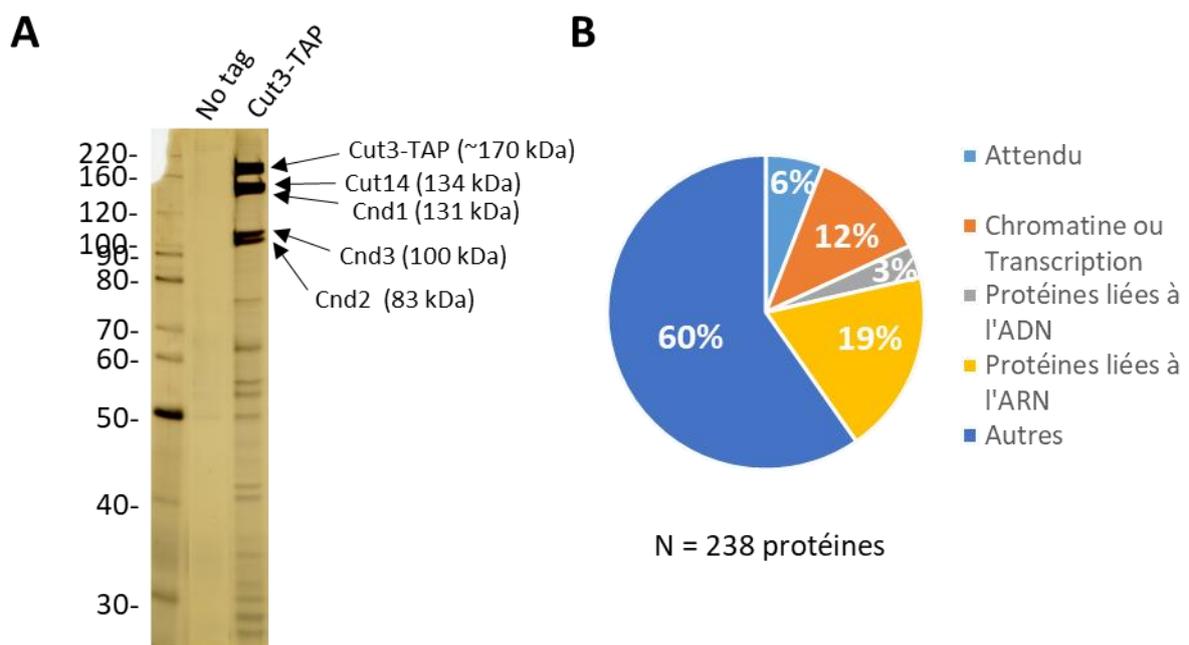


Figure 4 : Analyse par spectrométrie de masse des interacteurs potentiels de Cut3. A- Gel d'argent montrant la purification du complexe Condensine chez *S. pombe*. Les cinq sous-unités de Condensine sont indiquées avec leur poids moléculaire. Une souche *no tag* sert de contrôle de spécificité des interactions. B- Catégorie des 238 protéines interagissant potentiellement avec Cut3.

Nous avons alors observé que 6% de ces 238 protéines, correspondent à des interacteurs attendus de Condensine. On retrouve les sous-unités de Condensine, les histones H4 (Hhf1), H2A et H2B (Hta1, Htb1), la kinase Cdc2, les protéines du CPC : Bir1 Nbl1 et Pic1, et les phosphatases Clp1^{CDC14} et Dis2^{PP1}. Condensine a été montrée interagir avec l'histone H2A et

son variant H2A.Z (Tada et al., 2011), Cdc2 est la kinase qui phosphoryle Cut3 en mitose pour permettre son entrée dans le noyau (Kimura et al., 1998; Sutani et al., 1999), l'interaction avec les protéines du CPC est cohérente avec l'enrichissement de Condensine au centromère, et avec la phosphorylation de Condensine par Ark1 (Aurora-B). On aurait d'ailleurs pu s'attendre à trouver Ark1 dans la liste des interacteurs. CDC14 est connue pour réguler la localisation de Condensine à l'ADNr chez *S. cerevisiae* (Wang et al., 2004) et Dis2^{PP1} est un régulateur négatif de Condensine (Vagnarelli et al., 2006; Vanoosthuyse et al., 2014).

3% des 238 interacteurs potentiels de Cut3 sont des protéines liant l'ADN et 12% sont des protéines associées à la chromatine et/ou qui participent à la transcription. Ces résultats sont cohérents avec l'association de Condensine à la chromatine et son enrichissement aux gènes fortement transcrits. Un résultat plus inattendu est la présence de protéines liant les ARN à hauteur de 19% (Figure 4B). Parmi celles-ci se trouve notamment Rrp6. Ce résultat est cohérent avec notre hypothèse d'un lien fonctionnel entre Condensine et cette ribonucléase. On ne trouve pas Rrp47 dans la liste des interacteurs, ce qui est contraire au résultat de double hybride présenté dans la partie Contexte. Soit le résultat du double hybride est un faux positif, qui n'a pas de pertinence chez *S. pombe*. Soit Rrp47, qui est une petite protéine de 15 kDa, est difficile à détecter en spectrométrie de masse. On ne retrouve aucune autre protéine du complexe exosome. Il a été suggéré que Rrp6 pouvait fonctionner en dehors du complexe de l'exosome (Callahan and Butler, 2008). Condensine pourrait donc peut-être interagir avec Rrp6 en dehors de l'exosome. On retrouve également dans la liste des potentiels interacteurs de Cut3 les protéines Dbp2 et Dhp1, sur lesquelles je me suis plus particulièrement penchée, pour plusieurs raisons qui seront détaillées par la suite.

L'ARN hélicase DDX3/Belle a été montrée interagir avec Condensine I chez la Drosophile et l'Homme, et participer à la localisation chromatiniennne de Condensine I (Pek and Kai, 2011a, 2011b). De manière intéressante, nous avons aussi retrouvé l'hélicase Sum3 (DED1 chez *S. cerevisiae*) qui est l'homologue de DDX3/Belle dans la liste des interacteurs de Cut3. Malgré mes efforts, je n'ai cependant pas réussi à construire de protéine fusion pour étiqueter Sum3, ce qui m'a empêché d'analyser plus en détail cette interaction.

II. Liens entre Condensine et Rrp6, et Dbp2

Je me suis tout d'abord intéressée à l'interaction de Condensine avec Rrp6, et avec la protéine Dbp2. L'intérêt pour Rrp6 est évident de par notre hypothèse précédemment évoquée. L'intérêt pour la protéine Dbp2 vient des données de la littérature qui montrent que chez *S. cerevisiae*, le mutant *dbp2Δ* accumule des ARNnc et des ARN étendus en 3' (Cloutier et al., 2012). Ainsi, les mutants Condensine, *rrp6Δ* et *dbp2Δ* accumulent des transcrits aberrants qui semblent de même nature. De plus, l'orthologue de Dbp2 chez l'homme, DDX5, interagit *in situ* par PLA (*proximity ligation assay*) avec Rrp6/EXOSC10 (Zonta et al., 2013). A l'époque nous avons donc émis l'hypothèse que Condensine, Rrp6 et Dbp2 pourraient agir conjointement au sein d'un même complexe, dans la régulation de ces ARN aberrants. J'ai donc analysé plus en détail ces interactions potentielles.

1) Interactions physiques

J'ai tout d'abord tenté de confirmer l'interaction entre Cut3 et Rrp6 par une expérience de co-immunoprécipitation. Pour éviter de mettre en évidence des interactions médiées par de l'ADN ou des ARNs, j'ai digéré la fraction protéique retenue sur colonne d'affinité à la Benzonase (nucléase) pendant 10 min sur la glace, avant l'élution.

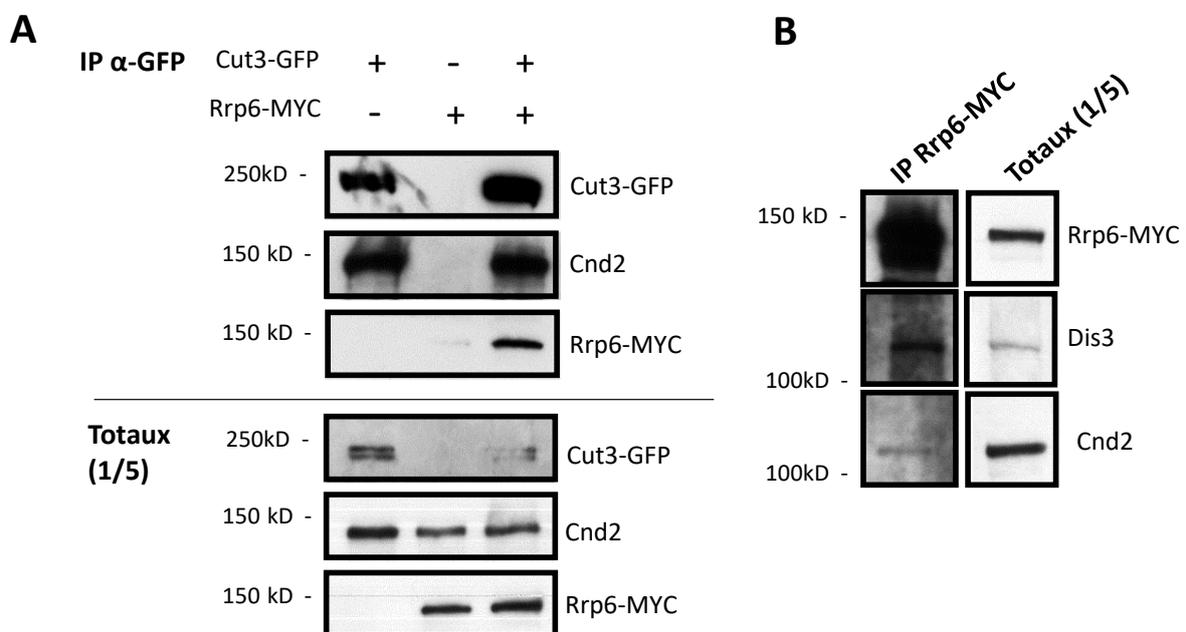


Figure 5 : La sous-unité Cut3 de Condensine co-immunoprécipite Cnd2 et Rrp6. Les co-IP ont été réalisées sur 2.10^8 cellules cultivées en phase exponentielle de croissance à 28°C. **A-** Co-immunoprécipitation de Cnd2 et Rrp6-MYC avec Cut3-GFP. Les fractions immunoprécipitées ont été digérées à la Benzonase pour éviter de révéler des interactions médiées par l'ADN ou les ARNs. **B-** Co-immunoprécipitation de Dis3 et Cnd2 avec Rrp6-MYC. Cette Co-IP a été réalisée à partir de 6.10^8 cellules au lieu de 2.10^8 cellules utilisées d'habitude.

On peut voir en Figure 5A que Cut3-GFP co-immunoprécipite Cnd2, ce qui confirme la capacité à purifier le complexe Condensine par immunoprécipitation de Cut3 dans ces conditions expérimentales. On peut également observer la co-immunoprécipitation de Rrp6-myc avec Cut3-GFP, confirmant l'interaction observée en spectrométrie de masse. L'immunoprécipitation de Rrp6-myc n'est visible que dans la souche possédant la version tagguée de Cut3, confirmant la spécificité de l'interaction (Figure 5A, au milieu). J'ai également réussi à observer l'interaction reverse, en co-immunoprécipitant Cnd2 avec Rrp6-MYC (Figure 5B). Dis3-HA est utilisée comme contrôle positif, confirmant la précipitation du complexe de l'exosome. Cependant, il est à noter que cette expérience ne possède pas de contrôle de spécificité. De plus, pour observer l'interaction entre Rrp6 et Cnd2, j'ai dû utiliser 3 fois plus de cellules que d'habitude ($6 \cdot 10^8$ cellules au lieu de $2 \cdot 10^8$ cellules). L'interaction est donc plus facile à observer en immuno-précipitant une sous-unité de Condensine que de l'exosome. Cela suggère que toutes les protéines Rrp6 ne sont pas associées à Condensine. Cela peut aussi s'expliquer par une sensibilité plus forte de l'anticorps anti-myc comparé à l'anticorps anti-GFP.

J'ai ensuite tenté de confirmer l'interaction de Condensine avec Dbp2 observée en spectrométrie de masse. Pour cela j'ai tout d'abord construit une version de la protéine Dbp2 fusionnée avec une étiquette MYC positionnée à son extrémité 3'. Le gène *dbp2* a été fusionné en position 3', à son locus, avec la séquence codante MYC. L'intégration a été vérifiée par PCR et par séquençage. J'ai réussi à confirmer l'interaction de Cut3 avec Dbp2, en co-immunoprécipitant Dbp2-MYC avec Cut3-GFP (Figure 6). Encore une fois, cette co-immunoprécipitation n'est visible que dans la souche possédant la version tagguée de Cut3 (Figure 6, au milieu), confirmant la spécificité de l'interaction.

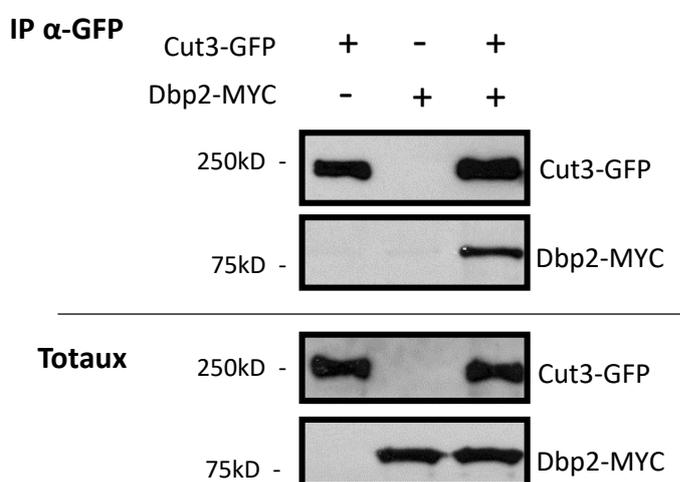


Figure 6 : La sous-unité Cut3 de Condensine co-immunoprécipite Dbp2. Co-immunoprécipitation de Dbp2-MYC avec Cut3-GFP. La co-IP a été réalisée sur $2 \cdot 10^8$ cellules cultivées en phase exponentielle de croissance à 28°C. Les fractions immunoprécipitées ont été digérées à la Benzonase pour éviter de révéler des interactions médiées par l'ADN ou les ARNs.

A la suite de l'observation des interactions de Cut3 avec Rrp6 et Dbp2 par co-immunoprécipitation, nous avons voulu savoir si ces interactions étaient directes ou indirectes et préciser quelles sous-unités de Condensine étaient impliquées dans l'interaction. Pour cela nous avons réalisé des expériences de double hybride. Ces expériences ont été réalisées par Xavier Robellet en collaboration avec David Cluet de l'équipe de Martin Spichty du LBMC. Je les présente dans mon manuscrit de thèse dans un souci d'exhaustivité.

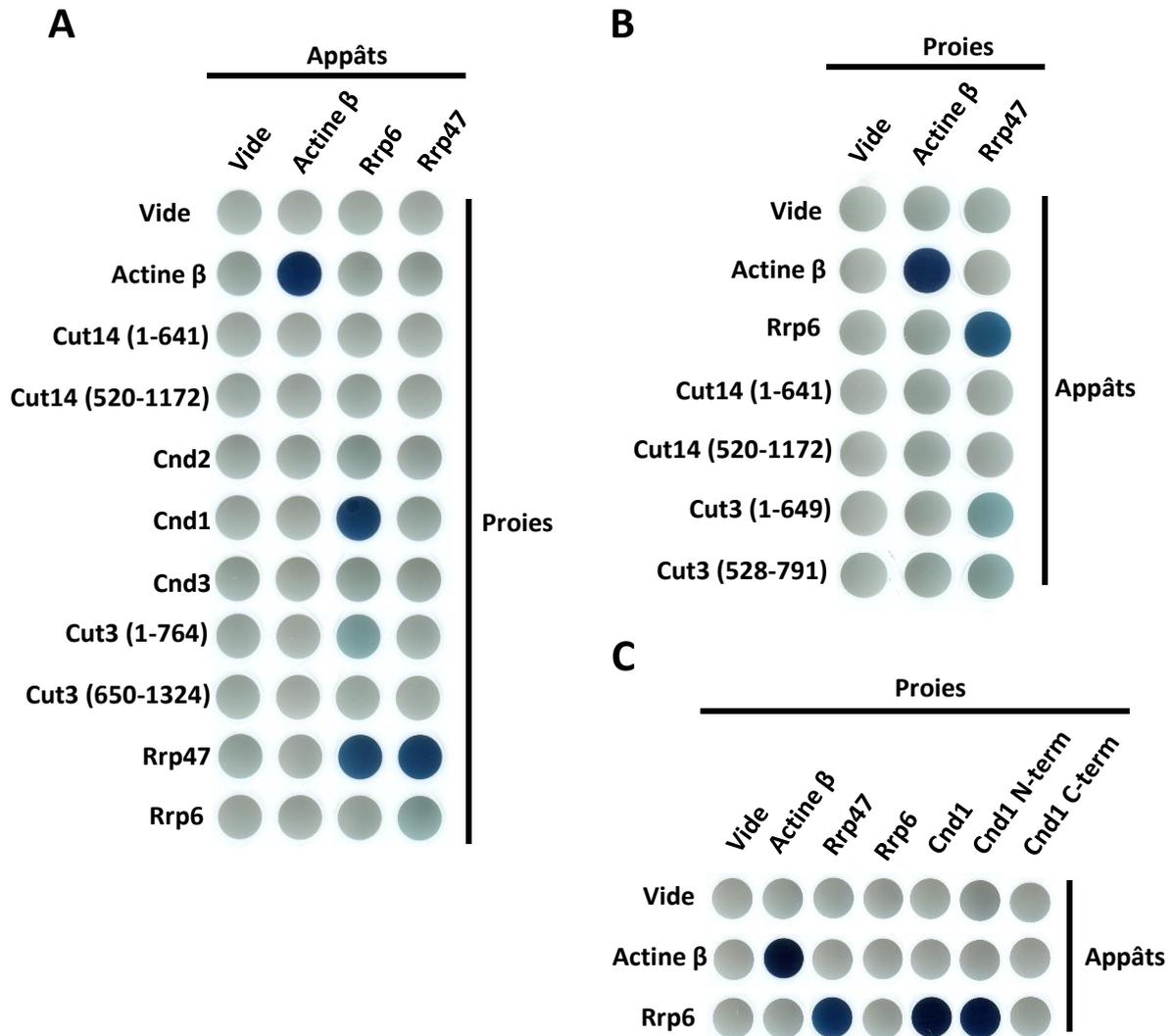


Figure 7 : La partie N-terminale de Cnd1 interagit fortement avec Rrp6 par double hybride. L'ADNc des protéines pleine taille et des tronçons de Cut3, Cut14 et Cnd1 ont été clonés dans des vecteurs pour exprimer des protéines de fusions avec un domaine de liaison à l'ADN (constructions appâts) et un domaine d'activation de la transcription (constructions proies). Le signal bleu marque une interaction entre les protéines appâts et proies. **A-** Mise en évidence de l'interaction entre Cnd1 et Rrp6 par double hybride. Le domaine des différentes constructions de Cut14 et Cut3 sont précisés en acides aminés. Rrp47 homodimérise comme publié par Feigenbutz *et al.* 2013. **B-** Reproduction de l'interaction publiée par Chen *et al.* du domaine N-terminal de Cut3 avec Rrp47. **C-** Le domaine N-terminal de Cnd1 est responsable de l'interaction avec Rrp6. N-term : 1 à 512 aas et C-term : 512 à

Lors des expériences de double hybride que j'ai réalisées en master (cf partie Contexte), je n'avais testé que l'interaction de Cut3 avec Rrp47. Ici, nous avons testé l'interaction des différentes sous-unités de Condensine avec Rrp47 mais aussi avec Rrp6. En Figure 7A, on peut voir le test d'interaction des cinq sous-unités de Condensine avec Rrp6 et Rrp47. Les sous-unités SMC Cut3 et Cut14 ont été séparées en deux parties, comme indiqué sur la Figure 7A. L'interaction de l'actine β avec elle-même sert de contrôle positif et l'absence d'interaction dans des levures portant un vecteur vide sert de contrôle négatif. On peut observer que Cnd1 interagit fortement avec Rrp6 par test double hybride (signal bleu intense en Figure 7A). Le niveau du signal est proche de celui observé pour l'interaction de Rrp6 avec son co-facteur essentiel Rrp47 (Feigenbutz et al., 2013b). Aucune autre sous-unité de Condensine ne montre d'interaction robuste avec Rrp6 ou Rrp47. La partie N-terminale de Cut3 interagit faiblement avec Rrp47 (comme précédemment observé) et également avec Rrp6 (Figure 7A et 7B). Etrangement, lorsque Rrp47 est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (configuration appât), la protéine interagit uniquement avec elle-même. Ce résultat est conforme aux données de Feigenbutz *et al.* qui montrent qu'en l'absence de Rrp6, Rrp47 homo-dimérise *in vitro* (Feigenbutz et al., 2013b). L'absence d'interaction de Rrp47 avec Rrp6 et la partie N-terminale de Cut3 peut s'expliquer par l'homodimérisation préférentielle de Rrp47 dans le contexte de sa fusion au domaine de liaison à l'ADN.

L'interaction double hybride entre Cnd1 et Rrp6 est beaucoup plus marquée que celle observée entre Cut3 et Rrp47 ou Rrp6. Cela suggère que l'interaction observée entre Condensine et Rrp6 par spectrométrie de masse et co-immunoprécipitation, serait principalement due à l'interaction directe de Cnd1 avec Rrp6. Nous avons ensuite essayé de déterminer le domaine d'interaction de Cnd1 avec Rrp6. Pour cela Xavier Robellet a testé l'interaction double-hybride de Rrp6 avec la partie N-terminale (1 à 512 aas) ou la partie C-terminale de Cnd1 (512 à 1158 aas). On peut voir en Figure 7C que la partie N-terminale de Cnd1 interagit avec Rrp6, alors que la partie C-terminale n'interagit pas avec Rrp6. Ce résultat montre que le domaine d'interaction de Cnd1 avec Rrp6 se situe dans la première moitié N-terminale de la protéine Cnd1.

A l'inverse, aucune interaction par double hybride n'a pu être observée entre Dbp2 et l'une des sous-unités de Condensine (données non montrées). Ce résultat suggère que Dbp2 n'interagirait pas directement avec Condensine, mais peut-être par le biais d'une autre

protéine (Rrp6 ?). Ce résultat est à pondérer par le fait que nous n'avons aucun contrôle positif d'interaction de Dbp2 avec une protéine contrôle.

2) Analyse fonctionnelle de l'interaction de Condensine avec Rrp6

L'interaction directe forte de Cnd1 avec Rrp6, observée par test double hybride, suggère une potentielle fonction biologique. A l'époque, ces résultats confortaient notre hypothèse d'un lien fonctionnel entre Condensine et Rrp6 dans la régulation de l'expression génique. J'ai donc continué à investiguer les liens entre Condensine et Rrp6. J'ai arrêté ici l'analyse de Dbp2, car *dbp2* est un gène essentiel et il n'existait aucun mutant conditionnel permettant de tester rapidement la pertinence d'un lien fonctionnel avec Condensine.

a) Interaction génétique négative entre *cut3-477* et *rrp6Δ*

J'ai d'abord regardé s'il existait une interaction génétique entre Rrp6 et Condensine, qui pourrait nous informer sur la fonction biologique portée par l'interaction physique précédemment observée.

Une interaction génétique caractérise le fait que le produit d'un gène impacte la fonction d'un autre gène. Cette interaction peut être directe, par l'interaction physique des protéines codées par ces deux gènes. Elle peut également être indirecte, par l'action du produit de ces deux gènes dans une même voie (on parle d'épistasie), ou dans différentes voies en redondance fonctionnelle. Une interaction génétique peut être positive ou négative, selon que le premier gène réprime ou active la fonction du second gène. Chez *S. pombe*, les interactions génétiques sont facilement observables par des tests en goutte. Le principe d'un test en goutte est de comparer la croissance des cellules simples mutantes à celle des cellules double mutantes associant ces deux mutations. Si la croissance du double mutant est altérée (ou à l'inverse favorisée) de manière synergique, comparée aux simples mutants, ces deux gènes sont dit en interaction génétique. J'ai donc recherché s'il existait une interaction génétique entre Rrp6 et Condensine. Si l'interaction physique observée entre Condensine et Rrp6 a une fonction biologique, nous nous attendons à voir une interaction génétique entre

des mutations de ces différents gènes. Le gène *rrp6* n'est pas essentiel, j'ai donc pu analyser la délétion de *rrp6* en association avec le mutant thermosensible *cut3-477*.

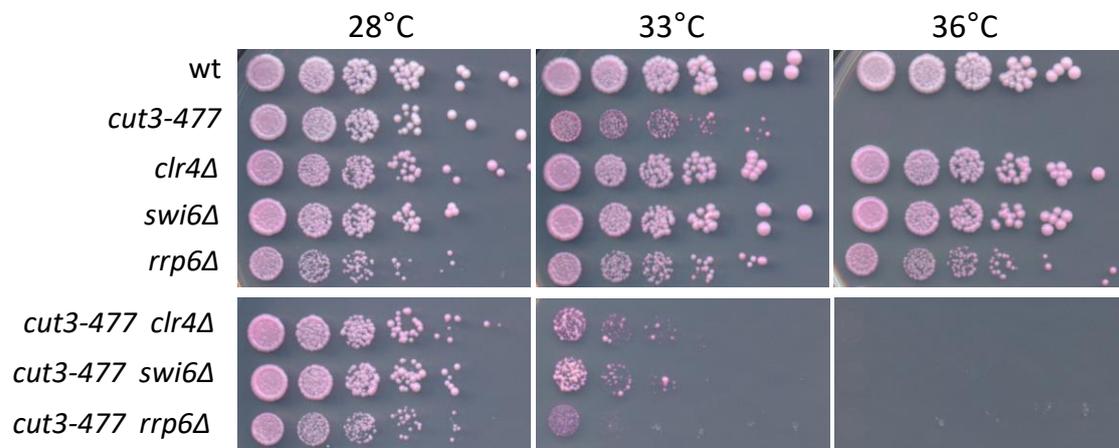


Figure 8 : La mutation *cut3-477* interagit négativement avec *rrp6Δ*, *clr4Δ* et *swi6Δ* à 33°C. Pour chaque souche, une suspension de 10^6 cellules a été diluée en série et déposée en gouttes sur du milieu complet supplémenté en phloxine B (colorant vital rouge qui s'accumule dans les cellules mortes). Les boîtes ont été incubées pendant 4 jours à 28°C, 33°C et 36°C.

A 28°C les simples mutants ainsi que le double mutant *rrp6Δ cut3-477* sont viables, mais la délétion de *rrp6* impacte cependant la croissance des levures, la taille des colonies est plus petite comparé au sauvage (Figure 8). A 33°C le mutant *cut3-477* pousse moins bien, la taille des colonies est réduite comparé au sauvage ou au mutant à 28°C, et les levures accumulent la phloxine, un colorant vital rouge qui s'accumule dans les cellules mortes. On peut néanmoins observer un effet synthétique négatif entre *rrp6Δ* et *cut3-477* à 33°C. La croissance du double mutant est fortement altérée comparé aux simples mutants à la même température. Il y a donc une interaction génétique négative entre *rrp6Δ* et *cut3-477*.

A 33°C, la souche mutante *cut3-477* est viable, mais les cellules présentent des ponts chromatinien en anaphase (Robellet et al., 2014). Ces ponts seront probablement majoritairement résolus avant la fin de la mitose, sinon ils seraient coupés par le septum en sortie de mitose et la souche ne serait pas viable (Yanagida, 1998). Comment comprendre cette interaction génétique ? Dans l'hypothèse où Rrp6 est l'effecteur final de la voie de régulation de l'expression génique impliquant Condensine, il est peu probable que le double mutant *cut3-477 rrp6Δ* meure à cause de l'accumulation d'ARN aberrants toxiques. En effet, le simple mutant *rrp6Δ* qui accumule déjà de multiples ARN aberrants est viable.

Une possibilité est que le double mutant souffre d'un défaut accru de ségrégation des chromosomes. Rrp6 a été montré participer à la formation de l'hétérochromatine péri-centromérique, en parallèle de la voie de l'ARNi chez *S. pombe* (Bühler et al., 2007; Reyes-Turcu et al., 2011). L'hétérochromatine péri-centromérique est nécessaire à la bonne fonction centromérique, et, de ce fait, est nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes. Chez *D. melanogaster*, la réduction du dosage de Rrp6 montre l'apparition de défauts de ségrégation des chromosomes (Graham et al., 2009), peut-être en lien avec une défaillance d'hétérochromatine. Une possibilité est alors que l'interaction génétique négative observée entre *rrp6Δ* et *cut3-477* soit due à l'addition des défauts de ségrégation des chromosomes venant de défauts de l'hétérochromatine péri-centromérique et de condensation des chromosomes. Pour analyser cette hypothèse, j'ai comparé l'interaction génique entre *cut3-477* et la mutation *rrp6Δ*, à deux mutations impactant fortement l'hétérochromatine péri-centromérique : *clr4Δ* et *swi6Δ*. Clr4 est une histone methyl-transférase, homologue de SUV39h chez les mammifères, qui catalyse la méthylation d'H3K9, notamment aux zones d'hétérochromatine péri-centromériques. Swi6, homologue d'HP1 chez les mammifères, reconnaît les modifications H3K9me3 grâce à son chromodomaine et participe à la mise en place et au maintien de l'hétérochromatine péri-centromérique par la voie du RNAi (pour revue voir (Lejeune et al., 2010; Verdell and Moazed, 2005)). Comme suspecté, on peut également observer une interaction génétique négative de *cut3-477* avec *clr4Δ* ou *swi6Δ*, même si elle est moins marquée qu'avec *rrp6Δ*. Il est donc possible que l'interaction génétique observée entre *rrp6Δ* et *cut3-477* soit due à l'addition de différents défauts, impactant tous deux la ségrégation des chromosomes.

Cependant, il est également possible que les mutations *clr4Δ* et *swi6Δ* réorientent des ARNs non-codant péri-centromériques, normalement dégradés par la voie de l'ARNi, vers Rrp6, surchargeant l'activité de cette dernière. Cela pourrait induire indirectement des défauts de fonctionnement de l'exosome dans ses voies de maturation et de dégradation des ARN. L'interaction génétique observée entre *cut3-477* et *clr4Δ* ou *swi6Δ* pourrait alors se résumer à un défaut de fonctionnement de Rrp6 et de l'exosome dans *cut3-477*. Cela aurait pour résultat de phéno-copier l'interaction génétique observée entre *rrp6Δ* et *cut3-477*.

Alternativement, Rrp6 pourrait favoriser le fonctionnement correct de Condensine dans la condensation des chromosomes. En l'état, nous ne pouvons donc pas expliquer les bases moléculaires de l'interaction génétique entre *rrp6Δ* et *cut3-477*.

b) La réduction de l'association de Condensine à la chromatine dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208* n'est pas suffisante pour expliquer les dérégulations géniques

Pour déterminer si Condensine pouvait agir directement dans l'expression des gènes, possiblement avec Rrp6, j'ai ensuite analysé la localisation du complexe SMC aux gènes dérégulés dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*. Pour cela j'ai réalisé une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dirigée contre la kleisine Cnd2 de Condensine étiquetée avec la GFP (Cnd2-GFP). Les cellules ont été bloquées en métaphase et les mutants ont été inactivés à 36°C pendant 2h30.

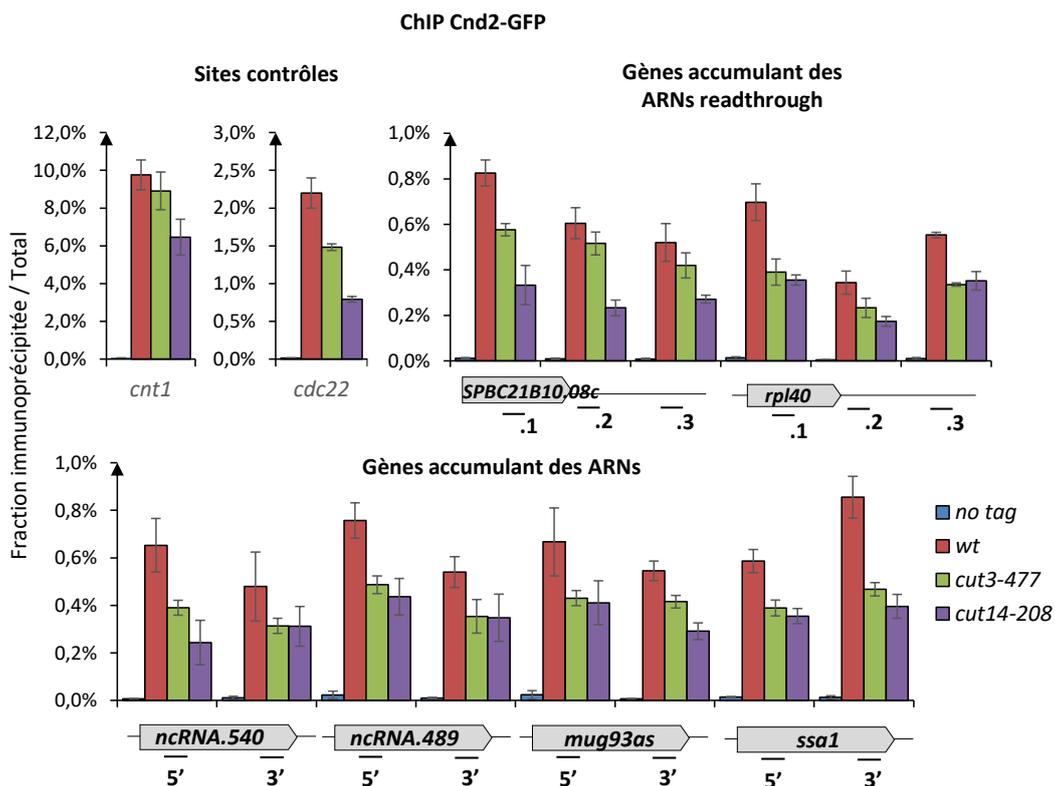


Figure 9 : La réduction de l'association de Condensine à la chromatine dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208* n'est pas suffisante pour expliquer les dérégulations géniques. ChIP contre la sous-unité Cnd2-GFP de Condensine. Les cellules des génotypes indiqués sur la Figure ont été cultivées à 28°C en milieu minimum. L'arrêt des cellules en métaphase a été obtenu grâce à l'ajout de thiamine (20 μM) dans le fond génétique *P_{mtt1}-slp1*. L'index mitotique de chaque souche a été mesuré et avoisine les 90%. Après 1h30 d'arrêt en métaphase les cellules ont été soumises à un shift de 2h30 à 36°C. Les valeurs moyennes et les écarts types représentés sont issus de trois ChIPs effectués sur trois réplicats biologiques.

On peut voir en Figure 9 que Cnd2-GFP est associée aux gènes qui accumulent des ARNs (de type codants, non codants ainsi que des ARNs readthrough) dans les mutants de Condensine. Cependant, il faut noter que cette association n'est pas très forte comparée aux pics connus d'association de Condensine à la chromatine, comme le site centromérique *cnt1* (environ 10%) et le gène *cdc22* (environ 2,3%). Dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*, on peut voir que l'association du complexe à la chromatine est réduite à tous les sites étudiés, confirmant la dissociation globale de Condensine des chromosomes dans ces mutants à température restrictive (Nakazawa et al., 2015; Robellet et al., 2014; Tada et al., 2011). Cependant, et de façon cruciale, nous avons observé que tous les gènes occupés par Condensine ne sont pas dérégulés par les mutations *cut3-477* et *cut14-208*. Par exemple l'expression du gène *cdc22* n'est pas modifiée dans les fonds génétiques *cut3-477* et *cut14-208*. Ces résultats montrent que la seule présence de Condensine sur la chromatine n'est pas suffisante pour expliquer les dérégulations géniques observées dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*.

c) Maintien de l'interaction physique de Condensine/Rrp6 dans *cut3-477* et *cut14-208*

J'ai ensuite recherché si l'interaction physique entre Condensine et Rrp6 était perturbée dans les mutants de Condensine *cut3-477* et *cut14-208*. Si Condensine était un co-facteur de Rrp6 pour la dégradation de certains ARNs aberrants, nous nous attendions à observer une perturbation de l'interaction de Condensine avec Rrp6 dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*, qui aurait pu expliquer les défauts transcriptomiques observés dans ces souches. J'ai donc réalisé une expérience de co-immunoprécipitation entre Rrp6 et la sous-unité Cnd2 de Condensine, dans une souche sauvage et dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208* inactivés pendant 2h30 à la température restrictive de 36°C.

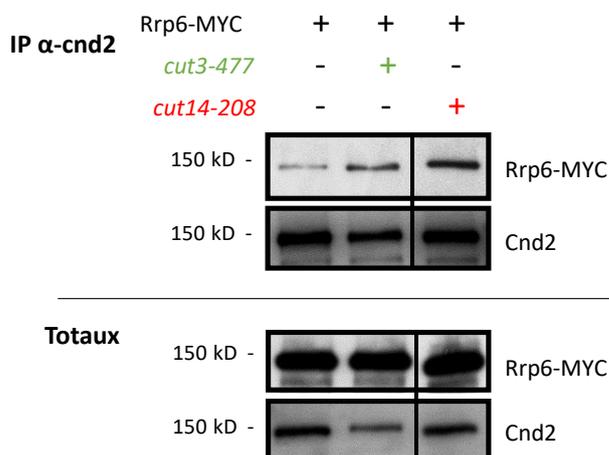


Figure 10 : Cnd2 co-immunoprécipite toujours Rrp6 dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*. Co-IP de Rrp6-myc avec Cnd2 dans des cellules cultivées à 28°C et soumises à un shift de 2h30 à 36°C. Les lysats co-immunoprécipités ont été digérés à la Benzonase. Une piste a été éliminée pour plus de clarté (représenté par un trait noir), mais il s'agit de la même membrane.

Contrairement à ce que l'on attendait, on peut voir en Figure 10 qu'il n'y a pas de réduction de l'interaction entre Condensine et Rrp6 dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*. L'interaction semble à l'inverse augmentée/stabilisée. Mais cette expérience n'est pas quantitative et ne permet pas de conclure avec certitude quant à cette augmentation.

Comment concilier le maintien de l'interaction entre Condensine et Rrp6, avec une diminution de l'association de Condensine à la chromatine dans ces mutants ? On peut imaginer que Rrp6 puisse maintenir une interaction avec la fraction de complexes Condensine restée associée à la chromatine dans *cut3-477* et *cut14-208*, ou alors que Rrp6 soit délocalisée de la chromatine conjointement avec les complexes Condensine avec lesquels elle interagit. Une autre possibilité serait que les mutations *cut3-477* et *cut14-208* induisent un signal ou un état dans la chromatine qui promeut l'interaction de Condensine avec Rrp6.

d) L'association globale de Rrp6 à la chromatine demeure inchangée chez le mutant *cut3-477*

Si la fonction de Condensine est de recruter Rrp6 sur la chromatine, alors on peut espérer observer moins de protéines Rrp6 associées à la chromatine dans les cellules mutantes *cut3-477* et *cut14-208*, chez lesquelles les Condensines sont délocalisées de la chromatine. J'ai alors testé s'il y avait globalement moins de protéines Rrp6 associées à la chromatine dans un mutant *cut3-477*, par une expérience d'étalement de chromatine. Le principe de cette expérience est d'extraire par la pression osmotique les noyaux de levures dont la paroi a été pré-digérée de manière enzymatique, de les lyser en présence de détergent et de fixateur (formaldéhyde), et en même temps d'étaler la chromatine libérée sur une lame de verre. La chromatine et les protéines associées collent à la lame de verre. Les protéines nucléosolubles et les débris cellulaires sont éliminés par lavages et les protéines d'intérêt sont détectées par immunofluorescence. Il est ainsi possible de quantifier l'association de diverses protéines à la chromatine. Afin d'identifier la chromatine provenant de cellules en mitose, en l'absence de signaux cytologiques observables, nous avons détecté une protéine du kinétochore (Dam1) qui se localise au kinétochore uniquement pendant la mitose (Cheeseman et al., 2001).

Les résultats consignés dans la Figure 11, montrent que Rrp6 est associée à la chromatine en mitose et en interphase, ce qui est cohérent avec l'idée que l'exosome pourrait fonctionner à

proximité de la chromatine. En revanche, il n'y a pas de dissociation globale de Rrp6 de la chromatine dans un fond génétique *cut3-477* comparé au sauvage, que ce soit en interphase ou en mitose. Ce résultat contredit l'hypothèse d'un rôle pour Condensine dans le recrutement de Rrp6 sur la chromatine.

Toutefois, l'analyse globale menée ici ne permet pas de mesurer une diminution (ou une augmentation) locale de l'association de Rrp6, en certains sites discrets des chromosomes. Pour répondre à cette question il faudrait réaliser une immunoprécipitation de chromatine (ChIP) contre Rrp6. Cependant cette expérience est réputée difficile avec Rrp6. A ce stade, l'ensemble de mes résultats suggère que Condensine ne joue pas de rôle majeur dans l'association globale de Rrp6 à la chromatine.

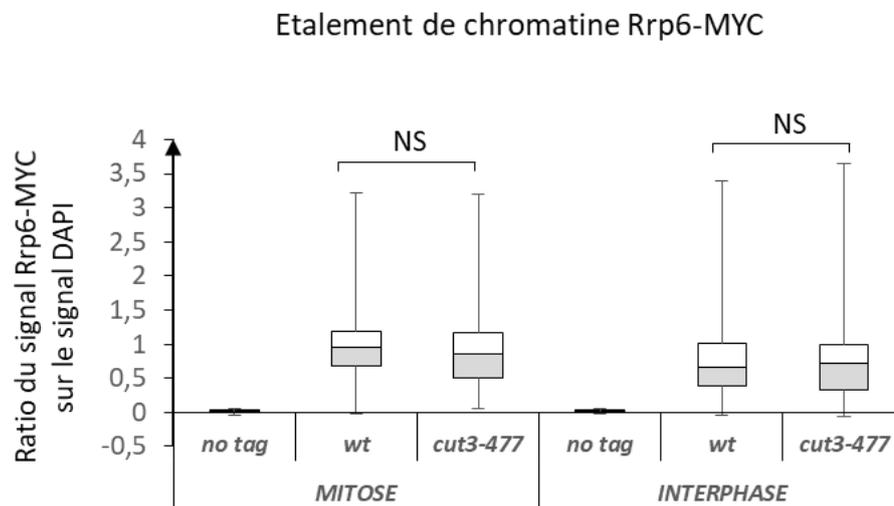


Figure 11 : L'association globale de Rrp6 à la chromatine n'est pas modifiée dans le mutant *cut3-477*. Les souches indiquées ont été cultivées à 28°C puis placées à 36°C pendant 2h30. Les cellules ont ensuite été traitées pour un étalement de la chromatine et une quantification de la fraction chromosomique de Rrp6-MYC par immunofluorescence anti-MYC. Les noyaux mitotiques sont identifiés par immunofluorescence contre Dam1-gfp. Pour chaque souche et chaque noyau, le ratio du signal Rrp6-MYC/DAPI a été mesuré (n≥40). NS = p-value > 0,05 par le test U de Mann and Whitney.

e) L'occupation de l'ARNPII n'est pas modifiée aux gènes dérégulés dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*

En l'absence d'une Condensine fonctionnelle dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*, on peut observer l'accumulation d'ARNs codants, non codants et étendus en 3' (Figures 1 et 3). Cependant, on peut se demander si l'accumulation de ces ARNs provient d'une transcription accrue des gènes, ou bien d'une moindre dégradation des transcrits. Si Condensine régule l'expression des gènes par l'action de la ribonucléase Rrp6, on peut s'attendre à ce que les ARNs s'accumulent du fait d'un défaut de dégradation dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*. Pour répondre à cette question j'ai mesuré par ChIP l'occupation par l'ARNPII en cours d'élongation (phosphorylée sur la Serine 2 du CTD) des gènes dérégulés chez les mutants Condensine *cut3-477* et *cut14-208* et chez *rrp6Δ*.

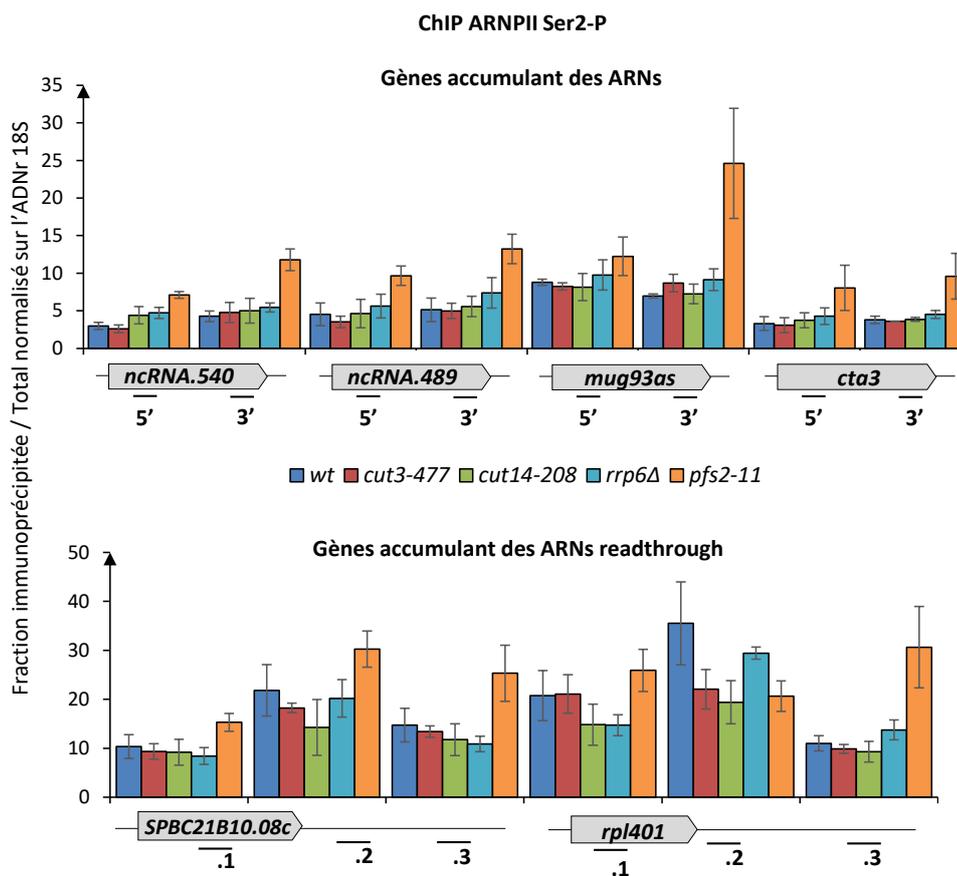


Figure 12 : L'occupation de l'ARNPII n'est pas modifiée aux gènes dérégulés dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208*. Les cellules des génotypes indiqués sur la figure ont été cultivées à 28°C en phase exponentielle de croissance, soumises à un shift de 2h30 à 36°C puis préparées pour un ChIP contre la Ser2 phosphorylée du CTD de l'ARNPII. Le mutant de terminaison *pfs2-11* est un contrôle positif d'accumulation d'ARNPII en 3' des gènes. Les valeurs moyennes et les écarts types représentés sont issus de 6 ChIPs effectués sur 3 réplicats biologiques.

On peut voir en Figure 12 que l'occupation de l'ARNPII est inchangée en 5' et en 3' de quatre gènes dérégulés dans les mutants de Condensine. Le mutant de Rrp6 montre le même résultat. Au contraire, je détecte bien une accumulation de l'ARNPII en 3' des gènes chez le mutant de terminaison *pfs2-1*, utilisé ici comme contrôle positif (Wang et al., 2005). Ce résultat suggère que l'accumulation des ARNs correspondant à ces gènes, chez les mutants *cut3-477* et *cut14-208* n'est probablement pas la conséquence d'une transcription accrue. Le corollaire est que l'accumulation de ces ARNs serait plutôt causée par un défaut de dégradation, possiblement par Rrp6. De la même manière, les gènes qui accumulent des ARNs readthrough dans les mutants de Condensine ne montrent pas non plus d'augmentation de l'occupation de l'ARNPII après le site de terminaison de la transcription dans les mutants *cut3-477* *cut14-208* et *rrp6Δ*, à l'inverse de *pfs2-11*.

Ce résultat suggère que les ARN étendus en 3' pourraient être le résultat d'un défaut de surveillance et de dégradation par Rrp6. Cette hypothèse est cohérente avec le rôle proposé de Rrp6 dans la dégradation d'ARNs readthrough (Zofall et al., 2009), mais diffère du rôle publié de l'autre ribonucléase de l'exosome, Dis3, dans la terminaison de la transcription (Lemay et al., 2014). On peut imaginer que Condensine en interaction avec Rrp6 fonctionne dans une voie de surveillance et de dégradation d'ARNs aberrants readthrough, en dehors du rôle établi de Dis3 dans la terminaison de la transcription. Alternativement, il est possible que le rôle de Condensine et Rrp6 dans la terminaison de la transcription soit moins important que celui de Dis3. L'immunoprécipitation de chromatine contre la Ser2 phosphorylée du CTD de l'ARNPII pourrait alors ne pas être assez sensible pour visualiser une faible augmentation de l'occupation de l'ARNPII en aval des gènes dans les mutants *cut3-477*, *cut14-208* et *rrp6Δ*.

III. Lien de Condensine avec Dhp1

La recherche des partenaires potentiels de Cut3/Condensine avait identifié la protéine Dhp1 de *S. pombe*. Dhp1 est l'orthologue de la protéine RAT1 chez *S. cerevisiae* et de XRN2 chez l'homme, qui sont les ribonucléases dite *torpedo* qui participent activement à la terminaison de la transcription (Tollervey, 2004). Sachant l'accumulation de transcrits étendus en 3' chez les mutants de Condensine *cut3-477* et *cut14-208*, je me suis aussi intéressée de plus près à l'interaction potentielle entre Dhp1 et Condensine.

1) Interaction physique

J'ai tout d'abord essayé de confirmer l'interaction entre Condensine et Dhp1 par une expérience de co-immunoprécipitation. Comme attendu, on peut observer en Figure 13 que l'immunoprécipitation de Cnd2-gfp co-précipite la protéine Dhp1-myc de manière spécifique.

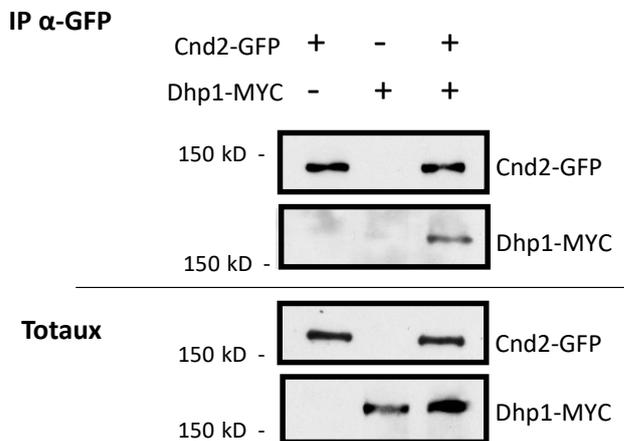


Figure 13 : La sous-unité Cnd2 de Condensine co-immunoprécipite Dhp1. Co-immunoprécipitation de Cnd2-gfp et Dhp1-myc avec un anticorps anti-gfp. La co-IP a été réalisée sur 2.10^8 cellules cultivées en phase exponentielle de croissance à 28°C. Les fractions immunoprécipitées ont été digérées à la benzonase avant élution.

Xavier Robellet a également regardé si la protéine Dhp1 pouvait interagir directement avec une sous-unité de Condensine par test double hybride. Il a testé toutes les sous-unités du complexe Condensine, et n'a pu mettre en évidence aucune interaction directe (données non montrées). Il a utilisé la protéine Din1 (*Dhp1-interacting*) comme contrôle positif d'interaction avec Dhp1, qui montre un signal en double hybride comme attendu (Chalamcharla et al., 2015). Condensine ne semble donc pas interagir directement avec Dhp1.

2) Analyse fonctionnelle de l'interaction de Condensine avec Dhp1

a) Interaction génétique de *cut3-477* avec *dhp1-154*

J'ai ensuite recherché si, comme pour *rrp6Δ*, une mutation de *dhp1* pouvait interagir génétiquement avec des mutations de Condensine. Le gène *dhp1* est essentiel, mais il existe deux mutations thermosensibles que j'ai testées en association avec des mutations de Condensine. La mutation *dhp1-1* correspond à une troncation de la partie C-terminale du gène (des acides aminés 867 à 991), et ce mutant pousse bien jusqu'à 33°C d'après Takeo Shobuike et al. (Shobuike et al., 2001). La deuxième mutation que j'ai utilisée est la mutation *dhp1-154*, qui est une substitution de l'histidine 229 par une arginine. Le mutant *dhp1-154* n'est pas

viable à 37°C d'après Kenichi Sajiki *et al.* (Sajiki et al., 2009). J'ai d'abord testé si ces deux mutations interagissaient génétiquement avec la mutation *cut3-477* de Condensine.

En Figure 14A on peut voir que tous les mutants poussent bien après 3 jours à 28°C (*cut3-477*, *dhp1-1*, *dhp1-154* et les doubles mutants). Par contre à 32°C, le mutant *dhp1-1* est non viable, contrairement à ce qui a été publié, empêchant son analyse à 32°C dans un fond génétique *cut3-477*. Au contraire le mutant *dhp1-154* est viable à 32°C. Mais la souche double mutante *cut3-477 dhp1-154* ne pousse pas à cette température. Les mutations *cut3-477* et *dhp1-154* sont donc synthétiquement létales. Cette interaction génétique négative suggère une potentielle réalité biologique à l'interaction physique qui a été observée entre Condensine et Dhp1. La bonne fonction de Condensine est peut-être nécessaire au fonctionnement de Dhp1, ou inversement. Il est cependant aussi possible que cette interaction génétique traduise une interaction fonctionnelle indirecte en cascade.

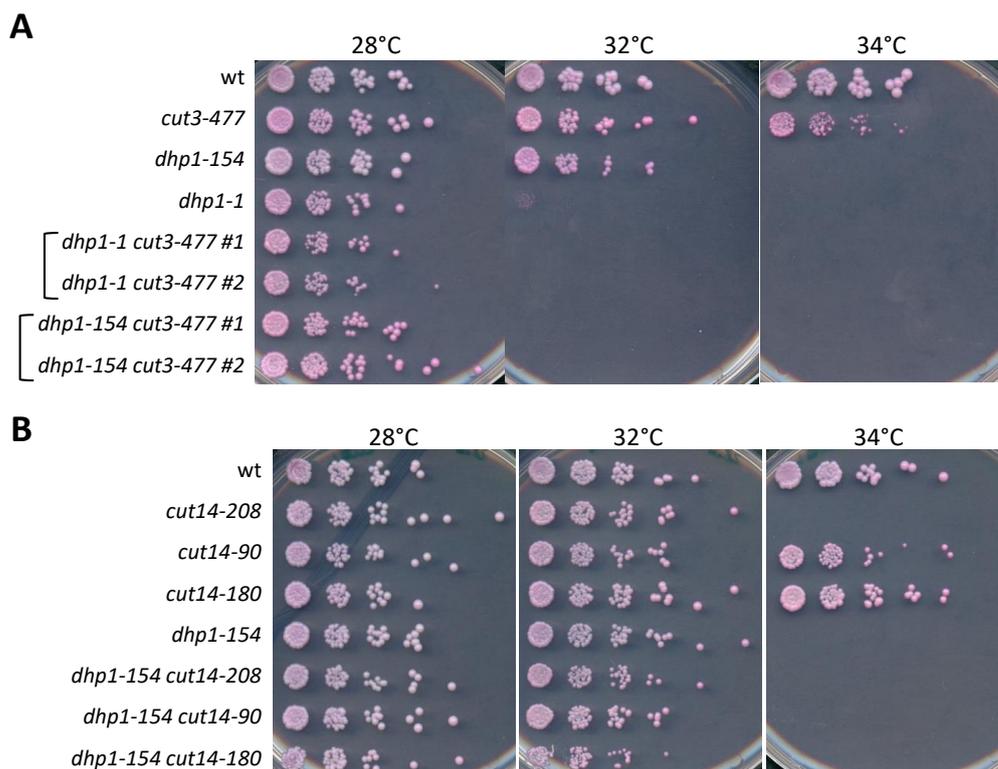


Figure 14 : La mutation *dhp1-154* interagit négativement avec *cut3-477* à 32°C. Pour chaque souche, une suspension de 10^6 cellules a été diluée en série et déposée en gouttes sur du milieu complet supplémenté en phloxine B (colorant vital rouge qui s'accumule dans les cellules mortes). Les boîtes ont été incubées pendant 4 jours à 28°C, 33°C et 36°C.

J'ai ensuite également testé trois mutations de la sous-unité Cut14 pour des interactions génétiques avec *dhp1* : *cut14-208* (S861P), *cut14-90* (T652M) et *cut14-180* (C631Y). La mutation *cut14-208* est létale à partir de 34°C, tandis que *cut14-90* et *cut14-180* sont létales à 36°C (Robellet et al., 2014; Saka et al., 1994). En Figure 14B, on voit que les souches associant *dhp1-154* avec chacune de ces mutations de *cut14* sont également viables à 28 et 32°C. On n'observe donc pas d'interaction génétique entre ces mutants de *cut14* et *dhp1* à 32°C, à l'inverse de *cut3-477*.

Quelle est la spécificité de l'allèle *cut3-477* qui pourrait expliquer son interaction avec *dhp1-154* ? Cette distinction peut s'expliquer par les différents degrés de thermo-sensibilité des mutants de *cut14* comparé à *cut3-477*. Nakazawa *et al.* ont montré que la mutation *cut14-208* induit des défauts massifs de ségrégation des chromosomes en seulement quinze minutes après un shift de température à 36°C (Nakazawa et al., 2015). Cependant, à 30°C, la mutation *cut14-208* n'induit aucun défaut de ségrégation des chromosomes (Nakazawa et al., 2011), suggérant que le complexe Condensine est encore globalement fonctionnel à cette température. A l'inverse, des expériences réalisées au laboratoire avant mon arrivée en thèse ont montré que l'effet de la mutation *cut3-477* sur la ségrégation des chromosomes était graduel avec l'augmentation de la température et s'exerçait dès 25°C (Robellet et al., 2014). Il est possible d'observer des défauts de ségrégation des chromosomes en anaphase dès 25°C chez *cut3-477*, qui s'intensifient avec la température. Une possibilité est que les mutants *cut14-90* et *cut14-180* se comportent de la même façon que *cut14-208*, avec une perte brutale de la fonction de Condensine et de la viabilité des cellules à haute température. On peut d'ailleurs voir que *cut14-90* et *cut14-180* sont encore viables à 34°C, à l'inverse de *cut14-208* (Figure 14B). Ainsi, à la température de 32°C, le mutant *cut3-477* présente déjà des défauts de fonctionnement de Condensine, alors que les mutants *cut14* ne seraient pas ou très peu altérés pour la fonction de Condensine. Ce serait pour cette raison que l'on observerait une létalité synthétique seulement avec *cut3-477* à 32°C. Le corollaire est que le fonctionnement de Dhp1 serait très sensible à l'activité de Condensine ou réciproquement.

b) Tentatives d'analyse de l'association de Condensine à la chromatine chez les mutants de *dhp1*

Condensine est enrichie à l'extrémité 3' des gènes fortement transcrits chez *S. pombe*. Dhp1 est pensée opérer sa fonction de terminaison de la transcription en 3' des gènes. J'ai donc naturellement voulu savoir si Dhp1 pouvait participer à la localisation correcte de Condensine sur les chromosomes. Le positionnement de Condensine en 3' des gènes pouvait être favorisé par Dhp1. Soit directement, par leur interaction physique, soit indirectement, par le rôle joué par Dhp1 dans la terminaison de la transcription. Il a été montré que le complexe Cohésine pouvait glisser sur la chromatine depuis son point de recrutement jusqu'aux séquences intergéniques situées en 3' des gènes, en réponse à une induction de la transcription (Lengronne et al., 2004; Ocampo-Hafalla et al., 2016). On peut donc imaginer un mécanisme similaire pour Condensine. En assurant la terminaison de la transcription, Dhp1 positionnerait Condensine en 3' des gènes.

Pour tester cette hypothèse j'ai voulu mesurer l'association de Condensine à la chromatine dans les mutants *dhp1-154* et *dhp1-1*, par ChIP. Comme Condensine se fixe à la chromatine essentiellement en mitose, déterminer l'impact d'une mutation sur la fixation de Condensine par ChIP nécessite de travailler sur des populations de cellules sauvages et mutantes synchronisées en mitose et montrant des index mitotiques similaires. Dans cet objectif, j'ai tenté de bloquer les cellules *dhp1-1* et *dhp1-154* en métaphase ou en anaphase par deux méthodes complémentaires.

La première méthode a consisté en l'utilisation du gène répressible P_{nmt1} -*slp1* (où le gène *slp1* qui code une protéine activatrice du complexe de l'APC est placé sous le contrôle du promoteur *nmt1* répressible par la thiamine). Les cellules P_{nmt1} -*slp1*, dont le seul gène *slp1* est réprimé en présence de thiamine dans le milieu de culture, prolifèrent dans un milieu synthétique dépourvu de thiamine, mais se bloquent en métaphase en environ 3 heures à 32°C après l'addition de Thiamine (20 µM) dans le milieu de culture.

La deuxième méthode de synchronisation a consisté en l'utilisation de la mutation *cdc2as*, qui après ajout d'un analogue d'ATP dans le milieu de culture (3-Br-PP1, 2µM) bloque les cellules en fin de phase G2 (Aoi et al., 2014). Il est ensuite possible de relâcher les cellules dans le cycle cellulaire de manière synchrone, après lavage avec du milieu frais dépourvu de 3-Br-PP1. J'ai

pu déterminer qu'environ 15min après les lavages, les cellules sauvages sont majoritairement en anaphase.

Malheureusement aucune de ces deux méthodes ne m'a permis de synchroniser convenablement les mutants *dhp1-154* et *dhp1-1* en mitose. Le pourcentage de cellules en métaphase après répression de *slp1* était trop bas chez les mutants comparés au sauvage, et les cellules *dhp1* mutantes se bloquaient mal en fin de G2 avec le système *cdc2as* et repartaient très lentement dans le cycle cellulaire. J'ai donc arrêté ici ces investigations. L'impact de Dhp1, et d'une modulation de la terminaison de la transcription, sur le positionnement de Condensine demeure selon moi une question importante, qui mériterait d'être traitée en détail.

Axe 2 : Condensine impacte l'expression génique indirectement, en préservant la stabilité du génome lors de la mitose chez *S. pombe*

I. Préambule

Lorsque j'ai débuté ma thèse, les résultats préliminaires disponibles au laboratoire pointaient vers un rôle direct et inattendu de Condensine dans la répression de l'expression des gènes chez *S. pombe*, en lien avec la dégradation des ARNs par le complexe exosome. L'interaction de Condensine avec Rrp6, observée par spectrométrie de masse et par co-immunoprécipitation au cours de ma première année de thèse m'a confortée dans cette hypothèse. Une partie importante de mon travail de thèse a été de tester cette idée. Pour cela, j'ai tout d'abord analysé plus en détail les résultats de l'analyse transcriptomique par microarray, notamment en ce qui concerne les transcrits étendus en position 3'. J'ai inspecté visuellement le profil d'expression de chacun des 321 gènes qui montraient une augmentation du ratio 3'UTR/CDS dans les mutants Condensine comparé au sauvage. J'ai vérifié l'accumulation de *reads* de séquençage dans la partie 3'UTR des gènes mais également en aval du site de terminaison, afin de déterminer si le profil transcriptomique ressemblait bien à une accumulation d'ARN étendus en 3'. Cohésine a été impliqué dans la terminaison de la transcription aux gènes convergents chez *S. pombe* (Gullerova and Proudfoot, 2008). J'ai alors cherché à déterminer l'orientation des gènes présentant des ARNs readthrough dans les mutants de Condensine. J'ai observé autant de gènes en position convergente qu'en tandem, à l'inverse des résultats obtenu par Gullerova *et al.* pour Cohésine, suggérant l'existence d'un mécanisme distinct pour les deux complexes SMC (Gullerova and Proudfoot, 2008). Je me suis également rendu compte que la liste des gènes présentant des transcrits étendus en 3' était non exhaustive. De nombreux gènes n'étaient pas identifiés par le ratio 3'UTR/CDS, et certains étaient de faux positifs. Cette analyse transcriptomique par microarray n'était donc pas satisfaisante, notamment pour analyser de potentiels défauts de terminaison. En outre cette analyse ne nous permettait pas de comparer finement les profils transcriptomiques des mutants de Condensine et du mutant *rrp6Δ*.

Au fil de mes expériences complémentaires, nous avons accumulé des données qui remettaient en cause notre hypothèse de départ, et pointaient vers un effet indirect de

Condensine dans la régulation de l'expression génique, en lien avec la mitose et la transmission des chromosomes. Afin de trancher entre notre premier modèle et l'hypothèse d'un effet indirect de condensine via la stabilité des chromosomes en mitose, nous avons décidé de conduire de nouvelles analyses transcriptomiques, par RNA seq.

Entre temps nous avons également découvert des différences phénotypiques entre la souche *cut3-477* originelle et une souche descendante plus récente, issue de croisements retours. Nous pensons que la souche *cut3-477* originelle, obtenue de M. Yanagida via la banque de levures YGRC, porte une mutation secondaire qui a été éliminée dans les descendants par croisement retour. Dans ce contexte, nous avons décidé d'utiliser seulement le mutant *cut14-208* pour les analyses RNA-seq. C'est pour ces différentes raisons que nous avons choisi de ne présenter que les résultats de la 2^{ème} analyse transcriptomique par RNA seq dans le manuscrit soumis pour publication à e-Life et présenté ci-après.

II. Ma contribution au manuscrit

J'ai réalisé la majeure partie des expériences présentées dans l'article, à l'exception des analyses de cycle cellulaire, et de l'analyse de la ségrégation du nucléole par microscopie. Ces deux parties ont été réalisées par Xavier Robellet. C'est pour cela que nous sommes co-premiers auteurs de la publication.

Les analyses de transcriptomique chez *S. cerevisiae* et de RNA FISH chez *S. pombe* ont été réalisées par nos collaborateurs, Christian Haering et Samuel Marguerat, respectivement.

J'ai activement participé à l'analyse de nos données RNA-seq, mais elles ont été réalisées principalement par des ingénieurs en bio-informatique : Claire Burny et Laurent Modolo. Pendant ma thèse je me suis formée à l'analyse bioinformatique des données de transcriptomique par l'outil Galaxy. J'ai ainsi pu réaliser une première analyse d'expression différentielle de nos données RNA seq grâce à Galaxy. Ces analyses ont ensuite été confirmées par les bio-informaticiens et ce sont ces résultats qui figurent dans l'article. J'ai activement participé à la réflexion sur la méthode de détection des ARN readthrough et à sa mise au point.

J'ai également passé beaucoup de temps à mettre au point l'analyse d'ARNs étendus en 3' par Northern blot. Cette expérience n'avait jamais été réalisée dans le laboratoire auparavant. J'ai

effectué de multiples tentatives pour visualiser les ARN readthrough dans les mutants Condensine. Seul le gène *hsp9* présenté dans le papier donne un résultat clair.

III. Insertion du manuscrit

Condensin controls cellular RNA levels through the accurate segregation of chromosomes instead of directly regulating transcription

Clémence Hocquet^{1,2,7}, Xavier Robellet^{1,2,7}, Laurent Modolo^{1,2}, Xi-Ming Sun^{3,4}, Claire Burny^{1,2}, Sara Cuylen-Haering⁵, Esther Toselli^{1,2}, Sandra Clauder-Münster⁶, Lars M. Steinmetz⁶, Christian H. Haering⁵, Samuel Marguerat^{3,4} and Pascal Bernard^{1,2,8}

1. CNRS Laboratory of Biology and Modelling of the Cell (LBMC), 46 Allée d'Italie, 69007, Lyon, France

2. Université de Lyon, ENSL, UCBL, 46 Allée d'Italie, 69007, Lyon, France

3. MRC London Institute of Medical Sciences (LMS), Du Cane Road, London W12 0NN, UK

4. Institute of Clinical Sciences (ICS), Faculty of Medicine, Imperial College London, Du Cane Road, London W12 0NN, UK

5. Cell Biology and Biophysics Unit, Structural and Computational Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

6. Genome Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany.

7. These authors contributed equally to this work

8. Corresponding author

Abstract

Condensins are genome organisers that shape chromosomes and promote their accurate transmission. Several studies have also implicated condensins in gene expression, although the mechanisms have remained enigmatic. Here, we report on the role of condensin in gene expression in fission and budding yeasts. In contrast to previous studies, we provide compelling evidence that condensin plays no direct role in the maintenance of the transcriptome, neither during interphase nor during mitosis. We further show that the changes in gene expression in post-mitotic fission yeast cells that result from condensin inactivation are largely a consequence of chromosome missegregation during anaphase, which notably depletes the RNA-exosome from daughter cells. Crucially, preventing karyotype abnormalities in daughter cells restores a normal transcriptome despite condensin inactivation. Thus, chromosome instability, rather than a direct role of condensin in the transcription process, changes gene expression. This knowledge challenges the concept of gene regulation by canonical condensin complexes.

Introduction

Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) complexes are ring-shaped ATPases, conserved from bacteria to human, which shape chromosomes and ensure their accurate transmission during cell division (Hirano, 2016; Uhlmann, 2016). Eukaryotes possess three distinct SMC protein complexes, named condensins, cohesin and SMC5/6. Condensins structure and condense chromosomes, cohesin ensures sister-chromatid cohesion and organises topological domains in the genome during interphase, and SMC5/6 promotes proper DNA replication and repair (Hirano, 2016; Uhlmann, 2016). A large body of *in vivo* and *in vitro* studies has substantiated the idea that SMC complexes shape the genome and preserve its integrity by encircling DNA helices and, at least partly, by extruding loops of DNA (Ganji et al., 2018; Gibcus et al., 2018; Hirano, 2016; Uhlmann, 2016). Besides organising chromosomes, cohesin and condensins have also been widely implicated in the control of gene expression, raising the idea that the two complexes link gene expression to chromosome architecture (Downen and Young, 2014). Yet, while our understanding of gene regulation by cohesin has progressed during the last decade (Merkenschlager and Nora, 2016), the mechanisms through which condensins impact on gene expression have remained largely enigmatic.

Condensins have been best characterised as the key drivers of the assembly of mitotic chromosomes (Gibcus et al., 2018; Hirano, 2016; Robel et al., 2017). The profound reorganisation of chromatin fibres into compact and individualised rod-shaped chromosomes, that marks the entry into mitosis, is essential for the accurate transmission of the genome during anaphase. When condensins are impaired, sister-centromeres migrate towards the opposite pole of the mitotic spindle upon anaphase onset, but chromosome arms remain entangled and hence fail to separate, leading to the formation of sustained anaphase chromatin bridges and DNA breakage in telophase and in post-mitotic cells (Cuylen et al., 2013; Hyun-Soo Kim et al., 2009; Samoshkin et al., 2012; Sutani et al., 1999; Toselli-Mollereau et al., 2016; Woodward et al., 2016).

Like all SMC complexes, condensins are made of two ATPases, called SMC2^{Cut14} and SMC4^{Cut3} (fission yeast names are indicated in superscript), associated with three non-SMC subunits that regulate the ATPase activity of the holocomplex and govern its association with DNA (Kschonsak et al., 2017). Most eukaryotes possess two condensins, called condensin I and II, which are composed of a same SMC2/SMC4 heterodimer but are associated with two different sets of regulatory subunits (Hirano, 2016; Robellet et al., 2017). Despite their structural and functional similarities, the dynamics of association of condensin I and II with chromosomes differ (Walther et al., 2018). Condensin II is nuclear during interphase and enriched on chromosomes from prophase until telophase. Condensin I, in contrast, is mostly cytoplasmic during interphase and associates with chromosomes from prometaphase until telophase. A third condensin variant called the Dosage Compensation Complex

(DCC) has been described in the worm *Caenorhabditis elegans*, which associates with the two X chromosomes in hermaphrodite animals and halves the expression of X-linked genes by reducing the occupancy of RNA polymerase II (RNA Pol II) (Kruesi et al., 2013). Yeasts, in contrast, possess a unique condensin complex, similar in term of primary sequence to condensin I.

Condensin I and II have been implicated in the control of gene expression in various organisms, ranging from yeasts to human. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the silencing of heterochromatic mating type genes and the position effect exerted by repetitive ribosomal DNA are both alleviated when condensin is impaired (Bhalla et al., 2002; Wang et al., 2016). Likewise, in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the SMC4^{Cut3} subunit of condensin is needed to repress tRNAs genes as well as reporter genes inserted into the pericentric DNA repeats that are coated with heterochromatin (He et al., 2016; Iwasaki et al., 2010). It remains unclear, however, in which cell cycle phase and through which mechanism budding and fission yeast condensins regulate the expression of such diverse genes in such different genomic contexts. In *C. elegans*, depletion of condensin II is linked to an increase in the expression of at least 250 genes, but this effect does not correlate with the occupancy of condensin II on chromosomes (Kranz et al., 2013). In *Drosophila melanogaster*, condensin I has been implicated in the repression of homeotic genes (Lupo et al., 2001), whereas condensin II has been reported to take part in the production of antimicrobial peptides (Longworth et al., 2012). Murine peripheral T cells that express a mutant version of the condensin II CAP-H2 regulatory subunit, exhibit a decreased compaction of chromatin and an increased expression of the proliferative gene *Cis* (Rawlings et al., 2011), suggesting a possible mechanistic relationship between condensin-mediated chromosome organisation and gene expression. However, another study reported that the same CAP-H2 mutation led to only subtle effects on the transcriptome of precursor thymocytes, which might be caused by chromosomal instability (Woodward et al., 2016).

Perhaps more consistent with a direct role, condensin I was found associated with active promoters during M phase in chicken DT40 cells, and its depletion prior to mitotic entry coincided with a decreased expression during the subsequent G1 phase of a subset of genes to which it was bound to (Kim et al., 2013). Similarly, cohesin and condensin II have been detected at super-enhancers in rapidly proliferating mouse embryonic stem cells, and depleting condensin II has been associated with a reduced expression of cell-identity genes driven by these super-enhancers (Downen et al., 2013). Yuen et al. observed a similar effect on the expression of highly-expressed housekeeping genes in mouse embryonic stem cells and human embryonic kidney cells (Yuen et al., 2017). Finally, it has been reported that not only condensin II, but also condensin I, binds enhancers activated by β -estradiol during interphase in human MCF7 breast adenocarcinoma cells, and that the depletion of condensin I or II led to a reduced transcription of oestrogen-activated genes (Li et al., 2015). Intriguingly, the same

enhancers were also found occupied by cohesin and to rely upon this complex to drive gene expression (Li et al., 2013).

All these studies tend to support the idea that condensin I and II play an important and evolutionarily-conserved role in gene expression, through which they impinge on cell identity, cell proliferation and, possibly, also immunity. Yet, no conclusive evidence has been provided thus far as to how condensin I and II might achieve this function. Mitotic chromosomes conserve considerable chromatin accessibility, similar to interphase chromatin (Hihara et al., 2012), and DNA remains accessible to transcription factors even in mitotic chromosomes that have been structured by condensin complexes (Chen et al., 2005; Palozola et al., 2017). Thus, it remains unclear whether and how mechanisms related to chromosome condensation could possibly underlie condensin-mediated gene regulation. Furthermore, given that the loss or gain of chromosomes is sufficient to alter gene expression (Sheltzer et al., 2012), it is crucial to determine to which extent the role attributed to condensin I and II in the control of gene expression is mechanistically different from, or related to, the assembly and segregation of chromosomes during mitosis.

Gene expression can be controlled at the transcriptional level, by changing the activity and/or the occupancy of RNA polymerases, as exemplified by condensin^{DCC} (Kruesi et al., 2013). It can also be controlled at the co- or post-transcriptional level by modulating the half-life of transcripts (Buhler et al., 2007; Harigaya et al., 2006). The RNA-exosome is a conserved ribonuclease complex that ensures the maturation and the controlled degradation of a plethora of RNAs in the cell, including, for example, defective RNAs or cryptic unstable non-coding RNAs (Kilchert et al., 2016). The RNA-exosome consists of nine core subunits associated with the RNase Dis3 in the cytoplasm plus a second RNase, called Rrp6, in the nucleus (Kilchert et al., 2016). The mechanisms behind target recognition and processing or degradation modes selection by the RNA-exosome are not fully understood. Cofactors, such as the TRAMP poly(A)polymerase complex, stimulate the RNase activity of the RNA-exosome and specify its targets (Kilchert et al., 2016). Rrp6 has been found associated with chromosomes at actively transcribed genes (Andrulis et al., 2002), leading to the idea that the RNA-exosome can handle nuclear RNA in a co-transcriptional manner. By processing and eliminating cellular transcripts, the RNA-exosome plays a central role in proper gene expression (Kilchert et al., 2016).

To gain insights into how canonical condensins regulate genes, we investigated the role of condensin complexes in gene expression during the cell cycle, in fission and budding yeasts. In contrast with previous studies, we present here converging evidence that condensin plays no major direct role in the control of gene expression, neither in *S. pombe* nor in *S. cerevisiae*. We show that lack of condensin is associated with increased levels of mRNAs and non-coding RNAs in post-mitotic fission yeast cells,

reminiscent of other organisms, but that this effect is indirect: RNAs accumulate in condensin mutant cells because the missegregation of the rDNA during anaphase dampens RNA degradation by the nucleolar RNA-exosome in post-mitotic cells. The discovery that budding and fission yeast condensins contribute to proper gene expression by maintaining chromosome stability during cell divisions, and not through a direct impact on gene transcription, challenges the widespread idea that condensin I and condensin II are direct regulators of gene expression.

Results

RNA-exosome-sensitive transcripts accumulate when condensin is impaired in fission yeast

To assess the role of condensin in gene expression in fission yeast, we compared the transcriptomes of wild-type and mutant cells in which the SMC2^{Cut14} ATPase subunit of condensin was inactivated by the thermosensitive *cut14-208* mutation (Saka et al., 1994). Cells growing asynchronously at permissive temperature were shifted to the restrictive temperature of 36°C for 2.5 hours (one cell doubling) to inactivate SMC2^{Cut14} and their transcriptomes determined using strand-specific RNA-seq. We identified 306 transcripts that were differentially expressed by log₂ fold changes superior to 0.5 or inferior to -0.5 (p value ≤ 0.05) in the *cut14-208* condensin mutant compared to wild type (Fig. 1A). The vast majority (98.5%; $n=302/306$) exhibited an increased steady-state level in the mutant. We confirmed the increase for six example RNAs by RT-qPCR, using either *act1* or *nda2* mRNA levels as internal controls (Fig. 1B and Fig. S1A). Thus, gene expression is altered, and mainly increased, in dividing condensin mutant *cut14-208* cells.

Of the 306 misregulated transcripts, 57% were mRNAs and the remaining 43% were non-protein coding RNAs (ncRNA) (Fig. 1C). We found histone mRNAs amongst the upregulated transcripts, confirming previous observations (Kim et al., 2016). However, the analysis of all increased mRNAs revealed no enrichment for a specific gene ontology (GO) term, which suggests that condensin does not regulate the expression a particular family of protein-coding genes. In contrast, ncRNAs, which represent 22% of the transcription units in the fission yeast genome ($n = 1522/6948$), were significantly enriched in the population of transcripts up-regulated in the *cut14-208* mutant ($p < 0.001$, Chi-square test). Since most ncRNAs are maintained at a low level by the nuclear RNA-exosome (Wilhelm et al., 2008), their controlled degradation might be compromised in the mutant. We tested this hypothesis by Northern blotting using the antisense ncRNA *mug93-antisense-1* (*mug93as*) as a representative example. As shown in Figure 1D, *mug93as* was barely detectable in a wild-type background but accumulated in cells lacking Rrp6 or defective for Dis3, as expected if it were degraded by the RNA-exosome. Remarkably, *mug93as* also accumulated in *cut14-208* mutant cells, reaching levels reminiscent of the *rrp6* Δ control. Furthermore, chromatin immunoprecipitation (ChIP) against RNA Pol II revealed no change in RNA Pol II occupancy at neither the *mug93as* gene, nor two additional example ncRNA genes (*ncRNA.489* and *ncRNA.540*), in *cut14-208* cells (Fig. S1B), although their ncRNA levels were increased between 5 and 30-fold (Fig. 1B and S1A). These RNAs might therefore accumulate due to impaired degradation rather than increased transcription. Taken together, these results indicate that unstable RNA species accumulate when condensin is defective.

To clearly delineate the number of transcripts targeted by the RNA-exosome that accumulate in the *cut14-208* condensin mutant, we compared the transcriptomes of *cut14-208* and *rrp6Δ* cells that had been grown in parallel and processed simultaneously for strand-specific RNA-seq analyses. We identified 663 RNAs that were differentially expressed by log₂ fold changes superior to 0.5 or inferior to -0.5 (p value ≤ 0.05) in the *rrp6Δ* mutant (Fig. 1E). Of these differentially expressed RNAs, 78% were increased in levels and 22% were decreased. The population of Rrp6-sensitive RNAs was considerably enriched in ncRNAs ($p < 0.001$, Chi-square test) (Fig. 1F). Pairwise comparison with *cut14-208* revealed that 41% of the RNAs that accumulated in the condensin mutant also accumulated in cells lacking Rrp6 (Fig. 1G-H), with no clear preference for ncRNA and mRNA transcripts (50% each). A hypergeometric test confirmed that this overlap was statistically highly significant ($p = 4.6e^{-55}$). These data indicate that a large fraction of the transcripts that accumulate when condensin is impaired are normally targeted by the ribonuclease Rrp6.

Read-through transcripts accumulate upon condensin inactivation

Visual inspection of the RNA-seq profile of the *cut14-208* mutant revealed a widespread increase of reads downstream of the 3' ends of genes, suggesting defects in the termination of transcription (for an example, see the *hsp9* gene in Fig. 2A). Read-through transcripts are abnormal RNAs that are extended at their 3' ends when RNA polymerases transcribe over Transcription Termination Sites (TTS) into downstream DNA sequences. Dis3 and Rrp6 have been reported to prevent the accumulation of read-through transcripts, although through possibly different mechanisms (Lemay et al., 2014; Zofall et al., 2009). Lemay et al. have shown that 3'-extended *hsp9* RNA accumulate in fission yeast cells when Dis3 is impaired, and to a lesser extent when Rrp6 is lacking (Lemay et al., 2014). By using RNase-H digestion of the 5' end of *hps9* mRNA and northern blotting, we confirmed the accumulation of 3'-extended *hsp9* RNA in *dis3* and *rrp6* mutant cells (Fig. 2B). Importantly, *cut14-208* mutant cells accumulated 3'-extended *hsp9* RNA of the same length as cells depleted of Dis3 or Rrp6. Moreover, other condensin mutants, such as *cut3-477* and *cut14-180*, also accumulated read-through *hsp9* RNA (Fig. S2A), which demonstrates that the accumulation of uncleaved, 3'-extended *hsp9* transcripts is a feature of condensin inactivation.

To determine the prevalence of read-through RNAs in *cut14-208* mutant cells, we systematically searched and quantified stretches of consecutive RNA-seq reads that mapped immediately downstream the TTS of annotated genes on the same DNA strand and did not overlap with downstream genes (see Material and Methods). Using these criteria, we identified 489 transcripts, mostly mRNAs and ncRNAs, which were extended at their 3' ends (Fig. 2C). Oligo(dT)-primed RT-PCR

showed that read-through RNAs were polyadenylated (Fig. 2D and S2B), suggesting that non-canonical polyadenylation sites were more frequently used in the *cut14-208* mutant than in wild-type cells, as already described for cells lacking Dis3 (Lemay et al., 2014). GO term analysis revealed no specific feature defining the population of read-through transcripts that accumulate in *cut14-208* cells. Furthermore, only 111 of the 489 read-through transcripts were also up-regulated (Fig. S2C), which suggests that the 3'-extended RNAs were not the by-product of increased transcription.

To further investigate the molecular origin of read-through RNAs in condensin mutant cells, we compared *cut14-208* with *rrp6Δ* cells. We detected 622 read-through RNAs, again mostly mRNAs and ncRNAs, in the transcriptome of cells lacking Rrp6 (Fig. 2E), which confirms previous reports (Lemay et al., 2014; Zofall et al., 2009). Importantly, 50% of these RNAs were also extended at their 3' ends in the *cut14-208* mutant (Fig. 2F). This reinforces the idea that the function of Rrp6 might be affected in a *cut14-208* background. Note that the steady state level of the Rrp6 protein remained unchanged in *cut14-208* mutant cells (Fig. S2D). Likewise, we observed no change in the mRNA levels of RNA-exosome or TRAMP components in the condensin mutant by RNA-seq (Table S1). Collectively, these data indicate that 3'-extended read-through transcripts accumulate upon condensin inactivation in fission yeast and that this accumulation might stem from defects in RNA processing of these transcripts by Rrp6.

Condensin is dispensable for gene expression during interphase and metaphase in fission and budding yeasts

Since condensin is regulated over the course of the cell cycle, we sought to determine the phase(s) during which condensin function is required for proper gene expression. We synchronised *cut14-208* mutant cells in early S phase at the permissive temperature, raised the temperature to 36°C to inactivate condensin and at the same time released them into the cell cycle. We then measured gene expression by RT-qPCR as cells progressed from early S phase into the cell cycle (Fig. 3A). To ensure that cells went only through a single cell cycle at 36°C, we re-arrested cells in late G1 phase by the thermosensitive mutation *cdc10-129*. Previous work had shown that 10 min at 36°C are sufficient to inactivate condensin in *cut14-208* mutant cells (Nakazawa et al., 2011). FACSscan analysis of DNA content and cytological observations revealed that *cdc10-129* single mutant and *cdc10-129 cut14-208* double mutant cells completed S phase (t = 30 min after release) and progressed through G2 phase (t = 60 min) and mitosis (t = 90 min) with similar kinetics (Fig. 3B). Chromosome segregation was impaired in the *cut14-208* mutant background, as revealed by the appearance of anaphase chromatin bridges (Fig. 3B, green line), which were subsequently severed by the septum upon mitotic exit, producing the

CUT phenotype (Cells Untimely Torn) (Fig. 3B, red line). Accordingly, FACScan analysis revealed the appearance of aberrant karyotypes in post-mitotic cells ($t = 120$ and 180 min; Fig. 3B).

Remarkably, we measured no up-regulation of any of the three reporter RNAs that we had selected from the pool of upregulated transcripts in *cut14-208* mutants (Fig. 1B) during G2 phase in synchronized *cdc10-129 cut14-208* cells ($t = 60$ min, Fig. 3C). These RNAs started to accumulate, however, at $t = 90$ min and further increased at $t = 120$ min and 180 min (Fig. 3C), coincidentally with the accumulation of aneuploid post-mitotic cells. This result suggests a possible requirement for condensin for proper gene expression during late mitosis or early G1 phase. To validate these results, we repeated the RT-qPCR measurements by synchronously releasing *cut14-208* cells from the early S phase block only 1 hour after shifting the temperature to 36°C and re-arrested them already at the G2/M transition using a *cdc25-22* mutation (Fig. 3D-E). In this time course experiment, we observed no up-regulation of the reporter RNAs at any time point (Fig. 3F). Similarly, RNA levels remained unchanged after a sustained arrest in metaphase at 36°C by depletion of the anaphase promoting complex (APC/C) activator Slp1 (Fig. 3G-I). We conclude that, in fission yeast, the function of condensin is dispensable for gene regulation during S and G2 phases of the cell cycle, consistent with the finding that condensin is largely displaced from the nucleus during this time (Sutani et al., 1999).

Condensin in the budding yeast *S. cerevisiae* is, in contrast, bound to chromosomes throughout the cell cycle (D'Ambrosio et al., 2008), much like the condensin II complex in metazoan cells. This raises the possibility that condensin controls interphase gene expression in this species. We first confirmed that condensin localizes to chromosomes of cells released synchronously into the cell cycle from a G1 mating pheromone arrest (Fig. S3A). Chromosome spreading and ChIP showed that condensin bound to chromosomes already during G1 phase and that its levels on chromosomes increased as cells passed through S and G2 phases (Fig. S3B-C). To inactivate condensin in budding yeast, we proteolytically cleaved the kleisin (Brn1) subunit of the condensin ring by inducing expression of a site-specific protease from tobacco etch virus (TEV) using a galactose-inducible promoter, which efficiently released condensin from chromosomes (Cuylen et al., 2011), even during G1 phase (Fig. S3D). We then compared the transcriptome of G1 phase-arrested cells after condensin cleavage to cells with intact condensin (Fig. 4A). Remarkably, solely 26 transcripts were differentially expressed by at least two-fold (Fig. 4B). To rule out that this minor effect on gene expression was the result of the G1 phase arrest, we repeated the experiment, but this time released cells after Brn1 TEV cleavage from the G1 phase arrest and re-arrested them in the subsequent M phase by addition of the spindle poison nocodazole before preparing RNA for transcriptome analysis (Fig. 4C). In this experiment, only six genes showed an up- or downregulation of two-fold or more (Fig. 4D). We conclude that condensin inactivation by

releasing the complex from chromosomes has no major effects on the gene expression program of budding yeast cells.

Gene expression changes in fission yeast condensin mutants are the result of a loss of genome integrity

The fact that we observed changes in transcription levels in asynchronously dividing *cut14-208* fission yeast mutant cells, but not in fission or budding yeast condensin mutants that are prevented from undergoing anaphase, raises the possibility that defects in chromosome segregation caused by condensin inactivation might be causally responsible for condensin-dependent gene deregulation. Indeed, when we arrested fission yeast *cut14-208* cells at the G2/M transition using the analogue-sensitive Cdc2asM17 kinase (Aoi et al., 2014), shifted the temperature to 36°C and then released them from the arrest to complete mitosis, we measured an increase in transcript levels after mitotic exit and the severing of chromosomes (Fig. S4).

If RNA misregulation were indeed caused by the severing of missegregated chromosomes by the cytokinetic ring, then three key hypotheses should prove correct: (1) any mutation that results in chromosome missegregation and cutting upon mitotic exit should result in an increase in levels of the same or a similar set of RNAs as the *cut14-208* mutation, (2) the amplitude of the increase in RNA levels should correlate with the prevalence of missegregation, and (3) preventing chromosome cutting in *cut14-208* cells should attenuate the changes in RNA levels. As shown in Fig. 5A, mutation of separase (*ptr4-1*) or of a subunit of the APC/C (*cut9-665*) results in chromosome missegregation and severing by the cytokinetic ring upon mitotic exit and an increase in RNA levels in a manner similar to *cut14-208*. Moreover, the amplitude of the increase in RNA levels correlated with the frequency of chromosome cutting in the different mutants (Fig. 5A). The analysis of five additional condensin mutations of increasing prevalence further confirmed this correlation (Fig. S5A-B). Furthermore, we found that RNA levels remained comparable to wild-type in *cut14-208* cells that were prevented from undergoing cytokinesis. The thermosensitive *cdc15-140* mutation prevents cytokinesis at the restrictive temperature (Balasubramanian et al., 1998). Double mutant cells *cdc15-140 cut14-208* exhibited chromatin bridges during anaphase at 36°C (Fig. 5B), indicating that *cdc15-140* did not suppress the chromosome segregation defect caused by the *cut14-208* mutation. However, in the absence of a cytokinetic ring, these chromatin bridges were no longer severed upon mitotic exit, which suppressed the production of karyotypically-aberrant post-mitotic cells (Fig. 5B). Remarkably, parallel RNA-seq analysis revealed that ~98% of the RNA up-regulated in the *cut14-208* single mutant were no-longer detected as differentially expressed in the double mutant *cut14-208 cdc15-140* (Fig. 5C-D). The

suppressive effect of *cdc15-140* on *cut14-208* with respect to the accumulation of the anti-sense RNA *mug93as* is shown as an example in Fig. 5E. The production of read-through transcripts was similarly suppressed (Fig. S5C-D). Note that RNA levels remained increased in the *cdc15-140 rrp6Δ* mutant (Fig. S5E), ruling out a potential compensatory effect of *cdc15-140* on Rrp6 deficiency per se. Finally, we found that *cdc12-112*, another mutation that also impairs cytokinesis (Chang et al., 1997), equally restored normal gene expression in a *cut14-208* genetic background (Fig. S5F), confirming that cytokinesis was a driving force for the gene deregulation exhibited by the *cut14-208* mutant. Taken together, these data indicate that changes in gene expression exhibited by *cut14-208* condensin mutant cells are mostly, if not entirely, the consequence of cytokinesis when condensin is inactivated.

The severing of chromosomes by the cytokinetic ring leads to DNA damage, as revealed by the accumulation of sustained Rad22-GFP foci (Fig. S6A), but also to the formation of genomically-aberrant daughter cells, as shown by FACScan analysis of DNA contents (Fig. 3B). Both phenotypes coincide with the increase in RNA levels, and both are suppressed by *cdc15-140* (Fig. 5B and S6A). To test whether one or both might be responsible for gene deregulation in *cut14-208* cells, we analysed by RT-qPCR the impact of DNA damage upon mitotic exit, or of genomic imbalance, on gene expression in cells provided with a fully functional condensin. To damage DNA, cells were synchronized in prometaphase by using the cryosensitive mutation *nda3-KM311*, and released into mitosis in the presence of Camptothecin to induce DNA breaks during S phase, which in fission yeast *overlaps* with cytokinesis and septum formation. As an alternative experiment, wild-type cycling cells were treated with Zeocin. The appearance of sustained Rad22-GFP foci in cells treated with Camptothecin or with Zeocin confirmed the accumulation of DNA damage (Fig. S6B). However, RT-qPCR revealed no increase in RNA levels (Fig. S6B), arguing that DNA damage is not the main driver for gene deregulation in *cut14-208* mutant cells.

To test the impact of genomic imbalance on gene expression, we used the thermosensitive *mis6-302* mutation which disrupts kinetochore assembly, and hence accurate chromosome segregation during anaphase, leading to the production of aneuploid post-mitotic cells (Saitoh et al., 1997). Note that *mis6-302* causes neither chromatin bridges nor a CUT phenotype. FACScan analysis of *mis6-302* cells grown at the restrictive temperature confirmed the appearance of genomically-aberrant cells (Fig. 6A). Remarkably, RT-qPCR of four reporter RNAs revealed a similar increase in *mis6-302* cells as in *cut14-208* mutant cells (Fig. 6B). Therefore, this result strongly suggests that the imbalance in genomic content that results from chromosome missegregation during mitosis is a major cause of gene deregulation when condensin function is impaired.

Non-disjunction of the rDNA during anaphase depletes the RNA-exosome from post-mitotic fission yeast cells and results in ncRNA accumulation

To investigate further the mechanism of gene deregulation when condensin is impaired, we looked in more details at chromosome segregation during anaphase in *cut14-208* mutant cells. It has been reported that condensin plays a major role in the segregation of the rDNA in late anaphase in budding yeast (D'Ambrosio et al., 2008; Freeman et al., 2000). We reached the same conclusion in fission yeast. When we scored the segregation of a GFP-labelled version of the rDNA-binding protein Gar2 in *cut14-208* mutant cells, we found that sister rDNA copies failed to separate during anaphase, frequently resulting in the formation of anucleolate daughter cells (Fig. 6C). The *ptr4-1* and *mis6-302* mutants also exhibited a high rate of anucleolate cell formation (Fig. 6C) and the *cdc15-140* mutation suppressed the formation of anucleolate cells in *cut14-208* mutants (Fig. S6C). Thus, the inability to properly segregate the rDNA during anaphase correlates with the accumulation of mRNAs and ncRNAs targeted by the RNA-exosome.

Live imaging of Rrp6 and Dis3 has revealed that the two RNases are enriched in the nucleolus of fission yeast cells (Yamanaka et al., 2010). Given the overlap between the differential transcriptomes of *cut14-208* and *rrp6Δ* mutants, we hypothesised that rDNA non-disjunction might alter the localisation of Rrp6 in daughter cells upon mitotic exit. Co-immunostaining of Rrp6 tagged with a myc epitope and Gar2 tagged with GFP confirmed the nuclear localisation of Rrp6 and its marked enrichment within the nucleolus (Fig. 6D). In a wild-type background, Rrp6 appeared evenly distributed between nuclei in post-mitotic daughter cells (median signal ratio ~1). In sharp contrast, the amount of Rrp6 was markedly reduced in *cut14-208* anucleolate daughter cells compared to their nucleolate counterparts (median signal ratio ~0.25; Fig. 6D). We observed a similar asymmetrical distribution of Dis3 tagged with an HA epitope in post-mitotic *cut14-208* cells (Fig. S6D). Thus, condensin deficiency leads to rDNA non-disjunction during anaphase and the production of anucleolate post-mitotic cells, which are depleted of Rrp6 and Dis3.

The depletion of Rrp6 and Dis3 provided a plausible cause for the accumulation of exosome-sensitive RNA in asynchronously dividing *cut14-208* condensin mutant cells. If it were the case, exosome-sensitive RNAs should accumulate preferentially in anucleolate *cut14-208* cells. Single molecule RNA-FISH showed that the ncRNA *mug93as* produced very faint signals in wild-type cells (Fig. 6E), consistent with its active degradation by the RNA-exosome (Fig. 1D). On the contrary, *mug93as* levels were considerably higher in *cut14-208* mutant cells, which confirms our previous RNA-seq and RT-qPCR data (Fig. 6E). Crucially, *mug93as* RNA accumulated mainly in anucleolate cells devoid of Gar2-GFP, whereas a control mRNA (*cct2*) was evenly distributed in *cut14-208* mutant cells (Fig. 6F). We conclude that

condensin loss-of-function in fission yeast leads to the formation of anucleolate cells that accumulate RNA-exosome-sensitive transcripts.

Discussion

Condensin I and II have been implicated in the control of gene expression in a wide range of organisms, but it has remained unclear what aspect of the gene expression program they affect. Here, we challenge the idea that condensin complexes directly regulate transcription by providing compelling evidence that the functional integrity of condensin is dispensable for the maintenance of proper gene expression during interphase and even mitosis in fission and budding yeasts. Consistent with previous studies, we show that condensin deficiency alters the transcriptome of post-mitotic cells in fission yeast. However, we further show that this effect is mostly, if not entirely, the indirect consequence of chromosome missegregation during anaphase, which notably depletes the RNA-exosome from daughter cells. Our findings therefore indicate that condensin plays no direct role in the control of gene expression in fission and budding yeasts, but is essential for the maintenance of proper gene expression by contributing to the accurate segregation of chromosomes during mitosis.

Strand-specific RNA seq analysis revealed that *cut14-208* condensin mutant cells accumulate mRNA, ncRNA and 3'-extended read-through transcripts. Additional condensin mutants such as *cut3-477*, *cut3-m26*, *cut14-90* and *cut14-180* exhibited similar increases in RNA levels, arguing that condensin takes part in proper gene expression in fission yeast, alike in other organisms. The population of *cut14-208* condensin-mutant cells that exhibited increased RNA levels went through G2, M, G1, and S phases at the restrictive temperature in an asynchronous manner before their RNA was extracted and analysed. However, when *cut14-208* cells were synchronised during the S or G2 phases or even during metaphase, RNA levels remained unchanged. Moreover, the prevalent suppressive effect of *cdc15-140* upon *cut14-208* in term of changes in gene expression, argues (1) that condensin impinges on gene expression in a cytokinesis-dependent manner, and therefore in an indirect manner, and (2) that condensin deficiency has in itself no predominant impact on the steady state level of RNAs in post-mitotic cells. Thus, although we cannot rule out the possibility that subtle impacts of condensin on the dynamics of transcription might have escaped our detection, our data strongly indicate that condensin plays no major direct role in the maintenance of proper gene expression during interphase and even mitosis in fission yeast. Concordantly, we show that in budding yeast too, condensin is largely dispensable for the maintenance of gene expression during the G1 phase or during metaphase. Importantly, our results are in perfect agreement with recent data supporting the idea that the global transcriptional program of *S. cerevisiae* is largely insensitive to condensin depletion (Paul et al., 2017). Note that the separation of the budding and fission yeast lineages is thought to have occurred ~ 420 million years ago, which makes them as different from each other as either is from animals (Sipiczki, 2000). Thus, our results provide compelling evidence that, in two evolutionarily distant organisms,

condensin complexes play no major direct role in the maintenance of an established gene expression program.

The corollary is that the increased RNA levels exhibited by fission yeast *cut14-208* mutant cells must be the indirect consequence of a failure during late mitosis caused by a lack of condensin activity. This conclusion is in agreement with our observation that RNA levels increase coincidentally with mitotic exit in synchronized condensin-mutant cells. In line with this, we provide evidence that the non-disjunction of the duplicated copies of the rDNA during anaphase constitutes a major source of gene deregulation in condensin mutant cells. (1) We show that sister-rDNA almost systematically fail to disjoin during anaphase in *cut14-208* cells, leading to the production of anucleolate daughter cells. (2) Rrp6 and Dis3 are enriched in the nucleolus in wild-type cells, but largely depleted from anucleolate *cut14-208* cells. Rrp6 accumulates predominantly on chromosomes during mitosis in *Drosophila* (Graham et al., 2009), suggesting that the bulk of Rrp6 and Dis3 might similarly co-segregate with the nucleolus during anaphase in fission yeast. (3) We show by RNA-seq, RT-qPCR and Northern blotting that the depletion of Rrp6 and Dis3 from anucleolate condensin mutant cells coincides with an increased steady state level of RNA-exosome-sensitive transcripts. Note that the slight additive effect exhibited by the *cut14-208* and *rrp6Δ* mutations with respect to the accumulation of *mug93as* (Fig. 1E) and of 3'-extended *hsp9* RNA (Fig. 2B) is consistent with the co-depletion of Rrp6 and Dis3 from anucleolate *cut14-208* mutant cells. (4) We further show by RNA-FISH that an RNA-exosome sensitive transcript, the antisense RNA *mug93as*, accumulates principally if not exclusively in anucleolate condensin mutant cells, as expected from an impaired degradation. (5) Importantly, suppressing the production of anucleolate daughter cells by the cytokinesis mutation *cdc15-140*, in a *cut14-208* mutant background, is sufficient to restore an almost normal transcriptome, despite condensin remaining impaired. Mitosis being closed in fission yeast, when cytokinesis is prevented, anaphase chromatin bridges and the nucleolus collapse into a single nucleus upon mitotic exit. (6) Finally, we show that, reciprocally, generating anucleolate and aneuploid daughter cells by disrupting chromosome segregation by the kinetochore mutation *mis6-302*, is sufficient to trigger the accumulation of RNA-exosome-sensitive transcripts, alike *cut14-208*, but without mutating condensin.

Based on these observations, we propose the model depicted in Figure 7. Condensin deficiency impairs chromosome segregation and notably leads to chromatin bridges and the non-disjunction of the rDNA during anaphase. Rrp6 and Dis3, which are enriched in the nucleolus, and which most likely segregate with the bulk of the rDNA during anaphase, become depleted from anucleolate daughter cells produced upon mitotic exit. This strongly reduces the activity of the RNA-exosome in anucleolate daughter cells, allowing the accumulation of RNA molecules that are normally actively degraded by the

RNA-exosome, such as ncRNAs and 3'-extended RNAs. This sequence of events illustrate how condensin deficiency indirectly changes gene expression in fission yeast.

That the bulk of the nucleolar RNA-exosome might co-segregate with the rDNA during mitosis has some consequences in the fields of gene silencing and RNA export. Condensin has been implicated in gene silencing at pericentric heterochromatin in fission yeast (He et al., 2016). However, since Rrp6 is known to take part in the turnover of heterochromatic transcripts (Buhler et al., 2007), it will be important to assess to which extent chromosome missegregation during anaphase might account for the alleviation of silencing observed in condensin-mutant cells. Likewise, genetic screens for factors involved in the nuclear export of polyadenylated mRNAs have led to the isolation of various unrelated mutations that all generate anucleolate cells, including mutations in condensin in budding yeast (Ideue et al., 2004; Paul and Montpetit, 2016). This has raised the idea that the nucleolus takes part in the nuclear export of mRNAs. However, since we observed no nuclear retention of *cct2* mRNA in anucleolate condensin-mutant cells, and since non-coding RNA are heavily polyadenylated in fission yeast (Zhou et al., 2015), we propose that the accumulation of polyadenylated transcripts in anucleolate cells might reflect an impaired processing of non-coding RNAs by the RNA-exosome rather than a defective export. The finding that Dis3 or Rrp6 loss-of-function increases the concentration of polyadenylated transcripts in the nucleolus of budding yeast cells is in good agreement with this conclusion (Paul and Montpetit, 2016).

Additional mechanisms linked to chromosome instability and the genesis of aberrant karyotypes in post-mitotic cells most likely contribute to modify the transcriptome when condensin I or II is defective. The slight up-regulation of histone genes that we observed in *cut14-208* mutant cells has previously been attributed to an indirect stabilization of the transcription factor Ams2 during defective anaphase (Kim et al., 2016). More broadly, aneuploidy itself is known to change the transcriptome, with a recurrent increased expression of genes involved in the response to stress and a down-regulation of cell-cycle and proliferation genes (Sheltzer et al., 2012). Premalignant murine T-cells defective for condensin II exhibit a transcriptome evocative of a stress response to aneuploidy (Woodward et al., 2016). Similarly, the depletion of Smc2, and hence the reduction of both condensin I and II, in a human neuroblastoma cell line modifies the expression of a large number of genes implicated mainly in cell cycle progression or DNA damage response (Murakami-Tonami et al., 2014). However, we did not observe such a clear transcriptomic signature in *cut14-208* mutant cells, suggesting either that aneuploidy per se, i.e. the gain or loss of entire chromosomes, is not a prevalent condition when condensin is impaired in fission yeast, or that condensin-mediated aneuploidy is strongly counter-selected in asynchronous cultures, perhaps because most aneuploid cells are unviable or extremely unstable in fission yeast (Niwa and Yanagida, 1985).

Our finding that sister-rDNA almost systematically non-disjoin during anaphase in fission yeast condensin mutant cells is reminiscent of the severe missegregation of the rDNA observed in budding yeast and human cells deprived of functional condensin complexes (D'Ambrosio et al., 2008; Freeman et al., 2000; Samoshkin et al., 2012), and is consistent with the idea that decatenation of sister-rDNA during late anaphase relies upon condensin (D'Ambrosio et al., 2008). What remains puzzling, however, is the fact that chromatin bridges are almost systematically severed by the cytokinetic ring in *cut14-208* mutant cells, while the severing of the nucleolus is extremely infrequent (<10% of the cases). The persistence of the nucleolus in the axis of cleavage might mechanically hinder cytokinesis, or trigger a wait signal. Alternatively, condensin deficiency might cause DNA double-strand breaks at fragile sites located on the centromere-proximal border of the cluster of rDNA repeats, allowing the displacement of untangled sister-rDNA towards one pole of the mitotic spindle through a spring-relaxation effect. A focused role for condensin in organising a region proximal to the rDNA, and located on its centromeric side, has been reported in budding yeast (Schalbetter et al., 2017). In HeLa cells, the depletion of SMC2 induces DNA breaks predominantly in repetitive DNA, including the rDNA/Nucleolar Organising Regions (Samoshkin et al., 2012). Thus missegregation of the rDNA in fission yeast cells when condensin is impaired might reveal an evolutionarily-conserved acute dependency of repeated DNA elements upon condensin for their segregation and integrity. Given the prevalence of tandem repetitive DNA arrays in mammalian genomes (Warburton et al., 2008), it is tempting to speculate that condensin loss of function might have similar confounding impacts on the preservation of their structural integrity and proper expression.

Studies performed over the last 20 years have shown that the tri-dimensional organization of the genome influences gene expression, raising the key question of the role played by SMC complexes in the control of gene expression. A large number of studies have concluded in favour of a role for cohesin and condensin I and II in the control of gene expression (Downen and Young, 2014; Merkschlager and Nora, 2016), raising the idea that cohesin and condensins might collectively link gene expression to genome architecture. Although there are robust examples of cohesin-mediated regulation of cell-type-specific gene expression (Merkschlager and Nora, 2016), for instance through enhancer-to-promoter interactions (Ing-Simmons et al., 2015; Kagey et al., 2010), a recent study has raised the idea that the involvement of cohesin in the maintenance of an established gene expression program might be less prominent than initially thought (Rao et al., 2017). Similarly, despite ample reports of cells defective for condensin I or II exhibiting changes in gene expression (Bhalla et al., 2002; Downen et al., 2013; He et al., 2016; Iwasaki et al., 2010; Kranz et al., 2013; Li et al., 2015; Longworth et al., 2012; Lupo et al., 2001; Murakami-Tonami et al., 2014; Rawlings et al., 2011; Wang et al., 2016; Yuen et al., 2017), to the best of our knowledge, there has been thus far no clear case where the influence of

condensin I or II on gene expression has been dissociated from a possible confounding effect of chromosome missegregation. By providing evidence that condensin plays no major direct role in the control of gene expression in fission and budding yeasts, and showing that condensin impinges on gene expression by preserving the stability of the genome during mitosis, our work challenges the concept of gene regulation as a collective property of SMC complexes, and should help better define future studies on the role of canonical condensins in gene expression in other organisms.

Materials and Methods

Media, molecular genetics and strains

Media and molecular genetics methods were as previously described (Moreno et al., 1991). Fission yeast cells were grown at 28°C in complete YES+A medium or in synthetic PMG medium. The *nmt1-dis3* chimerical gene was repressed by the addition of thiamine 60 µM final to the growth medium, as described (Lemay et al., 2014), followed by further cell culture for 12–15h. Strains used in this study are listed in Table S2.

Cell cycle synchronization

Fission yeast cells were synchronized in early S phase at 28°C by the adjunction of hydroxyurea (HU) 15 mM final. G2/M arrest was achieved using the thermo-sensitive *cdc25-22* mutation or the analogue-sensitive *cdc2asM17* allele (Aoi et al., 2014), and G1 arrest using the thermo-sensitive *cdc10-129* mutation. Reversible prometaphase arrest was performed at 19°C using the cold-sensitive *nda3-KM311* mutation (Hiraoka et al., 1984). Metaphase arrest was achieved in PMG medium supplemented with thiamine 20 µM using the thiamine repressible *nmt41-slp1* gene (Petrova et al., 2013). Mitotic indexes were measured as the percentages of mitotic cells accumulating Cnd2-GFP in the nucleus (Sutani et al., 1999). Budding yeast cells were grown at 30°C in YEPD to mid-log phase, collected by filtration, washed with dH₂O, and re-suspended at an OD₆₀₀ of 0.30.4 in YEPD containing 3 µg/ml α-factor. After one hour, additional α-factor was added to 3 µg/ml. After another hour, an aliquot of cells was used for ChIP (G1 sample) and the remaining cells were collected by filtration, washed with dH₂O and re-suspended in YEPD to release the cells from the G1 arrest. 30 min after and 60 min after the release, aliquots were collected for ChIP (S phase sample and G2 sample respectively). Budding yeast strains expressing TEV protease under the *GAL1* promoter were grown at 30°C in YEP medium containing 2% raffinose (YEP-R) to mid-log phase, collected by filtration, washed with dH₂O, and re-suspended at an OD₆₀₀ of 0.15 in YEP-R containing 3 µg/ml α-factor. After one hour, additional α-factor was added to 3 µg/ml. After 30 min, the cultures were split and TEV protease expression was induced in one half by addition of 2% galactose. After another 30 min, cells were collected by filtration, washed with dH₂O and re-suspended in YEP-R (uninduced) or YEP-R with 2% galactose (YEP-RG; induced) with 3 µg/ml α-factor. Fresh α-factor was added to 3 µg/ml after another hour to all cultures and ChIP samples were collected one hour later.

Microscopy

To quantify anucleolate cells, cells expressing Gar2-mCherry and Psy1-GFP fusion proteins were fixed with cold methanol and DNA was stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 0,5 µg/ml in

PEM buffer (100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1mM MgSO₄, pH 6,9). Gar2-mCherry and Psy1-GFP were directly observed under the fluorescent microscope. Rad22-GFP foci were analysed on cells fixed with iced-cold methanol and stained with DAPI. Cytological analysis of the CUT phenotype was performed as described (Hagan, 2016) except that cells were fixed with cold methanol and stained with Hoechst 33342 (20 µg/ml). Immunofluorescence was performed as described (Robellet et al., 2014), with the following modifications. Cells shifted at 36°C for 2h30 min were fixed with ice-cold ethanol and stored at 4°C. 2x10⁷ cells were washed in PEMS (PEM +1.2 M Sorbitol) and digested with Zymolyase 100T (0.4 mg/ml in PEMS) for 30 min at 37°C. Images were processed and quantified using ImageJ with automated background subtraction.

FACScan

2x10⁶ fission yeast cells were fixed with ethanol 70% (v/v), washed in sodium citrate (50 mM pH 7) and digested with RNase A (100 µg/ml) (Merck). Cells were briefly sonicated and stained with 1 µM Sytox Green (ThermoFischer Scientific). DNA content was quantified on a FACSCALIBUR cytometer using CellQuest Pro software (BD Biosciences). Raw data were analyzed with FlowJo software (BD biosciences). FACScan analysis of budding yeast cells was performed as previously described after staining DNA with either propidium iodide (Fig. 4; Cuylen et al., 2011) or SYBR green I (Fig. S3; Cuylen et al., 2013).

Chromatin immunoprecipitation and quantitative PCR

ChIPs for fission yeast cells were performed as described (Vanoosthuyse et al., 2014). 2x10⁸ cells were fixed with 1% formaldehyde at 36°C for 5 min and then 19°C for 25 min, washed with PBS and lysed using acid-washed glass beads in a Precellys homogenizer. Chromatin was sheared into 300- to 900-bp fragments by sonication using a Diagenode bioruptor. Sheared chromatin was split in two equivalent fractions subjected to parallel immunoprecipitations using magnetic Dynabeads coated with the appropriate antibody. Total and immunoprecipitated DNA was purified using the NucleoSpin PCR clean-up kit (Macherey-Nagel). DNA was analysed on a Rotor-Gene PCR cycler using QuantiFast SYBR Green mix. ChIP-qPCR experiments for budding yeast cells were performed as described previously (Cuylen et al., 2011). In brief, aliquots of 42 ml culture with an OD₆₀₀ of 0.6 were fixed in 3% formaldehyde at 16°C. Chromatin was sonicated to an average length of 500 bp using a Diagenode bioruptor. For anti-HA immunoprecipitation, 50 µl protein G dynabeads and 1.5 µl 16B12 antibody (anti-HA.11, Covance) were used. For anti-PK immunoprecipitation, 50 µl protein A dynabeads and 2 µl anti-PK (V5) tag antibody (Abd Serotec MCA1360) were used. Purified DNA was analysed with an ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) using rDNA-specific primers. Primers are listed in Table S3.

Chromosome spreads

Budding yeast cells were grown at 30°C in YEPD to mid-log phase, collected by filtration, washed with dH₂O, and re-suspended at an OD₆₀₀ of 0.2 in YEPD containing 3 µg/ml α-factor. After one hour, additional α-factor was added to 3 µg/ml. After another hour, an aliquot of cells was used for chromosome spreading (G1 sample) and the remaining cells were collected by filtration, washed with dH₂O and re-suspended into YEPD to release the cells from the G1 arrest. Aliquots were collected for chromosome spreading 30 min and 60 min after the release (S and G2 phase samples, respectively). Chromosome spreads were prepared as described previously (Cuylen et al., 2011) and stained for Brn1-HA₆ with 16B12 (anti-HA.11, Covance, 1:500) and Alexa Fluor 594-labelled anti-mouse IgG (Invitrogen, 1:600) antibodies and for DNA with DAPI. Images were recorded on a DeltaVision Spectris Restoration microscope (Applied Precision) with a 100×, NA 1.35 oil immersion objective.

Total RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted from 2x10⁸ fission yeast cells by standard hot-phenol method. 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using Superscript III (Life Technologies) following the manufacturer's instructions, using random hexamers in the presence or absence of Reverse Transcriptase (RT). cDNAs were quantified by real time qPCR on a Rotor-Gene PCR cycler using QuantiFast SYBR Green mix. The absence of PCR product in minus RT samples has been verified for all RT-qPCR shown in this publication. Primers are listed in Table S3.

RNase digestion and Northern blot

For RNase H digestion, total RNA was hybridized with a DNA oligonucleotide complementary to a sequence located at the 5' end of the *hsp9* mRNA and digested with RNase H (Roche) following the manufacturer's instructions. For Northern blotting, total or RNase H-digested RNA was resolved on 1% agarose gel supplemented with formaldehyde 0.7% (v/v), transferred onto Hybond-XL nylon membranes (Amersham) and cross-linked. Pre-hybridization and overnight hybridization were carried out in ULTRAhyb buffer (Ambion) at 68°C. Strand-specific RNA probes were generated by in vitro transcription using the T7 riboprobe system (Ambion) and internally labelled with [α -³²P]-UTP. Membranes were quickly washed with 2X SSC and 0,1% SDS, 10 min in 2X SSC and 0,1% SDS, and 3 times in 0,2X SSC and 0,1% SDS. Blots were imaged with Typhoon 8600 instrument (Molecular Dynamics) and quantified with ImageQuant TL (GE Healthcare).

Single molecule RNA Fluorescence In Situ Hybridization (smFISH), imaging and quantification

smFISH was performed on formaldehyde-fixed cells, as described (Keifenheim et al., 2017). Probes were designed and synthesized by Biosearch Technologies (Petaluma, CA). The *mug93as* and *cct2*

probes were labelled with Quasar 670. Probe sequences are listed in Table S3. Cells were imaged on a Leica TCS Sp8, using a 63x/1.40 oil objective, Optical z sections were acquired (z-step size 0.3 microns) for each scan to cover the depth of the cells. For image analysis and quantification, cell boundaries were outlined manually and RNA spots quantified using FISH-quant package implemented in MATLAB, as described (Mueller et al., 2013). The FISH-quant detection technical error was estimated at 6-7% by quantifying mRNA numbers using two sets of probes covering the 5' half or the 3' half of the *rpb1* mRNA and labelled with different dyes.

RNA-seq and analysis

RNA-seq was performed on biological triplicates. Total RNA was extracted from 2×10^8 yeast cells by standard hot-phenol method. RNA quality was determined using TapeStation (Agilent) with RINe score >9. Ribosomal RNA was removed by treating 2 μ g of total RNA with the Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit (Yeast) (MRZY1324, Illumina, Paris, France). RNA-seq libraries were prepared using TruSeq Stranded kit. Sequencing was performed on Illumina Hiseq 4000, with single-end reads of 50 nt in length. Total number of reads per sample ranged from 59 million to 93 million. For in-silico analyses, we used the version 2.30 of the *S. pombe* genome in fasta format and the corresponding gff3 annotations downloaded from the ebi website (2017/03/22). Scripts are available in the following git repository: <https://github.com/LBMC/readthroughpombe>. The RNA-seq reads were processed with cutadapt to remove adaptors and further trimmed with UrQt (--t 20) based on their quality. After quality control with fastqc, we built the reverse complement of the reads in the fastq files using seqkit, indexed the genome (-build) and mapped the trimmed fastq files (--very-sensitive) using Bowtie2. Mapping output files were saved in bam format with samtools (view -Sb).

To detect read-through events, we searched for sections of reads located immediately downstream of the 3' ends of annotated transcription units, on the same DNA strand, and within gene-free intergenic regions. First, broad peaks of RNA-seq reads were identified using the peak caller Music (v6613c53). Bam files were sorted and filtered as forward or reverse with samtools (view -hb -F 0x10 or view -hb -f 0x10). The gff annotation file was converted to bed with convert2bed from bedtools, the genome indexed with samtools (faidx) and the annotation file split into forward and reverse with bedtools (complement). Next, reads corresponding to annotated transcripts were removed using samtools view (-hb bams -L annotation). Subtracted bam files were sorted with samtools sort, and RNA-seq peaks located outside annotated transcripts were detected with Music (-get_per_win_p_vals_vs_FC -begin_l 50 -end_l 500 -step 1.1 -l_mapp 50 -l_frag 363 -q_val 1 -l_p 0). The resulting annotation was further filtered by removing peaks whose starting positions were located more than 2 read-length away from the nearest 3'ends. Only peaks detected in at least 2 out of 3 biological replicates were

considered. Read-through detection was performed independently for the *rrp6Δ* and *cut14-208* mutants. To achieve comparable examination between *rrp6Δ* and *cut14-208* for reads quantification, we merged their respective read-through annotations and sorted them with bedtools (sort) and extracted the forward and reverse reads from the bam files with bedtools (bamtofastq). We generated the list of transcript sequences from the genome and the annotation with bedtools (getfasta -s). The transcript sequences were then indexed with kallisto (index-k 31 --make-unique) and the quantification achieved with kallisto (quant -single -l 363.4 -s 85.53354). Quantifications were performed separately on the transcript alone and on the transcript plus read-through annotation.

Quantifications in mutant strains compared to wt were performed using the package DESeq2 with R (v3.4.4). For differential expression analyses, we tested for log₂ fold change superior to 0.5 or inferior to -0.5. For read-through events, we tested for a log₂ fold change superior to 0 compared to the wild type to declare the read-through present in the mutant background. For all analyses, we selected p-values with an FDR ≤ 0.05. The package ggplot2 (v2.2.1) was used for graphics.

High-resolution tiling arrays

For transcriptome analysis in G1 phase, *Δbar1* cells were grown at 30°C in YEP-R to mid-log phase, collected by filtration, washed with dH₂O, and re-suspended at an OD₆₀₀ of 0.3–0.4 in YEP-R containing 3 μg/ml α-factor. After 1.5 h, galactose was added to 2% and, after another 2.5 h, 100 ml cells of OD₆₀₀ = 0.6–0.8 were harvested by centrifugation at room temperature for RNA isolation. For transcriptome analysis during G2 phase, cells were grown at 30°C in YEP-R to mid-log phase, collected by filtration, washed with dH₂O, and re-suspended at an OD₆₀₀ of 0.3–0.4 in YEP-R containing 3 μg/ml α-factor. After one hour, additional α-factor was added to 3 μg/ml and 30 min later galactose was added to 2%. After another 30 min, cells were collected by filtration, washed with dH₂O and re-suspended in YEP-RG with 3 μg/ml α-factor. Fresh α-factor was added to 3 μg/ml after one hour. After another hour, cells were collected by filtration, washed with dH₂O and re-suspended in YEP-RG with 10 μg/ml nocodazole. 1.5 h after the release from G1 phase, 100 ml culture with OD₆₀₀ of 1.0 were harvested by centrifugation at room temperature for RNA isolation. Samples were collected for FACScan analysis at the indicated time points.

High-resolution tiling arrays were performed and analysed as described (Xu et al., 2009). In brief, RNA isolated from yeast cells was reverse transcribed to cDNA with a mixture of random hexamers and oligo-dT primers, labelled and hybridized to tiled Affymetrix arrays of the budding yeast genome (S288c Genome Chip, <http://www-sequence.stanford.edu/s288c/1lq.html>). Transcripts that were two-fold or more up- or downregulated are listed in Table S5.

Accession number

RNA-seq data are accessible from the Gene Expression Omnibus (GEO) database under the accession number GSE112281.

Antibodies

Antibodies used in this study are listed in Table S4.

Acknowledgements

We thank Vincent Vanoosthuyse and André Verdel for fruitful discussions, and V. Vanoosthuyse for critical reading of the manuscript. We are grateful to François Bachant, Kim Nasmyth, Chris Norbury, Jean-Paul Javerzat, Masayuki Yamamoto and the Yeast Genetic Resource Center of the National BioResource Project–Japan for strains, and to *Keith Gull* for the TAT1 antibody. We thank the Pôle Scientifique de Modélisation Numérique (PSMN) of ENS-Lyon and the Biocomputing Pole of the LBMC for in-silico analyses. We acknowledge the help of Hélène Polveche and Lorraine Soudade during the initial phase of bioinformatics analyses. Clémence Hocquet is supported by a PhD studentship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Fondation pour la Recherche Médicale (grant FDT20170437039). Xavier Robellet is supported by a post-doctoral fellowship from the ANR. Research in the Bernard lab is supported by the CNRS, the ANR (grant ANR-15-CE12-0002-01), the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant PJA 20151203343) and the Comité du Rhône de la Ligue Nationale contre le Cancer. This research in the Marguerat lab was supported by the UK Medical Research Council. Research in the Haering and Steimetz labs is supported by EMBL.

Competing interests

The authors declare no financial and non-financial competing interest

References

- Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lis, J.T., 2002. The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* 420, 837–41. <https://doi.org/10.1038/nature01181>
- Aoi, Y., Kawashima, S.A., Simanis, V., Yamamoto, M., Sato, M., 2014. Optimization of the analogue-sensitive Cdc2/Cdk1 mutant by in vivo selection eliminates physiological limitations to its use in cell cycle analysis. *Open Biol.* 4. <https://doi.org/10.1098/rsob.140063>
- Balasubramanian, M.K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K.C., Naqvi, N.I., He, X., Sazer, S., Gould, K.L., 1998. Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* 149, 1265–1275.
- Bhalla, N., Biggins, S., Murray, A.W., 2002. Mutation of YCS4, a budding yeast condensin subunit, affects mitotic and nonmitotic chromosome behavior. *Mol Biol Cell* 13, 632–45.
- Buhler, M., Haas, W., Gygi, S.P., Moazed, D., 2007. RNAi-dependent and -independent RNA turnover mechanisms contribute to heterochromatic gene silencing. *Cell* 129, 707–21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.038>
- Chang, F., Drubin, D., Nurse, P., 1997. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J. Cell Biol.* 137, 169–182.
- Chen, D., Dundr, M., Wang, C., Leung, A., Lamond, A., Misteli, T., Huang, S., 2005. Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J Cell Biol* 168, 41–54. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407182>
- Cuylen, S., Metz, J., Haering, C.H., 2011. Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nat Struct Mol Biol* 18, 894–901. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2087>
- Cuylen, S., Metz, J., Hruby, A., Haering, C.H., 2013. Entrapment of chromosomes by condensin rings prevents their breakage during cytokinesis. *Dev. Cell* 27, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.018>
- D'Ambrosio, C., Kelly, G., Shirahige, K., Uhlmann, F., 2008. Condensin-Dependent rDNA Decatenation Introduces a Temporal Pattern to Chromosome Segregation. *Curr. Biol.* 18, 1084–1089. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.058>
- D'Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., Uhlmann, F., 2008. Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev* 22, 2215–27.
- Downen, J.M., Bilodeau, S., Orlando, D.A., Hübner, M.R., Abraham, B.J., Spector, D.L., Young, R.A., 2013. Multiple Structural Maintenance of Chromosome Complexes at Transcriptional Regulatory Elements. *Stem Cell Rep. Vol. I*, 371–378.
- Downen, J.M., Young, R.A., 2014. SMC complexes link gene expression and genome architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev., Genome architecture and expression* 25, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.009>
- Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., Strunnikov, A., 2000. The Condensin Complex Governs Chromosome Condensation and Mitotic Transmission of Rdna. *J. Cell Biol.* 149, 811–824. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.4.811>
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., Dekker, C., 2018. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* 360, 102–105. <https://doi.org/10.1126/science.aar7831>
- Gibcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M.T., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., Mirny, L.A., Dekker, J., 2018. A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* 359. <https://doi.org/10.1126/science.aao6135>
- Graham, A.C., Kiss, D.L., Andrulis, E.D., 2009. Core exosome-independent roles for Rrp6 in cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 20, 2242–53. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-08-0825>
- Hagan, I.M., 2016. Chromatin and Cell Wall Staining of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, pdb.prot091025. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot091025>

- Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., Yamamoto, M., 2006. Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442, 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature04881>
- He, H., Zhang, S., Wang, D., Hochwagen, A., Li, F., 2016. Condensin Promotes Position Effects within Tandem DNA Repeats via the RITS Complex. *Cell Rep.* 14, 1018–1024. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.006>
- Hihara, S., Pack, C.G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., Sako, Y., Kinjo, M., Takahashi, K., Nagai, T., Maeshima, K., 2012. Local nucleosome dynamics facilitate chromatin accessibility in living mammalian cells. *Cell Rep* 2, 1645–56. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.008>
- Hirano, T., 2016. Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. *Cell* 164, 847–857. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.033>
- Hiraoka, Y., Toda, T., Yanagida, M., 1984. The NDA3 gene of fission yeast encodes beta-tubulin: a cold-sensitive *nda3* mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* 39, 349–58.
- Hyun-Soo Kim, V.V., Jeffrey Fillingham, Assen Roguev, Stephen Watt, Thomas Kislinger, A.T., Laura Rocco Carpenter, Christopher S. Bennett, Andrew Emili, Jack F Greenblatt, K.G.H., Nevan J. Krogan, Jürg Bähler & Michael-Christopher Keog, 2009. An acetylated form of histone H2A.Z regulates chromosome architecture in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* In press.
- Ideue, T., Azad, A.K., Yoshida, J., Matsusaka, T., Yanagida, M., Ohshima, Y., Tani, T., 2004. The nucleolus is involved in mRNA export from the nucleus in fission yeast. *J. Cell Sci.* 117, 2887–2895. <https://doi.org/10.1242/jcs.01155>
- Ing-Simmons, E., Seitan, V.C., Faure, A.J., Flicek, P., Carroll, T., Dekker, J., Fisher, A.G., Lenhard, B., Merkenschlager, M., 2015. Spatial enhancer clustering and regulation of enhancer-proximal genes by cohesin. *Genome Res.* 25, 504–513. <https://doi.org/10.1101/gr.184986.114>
- Iwasaki, O., Tanaka, A., Tanizawa, H., Grewal, S.I., Noma, K., 2010. Centromeric localization of dispersed Pol III genes in fission yeast. *Mol Biol Cell* 21, 254–65. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-09-0790>
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., Taatjes, D.J., Dekker, J., Young, R.A., 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430–5. <https://doi.org/10.1038/nature09380>
- Keifenheim, D., Sun, X.-M., D'Souza, E., Ohira, M.J., Magner, M., Mayhew, M.B., Marguerat, S., Rhind, N., 2017. Size-Dependent Expression of the Mitotic Activator Cdc25 Suggests a Mechanism of Size Control in Fission Yeast. *Curr. Biol.* CB 27, 1491–1497.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.016>
- Kilchert, C., Wittmann, S., Vasiljeva, L., 2016. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 227–239. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.15>
- Kim, J.H., Zhang, T., Wong, N.C., Davidson, N., Maksimovic, J., Oshlack, A., Earnshaw, W.C., Kalitsis, P., Hudson, D.F., 2013. Condensin I associates with structural and gene regulatory regions in vertebrate chromosomes. *Nat Commun* 4, 2537. <https://doi.org/10.1038/ncomms3537>
- Kim, K.-D., Tanizawa, H., Iwasaki, O., Noma, K.-I., 2016. Transcription factors mediate condensin recruitment and global chromosomal organization in fission yeast. *Nat. Genet.* 48, 1242–1252. <https://doi.org/10.1038/ng.3647>
- Kranz, A.L., Jiao, C.Y., Winterkorn, L.H., Albritton, S.E., Kramer, M., Ercan, S., 2013. Genome-wide analysis of condensin binding in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 14, R112. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r112>
- Kruesi, W.S., Core, L.J., Waters, C.T., Lis, J.T., Meyer, B.J., 2013. Condensin controls recruitment of RNA polymerase II to achieve nematode X-chromosome dosage compensation. *Elife* 2, e00808. <https://doi.org/10.7554/eLife.00808>

- Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., Haering, C.H., 2017. Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell* 171, 588–600.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.008>
- Lemay, J.-F., Larochelle, M., Marguerat, S., Atkinson, S., Bähler, J., Bachand, F., 2014. The RNA exosome promotes transcription termination of backtracked RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 919–926. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2893>
- Li, W., Hu, Y., Oh, S., Ma, Q., Merkurjev, D., Song, X., Zhou, X., Liu, Z., Tanasa, B., He, X., Chen, A.Y., Ohgi, K., Zhang, J., Liu, W., Rosenfeld, M.G., 2015. Condensin I and II Complexes License Full Estrogen Receptor α -Dependent Enhancer Activation. *Mol. Cell* 59, 188–202. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.002>
- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A.Y., Merkurjev, D., Zhang, J., Ohgi, K., Song, X., Oh, S., Kim, H.-S., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2013. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* 498, 516–520. <https://doi.org/10.1038/nature12210>
- Longworth, M.S., Walker, J.A., Anderssen, E., Moon, N.S., Gladden, A., Heck, M.M., Ramaswamy, S., Dyson, N.J., 2012. A shared role for RBF1 and dCAP-D3 in the regulation of transcription with consequences for innate immunity. *PLoS Genet* 8, e1002618. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002618>
- Lupo, R., Breiling, A., Bianchi, M.E., Orlando, V., 2001. Drosophila chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing. *Mol Cell* 7, 127–36.
- Merkenschlager, M., Nora, E.P., 2016. CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 17, 17–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022339>
- Moreno, S., Klar, A., Nurse, P., 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzym.* 194, 795–823.
- Mueller, F., Senecal, A., Tantale, K., Marie-Nelly, H., Ly, N., Collin, O., Basyuk, E., Bertrand, E., Darzacq, X., Zimmer, C., 2013. FISH-quant: automatic counting of transcripts in 3D FISH images. *Nat. Methods* 10, 277–278. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2406>
- Murakami-Tonami, Y., Kishida, S., Takeuchi, I., Katou, Y., Maris, J.M., Ichikawa, H., Kondo, Y., Sekido, Y., Shirahige, K., Murakami, H., Kadomatsu, K., 2014. Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 1115–1131. <https://doi.org/10.4161/cc.27983>
- Nakazawa, N., Mehrotra, R., Ebe, M., 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, 1795–807. <https://doi.org/10.1242/jcs.078733>
- Niwa, O., Yanagida, M., 1985. Triploid meiosis and aneuploidy in *Schizosaccharomyces pombe*: an unstable aneuploid disomic for chromosome III. *Curr. Genet.* 9, 463–470. <https://doi.org/10.1007/BF00434051>
- Palozola, K.C., Donahue, G., Liu, H., Grant, G.R., Becker, J.S., Cote, A., Yu, H., Raj, A., Zaret, K.S., 2017. Mitotic transcription and waves of gene reactivation during mitotic exit. *Science* 358, 119–122. <https://doi.org/10.1126/science.aal4671>
- Paul, B., Montpetit, B., 2016. Altered RNA processing and export lead to retention of mRNAs near transcription sites and nuclear pore complexes or within the nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 27, 2742–2756. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-04-0244>
- Paul, M.R., Markowitz, T.E., Hochwagen, A., Ercan, S., 2017. Acute condensin depletion causes genome decompaction without altering the level of global gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *bioRxiv* 195487. <https://doi.org/10.1101/195487>
- Petrova, B., Dehler, S., Kruitwagen, T., Heriche, J.K., Miura, K., Haering, C.H., 2013. Quantitative analysis of chromosome condensation in fission yeast. *Mol Cell Biol* 33, 984–98. <https://doi.org/10.1128/MCB.01400-12>

- Rao, S.S.P., Huang, S.-C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J.M., Perez, E.M., Kieffer-Kwon, K.-R., Sanborn, A.L., Johnstone, S.E., Bascom, G.D., Bochkov, I.D., Huang, X., Shamim, M.S., Shin, J., Turner, D., Ye, Z., Omer, A.D., Robinson, J.T., Schlick, T., Bernstein, B.E., Casellas, R., Lander, E.S., Aiden, E.L., 2017. Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell* 171, 305–320.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.026>
- Rawlings, J.S., Gatzka, M., Thomas, P.G., Ihle, J.N., 2011. Chromatin condensation via the condensin II complex is required for peripheral T-cell quiescence. *Embo J* 30, 263–76. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.314>
- Robellet, X., Fauque, L., Legros, P., Mollereau, E., Janczarski, S., Parrinello, H., Desvignes, J.P., Thevenin, M., Bernard, P., 2014. A genetic screen for functional partners of condensin in fission yeast. *G3 Bethesda* 4, 373–81. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009621>
- Robellet, X., Vanoosthuyse, V., Bernard, P., 2017. The loading of condensin in the context of chromatin. *Curr. Genet.* 63, 577–589. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0669-0>
- Saitoh, S., Takahashi, K., Yanagida, M., 1997. Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. *Cell* 90, 131–43.
- Saka, Y., Sutani, T., Yamashita, Y., Saitoh, S., Takeuchi, M., Nakaseko, Y., 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, 4938–52.
- Samoshkin, A., Dulev, S., Loukinov, D., Rosenfeld, J.A., Strunnikov, A.V., 2012. Condensin dysfunction in human cells induces nonrandom chromosomal breaks in anaphase, with distinct patterns for both unique and repeated genomic regions. *Chromosoma* 121, 191–9. <https://doi.org/10.1007/s00412-011-0353-6>
- Schalbetter, S.A., Goloborodko, A., Fudenberg, G., Belton, J.-M., Miles, C., Yu, M., Dekker, J., Mirny, L., Baxter, J., 2017. SMC complexes differentially compact mitotic chromosomes according to genomic context. *Nat. Cell Biol.* 19, 1071–1080. <https://doi.org/10.1038/ncb3594>
- Sheltzer, J.M., Torres, E.M., Dunham, M.J., Amon, A., 2012. Transcriptional consequences of aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 12644–12649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209227109>
- Sipiczki, M., 2000. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* 1, REVIEWS1011. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-2-reviews1011>
- Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., Yanagida, M., 1999. Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev* 13, 2271–83.
- Toselli-Mollereau, E., Robellet, X., Fauque, L., Lemaire, S., Schiklenk, C., Klein, C., Hocquet, C., Legros, P., N’Guyen, L., Mouillard, L., Chautard, E., Auboeuf, D., Haering, C.H., Bernard, P., 2016. Nucleosome eviction in mitosis assists condensin loading and chromosome condensation. *EMBO J.* 35, 1565–1581. <https://doi.org/10.15252/embj.201592849>
- Uhlmann, F., 2016. SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 399–412. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.30>
- van Ruiten, M.S., Rowland, B.D., 2018. SMC Complexes: Universal DNA Looping Machines with Distinct Regulators. *Trends Genet. TIG.* <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.03.003>
- Vanoosthuyse, V., Legros, P., van der Sar, S.J., Yvert, G., Toda, K., Le Bihan, T., Watanabe, Y., Hardwick, K., Bernard, P., 2014. CPF-associated phosphatase activity opposes condensin-mediated chromosome condensation. *PLoS Genet* 10, e1004415. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004415>
- Walther, N., Hossain, M.J., Politi, A.Z., Koch, B., Kueblbeck, M., Ødegård-Fougner, Ø., Lampe, M., Ellenberg, J., 2018. A quantitative map of human Condensins provides new insights into mitotic chromosome architecture. *J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1083/jcb.201801048>
- Wang, D., Mansisidor, A., Prabhakar, G., Hochwagen, A., 2016. Condensin and Hmo1 Mediate a Starvation-Induced Transcriptional Position Effect within the Ribosomal DNA Array. *Cell Rep.* 14, 1010–1017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.005>

- Wang, S.W., Asakawa, K., Win, T.Z., Toda, T., Norbury, C.J., 2005. Inactivation of the pre-mRNA cleavage and polyadenylation factor Pfs2 in fission yeast causes lethal cell cycle defects. *Mol Cell Biol* 25, 2288–96.
- Warburton, P.E., Hasson, D., Guillem, F., Lescale, C., Jin, X., Abrusan, G., 2008. Analysis of the largest tandemly repeated DNA families in the human genome. *BMC Genomics* 9, 533. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-533>
- Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers, J., Bahler, J., 2008. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453, 1239–43. <https://doi.org/10.1038/nature07002>
- Woodward, J., Taylor, G.C., Soares, D.C., Boyle, S., Sie, D., Read, D., Chathoth, K., Vukovic, M., Tarrats, N., Jamieson, D., Campbell, K.J., Blyth, K., Acosta, J.C., Ylstra, B., Arends, M.J., Kranc, K.R., Jackson, A.P., Bickmore, W.A., Wood, A.J., 2016. Condensin II mutation causes T-cell lymphoma through tissue-specific genome instability. *Genes Dev.* 30, 2173–2186. <https://doi.org/10.1101/gad.284562.116>
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Münster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F., Huber, W., Steinmetz, L.M., 2009. Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature* 457, 1033–1037. <https://doi.org/10.1038/nature07728>
- Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R., Yamamoto, M., 2010. Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *Embo J* 29, 2173–81. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.108>
- Yuen, K.C., Slaughter, B.D., Gerton, J.L., 2017. Condensin II is anchored by TFIIC and H3K4me3 in the mammalian genome and supports the expression of active dense gene clusters. *Sci. Adv.* 3, e1700191. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700191>
- Zhou, Y., Zhu, J., Schermann, G., Ohle, C., Bendrin, K., Sugioka-Sugiyama, R., Sugiyama, T., Fischer, T., 2015. The fission yeast MTREC complex targets CUTs and unspliced pre-mRNAs to the nuclear exosome. *Nat. Commun.* 6, 7050. <https://doi.org/10.1038/ncomms8050>
- Zofall, M., Fischer, T., Zhang, K., Zhou, M., Cui, B., Veenstra, T.D., Grewal, S.I., 2009. Histone H2A.Z cooperates with RNAi and heterochromatin factors to suppress antisense RNAs. *Nature* 461, 419–22.

Figure Legends

Figure 1. The condensin loss-of-function mutant *cut14-208* accumulates RNA-exosome-sensitive transcripts

A. Volcano plot of RNA levels measured by strand-specific RNA-seq in the *cut14-208* condensin mutant after 1 cell doubling at 36°C, from biological triplicates. Genes exhibiting a log₂ fold change superior to 0.5 or inferior to -0.5 with an adjusted P-value (padj) ≤ 0.05 are indicated in red. **B.** RT-qPCR validation. Total RNA from cells grown at 36°C for 2.5 hours was reverse-transcribed in the presence or absence of Reverse Transcriptase (RT) and cDNAs were quantified by qPCR. Shown are the averages and standard deviations (SDs) measured from 3 biological replicates. **C.** Misregulated RNA in *cut14-208*. **D.** Northern blot analysis of the non-coding RNA *mug93as*. Cells were shifted at 36°C for 1 cell doubling and total RNA probed for *mug93as* level. Ribosomal RNA (rRNA) stained with ethidium bromide (EtBr) was used as loading control. **E.** Volcano plot of RNA levels measured by RNA-seq from biological triplicates of the *rrp6Δ* mutant after 1 cell doubling at 36°C. Genes exhibiting a log₂ fold change superior to 0.5 or inferior to -0.5 with an adjusted P-value (padj) ≤ 0.05 are indicated in red. **F.** Misregulated RNA in *rrp6Δ*. **G.** Genes misregulated in *cut14-208* and *rrp6Δ*. **H.** Comparison plots between the transcriptomes of *cut14-208* and *rrp6Δ*. Genes differentially expressed in both mutants are highlighted in red. The correlation coefficient has been calculated for all genes.

Figure 2. The condensin loss-of-function mutant *cut14-208* accumulates 3'-extended read-through transcripts

A. 3'-extended *hsp9* read-through RNA detected by strand-specific RNA-seq in *cut14-208*. **B.** Read-through *hsp9* RNA detected by RNase H digestion and Northern blotting. Total RNA from indicated strains grown at 36°C was digested by RNase H in the presence of a DNA oligonucleotide complementary to the 5' end of *hsp9* mRNA. Cleaved products were revealed by a probe hybridizing downstream the transcription termination site of *hsp9* (see probe2 in A), or within the coding sequence (probe 1, shown in A). rDNA stained with EtBr served as loading control. **C.** 3'-extended read-through RNAs in *cut14-208*. **D.** Polyadenylated RNAs detected by oligo(dT)-primed RT-PCR. Cells were grown at 36°C for 2.5 hours in PMG supplemented with 60 μM thiamine to repress *nmt1-dis3*. Total RNA was reverse transcribed using oligo(dT) primers in the presence or absence of RT. cDNA were amplified by 25 cycles of PCR using oligo(dT) and gene specific primers. Minus RT reactions produced no signal. **E.** 3'-extended read-through RNAs in *rrp6Δ*. **F.** Overlap between the sets of read-through RNAs in *cut14-208* and *rrp6Δ*.

Figure 3. The function of condensin is dispensable for gene regulation during S and G2 phases of the cell cycle in fission yeast

A-C. Gene expression was assessed in synchronized *cut14-208* cells progressing from early S phase to G1 phase at the restrictive temperature. **A.** Scheme of the experiment. **B.** Left panel: FACScan analyses. Right panels: chromosome segregation and cytokinesis assessed by staining DNA with DAPI and the septum with calcofluor ($n \geq 100$). **C.** Total RNA extracted from *cdc10-129* and *cdc10-129 cut14-208* cells shown in **B**, was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and cDNA quantified by qPCR. Red line = 1. Shown are averages \pm SDs measured from biological triplicates. **D-F.** Gene expression was assessed in synchronized *cut14-208* cells progressing from early S phase to late G2 phase at the restrictive temperature. **D.** Scheme of the experiment. **E.** FACScan analyses. **F.** Total RNA extracted from *cdc25-22* and *cdc25-22 cut14-208* cells shown in **E**, was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and cDNA quantified by qPCR. Shown are averages \pm SDs measured from biological triplicates. **G-I.** Gene expression was assessed in synchronized *cut14-208* cells progressing from early S phase to metaphase at the restrictive temperature. **G.** Scheme of the experiment. Thiamine repressed the *nmt41-slp1* gene in order to arrest cells in metaphase. **H.** Percentages of mononucleate, mitotic cells from $n = 3$ experiments. **I.** Total RNA extracted from *nmt41-slp1* and *nmt41-slp1 cut14-208* cells shown in **H** was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and cDNA quantified by qPCR. Shown are averages \pm SDs measured from biological triplicates.

Figure 4. Condensin release from chromosomes has no major effects on G1 or M phase gene expression programs in budding yeast.

A. TEV protease expression was induced in cells synchronized in G1 phase by α -factor (strains C3138 and C3139). 2.5 h after TEV induction, RNA was extracted, cDNA synthesized, labelled and hybridized to tiling arrays. Cell cycle synchronization was scored by FACScan analysis of cellular DNA content and Brn1 cleavage was monitored by western blotting against the C-terminal HA₆ tag. **B.** Scatter plot of gene expression values of cells from **A** with cleaved or intact Brn1 (mean values of $n=3$ biological replicates). Red color highlights two-fold or more up- or downregulated transcripts. **C.** TEV protease expression was induced in cells synchronized in G1 phase by α -factor (strains C2335 and C2455). Cells were release into nocodazole 2.5 h after TEV induction and RNA was extracted 1.5 h later, cDNA synthesized, labelled and hybridized on tiling arrays. Cell cycle synchronization and Brn1 cleavage was monitored as in **A**. **D.** Scatter plot of gene expression values of cells from **C** with cleaved or intact Brn1

(mean valued of n=2 biological replicates). Red color highlights two-fold or more up- or downregulated transcripts.

Figure 5. Defective mitosis underlies deregulated gene expression in the fission yeast *cut14-208* condensin mutant

A. Gene deregulation in mutant cells in which chromosomes are cut by the cytokinetic ring upon mitotic exit. Strains grown at 36°C for 2.5 hours were processed for cytological analysis and RT-qPCR. Right: total RNA was reverse-transcribed in the presence or absence RT and cDNA quantified by qPCR. Shown are averages \pm SDs calculated from 3 biological replicates. Left: cells were stained with DAPI and calcofluor to visualise DNA and the septum, respectively, and to quantify the frequency of chromosome cutting by the septum (CUT cells). **B-E.** Preventing chromosome severing restores normal gene expression in the condensin mutant *cut14-208*. **B.** Cells were grown at 36°C for 2.5 hours and stained with DAPI and calcofluor to reveal DNA and the septum, and measure the frequency of CUT cells, or treated for FACScan analysis of DNA content. **C.** Volcano plot of RNA levels measured by strand-specific RNA-seq in the *cdc15-140 cut14-208* double mutant after 2.5 hours at 36°C, from biological triplicates. **D.** Comparative RNA-seq transcriptomic analysis from biological triplicates. **E.** RNA-seq profiles of the *mug93* ncRNA.

Figure 6. Condensin inactivation generates anucleolate daughter cells in fission yeast, which are depleted of the RNases Rrp6 and Dis3 and accumulate unstable RNA

A-B. The kinetochore mutation *mis6-302* and the condensin mutation *cut14-208* deregulate a same set of genes. Wildtype and *mis6-302* cells grown at 36°C for 8 hours were processed to analyse DNA content by FACScan (**A**) and RNA levels by RT-qPCR (**B**). *cut14-208* cells and the isogenic wt control grown at 36°C for 2.5 hours were used for comparison. Shown are averages \pm SDs measured from biological triplicates. **C.** Non-disjunction of the rDNA in *cut14-208* and *mis6-302* cells. The nucleolar protein Gar2-mcherry was used as a marker for the rDNA and the plasma membrane protein Psy1-GFP to visualise cytokinesis. Mutant cells and their isogenic wt controls were grown at 36°C for 2.5h (*cut14-208*) or 8 hours (*mis6-302*), fixed and stained with DAPI. Segregation of the rDNA in daughter nuclei was measured upon mitotic exit. **D.** Rrp6 is enriched in the nucleolus, and depleted from anucleolate *cut14-208* mutant cells. Indicated cells were grown at 36°C, fixed and processed for immunofluorescence against Gar2-GFP and Rrp6-myc. DNA was stained with DAPI. Right panel shows the ratio of Rrp6-myc signals measured within daughter nuclei in septated cells. **E-F.** The non-coding

RNA *mug93as* accumulate in anucleolate *cut14-208* cells. Cells of indicated genotype and expressing Gar2-GFP were grown at 36°C for 2.5 hours, fixed and processed for single molecule RNA FISH using probes complementary to the ncRNA *mug93as* (E) or the mRNA *cct2* (F). Box and whiskers plots show quantifications of RNA spots in *cut14-208* compared to wt, and in nucleolate compared to anucleolate mutant cells. ***p<0.01, *p<0.05 and °p>0.05.

Figure 7. Condensin deficiency impinges upon gene expression by promoting accurate chromosome segregation throughout mitosis

In wild-type fission yeast cells, Rrp6 and Dis3, the catalytic subunits of the RNA-exosome, are enriched in the nucleolus and most likely co-segregate with the bulk of the rDNA during anaphase. In condensin mutant cells, chromosomes fail to properly segregate during anaphase. Chromatin bridges are formed and entangled sister-rDNA copies fail to separate. The non-disjunction of the rDNA upon mitotic exit leads to the production of anucleolate daughter cells deprived of Rrp6 and Dis3, which start to accumulate RNA molecules that are normally actively degraded by the RNA-exosome, such as unstable ncRNA and 3'-extended RNA.

Supplemental Figure S1 - related to Figure 1. The condensin loss-of-function mutant *cut14-208* accumulates exosome-sensitive transcripts

A. RT-qPCR validation of up-regulated RNA in *cut14-208* mutant cells. Total RNA extracted from wild-type and *cut14-208* cycling cells grown for 2.5 h at the restrictive temperature of 36°C was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and the cDNA quantified by qPCR. Shown are averages ± SDs measured from n = 3 biological replicates. **B.** Pol II occupancy measured by CHIP. Cells of indicated genotypes were grown at the restrictive temperature of 36°C for 2.5 hours and processed for CHIP against RNA Pol II phosphorylated on serine 2 of the CTD. The transcription termination mutant *pfs2-11* was used as a control for Pol II accumulation in the 3' ends of genes (Wang et al., 2005). Show are averages ± SDs calculates from 6 ChIPs performed on biological triplicates.

Supplemental Figure S2 - related to Figure 2. The condensin loss-of-function mutant *cut14-208* accumulates 3'-extended read-through transcripts

A. 3'-extended *hsp9* RNA detected by RNase H digestion and Northern blotting in condensin mutant cells. Indicated strains were grown at 36°C for 2.5 hours. Total RNA was digested by RNase H in the

presence of a DNA oligonucleotide complementary to the 5' end of *hsp9* mRNA. Cleaved products were revealed by a probe hybridizing downstream of the transcription termination site of *hsp9* (probe 2 in Fig. 2A), or within the coding sequence (probe 1 in Fig. 2A). rDNA stained with EtBr served as loading control. **B.** Polyadenylated RNAs detected by oligo(dT)-primed RT-PCR. Cells were grown at 36°C for 2.5 hours in PMG supplemented with 20 μ M thiamine to repress *nmt1-dis3*. Total RNA was reverse transcribed using oligo(dT) primers in the presence or absence of RT. cDNA were amplified by 25 cycles of PCR using oligo(dT) and gene specific primers. PCR products were separated on an agarose gel and stained with EtBr. Minus RT reactions produced no signal. **C.** Venn diagram showing the overlap between the two sets of increased RNAs and read-through RNAs in *cut14-208*. **D.** Steady state level of Rrp6. Indicated strains were grown at 36°C for 2.5 hours, total proteins were extracted and probed with an anti-myc antibody. Alpha-tubulin served as loading control.

Figure S3 – related to Figure 4. Condensin binds to budding yeast chromosomes throughout the cell cycle and is released by TEV cleavage of its kleisin subunit.

A. Cells were synchronized to G1 phase by α -factor and released (strains C1 and C1584). Samples for chromosome spreads were taken prior to the release, 0.5 and 1 h after the release in order to yield G1, S and G2 phase samples, as indicated. Cell cycle synchronization was scored by FACScan analysis of cellular DNA content. **B.** Condensin levels on chromosomes of cells in **A** were measured by immunofluorescence of chromosome spreads (red, anti-HA; blue DAPI). Scale bar: 5 μ m. **C.** Cells were synchronized to G1 phase by α -factor (strains C1 and C1597) and released as in **A**. Samples for ChIP were taken prior to the release, or 0.5 or 1 h after the release for G1, S and G2 phase samples, respectively. Condensin levels on chromosomes were measured by anti-PK ChIP at the rDNA locus followed by quantitative PCR. **D.** TEV protease expression was induced by addition of galactose (+ gal) in cells synchronized in G1 phase by α -factor (strains C1039 and C2455). A control sample was not induced (– gal). Condensin levels on chromosomes were measured by anti-HA ChIP followed by quantitative PCR at the rDNA locus.

Supplemental Figure S4 – related to Figure 5. Defective mitosis underlies deregulated gene expression in the fission yeast *cut14-208* condensin mutant

A-C. Gene expression was assessed in synchronized *cut14-208* cells progressing through mitosis. **A.** Cells expressing the analogue-sensitive Cdc2asM17 kinase were arrested at the G2/M transition in the presence of 3-Br-PP1 (2 μ M), shifted at 36°C, released into mitosis and re-arrested in late G1 phase by

the *cdc10-129* mutation. **B.** DNA content was assessed by FACScan analysis and mitotic progression by cytological observation. DNA was stained with DAPI and the septum with calcofluor. The frequencies of chromatin bridges (red line) and chromosome cutting by the septum (green line) are shown. **C.** Total RNA extracted from wild-type and *cut14-208* cells shown in **B** was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and cDNA quantified by qPCR.

Supplemental Figure S5 - related to Figure 5. Defective mitosis underlies deregulated gene expression in the fission yeast *cut14-208* condensin mutant

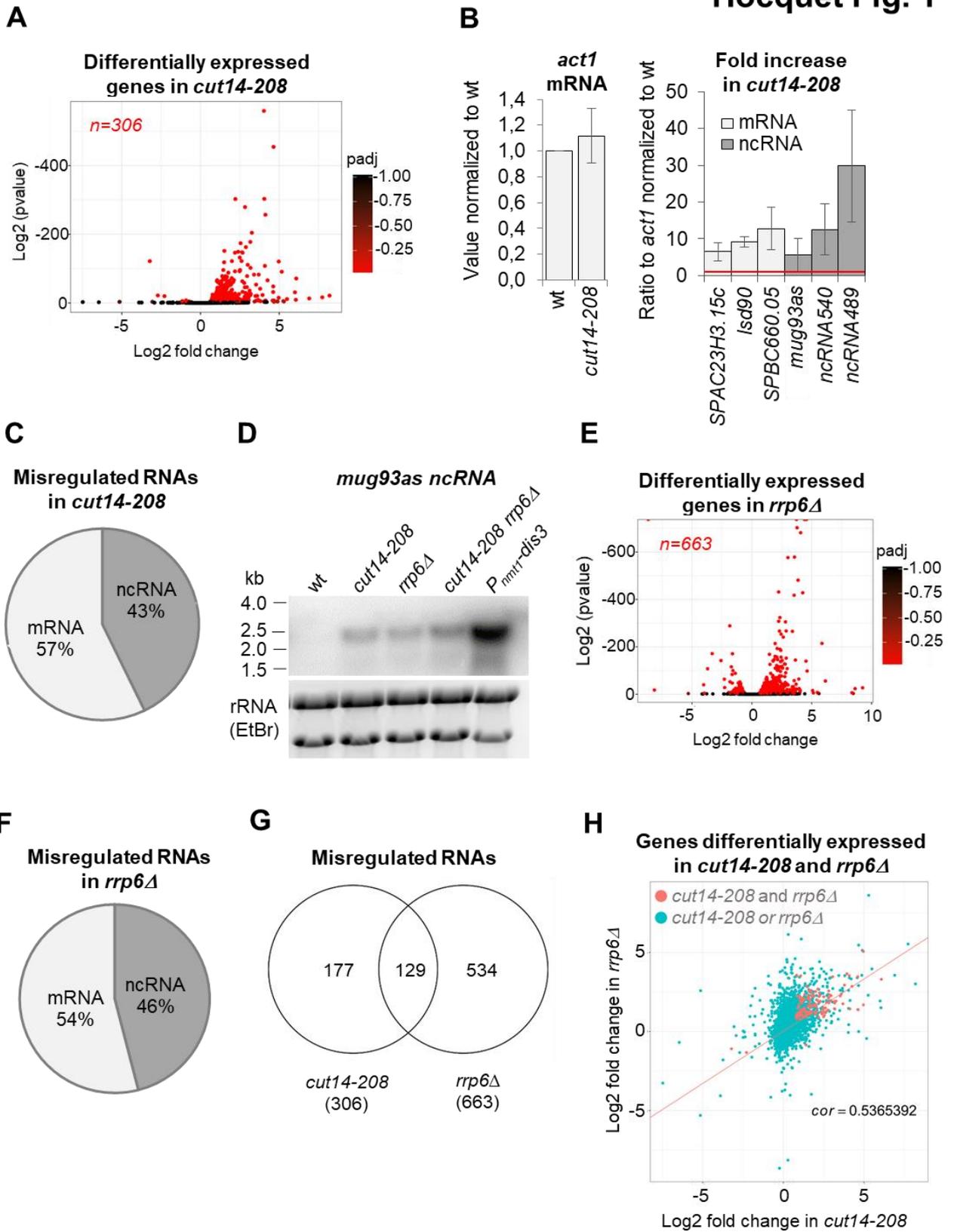
A-B. The amplitude of increase in RNA levels correlates with the prevalence of chromosome severing. Indicated cells were grown at 36°C for 2.5 hours and processed for cytological analysis of chromosome segregation or RT-qPCR. **A.** Cells were fixed and processed for immunofluorescence against α -tubulin. DNA was stained with DAPI. Chromosome segregation was assessed in anaphase cells exhibiting a mitotic spindle $\geq 6 \mu\text{m}$ in length ($n \geq 100$). CUT phenotype (chromosome severing by the septum) was assessed by staining DNA with Hoechst 3342 and the septum by calcofluor ($n \geq 100$). Shown are averages \pm SDs from biological triplicates. **B.** Total RNA extracted from cells grown at 36°C was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and the cDNA quantified by qPCR. Shown are the averages \pm SDs measured from biological triplicates. **C.** Venn diagram of 3-extended RNA detected by strand specific RNA-seq in indicated strains. **D.** RNAseq profiles of the *hsp9* gene showing the suppressive effect of *cdc15-140* on the accumulation of read-through transcripts caused by *cut14-208*. **E.** Increased RNA levels persist in the double mutant *cdc15-140 rrp6 Δ* . Cells were grown at 36°C for 2.5 hours, total RNA was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and cDNA quantified by qPCR. Shown are the averages \pm SDs measured from biological triplicates. **F.** The mutations *cdc12-112* that prevents cytokinesis at the restrictive temperature restored normal RNA levels in a *cut14-208* genetic background. Cells were grown at 36°C for 2.5 hours, total RNA was reverse-transcribed in the presence or absence of RT and cDNA quantified by qPCR. Shown are the averages \pm SDs measured from biological duplicates.

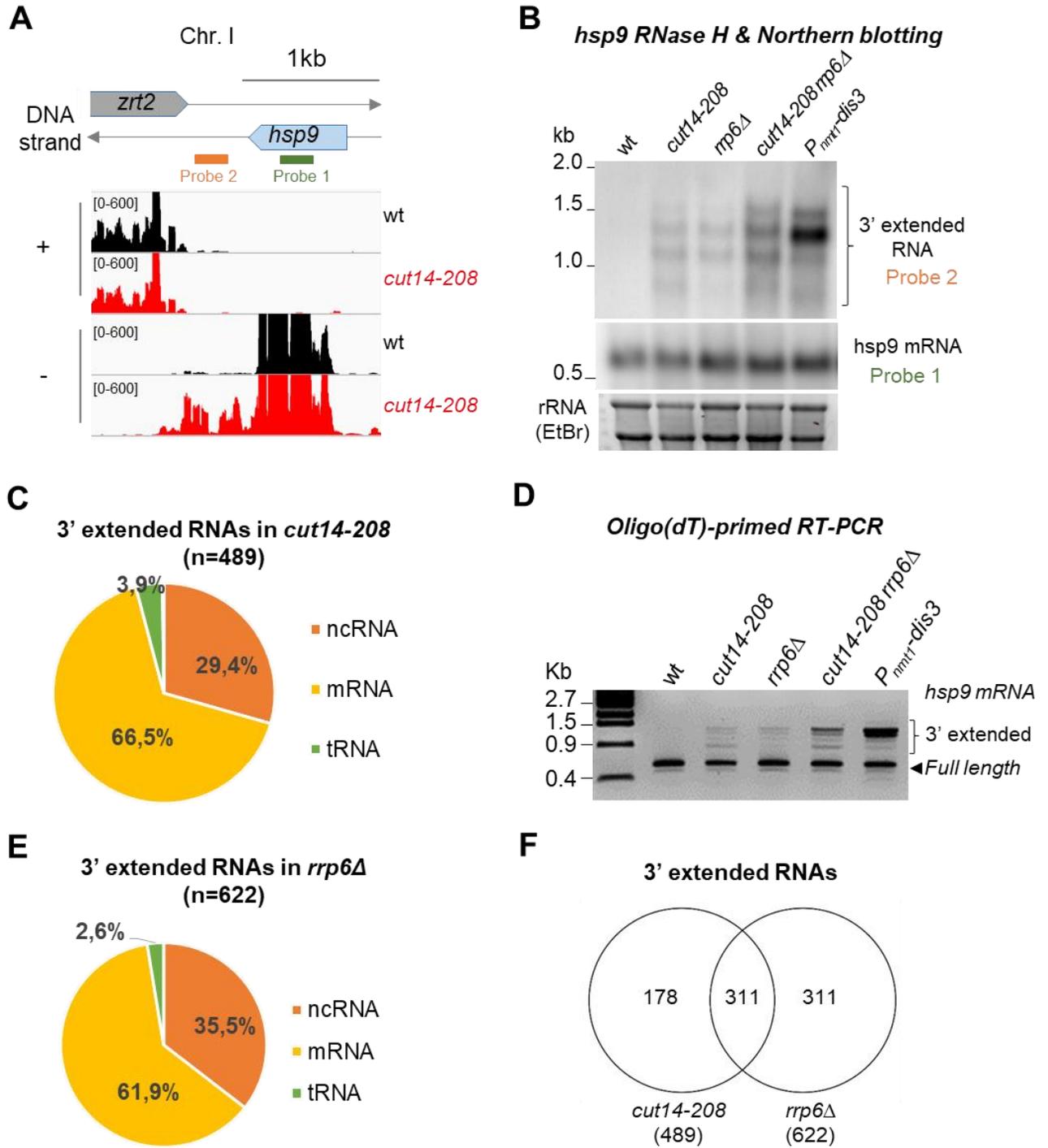
Supplemental Figure S6 – related to Figure 6. Condensin inactivation generates anucleolate daughter cells in fission yeast, which are depleted of the RNases Rrp6 and Dis3 and accumulate unstable RNA

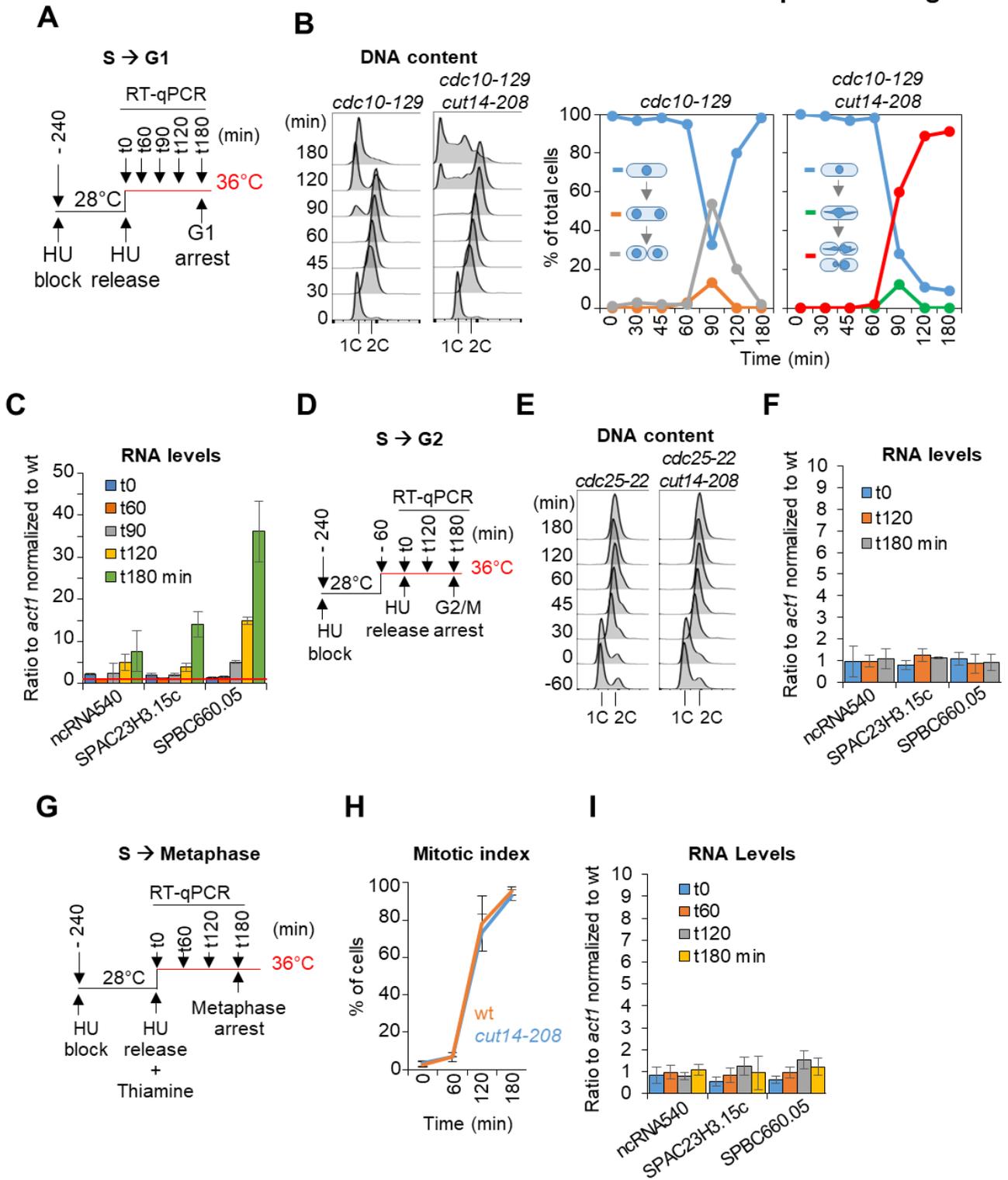
A. *cut14-208* mutant cells accumulate DNA damage that can be suppressed by *cdc15-140*. Cells expressing Rad22-GFP were grown at 36°C for 2.5 hours, fixed and stained with DAPI. Cells exhibiting at least one Rad22-GFP focus were scored. Shown are the averages \pm SDs calculated from biological triplicates with more than 100 cells per experiment. **B.** DNA damage does not increase RNA levels as

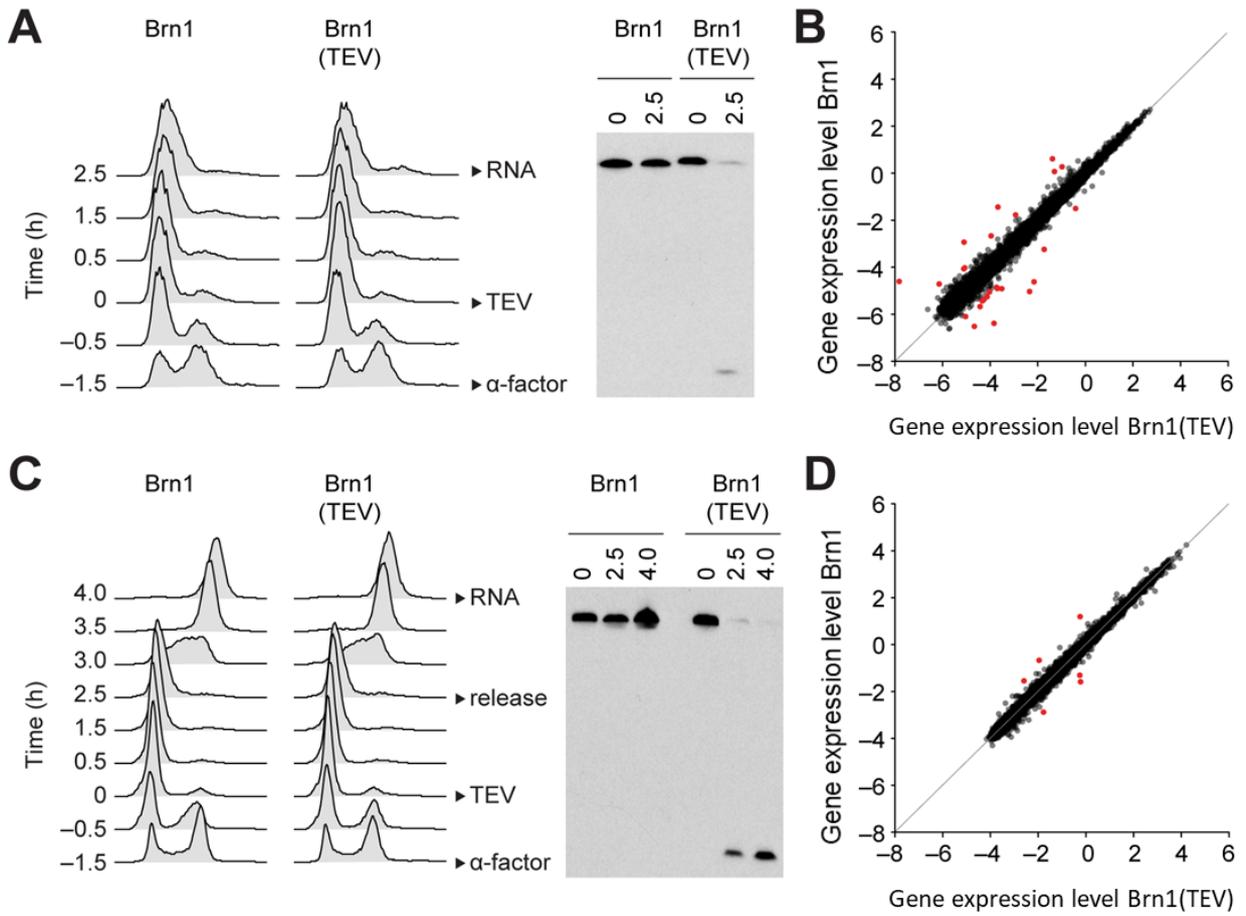
cut14-208. Cells expressing Rad22-GFP were synchronised in prometaphase by the *nda3-KM311* mutation and released in mitosis in the presence of Camptothecin (CPT), or its vehicle DMSO, to induce DNA damage upon mitotic exit. Asynchronously growing cells expressing Rad22-GFP were treated with zeocin to induce DNA double-strand breaks. The prevalence of DNA damage was measured by scoring Rad22-GFP foci. RNA levels in cells experiencing DNA damage were assessed by RT-qPCR. Shown are averages \pm SDs calculated from biological triplicates. **C.** The *cdc15-140* mutation prevents the production of anucleolate cells in a *cut14-208* genetic background. Cells expressing Gar2-GFP were grown at 36°C for 2.5 hours, fixed and stained with DAPI to score the percentage of anucleolate cells. Shown are the averages \pm SDs calculated from biological triplicates with more than 100 cells per experiment. **D.** Dis3 is enriched in the nucleolus and segregates asymmetrically in *cut14-208* mutant cells (arrow). Indicated cells were grown at 36°C, fixed with ethanol and processed for immunofluorescence against Dis3-HA. DNA was stained with DAPI. Right panel shows the ratio of Dis3-HA signals measured within daughter nuclei in septated cells. *** indicates that the difference is statistically significant with $p < 0.001$ by the Chi-square test.

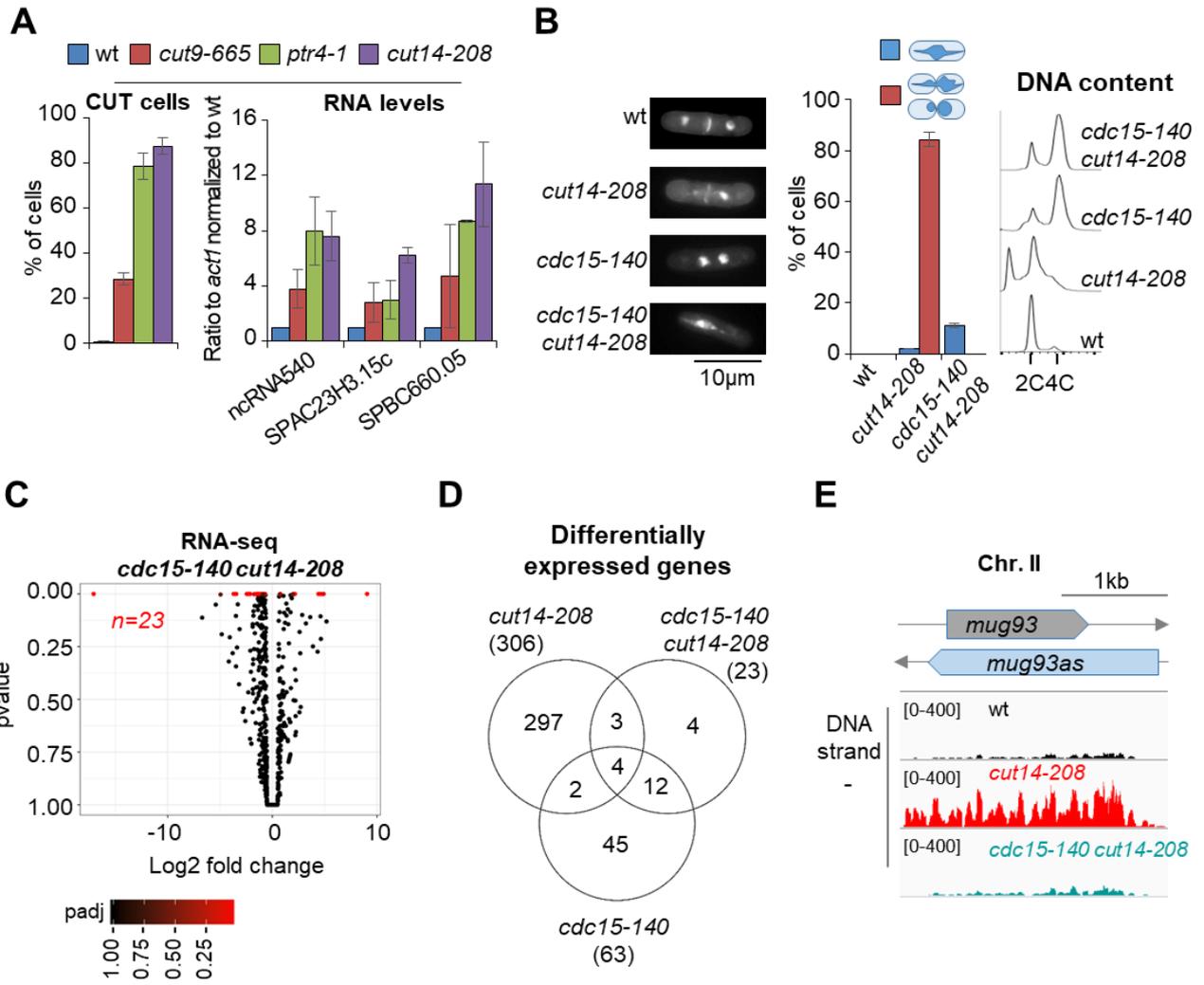
Hocquet Fig. 1

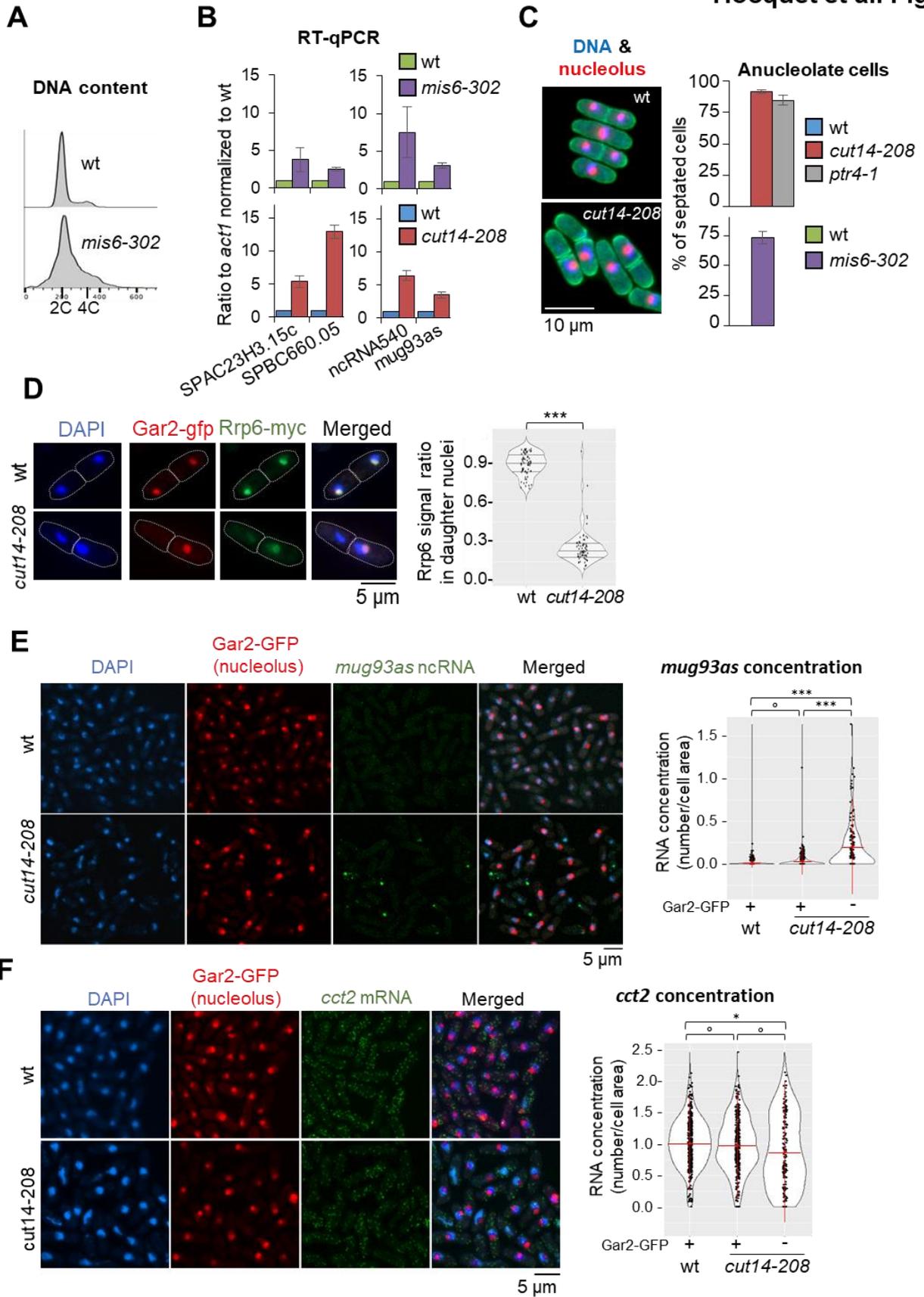


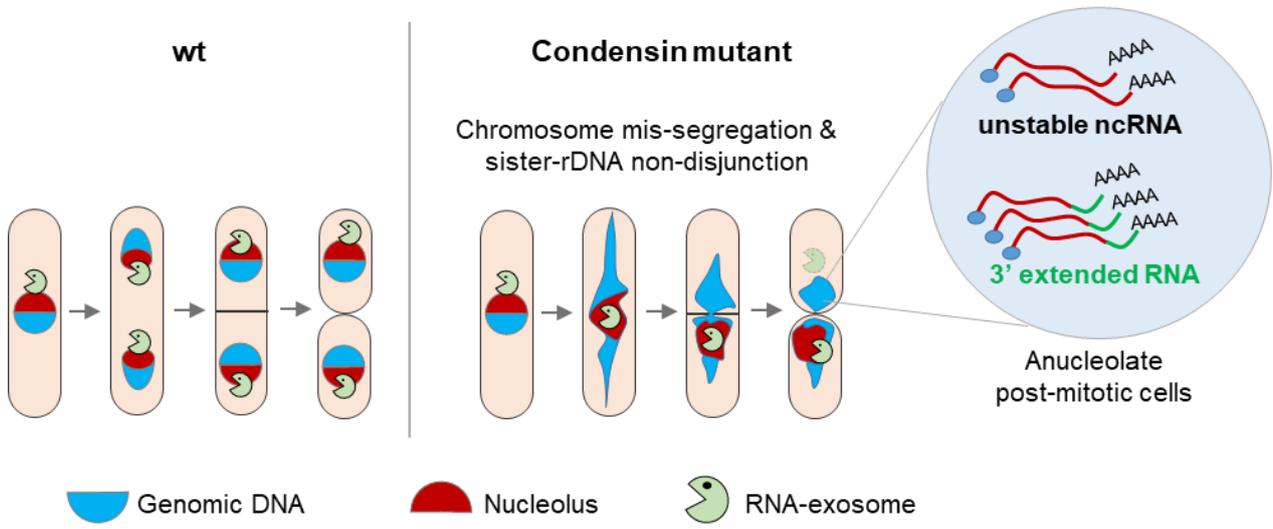


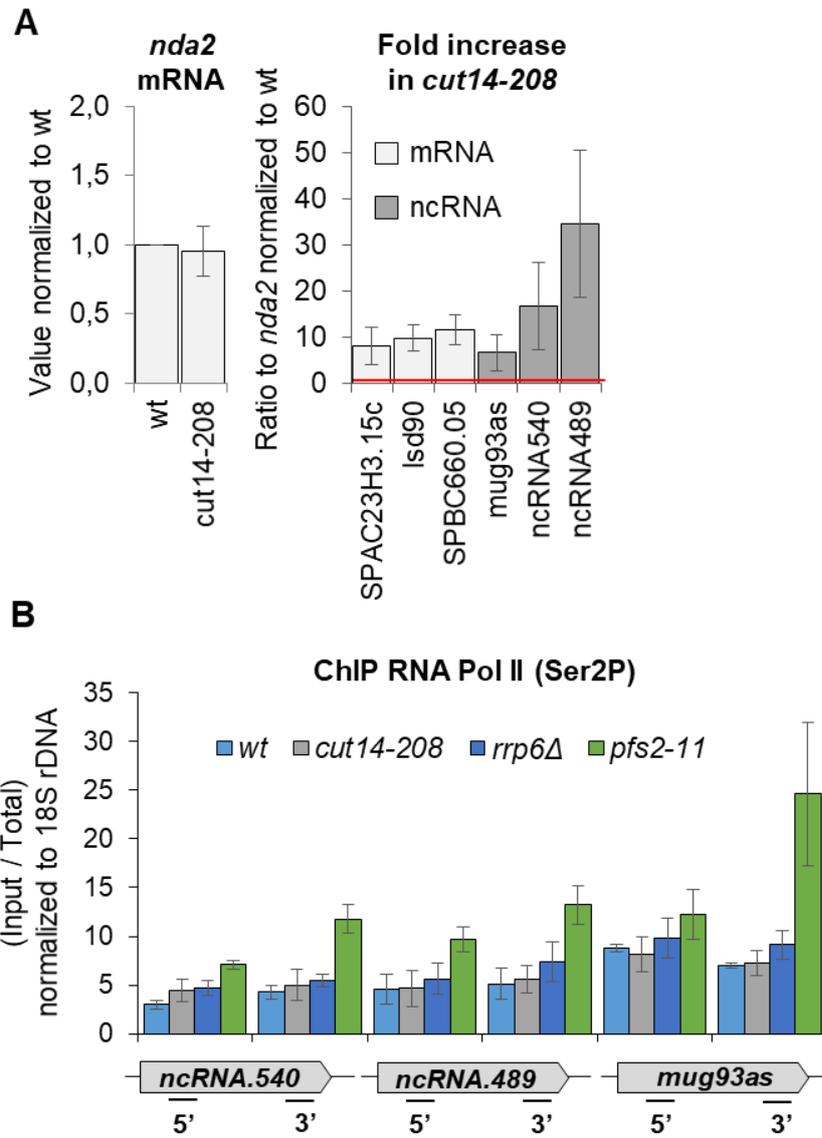


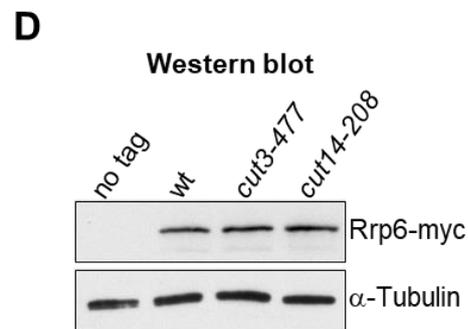
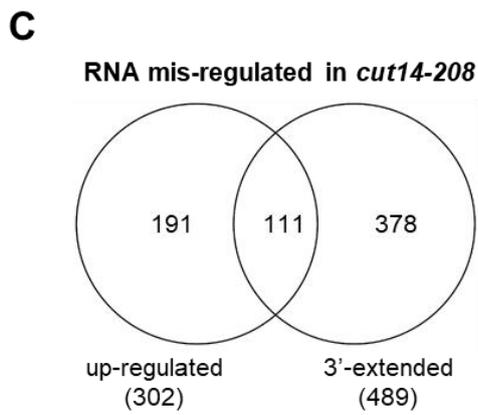
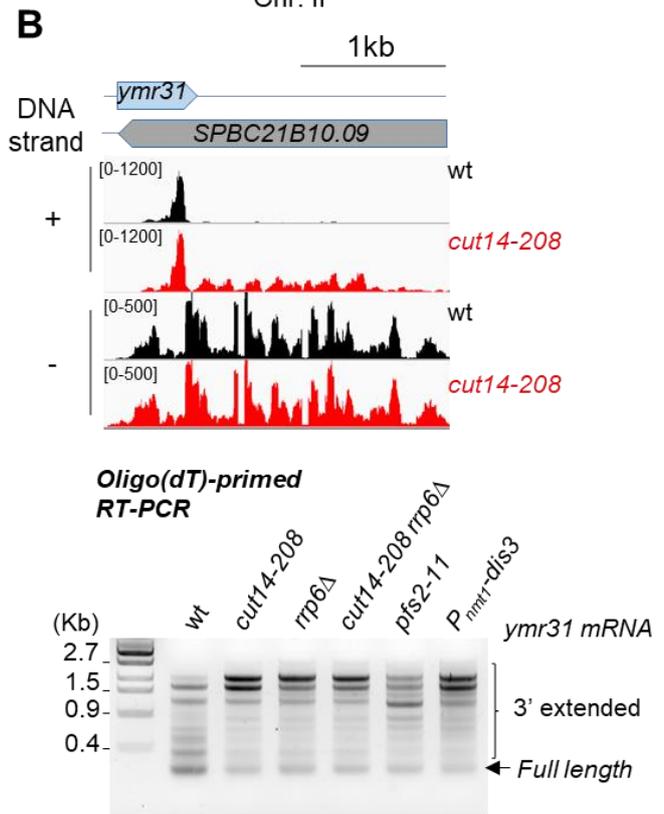
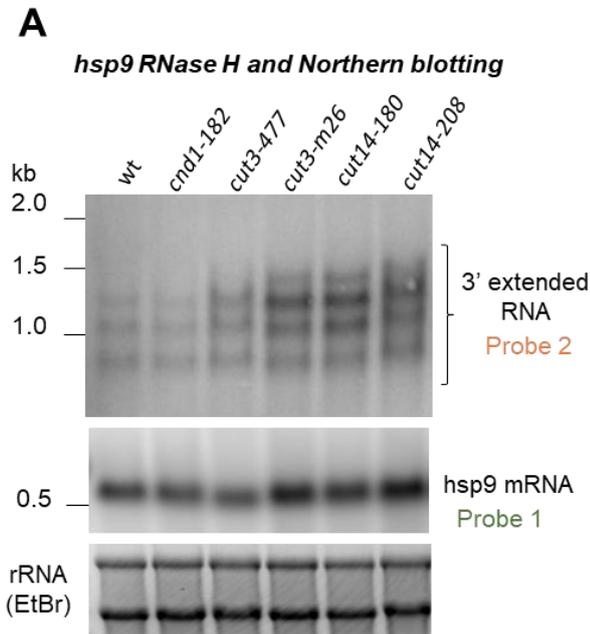


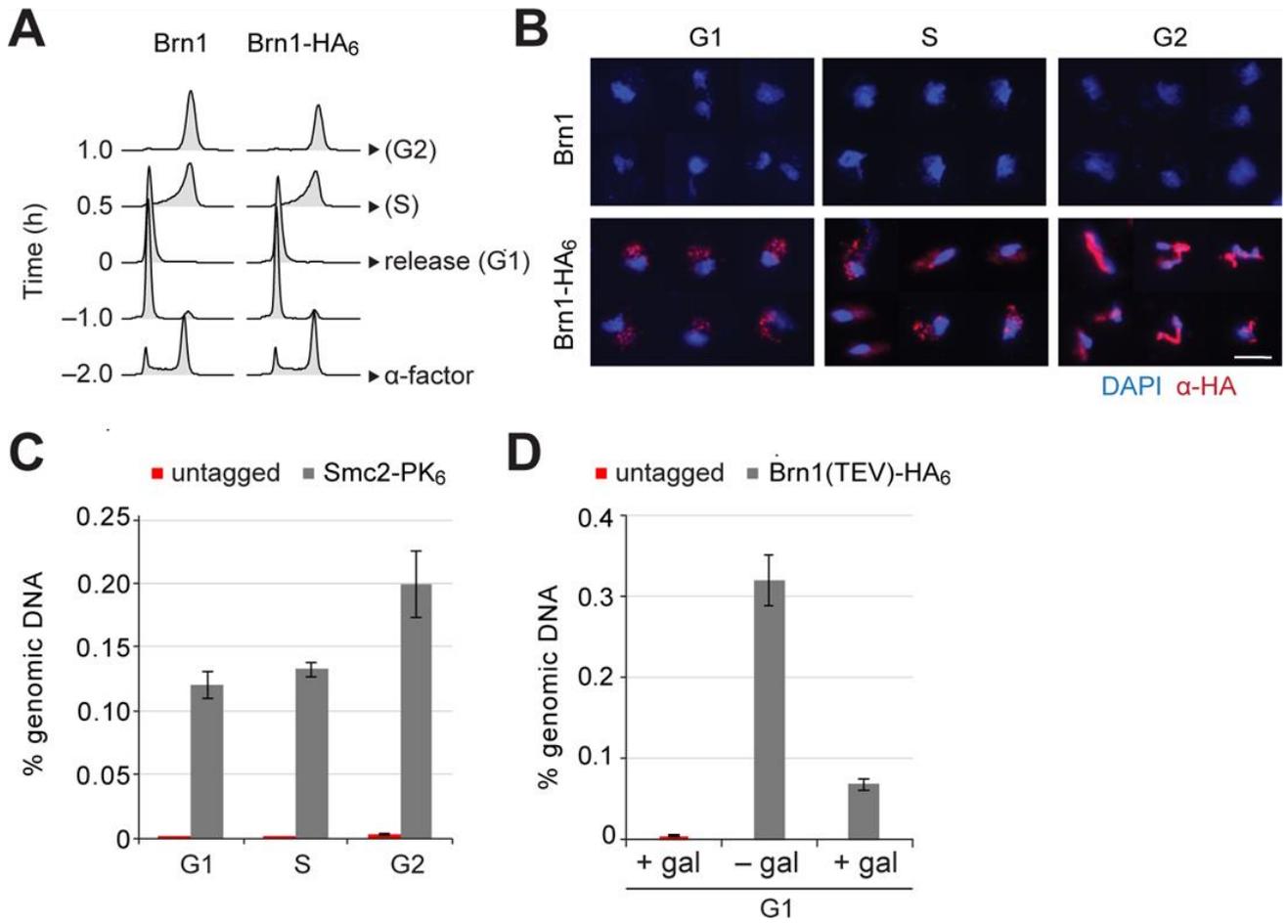


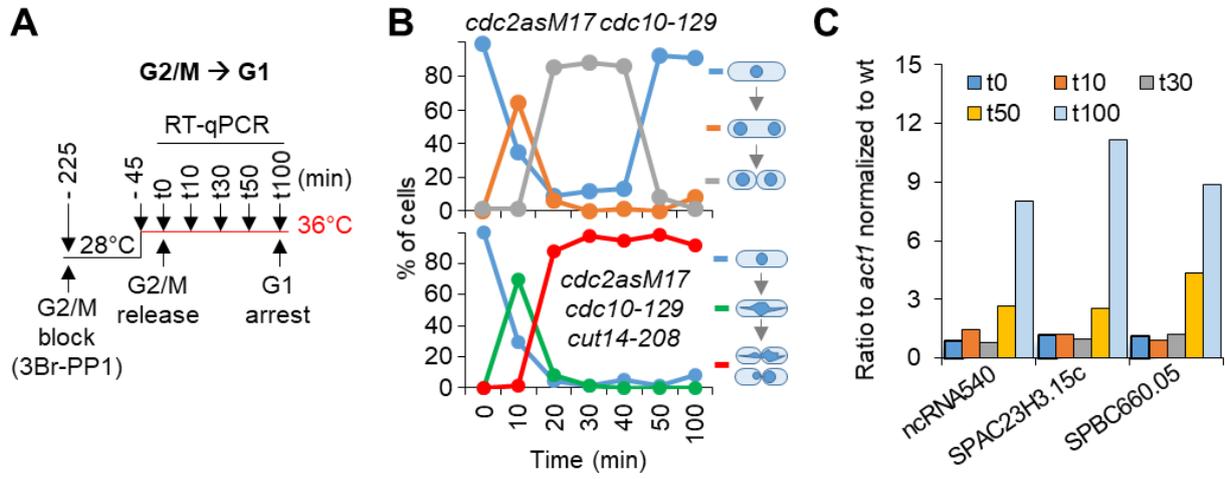




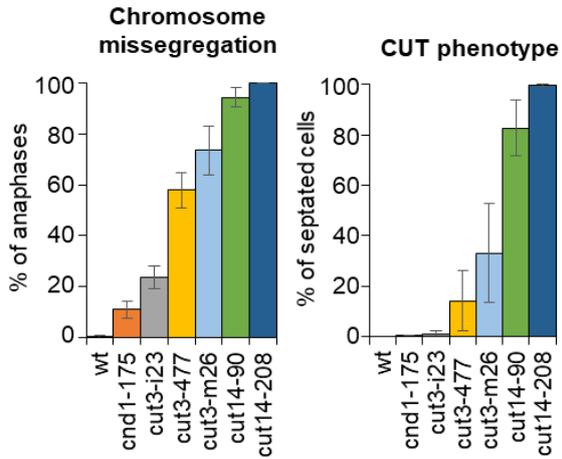




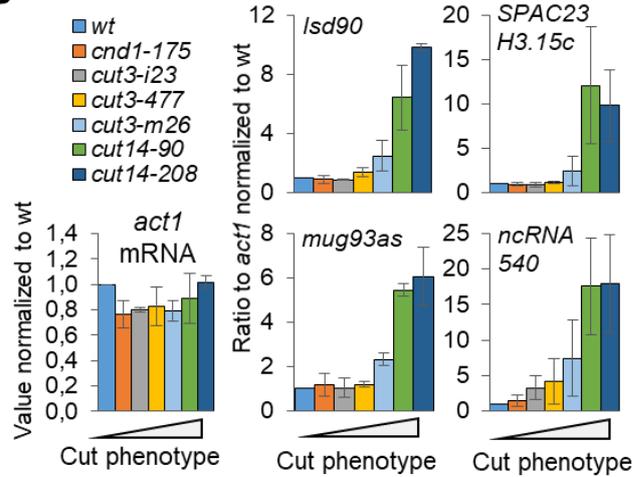




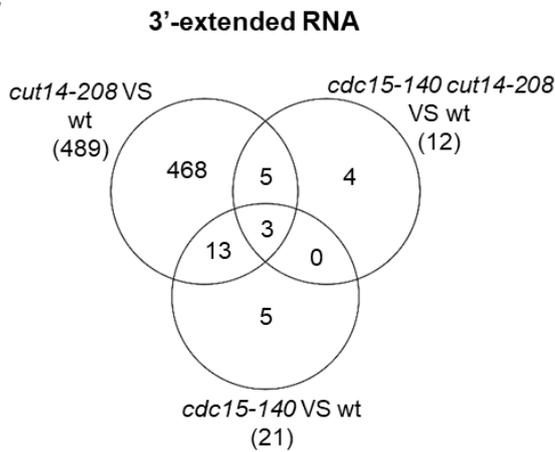
A



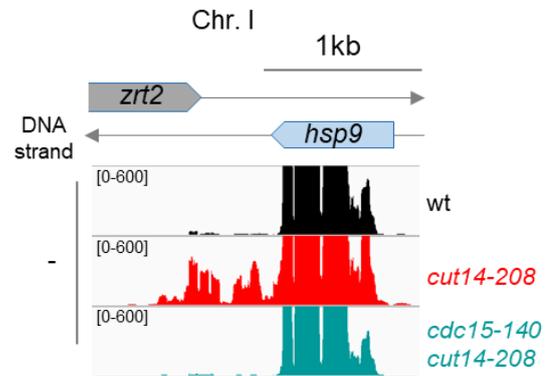
B



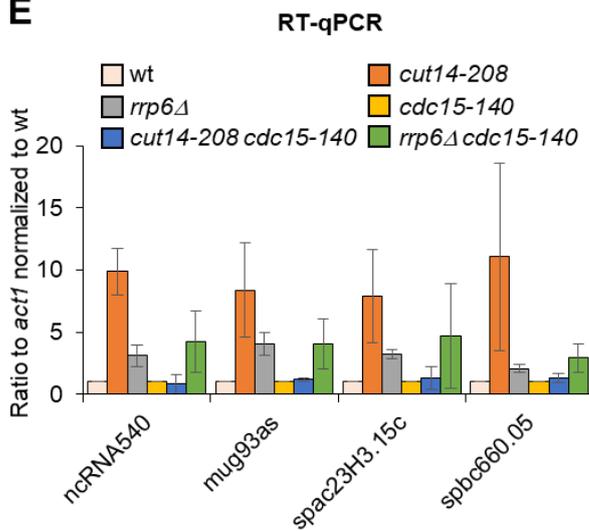
C



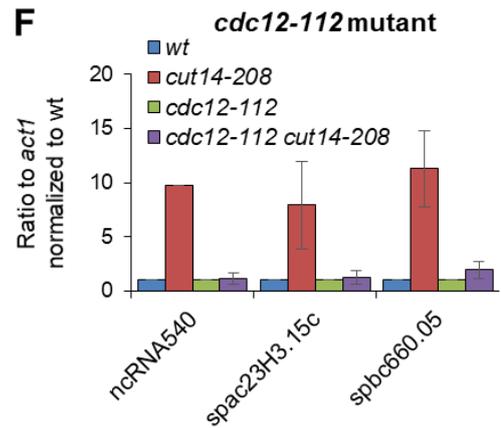
D



E



F



Supplemental Table S1. RNA levels of RNA-exosome and TRAMP components in *cut14-208* mutant cells

Protein	Systematic gene name	Protein Complex	<i>cut14-208</i> vs wt	
			P value adj	Log2FC
Rrp6	SPAC1F3.01	RNA-exosome	1	-0,24371
Dis3	SPBC26H8.10	RNA-exosome	1	-0,13197
Rrp41	SPAC3G9.10c	RNA-exosome	1	-0,23751
Rrp43	SPBC17D1.03c	RNA-exosome	1	-0,10895
Cti1/Rrp47	SPCC1739.07	RNA-exosome	1	0,00185
Csl4	SPCC1840.11	RNA-exosome	1	-0,13319
Rrp4	SPAC2F7.14c	RNA-exosome	1	-0,18844
Rrp40	SPAC22A12.12c	RNA-exosome	1	0,02820
Rrp46	SPBC115.01c	RNA-exosome	1	-0,16979
Mtr3	SPBC211.08c	RNA-exosome	1	0,03692
Rrp42	SPBC16G5.10	RNA-exosome	1	-0,01230
Rrp45	SPCC757.08	RNA-exosome	1	-0,09132
cid14	SPAC12G12.13c	TRAMP	1	-0,17385
Air1	SPBP35G2.08c	TRAMP	1	-0,32050
Mtr4	SPAC6F12.16c	TRAMP	1	-0,02359
RNA helicase	SPAC17H9.02	TRAMP	1	-0,22135

Supplemental Table S2. Yeast strains used in this study

* fission yeast strains (LY); leu- : leu1-32 ; ura- : ura4D18 or DS/E ; ade- : ade6-210 or -216 ; lys- : lys1-131 ; his- : his3D1

Figure	strain number		Genotype*	Origin
Fig. 1, 2	LY113	h-	leu- ura- ade-	our stock
	LY140	h-	leu- ura- leu- ura- cut14-208	our stock
Fig. 3	LY979	h-	ade- rrp6Δ::KanR	Jean-Paul Javerzat
	LY2403	h-	leu- ura- leu- ura- cut14-208 rrp6Δ::KanR	this study
	LY3966	h-	ade- his- P81nmt1-dis3::KanR	François Bachand
	LY1238	h-	leu- ura- cdc10-129	YGRC
	LY4675	h+	ura- cdc10-129 cut14-208	this study
	LY4476	h-	leu- ura- cdc25-22 cdc13-GFP-LEU2	this study
	LY4478	h-	leu- ura- cdc25-22 cdc13-GFP-LEU2 cut14-208	this study
	LY4067	h-	leu- ade- leu- ade- P41nmt1-slp1::KanR cn2-GFP-LEU2	this study (slp1 from C. Haering)
	LY4070	h-	his- cut14-208 brn1::HIS3 ura3::BRN1-HA6::URA3 pGAL-NLS-myc9-TEVprotease- NLS2::TRP1	this study
	Fig. 4	C2335	MAT _a	leu- brn1::HIS3 ura3::BRN1(3xTEV622)- HA6::URA3 trp1::pGAL-NLS-myc9- TEVprotease-NLS2::TRP1
C2455		MAT _a	leu- bar1::LEU2 brn1::HIS3 ura3::BRN1- HA6::URA3 pGAL-NLS-myc9- TEVprotease-NLS2::TRP1	our stock
C3138		MAT _a	leu- bar1::LEU2 brn1::HIS3 ura3::BRN1(3xTEV622)-HA6::URA3 pGAL-NLS-myc9-TEVprotease- NLS2::TRP1	this study
C3139		MAT _a	leu- ura- ade- NLS2::TRP1	this study
Fig. 5	LY113	h-	leu- ura- ade-	our stock
	LY140	h-	leu- ura- cut14-208	our stock
	LY4669	h+	leu- ura- cdc15-140	this study
	LY4672	h-	leu- ura- cdc15-140 cut14-208	this study
	LY4632	h-	leu- cut9-665	YGRC
	LY4699	h-	leu- ptr4-1	YGRC
Fig. 6	LY113	h-	leu- ura- ade-	our stock
	LY140	h-	leu- ura- cut14-208	our stock
	LY4706	h-	leu- ura- mis6-302	YGRC
	LY4924	h+	leu- ura- gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP- Psy1	this study (gar2-mcherry YGRC)
	LY4925	h-	leu- ura- gar2-mcherry ade6<<GFP-Psy1 cut14-208	this study (gar2-mcherry YGRC)
	LY5001	h+	leu- ura- gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP- Psy1 ptr4-1	this study (gar2-mcherry YGRC)
	LY5248	h-	leu- ura- gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP- Psy1 mis6-302	this study (gar2-mcherry YGRC)
	LY5332	h-	leu- ura- ade- rrp6-13-MYC:HygroR gar2- GFP::KanR nda3-KM-311	this study
	LY5334	h-	leu- ura- ade- rrp6-13-MYC:HygroR gar2- GFP::KanR cut14-208 nda3-KM-311	this study

	LY4021	h+	leu- ura- ade-	rrp6-13-MYC:HygroR rrp6-13-MYC:HygroR nda3-KM-311	this study
	LY4026	h+	leu- ura-	cut14-208	this study
	LY5404	h+	leu- ura-	gar2-GFP:KanR	this study
	LY5405	h-	leu- ura- leu- ura-	gar2-GFP:KanR cut14-208	this study
Fig. S1	LY113	h-	ade-		our stock
	LY140	h-	leu- ura- leu- ura-	cut14-208	our stock
	LY979	h-	ade-	rrp6Δ::KanR	Jean-Paul Javerzat
	LY1155	h-		pfs2-11	Chris Norbury
Fig. S2	LY113	h-	leu- ura- ade- leu- ura-		our stock
	LY1266	h-	ade-	cnd1-182	our stock
	LY1069	h-	leu- ura-	cut3-477	our stock
	LY3185	h-	leu- ura- leu- ura-	cut3-m26	Christian Haering
	LY1252	h-	ade-	cut14-180	our stock
	LY140	h-	leu- ura- leu- ura-	cut14-208	our stock
	LY979	h-	ade-	rrp6Δ::KanR	Jean-Paul Javerzat
	LY2403	h-	leu- ura-	cut14-208 rrp6Δ::KanR	this study
	LY1155	h-		pfs2-11	Chris Norbury
	LY3966	h-	leu- ura- ade- his- leu- ura-	P81nmt1-dis3:KanR	François Bachand
	LY4021	h+	ade- leu- ura-	rrp6-13-MYC:HygroR	this study
	LY4025	h+	ade-	rrp6-13-MYC:HygroR cut3-477 rrp6-13-MYC:HygroR nda3-KM-311	this study
	LY4026	h+	leu- ura- leu- ura-	cut14-208	this study
Fig. S3	C1	MAT _a	his- trp- leu- ura-	wild-type pGAL-NLS-myc9-TEVprotease-	Kim Nasmyth
	C1039	MAT _a	his- leu- ura-	NLS2::TRP1	Kim Nasmyth
	C1584	MAT _a	trp- leu- ura-	BRN1-HA6::HIS3	Kim Nasmyth
	C1597	MAT _a	his- trp-	SMC2-PK6::KanR brn1::HIS3 ura3::BRN1(3xTEV622)- HA6::URA3 trp1::pGAL-NLS-myc9- TEVprotease-NLS2::TRP1	Kim Nasmyth
Fig. S4	C2455	MAT _a	leu-		our stock
	LY4764	h-	leu- ura-	cdc2-as-M17 cdc10-129	this study
	LY4766	h-	leu- ura- leu- ura-	cdc2-as-M17 cdc10-129 cut14-208	this study
Fig. S5	LY113	h-	ade-		our stock
	LY1069	h-	leu- ura-	cut3-477	our stock
	LY3185	h-	leu- ura- leu- ura-	cut3-m26	Christian Haering
	LY1261	h+	ade-	cnd1-175	our stock
	LY3186	h-	leu- ura- leu- ura-	cut3-i23	Christian Haering
	LY725	h-	ade-	cut14-90	our stock
	LY140	h-	leu- ura-	cut14-208	our stock
	LY4669	h+	leu- ura-	cdc15-140	this study
	LY4672	h-	leu- ura- leu- ura-	cdc15-140 cut14-208	this study
	LY979	h-	ade- leu- ura-	rrp6Δ::KanR	Jean-Paul Javerzat
	LY5222	h-	ade-	rrp6Δ::KanR cdc15-140	this study

			leu- ura-		
	LY4727	h+	ade-	cdc12-112	this study
	LY4857	h-	leu- ura-	cdc12-112 cut14-208	this study
Fig. S6	LY4944	h+	leu- ura-	rad22-GFP	our stock
	LY4949		leu- ura-	rad22-GFP cut14-208	this study
	LY4951		leu- ura-	rad22-GFP cdc15-140	this study
	LY4953		leu- ura-	rad22-GFP cdc15-140 cut14-208	this study
	LY5118	h-	leu- ura-	rad22-GFP nda3-KM-311	this study
	LY4924	h+	leu- ura-	gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP-Psy1	this study (gar2-mcherry YGRC)
	LY4925	h-	leu- ura-	gar2-mcherry ade6<<GFP-Psy1 cut14-208	this study (gar2-mcherry YGRC)
	LY5003	h+	leu- ura-	cdc15-140 gar2-mcherry ade6<<GFP-Psy1	this study
	LY5023	h+	leu- ura-	cdc15-140 cut14-208	this study
	LY2266	h-	ura-	dis3-HA:KanR	Jean-Paul Javerzat
	LY2859	h-	ura-	dis3-HA:KanR cut14-208	this study

Appendix Tables S3 : Primers and RNA-FISH probes used in this study

primer	Left	Right	experiment
ncRNA.540 5'	TTGCAGTAATGCTCACGGTAG	GTTGTGAAAACCTCTCCGTCTCC	ChIP, RT-qPCR
ncRNA.540 3'	GAGAAAAGATGGGGAAACTGC	GAAGACGGCAGAATGGAAAG	ChIP
ncRNA.489 5'	TTTATCTGGATGGGGTTTATCG	GTGACTCGTATGCCAGAAGAAG	ChIP
ncRNA.489 3'	GCCTTTTGTTCCTTCTATGC	TGCTTGTATGTTTCGGCCTAC	ChIP, RT-qPCR
mug93as 5'	AACGGCAGTATTGGTGTGC	CGGATACACCAAGCAATGAAG	ChIP, RT-qPCR
mug93as 3'	TCCACCAAGTTTACGTTCTCC	TCCACCAAGTTTACGTTCTCC	ChIP
act1	GAATGGATCCACCAATCCAG	CCGATCGTATGCAAAAGGAG	RT-qPCR
nda2	GCGTCCAACCTATGAAAACC	CCAGCAAATCGAAGAGAAGC	RT-qPCR
lsd90	TTCTTCGGATAGCGACAAGG	ATACCAAGGCATGACGAAC	RT-qPCR
spac23h3.15c	GTTACAGCGGTGAGGGATATG	TGCAGTTGTACGAGCATTACG	RT-qPCR
spbc660.05	TCCAGGCTTGCATATTCCTC	AAGAACACTGCCGGCTAAAG	RT-qPCR
rDNA	TTTCTGCCTTTTTCGGTGAC	TGGCATGGATTTCCCTTTAG	qPCR
cct2_1	TTGGATGCCACTTTTCGTTAA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_2	GAAAGACGGGCATTTTCACC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_3	CAGCAATTGCACCCACAAAC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_4	AGTGCTTTTACCAAATCGC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_5	AATTTTGTCCATTCCCTTAG	n.a.	smRNA-FISH
cct2_6	GTCACAACAATATCACCCGA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_7	AAGAATGGTAGCACCGTCAT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_8	GCTGCATTATCCAAAGCTAT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_9	CCAACCTCATCATCTTGGAC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_10	GACACACACACTGGTAGTAC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_11	GACGAAGAAGTTCAGCAGCG	n.a.	smRNA-FISH
cct2_12	GCATTGACCATAATTTCTGC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_13	CGAAGAGCATCGATAGCAGT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_14	TATTCTCGAGGTCACTACGA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_15	GAAGACAGAGTAGTTCTGGC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_16	CCAGCTGAGCAAAATGGTTT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_17	CAAGCGAAGCACTGCATCAA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_18	TGTTATCCAAGTTCGTGCTA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_19	GTTTACCACCAAGGATCTTA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_20	AATCCCTCATCAAGGAAGGA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_21	CTTTGGGACAGTTAACACCA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_22	CCATAGCCGTATTAGCAATT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_23	CCTAGCACCAAAAACCTTC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_24	GTTCAAGTTCGGCAAGCTTG	n.a.	smRNA-FISH
cct2_25	ACTTTAGCCTTCATTTTCTC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_26	GCTCTGGCCAATTGTAAATG	n.a.	smRNA-FISH
cct2_27	AATACCAGCGTCAGCGAACA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_28	AGTCTGCATGTTCAATGGAC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_29	CAAAGACAGCCGCTCAATTC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_30	TTGAAGCAATTTACCACCA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_31	TGACAAGTTCAGGATGGTCA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_32	TTCACCGATAATGATCTCCT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_33	GGCTTCAACGCCAGAAAAC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_34	AAACAATGGTGCAGGCTTCT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_35	TAAGTATGAGTGGCACCAC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_36	TCATGAATGGCTCGTTCAGA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_37	CAGCGACTGTTGGGAAAGA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_38	TCCTCCTAAAGTGAAGTACGAG	n.a.	smRNA-FISH
cct2_39	CCATTAGCATTTTACGACAA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_40	CAGAAACAGCAACTGCCTTC	n.a.	smRNA-FISH

cct2_41	GTCAAAGCCAGCATTATCAG	n.a.	smRNA-FISH
cct2_42	AACTGAGCTACTAGCTCACT	n.a.	smRNA-FISH
cct2_43	GTTGCCATCATAATGAGCTG	n.a.	smRNA-FISH
cct2_44	CCATATCAAGACCCATTGTA	n.a.	smRNA-FISH
cct2_45	ATATCAGCAATCTCTCCTTC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_46	TTCAATGCCTCGAGTATACC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_47	AAGTTGAGCACCTTCAGATC	n.a.	smRNA-FISH
cct2_48	GGTGCAGCCTTTAATATAGT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_1	TTTATCGGTATGGCAAGGTT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_2	GCAACCTTTTCTCATAATC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_3	ACAGATACACAGCCAACGTG	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_4	TGCCATGAATCGCATATTCA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_5	AATACTGCCGTTTCTCATAC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_6	AGACAGTTTTGTGTTGCACA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_7	TACACAAGTATTGTCCGTC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_8	ATGAAGACAGTCATCGACCC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_9	TGTTTGCCATTTTGTACC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_10	AACCTCTATTTTCAGTGCT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_11	AGGCATTAATAACCGTGTGT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_12	CCATCGATGCAATCATTGG	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_13	GTATGTTAAGTCAGTCCAGA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_14	TCCAATCAATTGCTACACA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_15	GGCATGTTTCCAAAAACCC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_16	GCAGCTCAAATTCTTTTGA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_17	TTCAGTTTTGTCGTGCAACA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_18	CAAGCAATGGTCCGACAAGG	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_19	TCGGATTGTGTTCAAGGTTT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_20	ATGGAATGTCGGTTGAGCAG	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_21	TTTCATTTCTATTTCCACA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_22	CCCCTGTTGTACATTGAAA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_23	GTACAGATCCAATTACCCAT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_24	AGAACACTCTCTATTGGTCC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_25	AGCTCGGAGGACGAATTAGA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_26	GATACCGAAAATCACTCGCC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_27	TTTCAGCAATGCGGTCTATG	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_28	TGTGGACAGCAATGCGAACT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_29	AAGTGCACGACAATTGCCAA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_30	AATTCGTGGCAAGATCTGGT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_31	GCAATTACCTGTAGGATTGC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_32	AGACACCTTAGAGTTGCTTC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_33	ATGTGCAGAAACATGGCAGT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_34	TCACTTGAACCTGGACCCAAA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_35	ACTTAGCCAATCGTGATTGG	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_36	TATTTGCGACTTGGACATCC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_37	GTGATATGGAGGAGAGGACT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_38	CTCTAGTCATCAATCCGTAT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_39	ACTTATTTTGCATGCAGCTA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_40	AACATCGTCTGAACCTTTGC	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_41	AGGTTTCAGAGAATCCTTTGG	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_42	CTCATTAACCTATTGCGCA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_43	AACACCATTACACCGGTTTA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_44	TGTAACGTTTCTAACCTCA	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_45	CACTAGAGGTATGCTCTACT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_46	CCATCTGATTTGAACCATCT	n.a.	smRNA-FISH
mug93as_47	TCCAATATTGTTCTACCACA	n.a.	smRNA-FISH

mug93as_48	CACATGGTTATGATATGCCT	n.a.	smRNA-FISH
------------	----------------------	------	------------

n.a. : not applicable

Supplemental Table S4. Antibodies used in this study

Application	Antibody
IF - α tubulin	mouse monoclonal Tat1, Keith Gull
IF Rrp6-MYC	mouse monoclonal #9E10 Thermo Fisher
IF Dis3-HA	mouse monoclonal #12CA5 Sigma-Aldrich
IF Gar2-GFP	rabbit polyclonal #A11122, Life Technologies
ChIP RNA Pol II (ser2P)	rabbit polyclonal #ab5095 ChIP-grade, abcam
ChIP anti-HA	Monoclonal 16B12 (anti-HA.11, Covance)
ChIP anti-PK	Monoclonal anti-PK (V5) Abd Serotec MCA1360
Chromosome spreads anti-Brn1-HA ₆	Monoclonal 16B12 (anti-HA.11, Covance)

Table S5. Microarray analysis G1-arrested cells

id	tx_ID	seqName	strand	first	last	last type	name	mappedType	source	Brm1_repea t01	Brm1_repea t02	Brm1_repea t03	Brm1(TEV)_ repeat01	Brm1(TEV)_ repeat02	Brm1(TEV)_ repeat03	average Brm1	average Brm1(TEV)	logRatio
5902	ST5902		-	248597	249757	ORF-T	YLR054C	bothEndsMapped	Manual	-3.48117	-2.59869	-2.09485	-5.08599	-5.09483	-5.04824	-2.34677	-5.04154	-2.69477
4501	ST4501		-	52349	52485	CUTs	CUT544	mapped3	Automatic	-4.43256	-3.21128	-4.46924	-5.30533	-7.65787	-5.12852	-3.84026	-6.93919	-2.55293
151	ST0151		+	407335	410687	ORF-T	YBR083W	bothEndsMapped	Manual	0.16666	0.53404	-4.84896	-0.51932	-4.52882	-4.72394	-2.15746	-4.62638	-2.46892
2138	ST2138		+	105401	105545	CUTs	CUT247	mapped3	Automatic	-5.83515	-5.87913	-3.45310	-6.19907	-8.21444	-4.83796	-4.66612	-6.52620	-1.86008
6627	ST6627		-	777520	779200	ORF-T	YNR074C	bothEndsMapped	Manual	-3.08368	-2.43884	-1.02514	-1.83930	-2.45676	-4.04674	-1.73199	-3.25175	-1.51976
3450	ST3450		+	404243	404419	SUTs	SUT407	bothEndsMapped	Manual	-5.54183	-3.48487	-3.54037	-3.15808	-5.31097	-4.52692	-3.51262	-4.91895	-1.40633
5202	ST5202		-	386606	386734	CUTs	CUT651	mapped3	Automatic	-5.29801	-4.13431	-4.71461	-6.09072	-5.04489	-6.31474	-4.42446	-5.67981	-1.25535
5197	ST5197		-	378126	379886	ORF-T	YHR139C	bothEndsMapped	Manual	-5.14519	-3.55026	-3.84973	-4.74112	-4.43079	-5.39266	-3.70000	-4.91173	-1.21173
2492	ST2492		+	239025	239225	CUTs	CUT290	mapped3	Automatic	-5.31997	-3.11358	-5.14433	-6.00678	-5.04016	-5.48125	-4.12896	-5.26070	-1.13175
60	ST0060		+	88041	88393	other	snR56	bothEndsMapped	Manual	-4.47023	-3.18247	-4.27987	-4.60533	-4.54478	-5.16834	-3.73117	-4.85656	-1.12539
3110	ST3110		+	408138	408218	SUTs	SUT363	bothEndsMapped	Manual	-3.46131	-4.57276	-3.95585	-5.75668	-5.93836	-4.82969	-4.26431	-5.38403	-1.11972
6221	ST6221		-	302549	302669	CUTs	CUT765	mapped5	Automatic	-7.02135	-3.68532	-4.98378	-5.93715	-5.60098	-5.29123	-4.33455	-5.44610	-1.11155
5536	ST5536		-	471068	471820	ORF-T	YJR025C	bothEndsMapped	Manual	-1.24334	-0.35086	-0.47191	-2.76667	-1.39686	-1.60625	-0.41139	-1.50156	-1.09017
3983	ST3983		-	178254	178478	CUTs	CUT466	mapped5	Automatic	-3.98834	-5.01892	-5.04601	-6.06312	-6.05792	-6.15247	-5.03246	-6.10519	-1.07273
579	ST0579		+	791956	792108	CUTs	CUT070	bothEndsMapped	Automatic	-6.16314	-4.48993	-3.56240	-5.02902	-4.95319	-5.15140	-4.02617	-5.05229	-1.02613
3123	ST3123		+	435778	437386	CUTs	CUT376	mapped5	Automatic	-5.25013	-5.27972	-4.93013	-5.01997	-4.09493	-4.04544	-5.10492	-4.07018	1.03474
1643	ST1643		+	281153	281257	SUTs	SUT185	bothEndsMapped	Manual	-4.88930	-5.13821	-4.99639	-4.53378	-4.60989	-3.45173	-5.06730	-4.03081	1.03649
5190	ST5190		-	364917	365365	other	YHR130C, YHR131C	bothEndsMapped	Manual	-3.86027	-3.20706	-2.65851	-4.53919	-1.97958	-1.57231	-2.93278	-1.77595	1.15684
3248	ST3248		+	832339	832579	other	snR8	bothEndsMapped	Manual	-0.47182	-2.33819	0.37779	-1.43998	0.25944	0.27726	-0.98020	0.26835	1.24855
6839	ST6839		+	680566	680998	other	snR36	bothEndsMapped	Manual	-5.54900	-5.29085	-2.63283	-5.40163	-2.54941	-2.79757	-3.96184	-2.67364	1.28820
1954	ST1954		+	158572	159388	ORF-T	YKL156W	bothEndsMapped	Manual	-2.25683	-2.85398	0.25548	-3.69957	0.27613	-0.14455	-1.29925	0.06579	1.36504
2658	ST2658		+	731449	731553	SUTs	SUT313	bothEndsMapped	Manual	-5.65329	-5.83973	-6.45297	-6.03445	-4.64537	-4.79716	-6.14635	-4.72127	1.42508
761	ST0761		+	1401693	1402677	ORF-T	YDR471W	bothEndsMapped	Manual	-0.84753	-3.47101	0.70359	-3.82080	0.60799	0.61579	-1.38371	0.61189	1.99560
3679	ST3679		-	199979	200419	CUTs	CUT442	bothEndsMapped	Automatic	-8.81809	-3.38971	-6.80481	-6.61112	-4.18029	-1.69331	-5.09726	-2.93680	2.16046
6293	ST6293		-	550109	551245	ORF-T	YMR142C	bothEndsMapped	Manual	-4.31482	-3.79717	-3.54892	-1.04337	0.75528	-3.64919	-3.67304	-1.44695	2.22609
1911	ST1911		+	15881	16201	CUTs	CUT224	mapped3	Automatic	-2.37283	-8.27058	-7.37420	-5.44901	-6.21772	-3.00849	-7.82239	-4.61060	3.21179

Table S5. Microarrays analysis nocodazole-arrested cells

id	tx_ID	seqName	strand	first	last	type	name	mappedType	source	Brm1(TEV)_re peat01	Brm1(TEV)_re peat02	average Brm1	average Brm1(TEV)	logRatio	
4413	ST4413		4	-	1319401	1319889	ORF-T	YDR424C	bothEndsMapped	Manual	-0.23110	-0.21460	-0.22285	-1.59131	-1.36846
5671	ST5671		11	-	179104	179464	SUTs	SUT662	bothEndsMapped	Manual	-0.48974	-3.06247	-2.87663	-2.88732	-1.11122
2088	ST2088		11	+	554500	556036	ORF-T	YKR059W	bothEndsMapped	Manual	-0.44989	-0.05571	-0.42022	-1.30806	-1.05527
2970	ST2970		14	+	779124	781267	ORF-T	YNR075W	bothEndsMapped	Manual	-1.97764	-3.21846	-1.58373	-1.54836	1.04969
4957	ST4957		7	-	735287	736026	other	YGR122C-A	bothEndsMapped	Manual	-2.77460	-1.14738	-0.55634	-0.67477	1.28622
6753	ST6753		15	-	407822	408126	other	snR9	bothEndsMapped	Manual	0.95456	-1.43922	0.89781	1.18829	1.43062

Partie IV - Discussion

En plus de leur rôle dans l'organisation et la transmission des chromosomes, de nombreuses études impliquent les Condensines dans des fonctions de contrôle de l'expression génique et de réparation des dommages à l'ADN. Comment expliquer cette polyvalence de fonction ? Il a été proposé que les Condensines canoniques puissent fonctionner de manière similaire aux Cohésines dans le contrôle de l'expression génique, au travers de leur capacité à faire des boucles de chromatine (Downen et al., 2013; Li et al., 2015b). Il a également été proposé que les Condensines répriment la transcription en compactant la chromatine (Rawlings et al., 2011; Swygert et al., 2018). Cependant, malgré un nombre important d'études rapportant des changements d'expression génique après inactivation des Condensines, chez une large gamme d'organismes, le mécanisme d'action des Condensines I et II dans le contrôle de l'expression des gènes est resté vague dans la majeure partie des cas. En particulier, il n'est pas établi si le fonctionnement des Condensines dans la régulation de l'expression des gènes est lié ou non à leurs activités de condensation (organisation) de la chromatine en mitose. Au cours de ma thèse, j'ai tenté de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels Condensine contrôle l'expression génique en utilisant la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* comme organisme modèle. Mon travail s'est basé sur une analyse par transcriptomique de mutants de Condensine, mais également sur la recherche de partenaires physiques de Condensine par protéomique en collaboration avec l'équipe d'André Verdel (IAB-Grenoble). Les résultats que j'ai obtenus, renforcés par ceux de Xavier Robellet post-doctorant dans l'équipe, ainsi que ceux réalisés par nos collaborateurs, Sara Cuylen-Haering et Christian Haering (EMBL-Heidelberg) ainsi que Samuel Marguerat (LMS-Londres), nous permettent aujourd'hui de remettre en question l'idée communément admise que les Condensines jouent un rôle direct dans le contrôle de l'expression génique. De manière cohérente avec les études précédentes nous montrons que la déficience de Condensine impacte le niveau à l'équilibre de certains ARNs. Cependant, nous montrons également que cet effet est principalement la conséquence indirecte d'une mauvaise ségrégation des chromosomes en anaphase. Ces résultats seront discutés ci-dessous. Cette découverte amène également à la réinterprétation des interactions physiques observées entre Condensine et les protéines Rrp6, Dhp1 et Dbp2, qui lient les ARNs. Si Condensine n'agit pas directement dans

le contrôle de l'expression des gènes, quel pourrait bien être le rôle biologique de ces interactions?

Condensine contrôle le niveau des ARNs de manière indirecte chez *S. pombe*

Lors de ma thèse, nous avons réalisé deux expériences de transcriptomique sur des mutants thermosensibles de Condensine, une première par microarray sur les mutants *cut3-477* et *cut14-208* et une seconde par RNA seq sur le mutant *cut14-208* uniquement. L'analyse de chacune de ces expériences de transcriptomique a montré l'accumulation d'ARNs, notamment des ARNs non codants et des ARNs *readthrough*, étendus en 3', après l'inactivation des mutants à température restrictive pendant un cycle cellulaire. D'autres mutants thermosensibles de Condensine (*cut3-m26*, *cut14-90* et *cut14-180*) montrent également ces défauts. Ces données indiquent donc que Condensine prend part au contrôle de l'expression correcte du génome chez *S. pombe*, comme ce qui a été observé chez de nombreux autres organismes depuis *S. cerevisiae* jusque chez l'Homme. Cependant plusieurs éléments indiquent que Condensine assure cette fonction de façon indirecte, en contribuant à la transmission fidèle des chromosomes en anaphase. En effet, bien que les différents mutants de Condensine aient un impact sur l'expression correcte des gènes, il est troublant d'observer une corrélation forte entre la pénétrance d'accumulation de ces ARNs et la pénétrance du défaut de migration des chromosomes révélés par le phénotype CUT (*Cell Untimely Torn*, (Yanagida, 1998)) chez les divers mutants de Condensine analysés. En effet chez *S. pombe*, la cytokinèse se produit malgré la défaillance de séparation des chromosomes en anaphase. En conséquence, les chromosomes encore présents dans l'axe de clivage de la cellule mère au sortir de la mitose, sont coupés par l'anneau contractile d'actine et le septum, ce qui conduit au phénotype CUT. La fréquence du phénotype CUT constitue donc un indicateur indirect de la pénétrance du défaut de séparation des chromosomes en anaphase. De manière encore plus frappante, la corrélation entre la fréquence du phénotype CUT et l'accumulation des ARNs est également vérifiée pour le mutant *cut9-665* du complexe APC (*Anaphase-Promoting Complex*) et le mutant *ptr4-1* de la Séparase. Ces deux mutations perturbent la ségrégation des chromosomes de manière indépendante de Condensine. Ainsi,

plus que l'effet direct d'une déficience de Condensine, c'est le résultat d'une défaillance de migration des chromosomes qui semble induire la dérégulation des ARNs.

Plus précisément encore, nos résultats montrent que c'est la cytokinèse en l'absence d'une migration correcte des chromosomes en mitose qui induit l'accumulation d'ARNs dans le mutant de *cut14-208*. La cytokinèse ou « division cytoplasmique », est l'étape qui aboutit à l'individualisation des cellules filles à la fin de la mitose. En l'absence d'une séparation équitable des chromatides sœurs en mitose, la cytokinèse produit chez *S. pombe* des cellules filles pourvues d'un caryotype aberrant ; aneuploïdes. Nous avons montré que si l'on supprime la division cytoplasmique grâce à la mutation *cdc15-140* dans un fond génétique *cut14-208*, on peut supprimer l'aneuploïdie des cellules filles tout en conservant l'inactivation de Condensine. En d'autres termes, on est alors capable de séparer l'inactivation de Condensine de son effet indirect sur la ploïdie des cellules filles. De manière frappante, on observe alors un quasi retour à la normale du niveau des ARNs, malgré l'inactivation persistante de Condensine par la mutation *cut14-208*. J'ai observé un même effet suppresseur par RT-qPCR quand la cytokinèse est inhibée par deux autres mutations, *cdc12-112* et *sid2-250*, démontrant que c'est bien l'élimination de la cytokinèse, et non un effet spécifique de *cdc15-140*, qui exerce un effet suppresseur phénotypique sur *cut14-208*. Ce résultat suggère que l'aneuploïdie des cellules *cut14-208*, causée par la cytokinèse, est responsable de l'accumulation des ARNs observés par RNA seq. Condensine en elle-même n'a donc pas de rôle direct majeur dans le contrôle du niveau à l'équilibre des ARNs chez *S. pombe*.

De plus, nous avons également observé que si l'on synchronise et inactive le mutant *cut14-208* depuis la phase S (par un bloc HU) jusqu'en fin de phase G2 grâce à la mutation *cdc25-22*, ou jusqu'en métaphase grâce à la construction *P_{nmt1}-slp1*, l'on n'observe aucune accumulation des ARNs rapporteurs malgré l'inactivation de Condensine. Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'effet direct de Condensine dans le contrôle de l'expression génique en interphase. Cependant, seuls des ARNs rapporteurs sélectionnés sur la base des résultats de la transcriptomique de *cut14-208* ont été mesurés par RT-qPCR dans ces expériences de cycle cellulaire. Il est possible que d'autres ARNs, que nous n'avons pas testés en RT-qPCR, voient leurs niveaux changer en interphase. L'idéal serait donc de réaliser une analyse transcriptomique à ces différentes phases du cycle. Le contre-argument est que le double mutant *cut14-208 cdc15-140* qui a été analysé en profondeur par RNA-seq ne montre

quasiment aucun changement du niveau des ARNs (seuls sept ARNs varient), confirmant l'absence d'effet notable de l'inactivation de Condensine sur le niveau à l'équilibre des ARNs, en mitose comme en interphase.

I. Absence de rôle direct majeur pour Condensine (I) dans le contrôle de l'expression des gènes ?

Le fait que nous n'observions plus de changement majeur des ARNs chez le mutant *cdc15-140 cut14-208* permet-il vraiment de conclure que Condensine n'a pas de rôle majeur dans le contrôle de l'expression des gènes ? La question se pose en effet car plusieurs études ont montré chez *S. cerevisiae* qu'un phénomène compensatoire se mettait en place au cours du temps pour contrebalancer les changements d'abondance des ARNm (Artieri and Fraser, 2014; Bader et al., 2015; McManus et al., 2014; Sun et al., 2013). On ne peut donc pas exclure sur la base de nos résultats que des changements transcriptionnels aient eut lieu dans le mutant *cut14-208 cdc15-140*, mais qu'ils aient été rapidement compensés par des boucles de rétrocontrôle. Un effet transitoire sur le niveau des ARN à un moment précis du cycle a donc pu être raté du fait de la non-synchronisation des cellules utilisées dans cette expérience. Il serait donc important de vérifier ce point en mesurant le niveau des ARNs peu de temps après l'inactivation de Condensine dans des populations de cellules synchrones, et idéalement à différents moments du cycle cellulaire.

De même, il a été observé que les Condensines sont enrichies au niveau de gènes fortement transcrits lors de la mitose chez *S. pombe* ainsi que chez d'autres espèces (Downen et al., 2013; Kim et al., 2013; Kranz et al., 2013; Nakazawa et al., 2015; Sutani et al., 2015). L'enrichissement des Condensines en ces sites est encore mal compris, mais l'on peut se demander s'il est réellement possible que l'absence de Condensine n'ait aucun impact sur la transcription de ces gènes fortement exprimés ? Un effet modeste de Condensine sur l'expression de ces gènes aurait-il pu être masqué par leur fort niveau de transcription ? Nakazawa *et al.* n'ont observé aucune différence dans le niveau des ARNm de deux gènes codant des protéines *heat shock* fortement transcrits, après 3, 9, 15 et 30 minutes d'inactivation du mutant *cut14-208* à 36°C, au sortir d'un arrêt en métaphase (Nakazawa et al., 2015). Les auteurs observent des ponts chromatiniens massifs dès 9 min après le shift de température à 36°C, confirmant

l'inactivation rapide de Condensine chez le mutant *cut14-208*. Condensine est donc associée à ces loci en mitose et s'en dissocie rapidement dans le mutant *cut14-208* (Nakazawa et al., 2015) sans que cela n'impacte le niveau des ARNs correspondant. Ces données sont donc cohérentes avec nos résultats. De même, Sutani *et al.* ont montré chez *S. pombe* que la déplétion de la sous-unité Cnd2 de Condensine en prométaphase n'induisait pas de changements global du niveau d'ARNPII associée à la chromatine, et que seule une légère diminution du niveau des ARNs était observable aux gènes fortement transcrits et enrichis en Condensine (Sutani et al., 2015). Même si ces données sont en accord avec nos conclusions, la meilleure façon pour déterminer avec certitude si Condensine joue un rôle ou non dans la transcription des gènes serait de regarder le taux d'ARNs naissants en l'absence de Condensine fonctionnelle. Pour ce faire, on pourrait cartographier les ARNPII actives par une expérience de CRAC (*crosslinking and analysis of cDNA*). Le principe de cette méthode est de lier par les UVs une protéine (ici l'ARNPII) aux ARNs avec lesquels elle interagit (ici les transcrits naissants) (Darnell, 2010; Granneman et al., 2009). Cela permettrait de ne séquencer que les ARNs associés aux ARNPII et de s'affranchir des potentiels effets tampon de rétrocontrôle. D'autres expériences peuvent être envisagées pour mesurer les transcrits naissants, comme le NET-seq (*native elongating transcripts*) (Churchman and Weissman, 2011), ou le cDTA (*comparative dynamic transcriptome analysis*) (Sun et al., 2012).

Lors de ma thèse je n'ai pas non plus adressé la question du rôle de Condensine dans le contrôle de l'expression des séquences répétées telles que les répétitions ADNr, les ADNt, les répétitions centromériques et télomériques, et les rétrotransposons. En effet, leur nature répétée rend difficile la quantification précise des ARNs correspondants par RNA seq. Ils n'ont donc pas été pris en considération lors de l'analyse. Une publication chez *S. pombe* suggère que Condensine aurait un rôle dans la réduction au silence de gènes rapporteurs insérés dans les répétitions silencieuses péri-centromériques (He et al., 2016). Cependant les auteurs de cette étude ont inactivé Condensine en utilisant la mutation thermosensible *cut3-477*, et ont cultivé les cellules *cut3-477* pendant plusieurs heures à température restrictive avant de mesurer l'expression du gène rapporteur péri-centromérique. La traversée de la mitose après inactivation de Condensine par la mutation *cut3-477* a vraisemblablement induit des effets indirects similaires à ceux que nous observons pour *cut14-208*. Rrp6 a été impliquée dans le *silencing* péri-centromérique (Bühler et al., 2007; Reyes-Turcu et al., 2011), suggérant que le

niveau réduit de l'exosome dans les cellules anucléolées *cut3-477* pourrait moduler son fonctionnement en ces sites.

De même, le groupe de Ken-ichi Noma a publié un rôle pour Condensine dans la répression de l'expression des ADNt, en lien avec leur regroupement dans le noyau à proximité des centromères (Iwasaki et al., 2010). Mais ici aussi, les auteurs ont inactivé Condensine par une culture de cellules mutantes *cut3-477* pendant 2h à température restrictive, ce qui soulève la question de la part des effets indirects liés à l'instabilité des chromosomes dans ce résultat. Aucune mesure du contenu en ADN des cellules *cut3-477* ne permet de trancher la question. Leurs conclusions doivent donc être prises avec précaution. En dépit de cela, il serait très intéressant d'investiguer le rôle de Condensine dans le contrôle de l'expression des gènes au niveau des séquences répétées. En effet, Condensine est présente aux répétitions péri-centromériques, enrichie au niveau des répétitions d'ADNr, et vraisemblablement présente également aux ADNt, ce qui fait de ces éléments de cibles potentielles de régulation. Pour cela, je pourrai analyser le niveau des transcrits de ces séquences par RT-qPCR dans la souche *cut14-208 cdc15-140*. Il est également envisageable d'insérer un gène rapporteur au niveau de différentes séquences répétées, afin de déterminer laquelle pourrait être différenciellement exprimée.

Formellement, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le mutant thermosensible *cut14-208* que nous avons utilisé dans notre étude, affecte spécifiquement la fonction de Condensine dans la ségrégation des chromosomes mitotiques, et laisse intact la fonction de Condensine dans le contrôle de l'expression génique. En effet, le mutant *cut14-208* a un effet massif dans la ségrégation des chromosomes en mitose, sans doute à cause de la dissociation forte de Condensine de la chromatine en mitose, après le passage à la température restrictive (Nakazawa et al., 2015). Cependant on peut se demander si une fraction des complexes Condensine pourrait persister sur les chromosomes et continuer d'agir dans la régulation de l'expression génique chez *cut14-208*. Cette fraction insensible à la mutation *cut14-208* pourrait être liée aux chromosomes dans un mode d'association particulier et pourrait suffire à assurer le contrôle de l'expression des gènes. Dans le cas des Cohésines, il a été montré chez *D. melanogaster* et *S. cerevisiae* qu'une forte diminution du nombre des complexes est requise pour compromettre la fonction de cohésion, alors qu'une faible réduction altère plutôt le rôle des complexes dans l'expression génique et le développement (Heidinger-Pauli et al., 2010;

Schaaf et al., 2009). On peut donc se demander si pour Condensine aussi, selon le mutant ou le degré de déplétion on pourrait affecter différentes fonctions du complexe. De plus, afin d'inactiver Condensine, les cellules *cut14-208* subissent un choc thermique : elles passent de 28°C à 36°C pendant 2h30. Ces conditions induisent une réponse transcriptionnelle, qui a été montrée notamment augmenter la transcription de gènes de réponse au stress et diminuer celles de gènes impliqués dans des processus consommant de l'énergie et reliés à la croissance des cellules (Chen et al., 2003). Ces conditions sont particulières et induisent des changements qui pourraient être confondants pour l'interprétation des résultats. Il serait donc important de confronter nos résultats à une étude du rôle de Condensine dans des conditions non stressantes. Idéalement, il faudrait, en parallèle de l'inactivation de Condensine par *cut14-208*, réaliser la déplétion d'une sous-unité du complexe à une température normale de croissance ; par exemple par la technique AID (*Auxin-inducible degron*, (Kanke et al., 2011)). L'équipe de Frank Uhlmann a notamment construit un degron des gènes *Cut14^{Smc2}* et *Cnd3^{Cap-6}*. Mais cette approche n'est efficace que si elle est renforcée par la répression de la transcription de ces deux gènes (Kakui et al., 2017).

Cela étant dit, nos collaborateurs Sara Cuylen-Haering et Christian Haering ont montré chez *S. cerevisiae* qu'une inactivation de Condensine par clivage protéolytique par la protéase TEV, qui élimine l'association de 80% des complexes à la chromatine, n'entraîne aucune modification majeure du niveau des ARNs, ni en phase G1 ni en métaphase. De manière similaire, une étude récente déposée dans BioRxiv montre que la déplétion quasi complète de la sous-unité Brn1 de Condensine par la technique *anchor-away* entraîne une décompaction du génome dans les cellules de *S. cerevisiae* sans altérer pour autant le niveau global de l'expression génique (Paul et al., 2017). Ainsi, malgré les limitations soulevées précédemment, l'absence d'effet direct de Condensine dans le contrôle du niveau des ARNs que nous avons observé chez *S. pombe* semble confirmée par les données obtenues par nos collaborateurs chez *S. cerevisiae*. L'absence d'effet direct dans ces deux levures distantes évolutivement d'environ 420 millions d'années (Sipiczki, 2000), suggère fortement que Condensine n'a pas de rôle direct dans l'expression génique. De plus, il semblerait que Condensine I n'ait pas non plus de rôle direct dans le contrôle du niveau des ARNs chez *D. melanogaster*. En effet, l'inactivation de Condensine I par clivage de l'anneau dans des cellules de glandes salivaires n'induit pas de différence notable dans le niveau à l'équilibre des ARNs (communication

personnelle de Raquel Oliveira). Mais qu'en est-il de Condensine II ? Condensine II est présente dans le noyau tout au long du cycle cellulaire, ce qui peut suggérer un rôle interphasique plus marqué pour ce complexe, à l'inverse de Condensine I. On peut rétorquer à cet argument que le complexe Condensine de *S. cerevisiae*, bien que similaire à Condensine I au niveau des séquences peptidiques des sous unités qui le composent, est associé aux chromosomes tout au long du cycle cellulaire (Bhalla et al., 2002; D'Ambrosio et al., 2008a; Freeman et al., 2000). Ce n'est pas pour autant qu'il joue un rôle clé dans la régulation de l'expression génique. De plus, il semblerait que Condensine II n'ait pas non plus de rôle dans le contrôle de l'expression génique dans des hépatocytes humains non-prolifératifs (communication personnelle Christian Haering).

Au final, que penser des données de la littérature qui impliquent les Condensines dans le contrôle de l'expression génique ? De nombreuses investigations effectuées dans divers organismes ont rapporté des changements de niveau des ARNs cellulaires après inactivation des Condensines (Bhalla et al., 2002; Downen et al., 2013; He et al., 2016; Iwasaki et al., 2010; Kim et al., 2013; Kranz et al., 2013; Li et al., 2015b; Longworth et al., 2012; Lupo et al., 2001; Rawlings et al., 2011; Wang et al., 2016; Yuen et al., 2017). A ma connaissance, toutes ces études sont fondées sur la déplétion progressive des Condensines par des approches de type ARNi ou gène répressible, et aucune ne peut formellement exclure la possibilité d'un effet indirect dû à des défauts de ségrégation des chromosomes en mitose.

De plus, une étude récente suggère également que le mutant thermosensible de Condensine *yca4-2* ait un effet indirect dans l'expression génique chez *S. cerevisiae*. A la différence de nos données, cet effet indirect est visible même à température permissive (Paul et al., 2017). Les auteurs observent que les gènes du bras droit du chromosome XII sont majoritairement surexprimés, et proposent que la souche *yca4-2* ait adapté son transcriptome pour essayer de compenser l'effet délétère de la mutation de Condensine. Il est donc essentiel de prendre garde aux effets indirects lorsque l'on souhaite étudier le(s) rôle(s) des Condensines.

II. Comment expliquer l'effet indirect de Condensine dans le contrôle du niveau global des ARNs chez *S. pombe* ?

Nos résultats indiquent que c'est la production de cellules aneuploïdes qui est à l'origine des modifications du transcriptome chez le mutant *cut14-208*. Mais quel est exactement le mécanisme associé à l'instabilité chromosomique qui aboutit à ces variations du niveau des ARNs ? Nos données suggèrent fortement que la non-disjonction des copies de l'ADNr lors de l'anaphase dans le mutant *cut14-208* est à l'origine de ces accumulations. En effet, nous observons que quasiment 100% des cellules *cut14-208* en mitose n'arrivent pas à séparer les deux copies de l'ADNr dans les cellules filles, ce qui aboutit à la formation d'un nombre important de cellules anucléolées après cytokinèse. La mutation *mis6-302* qui affecte une protéine du kinétochore, induit aussi une mauvaise ségrégation des chromosomes et notamment de l'ADNr sans présenter de phénotype CUT. De façon cruciale, les cellules *mis6-302* montrent une augmentation des mêmes ARNs rapporteurs que dans le mutant *cut14-208*. La mauvaise ségrégation des chromosomes, y compris la non-disjonction de l'ADNr, plutôt que le phénotype CUT, serait donc à l'origine de l'accumulation des ARNs observée.

De manière cohérente, nous montrons par une expérience de FISH ARN (*Fluorescence in situ hybridization*), réalisée en collaboration avec Xi-Ming Sun et Samuel Marguerat (LMS-Londres), que l'ARN non codant anti-sens *mug93as* s'accumule spécifiquement dans les cellules *cut14-208* anucléolées produites par la non-disjonction de l'ADNr en l'absence de Condensine fonctionnelle à 36°C. Bien sûr, notre résultat de FISH ARN ne concerne qu'un seul ARN non codant et il serait intéressant de tester d'autres ARNs dont notamment un ARN étendu en 3'. De plus, si cette hypothèse est juste, alors les modifications du transcriptome de *cut14-208* ne devraient provenir que des cellules anucléolées. On pourrait essayer de trier les cellules par FACScan sur la base de la présence/absence d'un marqueur nucléolaire (par exemple *Gar2-GFP*), et analyser les variations transcriptomiques de chaque sous-groupe de cellules.

Comment l'absence de nucléole pourrait-elle impacter l'expression des gènes ? Inspirés par les travaux de Yamanaka *et al.* (Yamanaka et al., 2010), nous montrons que Rrp6 et Dis3, les ribonucléases du complexe de l'exosome, sont fortement enrichies dans le nucléole des cellules sauvages chez *S. pombe*. Par immunofluorescence indirecte, nous observons une répartition quasi homogène de Rrp6 et Dis3 dans les noyaux des cellules filles au sortir de la

mitose chez le contrôle sauvage, mais une réduction importante des signaux Rrp6 et Dis3 dans les cellules anucléolées *cut14-208*. Ce résultat suggère que l'exosome se répartirait dans les cellules filles en association avec le nucléole et la chromatine lors de la mitose. La non-disjonction de l'ADNr chez le mutant *cut14-208* conduirait ainsi à la quasi-déplétion des protéines Rrp6 et Dis3 des cellules filles anucléolées. Cette hypothèse est en accord avec l'observation que l'exosome est associé aux chromosomes en mitose chez *D. melanogaster* (Graham et al., 2009). Le mécanisme de la co-ségrégation de l'exosome avec les chromosomes et notamment le nucléole n'est cependant pas connu.

Le dosage en complexes exosome est donc réduit dans les cellules anucléolées *cut14-208*. L'accumulation de l'ARN non codant *mug93as* dans les cellules anucléolées *cut14-208* pourrait donc simplement refléter une moindre efficacité de dégradation des ARNs par réduction de dosage de l'exosome. De manière cohérente avec cette hypothèse, la comparaison du transcriptome des cellules *rrp6Δ* et *cut14-208* montre une ressemblance phénotypique entre ces deux mutants perte de fonction. On observe que 42% des ARNs dont le niveau est modifié chez le mutant *cut14-208*, et qui sont majoritairement augmentés, sont également augmentés en l'absence de Rrp6. De même, 63% des ARNs étendus en 3' chez *cut14-208* sont également étendus en 3' lorsque le gène *rrp6* est délété. Ce chevauchement très significatif suggère qu'une partie au moins des ARNs qui s'accumulent de manière indirecte dans le mutant de Condensine sont sensibles à l'activité de Rrp6, très probablement au sein de l'exosome. J'ai confirmé l'accumulation conjointe de certains de ces ARNs chez les mutants de Rrp6, Cut14 et Dis3, par RT-qPCR et northern blot. Le mutant *dis3* montre une augmentation plus importante de l'ARNnc *mug93as* ainsi que des ARNs étendus en 3', suggérant que c'est la ribonucléase principale de l'exosome qui cible ces ARNs. Il serait intéressant de comparer le transcriptome d'un mutant de *dis3* avec celui de *cut14-208*, pour voir si l'on obtient un chevauchement plus important.

L'ensemble de ces données me permet de proposer le modèle présenté en Figure 1. La déficience de Condensine dans le mutant *cut14-208* induit la mis-ségrégation massive des chromosomes en anaphase, qui se traduit sous la forme de ponts chromatiniens. Malgré ces défauts, la cytokinèse a lieu en sortie de mitose et va couper les ponts chromatiniens (phénotype CUT), produisant des cellules dont le contenu en ADN génomique est aberrant. A la ségrégation défailante des chromosomes en anaphase s'ajoute la non-disjonction quasi

systématique des copies répliquées de l'ADNr, laquelle génère au sortir de la mitose des cellules filles anucléolées (les autres cellules filles étant vraisemblablement pourvues des deux copies de l'ADNr). Les cellules anucléolées verront leur niveau en exosome réduit, ce qui aura pour conséquence un amoindrissement de leur activité de surveillance et de dégradation. Le résultat final de cette réduction de dosage sera l'accumulation d'ARNs normalement ciblés par l'exosome, comme les ARNs non codants instables ou des ARNs anormaux étendus en 3', produits par les défaillances naturelles de la terminaison de la transcription. C'est pourquoi le profil transcriptomique du mutant *cut14-208* ressemble à celui du mutant *rrp6Δ*.

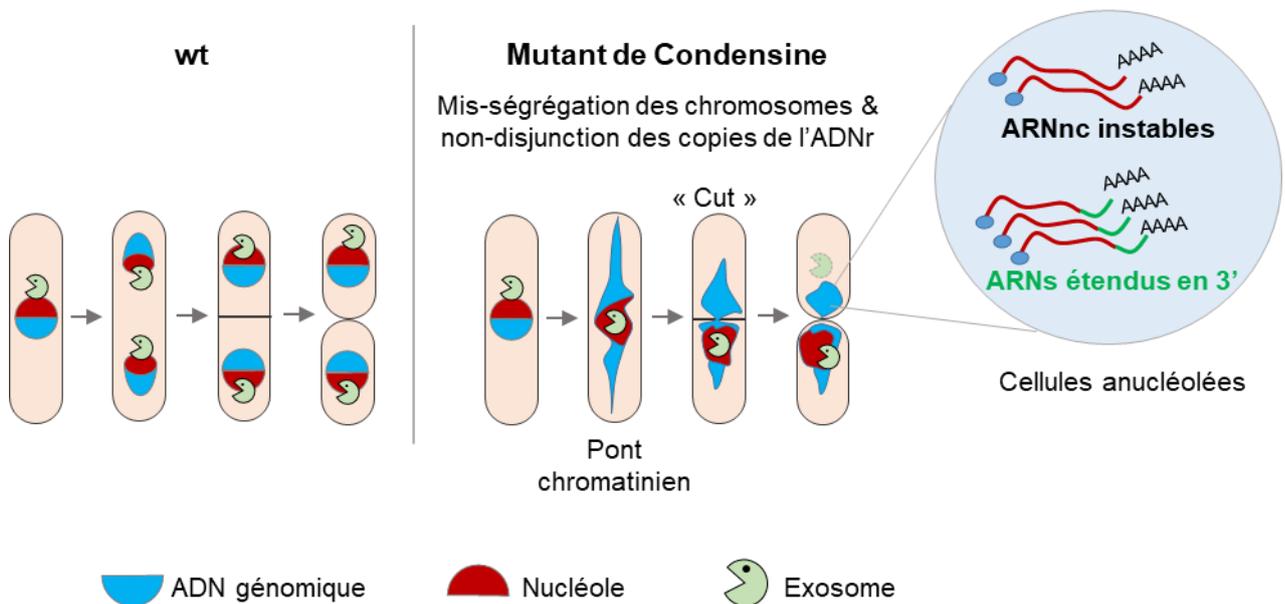


Figure 1 : Modèle expliquant le profil transcriptomique du mutant de Condensine *cut14-208*. Voir texte pour détail.

Ce modèle est renforcé par une donnée intrigante de la littérature : de nombreux mutants « CUT » accumulent des ARNs polyadénylés dans leurs noyaux chez *S. pombe* (Ideue et al., 2004; Kalam Azad et al., 2003). L'analyse plus précise des mutants *ptr4-1* (Cut1 Séparase) et *ptr11-1* (Top2) suggère que les ARNs poly(A)⁺ s'accumulent spécifiquement dans les cellules CUT anucléolées (Ideue et al., 2004). Ces résultats suggèrent d'une part que la non-disjonction de l'ADNr est un phénotype courant dans les mutants CUT, et d'autre part que l'absence de nucléole induit une défaillance dans le métabolisme des ARNs. Ces données font sens avec notre hypothèse que l'absence de nucléole réduit le niveau en exosome et perturbe son fonctionnement dans les cellules *cut14-208*. Cependant, contrairement à notre modèle, les

auteurs de ces publications concluent qu'il y a un défaut d'export des ARNm dans les cellules anucléolées, et que le nucléole est essentiel pour que les ARNm soient exportés dans le cytoplasme (Ideue et al., 2004). Cependant, ils n'ont pas mesuré le niveau d'expression des ARNs dans ces mutants CUT, ni déterminé si des changements du niveau d'expression des ARNnc ou si l'accumulation d'ARNs aberrants ne pouvaient pas être à l'origine de ce signal poly(A)⁺ accru. Or les ARNnc ont été montrés être hyper-adénylés chez *S. pombe* (environ 200nt contre 50 à 80nt pour les ARNm en moyenne) (Zhou et al., 2015). Une accumulation d'ARNnc pourrait donc contribuer fortement au signal poly(A)⁺ observé par Ideue *et al.* De manière cohérente, il a été observé chez *S. cerevisiae* que des ARNs poly(A)⁺ s'accumulent dans le nucléole des mutants perte de fonction de Dis3 et Rrp6, ce qui renforce l'idée que des défauts de maturation et de dégradation des ARNs pourraient mener à l'apparition d'un signal nucléaire poly(A)⁺ (Carneiro et al., 2007; Paul and Montpetit, 2016). De plus, l'apparition du signal poly(A)⁺ dans le noyau des cellules en l'absence de Rrp6, a été montré dépendre de la poly(A) polymérase Trf4 du complexe TRAMP co-facteur de l'exosome (Carneiro et al., 2007), suggérant que le signal poly(A)⁺ représente bien l'accumulation d'ARNs non dégradés par le complexe ribonucléasique.

L'émergence d'un signal poly(A)⁺ dans les cellules CUT anucléolées observée par Ideue *et al.* pourrait donc être la manifestation d'une forte activité de maturation et de dégradation des ARNs par l'exosome dans le nucléole, plutôt qu'un rôle pour ce dernier dans l'export des ARNs. En accord avec cette conclusion, nous n'observons pas de défaut massif d'export des ARNs dans les cellules *cut14-208*, puisque l'ARNm *cct2* testé est correctement exporté dans le cytoplasme. De plus, l'accumulation d'ARNnc hyperadénylés comme *mug93as* dans les cellules anucléolées du mutant de Condensine pourrait suffire à expliquer le signal poly(A)⁺ observé. Si cette hypothèse est vraie, les points précédents devraient pouvoir se généraliser aux autres mutants CUT, ainsi qu'au mutant *mis6-302* qui présente des défauts de non-disjonction de l'ADNr. Pour tester nos prédictions, on pourrait réaliser un séquençage ARN et un FISH ARN dans ces mutants. Chez *S. cerevisiae* des mutants de Condensine montrent également des défauts de ségrégation du nucléole : dans la majorité des cellules en anaphase, les deux copies de l'ADNr ne se divisent pas et co-ségrègent dans une même cellule fille (Freeman et al., 2000; Thadani et al., 2018). De manière frappante, l'accumulation d'ARN poly(A)⁺ est aussi observée dans le noyau des cellules anucléolées du mutant *smc4-1* de

Condensine chez cette levure (Paul and Montpetit, 2016). De plus, l'exosome est également retrouvé enrichi dans le nucléole chez *S. cerevisiae* (Allmang et al., 1999a). La non-disjonction de l'ADNr pourrait donc également induire la réduction du dosage en exosome dans les cellules anucléolées et l'accumulation d'ARNs aberrants polyadénylés dans la levure bourgeonnante.

L'enrichissement de l'exosome dans le nucléole est observé depuis les levures jusque chez l'Homme (Kilchert et al., 2016). Cette localisation est vraisemblablement, au moins en partie, la conséquence directe de son activité co-transcriptionnelle de maturation des ARNs ribosomiaux. Chez *S. pombe* et l'Homme, il y a une régionalisation de certains co-facteurs de l'exosome, ce qui pourrait contribuer à spécifier les différentes fonctions du complexe selon leur localisation nucléaire. Le complexe TRAMP est principalement nucléolaire alors que les complexes MTREC et NEXT sont nucléoplasmiques (Lubas et al., 2011; Wang et al., 2008b; Zhou et al., 2015). Cependant il est important de noter que l'exosome est également présent dans le nucléoplasme à proximité de la chromatine, et possiblement le long des chromosomes, où il agit peut-être dans la surveillance des ARNs et/ou dans la terminaison de la transcription par exemple (Andrulis et al., 2002; Lemay et al., 2014). D'après mes données d'immunofluorescence indirecte de Rrp6 et Dis3, la fraction nucléolaire de l'exosome est perdue dans les cellules *cut14-208* anucléolées. En revanche il est difficile de déterminer à partir de ces résultats, si les complexes exosomes présents à proximité de la chromatine voient leur niveau modifié dans *cut14-208*. Si une fraction de l'exosome est associée à la chromatine, alors la répartition de cette fraction doit également être altérée au sortir de la mitose dans les cellules mutantes pour Condensine. On peut également se demander si l'absence de la fraction nucléolaire de l'exosome pourrait avoir un impact sur le traitement des ARNs supposément assuré par une sous-population chromatinienne de l'exosome. Peut-être y-a-t-il un échange entre les fractions nucléolaires et chromatiniennes de l'exosome ? De même, on peut imaginer que certains ARNs non codants ou mal maturés soient dégradés spécifiquement dans le nucléole. Depuis les vingt dernières années, le nucléole a émergé comme étant une organelle multifonctionnelle, régulant des processus qui vont bien au-delà de son rôle traditionnel, comme notamment la réparation des dommages à l'ADN et la maintenance du génome (Tsekrekou et al., 2017). On peut donc envisager qu'à la manière des usines de

transcription, le nucléole puisse être un site de maturation et de dégradation de certains ARNs.

Dans tous les cas, pour formellement démontrer que c'est la réduction du dosage en exosome, et non la déplétion d'une autre protéine nucléolaire, qui est à l'origine de l'accumulation des ARNs dans le mutant de *cut14-208*, il faudrait pouvoir rétablir un niveau normal en complexe exosome dans les cellules anucléolées *cut14-208*, et tester l'impact de cette restauration sur le profil transcriptionnel du mutant de Condensine. Les mutations *nuc1-632* ou *acr1-936* qui affectent respectivement une sous-unité de l'ARNPI ou un facteur d'activation de la transcription Pol I, réduisent la transcription à l'ADNr par l'ARNPI, et pourraient peut-être libérer la fraction de Rrp6 associée aux ARN ribosomiques naissants et délocaliser Rrp6 du nucléole vers le nucléoplasme. Si tel était le cas, il serait intéressant de déterminer les conséquences de cette relocalisation de Rrp6 sur le transcriptome du mutant *cut14-208*.

III. Discussion de potentiels effets indirects additionnels

La mis-ségrégation du nucléole entraînant la réduction de dosage de l'exosome n'est vraisemblablement pas la seule cause de tous les changements du niveau des ARNs observés chez le mutant de Condensine *cut14-208*.

Il semble en effet très possible que d'autres mécanismes consécutifs à la mauvaise ségrégation des chromosomes en mitose participent également à la modification du transcriptome lorsque Condensine est déficiente. J'ai essayé de déterminer si la coupure des ponts chromatinien par le septum pouvait causer des changements transcriptionnels chez le mutant *cut14-208*. Pour tester cela j'ai induit des cassures double brin dans une souche sauvage, soit par ajout de la Camptothécine (un inhibiteur de la topoisomérase I qui agit en phase S (Pommier, 2004)), soit par ajout de Zéocine (une molécule radio-mimétique de la famille des Bléomycines (Povirk, 1996)). L'induction de cassures double brin par les drogues Camptothécine et Zéocine n'a pas montré de modification du niveau des ARNs rapporteurs. La cassure de l'ADN ne serait donc pas le moteur principal des changements transcriptionnels observés dans *cut14-208*. Cependant, il se pourrait que les cassures induites par ces drogues ne miment pas exactement le même défaut que celui d'un pont chromatinien coupé par le septum. On ne peut pas non plus exclure la possibilité que les dommages de l'ADN modifient

l'expression d'autres ARNs non étudiés, et participe bien au profil transcriptomique de *cut14-208*.

La genèse de cellules présentant un caryotype aberrant, est potentiellement aussi la cause de modifications transcriptionnelles dans *cut14-208*. En effet, l'aneuploïdie en elle-même est connue pour induire des changements du transcriptome (Pfau and Amon, 2012; Sheltzer et al., 2012). L'aneuploïdie caractérise le changement du nombre de chromosomes d'une cellule, qui n'est pas un multiple de son contenu haploïde (on l'oppose donc à la polyplôïdie). La micro-aneuploïdie décrit la perte ou le gain de fragments de chromosomes (Pfau and Amon, 2012). L'équipe d'Angelika Amon a beaucoup travaillé sur l'aneuploïdie et montre qu'une réponse transcriptionnelle à l'aneuploïdie est conservée chez plusieurs espèces. Elle a notamment montré que les gènes impliqués dans la réponse au stress sont surexprimés en cas d'aneuploïdie, et les gènes du cycle cellulaire et de la prolifération sont fréquemment sous-exprimés, indépendamment d'une aberration chromosomique spécifique (Sheltzer et al., 2012). Des cellules de lymphocytes T de souris portant une mutation touchant Condensine II montrent une modification du transcriptome qui évoque une réponse au stress de l'aneuploïdie (Woodward et al., 2016). Cependant, nous n'avons pas observé une telle réponse dans le mutant de *cut14*, les ARNm augmentés n'ont pas montré d'enrichissement pour un terme d'Ontologie particulier. Ce résultat peut être expliqué par le fait que dans le mutant *cut14-208*, il y a vraisemblablement peu de cas d'aneuploïdie en tant que telle. Ce sont plutôt des cas de micro-aneuploïdie ou d'aneuploïdie partielle, car ce sont rarement des chromosomes entiers qui sont perdus ou gagnés par les cellules *cut14-208*. En effet, les centromères migrent relativement sans problèmes aux pôles opposés de la cellule en mitose lorsque Condensine est inactivée. Nakazawa *et al.* ont observé que seuls 11% des cellules en anaphase non-disjoignent le centromère du chromosome II dans une même cellule fille (Nakazawa et al., 2015). Cela pourrait expliquer pourquoi on n'observe pas de signature transcriptomique typique d'une réponse à l'aneuploïdie.

D'autre part, une publication récente chez *S. pombe* suggère que le mutant *cut14-208* accumule des ARNm de gènes d'histones de façon indirecte, à cause de la stabilisation du facteur de transcription spécifique des gènes d'histones, Ams2, lors d'une anaphase défectueuse (Kim et al., 2016). Nous observons également une légère accumulation des ARNm des gènes histones dans *cut14-208*, qui pourrait donc être la conséquence de la stabilisation

d'Ams2 plutôt que de la non-disjonction de l'ADNr. Une analyse par FISH ARN nous dira si ces ARNm s'accumulent spécifiquement dans les cellules anucléolées ou non, et pourra nous orienter quant au mécanisme à l'origine de leur dérégulation. Chez *S. pombe* la phase G1 est enclenchée en même temps que l'anaphase, et la phase S a lieu de manière chevauchante avec la cytokinèse. Les données de l'article de Kim *et al.* laissent penser que la présence persistante de ponts chromatiniens dans le mutant *cut14-208* pourrait affecter l'expression des gènes de phase G1 et S. Cependant, nos données suggèrent le contraire. Les cellules *cdc15-140 cut14-208* forment des ponts chromatiniens en anaphase puis sortent de mitose sans effectuer la cytokinèse, et re-répliquent leur ADN. Or le profil transcriptomique du double mutant *cut14-208 cdc15-140* n'est pas ou très peu différent de celui d'une souche sauvage, arguant que la seule présence de ponts chromatiniens n'est pas suffisante pour induire des changements du niveau des ARNs.

Un autre mécanisme expliquant un effet indirect de Condensine dans l'expression génique a été proposé chez *S. cerevisiae* il y a quelques années déjà. Les auteurs proposent que Condensine participe au *silencing* de l'ADNr par le contrôle de sa topologie, ce qui maintient une balance correcte entre la fraction télomérique et nucléolaire de la protéine Sir2 (Machín et al., 2004). Cependant ils étudient la mutation *smc2-8*, qui montre de forts défauts de ségrégation du nucléole à la température restrictive (Freeman et al., 2000), ce qui pourrait impacter certains des résultats qu'ils ont obtenus et modifier leurs conclusions.

Une dernière hypothèse que l'on ne peut pas formellement exclure, serait que Condensine pourrait avoir un rôle dans la stabilité et la maturation des ARNs dans le cytoplasme, étant donné que le complexe y est présent lors de l'interphase. Aucun rôle pour Condensine dans le cytoplasme n'a cependant été identifié jusqu'à présent.

IV. Non-disjonction de l'ADNr dans les mutants de Condensine : une spécificité des levures ?

Notre observation que les copies de l'ADNr n'arrivent pas à se séparer correctement en anaphase dans le mutant de Condensine chez *S. pombe* est cohérente avec la littérature (Nakazawa et al., 2008), et rappelle les défauts tout aussi sévères de mis-ségrégation de l'ADNr observés chez la levure bourgeonnante en absence d'une Condensine fonctionnelle

(D'Ambrosio et al., 2008b; Freeman et al., 2000; Thadani et al., 2018). Ces données sont cohérentes avec l'idée que la décaténation des copies de l'ADNr en fin d'anaphase requiert Condensine (D'Ambrosio et al., 2008b). Des données de la littérature montrent également que l'organisation et la condensation de l'ADNr en mitose nécessitent une Cohésine fonctionnelle (Gard et al., 2009; Guacci et al., 1997; Lopez-Serra et al., 2013; Tong and Skibbens, 2015). D'autres publications montrent qu'un déficit d'acétylation des Cohésines induit des dysfonctionnements nucléolaires, comme l'illustrent notamment les défauts cytologiques observés dans le syndrome de Roberts, touchant le gène *ESCO2* (Harris et al., 2014; Xu et al., 2014).

Le modèle proposé par Takashi Ideue *et al.* qui explique l'accumulation d'ARN poly(A)⁺ par un défaut d'export des ARNs en l'absence de nucléole, repose aussi sur l'hypothèse que de nombreuses mutations CUT (affectant diverses protéines), perturbent la séparation des copies de l'ADNr en anaphase chez *S. pombe* (Ideue et al., 2004). Il serait intéressant d'observer si en effet les copies de l'ADNr co-ségrégent fréquemment dans une des deux cellules filles dans les différents mutants CUT, de manière similaire aux mutants de Condensine et de Cohésine. Si tel est le cas, cela suggérerait d'une part que la ségrégation du nucléole dépend de nombreux facteurs impliqués dans la ségrégation des chromosomes, mais aussi qu'un mécanisme présent chez *S. pombe* s'oppose à la coupure par l'anneau contractile d'actine et le septum des nucléoles frères (répliqués), non-séparés en anaphase. En effet, le fait que les deux nucléoles frères non ségrégés et trainant au milieu du pont chromatinien soit rarement coupés lors de la cytokinèse (<10% des cas pour *cut14-208*), suggère un mécanisme d'échappement. La persistance du nucléole dans l'axe de clivage pourrait gêner la cytokinèse de façon mécanique, ou pourrait provoquer un signal d'attente.

Chez l'homme, la situation est un peu différente car la déplétion de SMC2 induit certes des défauts de ségrégation des répétitions de l'ADNr, mais ne conduit pas au phénotype frappant de non-disjonction totale des copies de l'ADNr, comme observé chez les levures (Samoshkin et al., 2012). Il n'y a donc pas de cellules anucléolées à proprement parler dans ce cas. La non-disjonction des copies de l'ADNr est sans doute une spécificité des levures. En effet, des différences sont observées entre les levures et les eucaryotes multicellulaires. Le nucléole y est composé de répétitions de l'ADNr appelées NORs (*nucleolar associated regions*), qui sont généralement localisées sur différents chromosomes. Lors de la mitose, la structure du

nucléole est désassemblée (Hernandez-Verdun, 2011). Les levures, à l'inverse, ont une construction très intégrée du nucléole : le locus de l'ADNr est présent sur un seul chromosome et la structure complexe du nucléole est maintenue lors de la division cellulaire (pour revoir (Shaw and Doonan, 2005; Strunnikov, 2005). Cette particularité de séparation sans désassemblage du nucléole chez les levures en mitose est sans doute la raison pour laquelle il est fréquent d'observer la non-disjonction des copies de l'ADNr dans les mutants de Condensine (et les mutants CUTs). L'effet indirect de Condensine dans le contrôle du niveau des ARNs causé par la non-disjonction des copies de l'ADNr que nous avons observé chez *S. pombe* est donc peut-être une spécificité des levures.

En dépit de ces différences, Condensine semble avoir un rôle conservé dans le maintien de l'intégrité des régions répétées. Une étude a montré que la déplétion de SMC2 dans des cellules HeLa induisait des cassures de l'ADN au niveau de régions répétées du génome, dont notamment les régions NORs (Samoshkin et al., 2012). De plus, chez *S. cerevisiae*, le mutant de Condensine *yca4-2* montre une expansion des répétitions de l'ADNr par southern blot (Wang et al., 2016). Compte tenu de l'abondance des séquences répétées dans les génomes eucaryotes (Warburton et al., 2008), il est tentant d'imaginer que la déstabilisation des séquences répétées pourrait constituer un effet récurrent de la perte de fonction des Condensines. L'instabilité génétique qui en découlerait pourrait être responsable, au moins en partie, des changements de niveaux des ARNs observés en l'absence de Condensines fonctionnelles depuis les levures jusque chez l'homme.

Interaction de Condensine avec des protéines liant les ARNs

En parallèle des analyses transcriptomiques des mutants *cut3-477* et *cut14-208*, j'ai recherché en collaboration avec l'équipe d'André Verdel des interacteurs de Condensine qui auraient pu nous aiguiller sur les fonctions de Condensine, y compris dans le contrôle de l'expression génique.

Nous avons tout d'abord réalisé une analyse globale des partenaires physiques de Condensine par spectrométrie de masse. Cette expérience a été réalisée sur des cellules cyclantes, majoritairement en phase G2. L'analyse des partenaires potentiels de Condensine a notamment révélé la présence de la ribonucléase de l'exosome Rrp6, de la ribonucléase

torpedo Dhp1 (XRN2 chez l'homme) et de l'hélicase Dbp2 (DDX5/DDX17 chez l'homme). A l'époque où nous obtenions ces premiers résultats nous savions que les transcriptomes de *cut14-208* et *rrp6Δ* se ressemblaient, suggérant un chevauchement fonctionnel. En outre, les mutants de XRN2 et Dbp2 étaient connus pour accumuler des ARNs non codants et des ARNs étendus en 3' (Cloutier et al., 2012; Kilchert et al., 2016; Tollervey, 2004). La découverte de ces protéines de liaison aux ARNs comme partenaires physiques putatifs de Condensine étayait fortement l'hypothèse d'un lien fonctionnel entre Condensine et le traitement des ARNs, possiblement par Rrp6. Je me suis donc intéressée à ces protéines de liaison aux ARNs plus en détail. J'ai confirmé les interactions physiques par des expériences de co-immunoprécipitation, et Xavier Robellet, post-doctorant dans l'équipe, a montré par test de double hybride que Rrp6 contacte la sous-unité Cnd1 de Condensine au niveau de sa première moitié N-terminale. De plus, une interaction publiée (quoique assez faible) entre le domaine N-terminal de Cut3 et le co-facteur essentiel de Rrp6, Rrp47/Cti1 (Chen et al., 2004), a été confirmée par test de double hybride.

Maintenant que nous savons que Condensine ne contrôle pas directement l'expression des gènes, comment interpréter ces interactions physiques avec des protéines liant les ARNs ? Concernant Dbp2, il semblerait que cette protéine soit fréquemment retrouvée dans les analyses par spectrométrie de masse, posant question sur la réalité biologique de son interaction avec Cut3. Cependant, je confirme son interaction avec Condensine par co-immunoprécipitation. De plus, des données chez l'homme montrent que c'est un partenaire physique de Rrp6, suggérant la possibilité d'un complexe ternaire composé de Condensine, Rrp6 et Dbp2. L'explication de cette interaction est donc peut-être en lien avec celle de Rrp6.

I. Quel rôle pour l'interaction de Condensine avec Rrp6 ?

Le fait qu'on ne retrouve aucune autre sous-unité de l'exosome dans la liste des interacteurs protéiques de Cut3-TAP pose question. Il est possible que Rrp47 ait été ratée du fait de sa petite taille (15kDa) et de potentiels problèmes techniques d'ionisation, mais il y a peu de chance que l'on ait raté l'intégralité des autres sous-unités de l'exosome. A moins que l'interaction entre Condensine et l'exosome soit faible et/ou transitoire. On peut par contre imaginer que Condensine interagisse avec Rrp6 (et son co-facteur essentiel Rrp47), en dehors

du cœur de l'exosome. Il a en effet été suggéré que Rrp6 puisse fonctionner en dehors du complexe de l'exosome, même si aucune donnée solide ne le prouve (Callahan and Butler, 2008; Graham et al., 2009; Kiss and Andrulis, 2011). Malgré ces résultats étonnants au premier abord, l'interaction forte observée par test de double hybride entre Cnd1 et Rrp6 suggère cependant qu'elle pourrait avoir une pertinence biologique. Pour être sûr que cette interaction ne soit pas un artéfact expérimental, il faudrait la confirmer *in situ*, peut-être par une expérience de PLA (*proximity ligation assay*) ou de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*).

Si l'on accepté l'idée que l'interaction entre Cnd1/Condensine et Rrp6 est le support d'une fonction biologique, quelle peut-elle être ? L'interaction génétique négative que j'ai observée entre *cut3-477* et *rrp6Δ* à 33°C indique une relation fonctionnelle, voire une convergence de fonction, mais ne donne aucune information sur le mécanisme cellulaire concerné. J'ai aussi observé que Rrp6 est associée à la chromatine en interphase et en mitose, de manière cohérente à ce qui est décrit dans la littérature (Graham et al., 2009). En revanche, l'association de Rrp6 à la chromatine demeure inchangée chez le mutant *cut3-477* à 36°C. Il est donc possible que Condensine module l'association de Rrp6 en certains sites chromosomiques, mais un rôle général de recruteur de Rrp6 pour Condensine semble exclu. De plus, mon observation que la co-immunoprécipitation de Cnd2 et Rrp6 est maintenue, voire accrue, chez les mutants *cut3-477* et *cut14-208*, alors même que l'association de Condensine à la chromatine est réduite par ces deux mutations, argue que l'interaction entre Condensine et Rrp6 peut avoir lieu en dehors du contexte des chromosomes. Une immunoprécipitation de la chromatine associée à Rrp6 dans les mutants *cut3-477* et *cut14-208* pourrait être informative à condition d'analyser le génome entier par ChIP-seq quantitatif. On pourrait aussi imaginer que Rrp6 participe au recrutement ou au fonctionnement de Condensine. En effet, il a été montré que l'hélicase Vasa, son paralogue Belle, et son orthologue DDX3, qui lient les ARNs, facilitent la localisation robuste de la sous-unité Barren/CAP-H de Condensine I sur les chromosomes, et ce faisant promeuvent la ségrégation des chromosomes mitotiques chez *D. melanogaster* et chez l'homme (Pek and Kai, 2011a, 2011b). J'ai réalisé des expériences préliminaires pour tester cette hypothèse. Les résultats, qui ne sont pas présentés dans cette thèse, ne semblent pas conforter cette hypothèse. J'ai observé que le niveau de Condensine associé à la chromatine dans des cellules cyclantes n'est

pas modifié dans un mutant *rrp6Δ*, et que ce mutant ne présente pas de défaut de ségrégation des chromosomes mitotiques. Ces données demandent néanmoins à être confirmées et approfondies pour écarter totalement un potentiel rôle de Rrp6 dans la fonction de condensation de Condensine.

Une piste de réflexion est que Rrp6 pourrait potentiellement interagir avec Condensine dans le contexte de la prise en charge des dommages à l'ADN. Plusieurs études ont impliqué Condensine mais aussi l'exosome dans la réparation des dommages à l'ADN. Chez *S. pombe*, les mutants de Condensine *cnd2-1* et *cut14-Y1* sont sensibles aux agents génotoxiques tels que l'hydroxyurée (HU) et les UVs (Akai et al., 2011; Aono et al., 2002). Ces sensibilités sont observées à la température de 26°C, qualifiée de permissive pour la fonction de condensation chez *cnd2-1* et *cut14-Y1*, puisque les souches sont viables et ne présentent donc pas de défauts majeurs de ségrégation des chromosomes. Ces études suggèrent un rôle pour Condensine en interphase, bien que la présence du complexe sur les chromosomes à cette période du cycle soit très faible chez *S. pombe*. D'autres publications impliquent Condensine I dans la réparation de dommages simple brin à l'ADN en lien avec la poly(ADP-ribose) polymérase PARP-1 (Heale et al., 2006; Kong et al., 2011), ou montrent son accumulation au niveau des fourches de réplifications arrêtées (D'Ambrosio et al., 2008a).

Cependant le rôle exact des Condensines dans la prise en charge des dommages à l'ADN reste encore très énigmatique. Une donnée étonnante est que la sensibilité du mutant de Condensine *cnd2-1* à la présence d'HU (4 mM) et aux UVs est sauvée par la surexpression de Cti1/Rrp47 (Chen et al., 2004). Surexprimer Rrp47 pourrait donc compenser une défaillance de Condensine dans la signalisation et/ou la réparation des dommages causés par HU et les rayonnements UVs. On peut donc imaginer que Rrp6 et Rrp47 puissent agir avec Condensine dans une même voie de réparation des dommages à l'ADN. Il serait intéressant de voir si la surexpression de Rrp6 montre le même effet suppresseur. L'interaction de Condensine avec Rrp6/Rrp47 pourrait être modifiée dans le mutant *cnd2-1*. Rrp6/Rrp47 pourrait être l'effecteur de Condensine dans la réparation des dommages à l'ADN. En effet, il semblerait que Cti1/Rrp47 se relocalise du nucléole à la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN induit par l'HU chez *S. pombe* (Chen et al., 2004). Rrp47, a également été montrée agir dans la réparation des lésions induites par les UVs chez *S. cerevisiae* (Erdemir et al., 2002; Hieronymus et al., 2004). Chez *D. melanogaster*, la réparation des cassures DSBs est

compromise en l'absence de Rrp6, mais pas de la sous-unité du cœur de l'exosome Rrp4 (Marin-Vicente et al., 2015). Ainsi, il serait intéressant d'étudier la possibilité que Condensine interagisse avec Rrp6/Rrp47 dans le cadre d'une réponse aux dommages à l'ADN. Des évidences pointent en faveur d'un lien entre les facteurs de maturation des ARNs et les réponses aux dommages à l'ADN, renforçant la pertinence de cette hypothèse (Francia et al., 2012; Michelini et al., 2017; Mikolaskova et al., 2018).

Alternativement, on peut également imaginer que l'interaction de Cnd1 avec Rrp6/Rrp47 participe à la fonction de Condensine proposée par Sutani *et al.*, qui serait d'éliminer les structures d'ADN ouvertes générées par la transcription, lesquelles entraveraient l'assemblage des chromosomes mitotiques (Sutani et al., 2015). Si l'on se place dans le contexte de l'hypothèse de M. Yanagida selon laquelle Condensine « nettoie » les chromosomes en vue de leur compaction (Yanagida, 2009), alors on peut imaginer Rrp6 et Rrp47 en interaction avec Condensine pourraient faciliter la renaturation de l'ADN aux gènes fortement transcrits en permettant la dégradation des ARNs naissants. Cependant ce modèle s'accorde mal au fait que je n'ai pas observé de défaut majeur de migration des chromosomes évoquant une défaillance de condensation mitotique chez le mutant *rrp6Δ* (données préliminaires).

Afin de déterminer la fonctionnalité de l'interaction observée entre Cnd1 et Rrp6, l'idéal serait d'étudier un mutant de Condensine qui perdrait la possibilité d'interagir avec Rrp6, mais sans dissocier le complexe Condensine de la chromatine ni affecter sa fonctionnalité dans la condensation. On pourrait réaliser une mutagenèse de la partie N-terminale de Cnd1, et tester son interaction par double hybride avec Rrp6. La caractérisation phénotypique d'une telle mutation (notamment dans la réponse aux dommages à l'ADN, l'activité de renaturation de Condensine), pourrait permettre d'avancer dans la compréhension du rôle de l'interaction de Condensine avec Rrp6. Parallèlement, il serait intéressant de chercher des mutations dans Rrp6 qui éliminent son interaction avec Condensine. Cette approche aurait le grand avantage de laisser Condensine intacte.

II. Quels liens entre Condensine et la ribonucléase *torpedo* Dhp1 ?

L'interaction que j'ai observée entre Cnd2 et Dhp1 par co-immunoprécipitation reste aussi sans explication pour le moment. Ici aussi l'interaction physique est étayée par une interaction génétique négative entre *cut3-477* et *dhp1-154* à 32°C. Je n'ai pas observé de défauts majeurs de ségrégation des chromosomes mitotiques chez le mutant *dhp1-154*, suggérant que Dhp1 ne joue pas un rôle crucial dans la condensation des chromosomes. Concernant la terminaison de la transcription, l'accumulation de Condensine en 3' des gènes fortement transcrits chez *S. pombe* (Sutani et al., 2015), serait cohérente avec un rôle dans l'activité *torpedo* de Dhp1. Cependant, j'ai montré que Condensine ne joue pas de rôle direct dans la terminaison de la transcription. La recherche d'interaction entre Dhp1 et les différentes sous-unités de Condensine par test double-hybride s'est révélée négative, suggérant une interaction indirecte entre Dhp1 et Condensine. Il est possible que l'interaction soit médiée par l'ADN ; pour peu que la digestion benzonase n'ait pas été optimale (voir paragraphe suivant). Afin de tester cette possibilité je pourrais tenter d'amplifier par qPCR un locus de liaison de Condensine dans mes extraits protéiques digérés à la benzonase et utilisés pour réaliser la co-immunoprécipitation entre Condensine et Dhp1. Cette vérification par qPCR devra d'ailleurs être faite pour toutes mes expériences de co-immunoprécipitation. Si l'interaction de Condensine et Dhp1 reflète uniquement la co-localisation des deux protéines en 3' des gènes, il serait intéressant de voir si un mutant de *dhp1* qui retarde la terminaison de la transcription peut déplacer Condensine plus en aval de son site canonique d'association. Cette hypothèse s'inspire des données qui montrent que Cohésine peut glisser le long de la chromatine en lien avec la transcription (Lengronne et al., 2004; Ocampo-Hafalla et al., 2016).

Cartographier Condensine nécessite de travailler sur des cellules synchronisées en mitose. Malheureusement, mes tentatives d'arrêt en mitose des mutants de *dhp1* n'ont pas fonctionnées, possiblement car les mutations thermosensibles de ce gène sont très délétères pour la progression des levures au travers du cycle cellulaire à 36°C. Cependant je pourrais essayer de bloquer les cellules en mitose à température permissive, avant d'inactiver les mutants à température restrictive, pour éviter l'effet des mutations de *dhp1* sur la croissance des cellules.

III. De la difficulté d'étudier les interacteurs de Condensine

Les résultats de l'analyse des interacteurs de Cut3 par spectrométrie de masse montrent une forte proportion de protéines présentes dans le nucléole (environ 30%). Ce résultat fait sens avec l'enrichissement de Condensine sur l'ADNr, mais suggère que l'on a immunoprécipité de manière indirecte une partie du nucléole. Des évidences obtenues au laboratoire ont confirmé que la digestion à la benzonase pour éliminer les acides nucléique n'avait pas été optimale. Même après l'élimination informatique des protéines du nucléole (considérées comme des interactions indirectes), il est possible qu'il y ait un nombre non négligeable d'interactions non spécifiques parmi la liste des 238 protéines identifiées comme des partenaires putatifs de Condensine. De manière cohérente, Esther Toselli, technicienne dans l'équipe, n'a pas réussi à confirmer par co-immunoprécipitation les interactions entre Condensine et un panel de protéines associées à la transcription présentes dans la liste des interacteurs potentiels identifiés par protéomique. Ces interactions pourraient donc seulement refléter l'enrichissement de Condensine aux gènes fortement transcrits. Une deuxième expérience d'immunoprécipitation de Cut3, mais aussi de la sous-unité Cnd3, a été réalisée plus tard au cours de ma thèse par l'équipe d'André Verdel, dans des conditions plus stringentes de digestion à la benzonase. Les résultats de cette analyse montrent la disparition des protéines du nucléole et de la majorité des protéines associées à la chromatine, corroborant l'idée d'interactions indirectes. Les interactions de Cut3 (et Cnd3) avec Rrp6, Dhp1 et Dbp2 n'ont pas été retrouvées dans ces conditions très stringentes, posant question sur leur réalité biologique. Cependant, assez peu d'interacteurs ont finalement été observés pour Cut3 et Cnd3 à l'issue de cette seconde analyse. Cela suggère, soit que Condensine ait peu de partenaires physiques, soit que les interactions sont difficiles à détecter, ou encore que les conditions de cette deuxième analyse ont été trop stringentes, déstabilisant certaines interactions. Il est aussi possible que des interactions ayant lieu spécifiquement en mitose n'aient pas été détectées par la purification protéique de Condensine à partir de cellules asynchrones (dont seulement 10% étaient en mitose). Les contraintes expérimentales de volumes et de quantité de cellules ne permettaient pas de travailler sur des cellules synchronisées en mitose. Pour rechercher spécifiquement les interactions physiques pertinentes de la mitose, il faudra donc trouver un moyen de synchroniser des grandes quantités de cellules en mitose, et/ou d'augmenter la sensibilité de la détection. Ainsi, la

recherche des partenaires physiques des Condensines n'est pas aisée, et nécessite une grande prudence au regard de possibles résultats indirects dus à la localisation chromatinienne de ce complexe. Il est aussi tout à fait envisageable que Condensine n'ait pas besoin de partenaires physiques particuliers pour extruder de l'ADN et façonner les chromosomes mitotiques.

Conclusion générale

L'ensemble des données que j'ai obtenues au cours de ma thèse, en lien avec les données de nos collaborateurs, permettent de remettre en question le rôle communément admis de Condensine dans le contrôle de l'expression des gènes. La fonction bien établie de Cohésine dans l'organisation du génome et dans la régulation de l'expression génique suggérait que Condensine pouvait agir de manière similaire dans ces processus. Au contraire, nos résultats indiquent que Condensine n'a pas de rôle direct dans le contrôle du niveau des ARNs chez les levures à fission et à bourgeonnement. Plusieurs études indépendantes menées chez *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* et la souris semblent corroborer l'idée que ni Condensine I, ni Condensine II ne jouent de rôle majeur direct dans le contrôle de la transcription. Nos résultats invitent à la prudence lorsque l'on cherche à étudier les potentiels rôles des Condensines en dehors de la condensation de la chromatine en mitose, et notamment de prendre en considération les effets indirects engendrés par les déséquilibres génétiques consécutifs à l'instabilité des chromosomes en mitose en l'absence de Condensines fonctionnelles. A ma connaissance, aucune étude publiée à ce jour ne s'est affranchie clairement d'un tel effet indirect. Cette précaution peut d'ailleurs être élargie à toutes les protéines requises à la transmission fidèle des chromosomes en mitose, y compris Cohésine. De manière inattendue, une étude récente a montré que la perte de CTCF ou de Cohésine n'induit pas de changements généralisés de l'expression des gènes en dépit de la perte massive des TADs (Rao et al., 2017), suggérant que l'expression normale de la plupart des gènes ne relèverait pas de la structure des TADs et que le rôle des Cohésines dans l'expression des gènes ne serait pas aussi prépondérant qu'initialement imaginé.

Il demeure possible que nos résultats concernant les Condensines de levures ne soient pas directement transposables à Condensine II. En revanche il semble clair que toutes les Condensines sont requises à la stabilité des chromosomes et la préservation de l'intégrité structurale du génome. Aussi, quel que soit le niveau d'implication des divers complexes Condensines dans les transactions du génome autres que la condensation et la transmission des chromosomes, nos résultats illustrent très clairement l'importance capitale pour l'expérimentateur de séparer les conséquences de l'instabilité génétique causée par la perte de fonction des Condensines des phénotypes étudiés.

L'interaction de Condensine avec des protéines liant les ARNs, parmi lesquelles la sous-unité Rrp6 de l'exosome est intrigante, notamment au regard d'une possible conservation évolutive chez la Drosophile et l'Humain, et également de la reconnaissance croissante des multiples fonctions régulatrices des ARNs sur la chromatine. Mais en l'état de nos connaissances, et forte de mon expérience avec l'expression des gènes, je ne puis pour l'instant considérer ces interactions qu'avec prudence.

Annexe 1 - Tableau des souches utilisées

leu- : leu1-32 ; ura- : ura4D18 or DS/E ; ade- : ade6-210 or -216 ; lys- : lys1-131 ; his- : his3D1

Figure	Numéro de souche		Génotype
Fig. 1,2	LY113	h- leu- ura- ade-	
	LY140	h- leu- ura-	cut14-208
	LY41	h- leu-	cut3-477
Fig. 4	LY3389	h- leu- ura- ade-	cut3-TAP-KanMX6
Fig. 5	LY378	h- ura-	cut3-GFP-ura4+ nda3-KM-311
	LY3448	h+ leu- ura-	dam1-GFP-KanR rrp6-13myc-HygroR
	LY3770	h- ura-	cut3-GFP-ura4+ rrp6-13myc-HygroR nda3-KM-311
Fig. 6	LY3883	h-	rrp6-13myc-KanR
	LY378	h- ura-	cut3-GFP-ura4+ nda3-KM-311
	LY3722	h- leu- ura- ade-	dbp2-7myc-NatR
Fig. 8	LY3726	h- leu- ura- ade-	dbp2-7myc-NatR cut3-GFP-ura4+ nda3-KM-311
	LY113	h- leu- ura- ade-	
	LY1069	h- leu- ura-	cut3-477
Fig. 9	LY25	h- leu- ura- ade-	clr4Δ::LEU2
	LY89	h- leu- ura- ade-	swi6Δ::ura4+
	LY3147	h- leu- ura- ade-	cut3-477 clr4Δ::LEU2
	LY2334	h- leu- ura- ade-	cut3-477 swi6Δ::ura4+
	LY3459	h- leu- ade- his-	KanR-Pnmt41-slp1+
Fig. 10	LY4067	h- leu- ade-	KanR-Pnmt41-slp1+ cnd2-GFP-LEU2
	LY4068	h- leu- ura- his-	KanR-Pnmt41-slp1+ cnd2-GFP-LEU2 cut3-477
	LY4070	h- leu- ade- his-	KanR-Pnmt41-slp1+ cnd2-GFP-LEU2 cut14-208
Fig. 11	LY3448	h+ leu- ura-	dam1-GFP-KanR rrp6-13myc-HygroR cut3-477
	LY3446	h- leu- ura-	dam1-GFP-KanR rrp6-13myc-HygroR cut3-477
	LY3902	h+ leu- ura-	cut3-GFP-ura4+ rrp6-13myc-HygroR nda3-KM-311 cut14-208
Fig. 12	LY1927	h- leu- ura-	dam1-GFP-KanR
	LY3446	h- leu- ura-	dam1-GFP-KanR rrp6-13myc-HygroR cut3-477
	LY3449	h- leu- ura-	dam1-GFP-KanR rrp6-13myc-HygroR
Fig. 13	LY113	h- leu- ura- ade-	
	LY1069	h- leu- ura-	cut3-477
	LY140	h- leu- ura-	cut14-208
	LY979	h- leu- ura- ade-	rrp6Δ::KanR
	LY1155	h-	pfs2-11
Fig. 14	LY1802	h- leu- ura-	cnd2-GFP-LEU2 nda3-KM-311
	LY4539	h+ leu- ura-	dhp1-myc-KanR
	LY4535	h- leu- ura- ade-	dhp1-myc-KanR cnd2-GFP-LEU2
Fig. 14	LY113	h- leu- ura- ade-	
	LY999	h- leu- ura-	cut3-477-NatR
	LY4726	h- leu- ura- ade-	dhp1-154
	LY1284	h+ leu- ura- ade-	dhp1-1-ura4+

	LY4721	h+	leu- ura- ade-	dhp1-1-ura4+ cut3-477-NatR
	LY4722	h-	leu- ura- ade-	dhp1-1-ura4+ cut3-477-NatR
	LY4723	h+	leu- ura- ade-	dhp1-154 cut3-477-NatR
	LY4724	h-	leu- ura- ade-	dhp1-154 cut3-477-NatR
	LY140	h-	leu- ura-	cut14-208
	LY725	h-	leu- ura- ade-	cut14-90
	LY1252	h-	leu- ura- ade-	cut14-180
	LY4771	h-	leu- ura-	dhp1-154ts cut14-208
	LY4772	h-	leu- ura-	dhp1-154ts cut14-90
	LY4773	h-	leu- ura-	dhp1-154ts cut14-180
Manuscript				
Fig. 1, 2	LY113	h-	leu- ura- ade-	
	LY140	h-	leu- ura-	cut14-208
	LY979	h-	leu- ura- ade-	rrp6Δ::KanR
	LY2403	h-	leu- ura-	cut14-208 rrp6Δ::KanR
	LY3966	h-	leu- ura- ade- his-	P81nmt1-dis3:KanR
Fig. 3	LY1238	h-	leu- ura-	cdc10-129
	LY4675	h+	ura-	cdc10-129 cut14-208
	LY4476	h-	leu- ura-	cdc25-22 cdc13-GFP-LEU2
	LY4478	h-	leu- ura-	cdc25-22 cdc13-GFP-LEU2 cut14-208
	LY4067	h-	leu- ade-	P41nmt1-slp1:KanR cn2-GFP-LEU2
	LY4070	h-	leu- ade- his-	P41nmt1-slp1:KanR cn2-GFP-LEU2 cut14-208
Fig. 5	LY113	h-	leu- ura- ade-	
	LY140	h-	leu- ura-	cut14-208
	LY4669	h+	leu- ura-	cdc15-140
	LY4672	h-	leu- ura-	cdc15-140 cut14-208
	LY4632	h-	leu-	cut9-665
	LY4699	h-	leu-	ptr4-1
Fig. 6	LY113	h-	leu- ura- ade-	
	LY140	h-	leu- ura-	cut14-208
	LY4706	h-	leu- ura-	mis6-302
	LY4924	h+	leu- ura-	gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP-Psy1
	LY4925	h-	leu- ura-	gar2-mcherry ade6<<GFP-Psy1 cut14-208
	LY5001	h+	leu- ura-	gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP-Psy1 ptr4-1
	LY5248	h-	leu- ura-	gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP-Psy1 mis6-302
	LY5332	h-	leu- ura- ade-	rrp6-13-MYC:HygroR gar2-GFP::KanR nda3-KM-311
	LY5334	h-	leu- ura- ade-	rrp6-13-MYC:HygroR gar2-GFP::KanR cut14-208 nda3-KM-311
	LY4021	h+	leu- ura- ade-	rrp6-13-MYC:HygroR
	LY4026	h+	leu- ura-	rrp6-13-MYC:HygroR nda3-KM-311 cut14-208
	LY5404	h+	leu- ura-	gar2-GFP:KanR
	LY5405	h-	leu- ura-	gar2-GFP:KanR cut14-208
Fig. S1	LY113	h-	leu- ura- ade-	
	LY140	h-	leu- ura-	cut14-208
	LY979	h-	leu- ura- ade-	rrp6Δ::KanR
	LY1155	h-		pfs2-11
Fig. S2	LY113	h-	leu- ura- ade-	
	LY1266	h-	leu- ura- ade-	cnd1-182

	LY1069	h- leu- ura-	cut3-477
	LY3185	h- leu- ura-	cut3-m26
	LY1252	h- leu- ura- ade-	cut14-180
	LY140	h- leu- ura-	cut14-208
	LY979	h- leu- ura- ade-	rrp6Δ::KanR
	LY2403	h- leu- ura-	cut14-208 rrp6Δ::KanR
	LY1155	h-	pfs2-11
	LY3966	h- leu- ura- ade- his-	P81nmt1-dis3:KanR
	LY4021	h+ leu- ura- ade-	rrp6-13-MYC:HygroR
	LY4025	h+ leu- ura- ade-	rrp6-13-MYC:HygroR cut3-477
Fig. S4	LY4026	h+ leu- ura-	rrp6-13-MYC:HygroR nda3-KM-311 cut14-208
	LY4764	h- leu- ura-	cdc2-as-M17 cdc10-129
	LY4766	h- leu- ura-	cdc2-as-M17 cdc10-129 cut14-208
Fig. S5	LY113	h- leu- ura- ade-	
	LY1069	h- leu- ura-	cut3-477
	LY3185	h- leu- ura-	cut3-m26
	LY1261	h+ leu- ura- ade-	cnd1-175
	LY3186	h- leu- ura-	cut3-i23
	LY725	h- leu- ura- ade-	cut14-90
	LY140	h- leu- ura-	cut14-208
	LY4669	h+ leu- ura-	cdc15-140
	LY4672	h- leu- ura-	cdc15-140 cut14-208
	LY979	h- leu- ura- ade-	rrp6Δ::KanR
	LY5222	h- leu- ura- ade-	rrp6Δ::KanR cdc15-140
	LY4727	h+ leu- ura- ade-	cdc12-112
	LY4857	h- leu- ura-	cdc12-112 cut14-208
Fig. S6	LY4944	h+ leu- ura-	rad22-GFP
	LY4949	leu- ura-	rad22-GFP cut14-208
	LY4951	leu- ura-	rad22-GFP cdc15-140
	LY4953	leu- ura-	rad22-GFP cdc15-140 cut14-208
	LY5118	h- leu- ura-	rad22-GFP nda3-KM-311
	LY4924	h+ leu- ura-	gar2-mcherry:KanR ade6<<GFP-Psy1
	LY4925	h- leu- ura-	gar2-mcherry ade6<<GFP-Psy1 cut14-208
	LY5003	h+ leu- ura-	gar2-mcherry ade6<<GFP-Psy1 cdc15-140
	LY5023	h+ leu- ura-	gar2-mcherry ade6<<GFP-Psy1 cdc15-140 cut14-208
	LY2266	h- ura-	dis3-HA:KanR
	LY2859	h- ura-	dis3-HA:KanR cut14-208

Annexe 2 – Tableau des interacteurs potentiels de Cut3 obtenus par Spectrométrie de Masse

Majority protein IDs	Gene names	Protein names	-Log welch p value	welch Difference	Sequence coverage [%]	Peptides	Mol. weight [kDa]	Sequence length
Q9Y7R3	cnd2	Condensin complex subunit 2	4,07633	14,3929	82,5	58	83,253	742
Q10429	cnd3	Condensin complex subunit 3	3,6731	13,9313	78,7	70	100,49	875
P41003	cut14	Structural maintenance of chromosomes protein 2	4,08836	13,7413	84,6	131	134,14	1172
P41004	cut3	Structural maintenance of chromosomes protein 4	4,34017	13,0166	81,3	147	150,65	1324
O94679	cnd1	Condensin complex subunit 1	4,28522	12,8147	63,5	81	131,32	1158
Q1MTN3	pic1	Inner centromere protein-related protein pic1	7,03432	11,6859	41,8	33	114,47	1018
Q09330	mlo3	mRNA export protein mlo3	7,06594	11,2575	44,7	8	21,791	199
Q09794	ura1	Protein ura1;Glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthase;Aspartate carbamoyltransferase	6,28806	11,1346	15,2	26	248,31	2244
P09322	hhf1	Histone H4	4,53211	11,0483	40,8	4	11,423	103
Q9UU76	puf6	Pumilio homology domain family member 6	6,7969	10,5239	32,1	16	72,634	642
Q8TFH3	ost3	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 3	8,18488	10,3661	23	5	34,983	309
P04910;P04909	hta2;hta1	Histone H2A-beta;Histone H2A-alpha	4,98787	9,82983	28,2	3	13,776	131
Q09181	ste13	Putative ATP-dependent RNA helicase ste13	6,97171	9,69127	36,9	14	54,794	485
Q9P785	SPBC1711.05	LisH domain-containing protein C1711.05	5,94487	9,67515	11,8	4	47,427	451
Q10175	SPAC27F1.06c	Probable peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C27F1.06c	4,40728	9,58683	55,8	15	40,54	362
P31411	vma2	V-type proton ATPase subunit B	8,29941	9,5814	25	9	55,841	503
O13351	pmt3	Ubiquitin-like protein pmt3/smt3	6,32298	9,57511	42,7	3	12,934	117
O94328	nbl1	Borealin homolog Nbl1	7,83881	9,5233	34,8	4	16,18	141
Q09878	SPCC584.01c	Probable sulfite reductase [NADPH] flavoprotein component	5,94541	9,40555	17,8	12	111,35	1006
O42897	rpn3	Probable 26S proteasome regulatory subunit rpn3	6,75591	9,39786	45,1	16	57,346	497
Q9HEQ9	tcg1	Single-stranded TG1-3 DNA-binding protein	6,05849	9,3843	58,5	15	38,002	349
Q1K9C2	sir1	Sulfite reductase [NADPH] subunit beta	4,73117	9,37901	36,9	33	163,84	1473
O14064	bir1	Protein bir1	6,83418	9,27521	45,6	34	112,58	997
O94625	spj1	DnaJ-related protein spj1	7,39675	9,25275	31,8	11	42,383	381
P87144	ths1	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	6,32836	9,21191	31,3	16	80,137	703
O94280	SPBC2G5.01	UPF0674 endoplasmic reticulum membrane protein C2G5.01	7,78847	9,18336	22,5	6	43,097	374

O94335	stt3	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit stt3	8,69975	9,12096	15,3	10	84,973	752
Q09820	upf1	ATP-dependent helicase upf1	7,96629	9,12051	43,6	28	104,53	925
O59739	bag102	BAG family molecular chaperone regulator 1B	5,83761	9,09595	21,8	3	23,325	206
Q9UTE4	SPAC222.08c	Uncharacterized glutamine amidotransferase C222.08c	6,14635	9,08992	38	5	25,901	234
Q09843	rfc2	Replication factor C subunit 2	7,06941	9,05065	33,8	8	37,876	340
Q9H DU3	gal10	Bifunctional protein gal10;UDP-glucose 4-epimerase;Aldose 1-epimerase	6,6509	9,01279	40	21	80,665	713
Q03319	prh1	Probable ATP-dependent RNA helicase prh1	8,30368	8,92673	42,4	19	80,604	719
O14443	fet5	GPN-loop GTPase 3 homolog fet5	8,25043	8,87665	20,3	3	31,536	276
O13696	idh1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, mitochondrial	6,01849	8,84695	53,1	13	38,758	356
Q9URV8	SPBC106.03	UPF0744 protein C106.03	7,26759	8,81041	31,7	8	40,006	357
Q09916	has1	ATP-dependent RNA helicase has1	8,21938	8,8026	26,8	12	65,261	578
O60125	bag101	BAG family molecular chaperone regulator 1A	5,78135	8,79921	30,8	5	22,205	195
O94515	cct6	T-complex protein 1 subunit zeta	6,93346	8,76202	47,5	15	58,548	535
O60182	rfc1	Replication factor C subunit 1	5,72883	8,7474	35,3	19	103,49	934
O14003	rfc3	Replication factor C subunit 3	5,76573	8,64707	36,8	8	38,439	342
Q12126	crk1	Serine/threonine-protein kinase crk1	7,39063	8,62873	22,1	5	38,537	335
O94697	rfc5	Replication factor C subunit 5	5,49262	8,62116	34,4	9	40,403	358
O94462	puf3	mRNA-binding protein puf3	6,29375	8,59926	23,1	13	81,068	732
Q9USZ6	mtr4	mRNA turnover protein 4 homolog	5,62945	8,57315	42,7	8	26,663	241
Q10146	rrp6	Exosome complex exonuclease rrp6	5,29297	8,52826	24,6	13	89,559	777
Q9UT21	SPAC9.07c	Uncharacterized GTP-binding protein C9.07c	5,9269	8,46435	50,3	12	40,375	366
P87048	rpn1	26S proteasome regulatory subunit rpn1	6,92091	8,4122	34,8	20	97,998	891
Q9P6K0	SPAC1527.03	Uncharacterized HTH La-type RNA-binding protein C1527.03	5,45754	8,36181	34,9	11	53,232	475
P18869	leu1	3-isopropylmalate dehydrogenase	4,74176	8,11619	37,2	8	39,732	371
P78921	cct8	Probable T-complex protein 1 subunit theta	4,75456	8,10862	40,1	15	59,955	546
O14126	tbp1	26S protease regulatory subunit 6A	7,44543	8,09833	29,2	8	48,835	438
O60094	pol5	DNA polymerase V	7,80872	8,08378	25	17	109,72	959
P41836	let1	26S protease regulatory subunit 8 homolog	5,81884	8,07249	54,6	16	45,069	403
P36612	mts2	26S protease regulatory subunit 4 homolog	6,37949	8,03305	42,2	14	50,06	448
O94403	SPCC126.11c	Uncharacterized RNA-binding protein C126.11c	7,17367	8,00158	23,5	3	19,765	183
P09627	pma1	Plasma membrane ATPase 1	4,43097	7,99904	20,6	16	99,883	919
Q09702	nrd1	Negative regulator of differentiation 1	5,05804	7,98121	44,4	12	57,76	529

Q9P7H1	clp1	Cdc14-related protein phosphatase Clp1/Flp1	5,95125	7,94269	35,9	13	60,253	537
O74341	cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	4,84389	7,86828	26,5	11	58,48	528
Q9C1X1	pwp2	Periodic tryptophan protein 2 homolog	5,90317	7,83566	15,6	9	95,44	854
Q9P7X8	rpa2	Probable DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	6,61	7,82837	24,7	19	131,69	1174
O74976	SPCC1827.03c	Putative peroxisomal-coenzyme A synthetase	4,2255	7,81944	32,2	12	56,274	512
O60060	arg5	Carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific small chain	6,48546	7,79828	24,8	6	45,661	415
P78811	fuy1	Probable UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	6,33452	7,7553	31,8	10	56,429	506
O74452	scw1	Cell wall integrity protein scw1	5,04096	7,73737	23,4	9	60,393	561
P31209	pabp	Polyadenylate-binding protein, cytoplasmic and nuclear	5,52382	7,68737	27,6	14	71,512	653
Q9P789	SPBP35G2.14	Pumilio domain-containing protein P35G2.14	5,49117	7,68617	28,9	16	114,23	1065
Q10216	SPAC4H3.08	Uncharacterized oxidoreductase C4H3.08	4,52823	7,67613	32,9	6	31,336	286
P40231	cka1	Casein kinase II subunit alpha	4,54618	7,59002	41,9	10	39,527	332
O59778	bio2	Biotin synthase	5,01285	7,56859	23,7	4	40,65	363
O74445	rpt4	Probable 26S protease subunit rpt4	6,74201	7,56712	32,2	8	43,608	388
P40848	dhp1	5-3 exoribonuclease 2	5,17039	7,53173	15,5	11	112,37	991
P87112	not1	General negative regulator of transcription subunit 1	7,4327	7,45067	22	32	237,13	2100
O74191	fkbp39	FK506-binding protein 39 kDa	6,22852	7,43704	17,2	4	39,301	361
Q9P6R3	SPBC13E7.07	Uncharacterized protein C13E7.07	6,36411	7,3606	23,1	7	31,058	273
O14134	elf1	mRNA export factor elf1	5,3317	7,3186	13,7	11	116,7	1057
Q9P7T8	SPAC694.02	Uncharacterized helicase C694.02	7,32812	7,30361	14,4	20	195,06	1717
O13640	gmh4	Uncharacterized alpha-1,2-galactosyltransferase C8D2.17	7,23518	7,27573	14,3	3	36,998	328
O13971	sgd1	Suppressor of glycerol defect protein 1	7,04456	7,27421	17,5	11	87,87	775
O59866	wbp1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit wbp1	5,53188	7,22616	21,1	5	48,898	437
P50999	cct4	T-complex protein 1 subunit delta	5,77374	7,22607	27,1	10	56,968	527
Q9UTF7	SPAC1B2.03c	Putative elongation of fatty acids protein 1	5,58382	7,21546	16,8	3	38,337	334
P40232	ckb1	Casein kinase II subunit beta	5,41685	7,20851	23,4	3	26,677	231
O74442	ubp16	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	6,90173	7,2074	20,6	6	51,581	457
O94567	nrs1	Probable asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	7,27475	7,16461	25,7	8	63,869	568
O42945	prp43	Probable pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase prp43	7,2466	7,14396	27,1	13	83,803	735
O94449	rfc4	Replication factor C subunit 4	5,57809	7,1426	36,3	9	37,654	342
O94284	hmt2	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	5,28321	7,13789	21,1	7	51,574	459
O14326	pub3	E3 ubiquitin-protein ligase pub3	7,54665	7,09851	24,9	12	89,259	786

O60173	dbp7	ATP-dependent RNA helicase dbp7	7,61668	7,04546	27,9	11	78,83	709
O14293	SPAC9E9.09c	Putative aldehyde dehydrogenase-like protein C9E9.09c	5,07034	7,04425	66,8	23	54,768	503
P08096	top2	DNA topoisomerase 2	7,56998	7,01603	16,6	18	167,89	1485
Q10195	SPBC11C1.1.06c	Uncharacterized protein C11C1.1.06c	6,80303	7,01368	11,8	1	19,126	178
O13633	SPBC17A3.05c	Uncharacterized J domain-containing protein C17A3.05c	6,4207	6,99478	13,6	5	46,399	403
P78937	sua1	Sulfate adenyltransferase	4,97159	6,99058	17,8	7	54,754	490
Q10267	upf3	Nonsense-mediated mRNA decay protein 3	6,17328	6,97685	30,2	7	30,935	278
Q09831	ppk14	Serine/threonine-protein kinase ppk14	3,05345	6,948	17,7	7	63,482	566
P78798	pex7	Peroxisomal targeting signal 2 receptor	6,87922	6,94668	30,5	5	34,588	308
P36614	ppe1	Serine/threonine-protein phosphatase ppe1	6,71169	6,92396	28,5	6	35,259	305
O60080	dbp9	ATP-dependent RNA helicase dbp9	7,32302	6,85825	17,1	7	67,45	595
Q01663	pap1	AP-1-like transcription factor	5,44914	6,83851	23,2	8	61,531	552
Q10349	SPAC1F12.07	Putative phosphoserine aminotransferase	4,34972	6,81642	32,1	9	42,797	389
O94511	tsc13	Putative enoyl reductase C646.07c	4,5355	6,8083	19,7	5	34,64	295
Q9UUF2	rar1	Probable methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	5,62453	6,78658	16,9	8	88,88	782
O94550	phb2	Prohibitin-2	5,60519	6,77032	12,5	3	32,338	288
O13804	srp21	Uncharacterized protein C17H9.07	4,13648	6,76207	21,7	2	13,412	120
O94641	hsp104	Heat shock protein 104	4,83606	6,75801	15,8	9	100,51	905
O13870	not3	General negative regulator of transcription subunit 3	6,99546	6,73801	20,5	8	72,759	640
P78953	mid1	Division mal foutue 1 protein	6,33519	6,73723	20,8	13	102,37	920
P30655	pts1	Probable proteasome subunit beta type-5	5,66031	6,72685	11,8	3	29,986	272
O13370	sum3	ATP-dependent RNA helicase ded1	4,91776	6,71783	70,1	37	69,758	636
O74894	rpt3	26S protease regulatory subunit 6B homolog	7,49411	6,71385	45,2	12	43,552	389
Q9Y7Z5	tts1	Tetra-spanning protein 1	6,22735	6,71028	16,5	4	31,57	279
Q09100	rnp24	RNA-binding protein rnp24	7,5686	6,70273	19	5	42,073	369
P40383	exo2	5-3 exoribonuclease 1	5,40836	6,69681	15,3	16	152,59	1328
Q9URM2	SPBC2G5.05	Probable transketolase	5,83015	6,66479	17,2	7	75,181	685
Q10202	dbp3	ATP-dependent RNA helicase dbp3	5,5566	6,65501	19,2	8	63,912	578
Q9P7W3	SPBC1703.07	Probable ATP-citrate synthase subunit 1	6,46227	6,61653	18,4	7	67,203	615
Q9UTE3	seb1	Rpb7-binding protein seb1	5,76153	6,60606	12,1	4	66,439	620
O94267	spt16	FACT complex subunit spt16	4,33482	6,60362	11	10	116,45	1019
Q09171	pdb1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	4,46679	6,6013	33,1	7	39,623	366
O74943	swp1	Uncharacterized protein C553.06	5,53552	6,5954	17,3	4	29,329	271

O94378	SPBC1604.12	Uncharacterized protein C1604.12	3,864	6,56888	32	16	93,285	860
Q96WV0	ure7	Uncharacterized urease accessory protein ureG-like	5,83978	6,5562	35,3	8	31,33	286
Q9HGM5	dbp8	ATP-dependent RNA helicase dbp8	6,28411	6,50706	15,7	6	50,771	453
Q9UT44	pro1	Probable gamma-glutamyl phosphate reductase	4,56185	6,47734	23,1	8	48,706	451
P41887	swo1	Heat shock protein 90 homolog	5,36422	6,47208	34,9	24	80,595	704
O74463	SPCC1739.01	Uncharacterized protein C1739.01	3,82787	6,45554	39,5	13	57,978	547
P36591	dfr1	Dihydrofolate reductase	4,5574	6,45529	17,1	6	51,522	461
O42938	pfk1	6-phosphofructokinase	6,21208	6,4126	54	33	102,55	942
P21696	gpd1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] 1	4,52632	6,40704	22,1	6	41,995	385
O74338	blt1	Mitosis inducer protein blt1	4,95879	6,40314	21	9	78,116	700
O94529	pob3	FACT complex subunit pob3	7,28976	6,3742	14,1	5	57,456	512
O74958	mmi1	YTH domain-containing protein mmi1	7,47116	6,35655	13,3	4	54,538	488
O74828	esf1	Pre-rRNA-processing protein esf1	5,53949	6,35281	15	6	77,753	682
Q09719	dbp10	ATP-dependent RNA helicase dbp10	6,42877	6,33554	14,7	8	94,66	848
P13681	dis2	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-1	5,92106	6,31596	20,5	5	37,636	327
O13849	cpy1	Carboxypeptidase Y	3,77888	6,31202	17,3	10	114,24	1002
Q9UTQ5	SPAC1071.09c	Uncharacterized J domain-containing protein C1071.09c	5,20765	6,26345	12,8	3	32,85	282
O74874	ccr4	Glucose-repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effector	5,10836	6,25879	15,8	7	76,455	690
Q10489	pda1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, mitochondrial	7,38951	6,25485	50,4	14	45,137	409
O42931	rpt1	26S protease regulatory subunit 7 homolog	7,31737	6,2271	42	14	48,965	438
O74511	ekc1	Extragenic suppressor of kinetochore protein 1	5,14972	6,19471	14,4	7	94,966	838
Q9P3A7	cdc48	Cell division cycle protein 48	4,01353	6,18446	14,8	8	90,124	815
P19117	ipp1	Inorganic pyrophosphatase	5,48258	6,17571	20,8	4	32,467	289
P04551	cdc2	Cyclin-dependent kinase 1	6,3955	6,14771	13,8	3	34,358	297
O94486	chr2	Chitin synthase regulatory factor 2	4,95262	6,14726	15,4	5	58,42	512
O13759	csx1	RNA-binding post-transcriptional regulator csx1	3,38449	6,14026	33,2	10	67,87	632
P42657	rad25	DNA damage checkpoint protein rad25	5,18499	6,04183	65,6	12	30,369	270
P41878	rpn11	26S proteasome regulatory subunit rpn11	4,84506	6,0402	20,8	4	34,572	308
Q92359	puf4	Pumilio domain-containing protein C6G9.14	4,29796	5,99613	11,9	5	73,291	681
O14156	ptc4	Protein phosphatase 2C homolog 4	5,4639	5,98342	10,7	4	43,569	383
Q09871	SPAC12G12.07c	Uncharacterized protein C12G12.07c	4,51285	5,96666	18,4	4	45,724	412
Q9Y6Z9	SPAC8E11.10	Sorbose reductase sou1	4,02265	5,94908	12,5	2	27,437	255

Q09740	SPBC12C2.11	Probable glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	7,26117	5,93933	13,4	7	77,321	696
O74454	sts5	Protein sts5	4,68028	5,91417	16	11	117,6	1066
P78814	srp2	Pre-mRNA-splicing factor srp2	5,2987	5,90683	30,4	9	42,566	365
Q9USW1	ath1	Uncharacterized protein C21B10.03c	4,79868	5,89795	19	9	85,523	791
Q9C0X6	rvb1	RuvB-like helicase 1	5,95955	5,86792	62,5	25	50,052	456
P40387	tps1	Alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	5,8124	5,85049	13,6	5	58,493	513
Q10208	pyk1	Pyruvate kinase	5,11171	5,84035	63,7	22	55,514	509
O13824	upf2	Nonsense-mediated mRNA decay protein 2	5,50538	5,81246	12,6	10	122,09	1049
Q10265	ssa1	Probable heat shock protein ssa1	6,04347	5,8076	56,8	31	70,142	644
O43026	gpd3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	6,15402	5,80377	68,1	18	35,674	335
O14139	hrp3	Chromodomain helicase hrp3	6,10224	5,7617	12	12	159,38	1388
O42893	ntp1	Neutral trehalase	4,18768	5,75318	16,2	9	84,602	735
Q9UUE1	pyr1	Pyruvate carboxylase	7,43694	5,72306	10,8	8	130,86	1185
Q9Y7U7	snd1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	6,69767	5,6887	10,6	6	98,16	878
Q9P777	his2	Histidinol dehydrogenase	3,67499	5,65705	17,3	5	47,553	439
O14081	SPACUNK 4.16c	Putative alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 106 kDa subunit	5,87336	5,62571	10,2	6	106,82	944
O59711	lys9	Saccharopine dehydrogenase [NADP(+), L-glutamate-forming]	4,67231	5,58487	15,8	5	49,938	450
O13629	aim22	Putative lipoate-protein ligase A	5,43641	5,5664	18,7	4	40,651	363
O59838	pss1	Heat shock protein homolog pss1	4,78644	5,56318	27,6	14	80,374	720
Q9UTM3	rpn5a	26S proteasome regulatory subunit rpn5	5,54409	5,51937	40,9	15	51,618	443
P87240	not2	General negative regulator of transcription subunit 2	6,44959	5,48553	15,4	3	34,478	306
O74925	pep3	Vacuolar membrane protein pep3	6,71238	5,47223	10,6	6	103,72	900
P00332	adh1	Alcohol dehydrogenase	4,2831	5,40788	64	18	37,396	350
O42947	SPBC16H5.12c	Uncharacterized protein C16H5.12c	4,4485	5,36212	59,4	28	82,52	737
O74407	dps1	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	4,75165	5,36136	11,7	5	66,67	580
P36579	arf1	ADP-ribosylation factor 1	4,2284	5,32348	46,1	6	20,618	180
O94602	SPCC622.15c	Uncharacterized protein C622.15c	3,18811	5,31811	29,1	8	61,801	557
Q10272	crb3	Pre-rRNA-processing protein crb3/ipi3	4,43676	5,28615	16,1	6	49,506	446
P78827	ilv5	Probable ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial	3,66783	5,22052	28,7	9	45,188	404
Q9UTN3	cid14	Poly(A) RNA polymerase cid14	4,39328	5,20541	13,6	5	78,297	684
O14040	dis32	Dis3-like exonuclease C2C4.07c	4,30841	5,17972	12,7	8	105,15	927
O43024	def1	CUE domain-containing protein C354.10	2,97141	5,11573	25,1	13	100,13	963
Q10243	vps26	Vacuolar protein sorting-associated protein 26	6,43971	5,11285	15,1	3	35,779	298
P36604	bip1	78 kDa glucose-regulated protein homolog	5,65835	5,10163	51,3	34	73,226	663

O43036	rpa43	DNA-directed RNA polymerase I subunit rpa43	4,91281	5,06485	12,7	1	19,385	173
Q9UUJ3	rga9	Probable Rho-GTPase-activating protein 9	5,48145	5,04563	12,7	5	76,867	670
O94692	rvb2	RuvB-like helicase 2	5,68389	5,02208	49,5	21	51,561	465
O74484	mpg1	Mannose-1-phosphate guanyltransferase	4,0031	5,01212	11,3	3	39,718	363
O13620	mrd1	Multiple RNA-binding domain-containing protein 1	3,90118	4,97955	17,6	11	93,676	833
O59810	vgl1	Vigilin 1	4,45457	4,96152	13,1	12	142,61	1291
P78820	cut6	Acetyl-CoA carboxylase;Biotin carboxylase	5,65759	4,94248	20,2	31	256,84	2280
O60147	SPBC18H1 0.17c	Uncharacterized protein C18H10.17c	3,87437	4,9406	18,3	2	20,568	175
Q10284	sks2	Heat shock protein sks2	8,42614	4,93698	62,3	26	67,205	613
Q9US25	hrp1	Chromodomain helicase hrp1	5,30331	4,85845	10,9	12	158,55	1373
O43001	syj1	Inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1	4,80142	4,80018	11,7	7	121,82	1076
O14368	hsp16	Heat shock protein 16	3,79226	4,6969	44,8	6	15,968	143
O94501	cct1	T-complex protein 1 subunit alpha	5,29236	4,65355	25	12	60,046	556
O94269	ubp3	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3	2,6735	4,65146	42,4	14	58,081	512
O94260	nxt3	ubiquitin protease cofactor	3,80439	4,60793	48,6	14	47,972	434
Q9USQ1	ctf18	Chromosome transmission fidelity protein 18	4,48844	4,58561	12,8	7	108,65	960
O59855	ssa2	Probable heat shock protein ssa2	4,6412	4,57428	62,9	43	70,232	647
Q10203	SPBC17D1 .05	Uncharacterized protein C17D1.05	3,60938	4,50197	13,9	3	37,873	368
P36580	fba1	Fructose-bisphosphate aldolase	5,16075	4,46025	39,9	9	39,57	358
Q09822	cdc15	Cell division control protein 15	3,6525	4,45592	15,7	9	102,12	927
P41889	cut9	Anaphase-promoting complex subunit cut9	3,61142	4,40018	14,9	7	75,888	671
P78958	tdh1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	7,72984	4,38007	69,6	22	35,869	336
Q09912	psi1	Protein psi1	2,52116	4,29643	19,3	4	40,259	379
P18253	ppi1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3,1613	4,2875	23,5	3	17,402	162
P40370	eno101	Enolase 1-1	4,64209	4,23022	51,3	17	47,435	439
P22774	ssp1	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	4,61095	4,18218	46,6	26	72,976	674
P24782	dbp2	ATP-dependent RNA helicase dbp2	4,31101	4,02378	72,5	40	61,547	550
P42656	rad24	DNA damage checkpoint protein rad24	4,45542	4,0145	58,1	10	30,082	270
O42958	pdic2	DNA topoisomerase 2-associated protein pat1	5,49014	3,72048	39,4	22	84,116	754
O60198	sam1	S-adenosylmethionine synthase	3,73071	3,67153	17,8	4	41,831	382
Q92345	pdic101	Probable pyruvate decarboxylase C1F8.07c	3,96881	3,64463	47,8	19	61,719	569
O74402	hsp78	Heat shock protein 78, mitochondrial	2,95057	3,6331	10,2	7	90,153	803
Q9Y7P6	mug72	Meiotically up-regulated gene 72 protein	2,86521	3,59526	14,8	6	62,846	574
P04913	htb1	Histone H2B-alpha	4,46892	3,55465	38,1	6	13,819	126

Q9P7U2;G 2TRN6	SPAC977. 14c;SPAC7 50.01	Putative aryl-alcohol dehydrogenase C977.14c;Putative aryl-alcohol dehydrogenase C750.01	3,97476	3,5161	22,2	6	39,914	351
P87132	dbs2	Uncharacterized protein C167.05	2,34814	3,50543	20,8	7	65,947	601
O14011	cwf8	Pre-mRNA-splicing factor cwf8	5,13451	3,22335	22,3	6	54,191	488
Q09864	hsp60	Heat shock protein 60, mitochondrial	5,08728	3,19638	44	17	62,167	582
Q9P3W1	tfa1	Transcription initiation factor IIE subunit alpha	2,34458	3,05575	10,8	2	49,116	434
Q9UUG0	fas1	fatty acid synthase beta subunit Fas1	4,36511	3,01398	44	72	230,56	2073
Q09868	cip2	RNA-binding post-transcriptional regulator cip2	4,6159	2,92292	42	13	62,068	576
Q11004	wis2	40 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,93039	2,85053	16	3	40,161	356
O60101	pgk1	Phosphoglycerate kinase	3,38308	2,72755	65	22	43,963	414
O42923	cip1	RNA-binding post-transcriptional regulator cip1	4,2045	2,68803	64,7	19	53,477	490
O74352	hob1	Protein hob1	2,17222	2,64558	22,5	6	51,391	466
Q10289	fas2	fatty acid synthase alpha subunit Fas2	3,66221	2,59177	55,9	79	202,17	1842
Q9USM6	oca8	Probable cytochrome b5 2	1,75316	2,36478	20,9	2	14,252	129
P78804	gdh1	NADP-specific glutamate dehydrogenase	2,88846	2,33732	11,1	4	48,789	451
O42914	oga1	Uncharacterized protein C16A3.08c	2,05505	2,24302	21,8	4	30,949	284
Q10209	SPAC4H3. 01	Uncharacterized J domain- containing protein C4H3.01	4,15373	2,1523	41,6	14	44,768	392

Annexe 3- Participation à une publication

Nucleosome eviction in mitosis assists condensin loading and chromosome condensation (Toselli-Mollereau *et al.* 2016 - The EMBO Journal)

Esther Toselli-Mollereau^{1,†}, Xavier Robellet^{1,†}, Lydia Fauque^{1,†}, Sébastien Lemaire¹, Christoph Schiklenk², Carlo Klein², Clémence Hocquet¹, Pénélope Legros¹, Lia N’Guyen¹, Léo Mouillard¹, Emilie Chautard¹, Didier Auboeuf¹, Christian H Haering² & Pascal Bernard^{1,*}

1 : Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, Univ Lyon, ENS de Lyon, Univ Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Lyon, France

2 : Cell Biology and Biophysics Unit, EMBL, Heidelberg, Germany

† : These authors contributed equally to this work

* : Corresponding author

Au cours de ma thèse j’ai également participé à un projet qui a donné lieu à une publication dans le journal EMBO. Ma participation à cette publication est marginale, j’ai uniquement mis au point et réalisée les expériences de western blots sur les histones et leurs modifications.

Résumé : Plusieurs études ont montré que Condensine est enrichie à proximité des gènes fortement transcrits en mitose. Cependant comment Condensine s’associe à ces régions particulières est peu clair. Dans cet article, les auteurs montrent que Condensine s’accumule sur ou à proximité de régions pauvres en nucléosomes (NDRs) lors de la mitose chez *S. pombe*. Deux co-activateurs de la transcription, l’histone acétyl-transférase Gcn5 et le complexe de remodelage de la chromatine RSC, se lient aux promoteurs proches des sites d’association de Condensine et évincent localement les nucléosomes pour faciliter l’association de Condensine et son action efficace de condensation des chromosomes en mitose. La fonction de Gcn5 semble liée au positionnement de Condensine, puisque ni la localisation de la topoisomérase II, ni celle du *loader* de Cohésine Mis4 est altérée dans un mutant de *gcn5*. Les auteurs proposent que les nucléosomes agissent comme des barrières, gênant l’association initiale de Condensine aux chromosomes, et que les NDRs formées aux gènes fortement transcrits par les co-activateurs de la transcription, constituent un point d’entrée pour que Condensine se lie à de l’ADN génomique libre.

Bibliographie

Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* *25*, 863–874.

Akai, Y., Kurokawa, Y., Nakazawa, N., Tonami-Murakami, Y., Suzuki, Y., Yoshimura, S.H., Iwasaki, H., Shiroiwa, 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*.

Alipour, E., and Marko, J.F. (2012). Self-organization of domain structures by DNA-loop-extruding enzymes. *Nucleic Acids Res.* *40*, 11202–11212.

Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999a). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* *13*, 2148–2158.

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999b). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* *18*, 5399–5410.

Allshire, R.C., and Madhani, H.D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 229–244.

de Almeida, S.F., García-Sacristán, A., Custódio, N., and Carmo-Fonseca, M. (2010). A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Res.* *38*, 8015–8026.

Alt, A., Dang, H.Q., Wells, O.S., Polo, L.M., Smith, M.A., McGregor, G.A., Welte, T., Lehmann, A.R., Pearl, L.H., Murray, J.M., et al. (2017). Specialized interfaces of Smc5/6 control hinge stability and DNA association. *Nat. Commun.* *8*, 14011.

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.

Anderson, D.E., Losada, A., Erickson, H.P., and Hirano, T. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J. Cell Biol.* *156*, 419–424.

Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., et al. (2014). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* *507*, 455–461.

Andrulis, E.D., Werner, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lis, J.T. (2002). The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* *420*, 837–841.

Aoi, Y., Kawashima, S.A., Simanis, V., Yamamoto, M., and Sato, M. (2014). Optimization of the analogue-sensitive Cdc2/Cdk1 mutant by in vivo selection eliminates physiological limitations to its use in cell cycle analysis. *Open Biol.* *4*.

Aono, N., Sutani, T., Tomonaga, T., Mochida, S., and Yanagida, M. (2002). Cnd2 has dual roles in mitotic condensation and interphase. *Nature* *417*, 197–202.

- Arigo, J.T., Eyer, D.E., Carroll, K.L., and Corden, J.L. (2006). Termination of Cryptic Unstable Transcripts Is Directed by Yeast RNA-Binding Proteins Nrd1 and Nab3. *Mol. Cell* 23, 841–851.
- Artieri, C.G., and Fraser, H.B. (2014). Evolution at two levels of gene expression in yeast. *Genome Res.* 24, 411–421.
- Bacher, C.P., Guggiari, M., Brors, B., Augui, S., Clerc, P., Avner, P., Eils, R., and Heard, E. (2006). Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat. Cell Biol.* 8, 293–299.
- Bader, D.M., Wilkening, S., Lin, G., Tekkedil, M.M., Dietrich, K., Steinmetz, L.M., and Gagneur, J. (2015). Negative feedback buffers effects of regulatory variants. *Mol. Syst. Biol.* 11, 785.
- Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M.C., and Sherratt, D.J. (2012). In Vivo Architecture and Action of Bacterial Structural Maintenance of Chromosome Proteins. *Science* 338, 528–531.
- Ball, J., Schmiesing, J.A., Zhou, C., Gregson, H.C., Okada, Y., Doi, T., and Yokomori, K. (2002). Identification of a Chromosome-Targeting Domain in the Human Condensin Subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5769–5781.
- Bank, E.M., and Gruenbaum, Y. (2011). The nuclear lamina and heterochromatin: a complex relationship. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1705–1709.
- Bauer, C.R., Hartl, T.A., and Bosco, G. (2012). Condensin II Promotes the Formation of Chromosome Territories by Inducing Axial Compaction of Polyploid Interphase Chromosomes. *PLOS Genet.* 8, e1002873.
- Baxter, J., Sen, N., Martínez, V.L., Carandini, M.E.M.D., Schwartzman, 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.
- Bernard, P., Maure, J.-F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.-P., and Allshire, R.C. (2001). Requirement of Heterochromatin for Cohesion at Centromeres. *Science* 294, 2539–2542.
- Betts Lindroos, H., Ström, L., Itoh, T., Katou, Y., Shirahige, K., and Sjögren, C. (2006). Chromosomal Association of the Smc5/6 Complex Reveals that It Functions in Differently Regulated Pathways. *Mol. Cell* 22, 755–767.
- 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.
- Birkenbihl, R.P., and Subramani, S. (1992). Cloning and characterization of rad21 an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in DNA double-strand-break repair. *Nucleic Acids Res.* 20, 6605–6611.
- Bitton, D.A., Atkinson, S.R., Rallis, C., Smith, G.C., Ellis, D.A., Chen, Y.Y.C., Malecki, M., Codlin, S., Lemay, J.-F., Cotobal, C., et al. (2015). Widespread exon skipping triggers degradation by nuclear RNA surveillance in fission yeast. *Genome Res.* 25, 884–896.

- Blasius, M., Wagner, S.A., Choudhary, C., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2014). A quantitative 14-3-3 interaction screen connects the nuclear exosome targeting complex to the DNA damage response. *Genes Dev.* *28*, 1977–1982.
- Booth, G.T., Wang, I.X., Cheung, V.G., and Lis, J.T. (2016). Divergence of a conserved elongation factor and transcription regulation in budding and fission yeast. *Genome Res.* *26*, 799–811.
- Bortle, K.V., Nichols, M.H., Li, L., Ong, C.-T., Takenaka, N., Qin, Z.S., and Corces, V.G. (2014). Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome Biol.* *15*, R82.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a Regulated Pathway for Nuclear Pre-mRNA Turnover. *Cell* *102*, 765–775.
- Britton, R.A., Lin, D.C.-H., and Grossman, A.D. (1998). Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.* *12*, 1254–1259.
- Brugiolo, M., Herzelt, L., and Neugebauer, K.M. (2013). Counting on co-transcriptional splicing. *F1000Prime Rep* *5*.
- Bühler, M., Haas, W., Gygi, S.P., and Moazed, D. (2007). RNAi-Dependent and -Independent RNA Turnover Mechanisms Contribute to Heterochromatic Gene Silencing. *Cell* *129*, 707–721.
- Bulger, M., and Groudine, M. (2011). Functional and Mechanistic Diversity of Distal Transcription Enhancers. *Cell* *144*, 327–339.
- Buratowski, S. (2003). The CTD code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *10*, 679–680.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* *56*, 549–561.
- Bürmann, F., Shin, H.-C., Basquin, J., Soh, Y.-M., Giménez-Oya, V., Kim, Y.-G., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2013). An asymmetric SMC–kleisin bridge in prokaryotic condensin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 371–379.
- Callahan, K.P., and Butler, J.S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res.* *36*, 6645–6655.
- Canavan, R., and Bond, U. (2007). Deletion of the nuclear exosome component RRP6 leads to continued accumulation of the histone mRNA HTB1 in S-phase of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *35*, 6268–6279.
- Canudas, S., and Smith, S. (2009). Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J. Cell Biol.* *187*, 165–173.
- Carneiro, T., Carvalho, C., Braga, J., Rino, J., Milligan, L., Tollervey, D., and Carmo-Fonseca, M. (2007). Depletion of the Yeast Nuclear Exosome Subunit Rrp6 Results in Accumulation of Polyadenylated RNAs in a Discrete Domain within the Nucleolus. *Mol. Cell Biol.* *27*, 4157–4165.
- Chalamcharla, V.R., Folco, H.D., Dhakshnamoorthy, J., and Grewal, S.I.S. (2015). Conserved factor Dhp1/Rat1/Xrn2 triggers premature transcription termination and nucleates heterochromatin to promote gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 15548–15555.

- Cheeseman, I.M., Enquist-Newman, M., Müller-Reichert, T., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2001). Mitotic Spindle Integrity and Kinetochores Linked by the Duo1p/Dam1p Complex. *J. Cell Biol.* *152*, 197–212.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bähler, J. (2003). Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. *Mol. Biol. Cell* *14*, 214–229.
- Chen, D., Dundr, M., Wang, C., Leung, A., Lamond, A., Misteli, T., and Huang, S. (2005). Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J. Cell Biol.* *168*, 41–54.
- Chen, E.S., Sutani, T., and Yanagida, M. (2004). Cti1/C1D interacts with condensin SMC hinge and supports the DNA repair function of condensin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8078–8083.
- Chen, F.X., Smith, E.R., and Shilatifard, A. (2018). Born to run: control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 464–478.
- Churchman, L.S., and Weissman, J.S. (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* *469*, 368–373.
- 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.
- Clemente-Blanco, A., Mayán-Santos, M., Schneider, D.A., Machín, F., Jarmuz, A., Tschöchner, 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.
- Cloutier, S.C., Ma, W.K., Nguyen, L.T., and Tran, E.J. (2012). The DEAD-box RNA Helicase Dbp2 Connects RNA Quality Control with Repression of Aberrant Transcription. *J. Biol. Chem.* *287*, 26155–26166.
- Colin, J., Candelli, T., Porrua, O., Boulay, J., Zhu, C., Lacroute, F., Steinmetz, L.M., and Libri, D. (2014). Roadblock Termination by Reb1p Restricts Cryptic and Readthrough Transcription. *Mol. Cell* *56*, 667–680.
- Core, L.J., and Lis, J.T. (2008). Transcription Regulation Through Promoter-Proximal Pausing of RNA Polymerase II. *Science* *319*, 1791–1792.
- 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 remodelling of X chromosome topology during dosage compensation. *Nature* *523*, 240–244.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome Territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a003889.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I., and Fakan, S. (2006). Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 307–316.

- Csankovszki, G., Petty, E.L., and Collette, K.S. (2009). The worm solution: a chromosome-full of condensin helps gene expression go down. *Chromosome Res.* *17*, 621–635.
- 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.
- D'Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008a). Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* *22*, 2215–2227.
- D'Ambrosio, C., Kelly, G., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008b). Condensin-Dependent rDNA Decatenation Introduces a Temporal Pattern to Chromosome Segregation. *Curr. Biol.* *18*, 1084–1089.
- 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.
- Darnell, R.B. (2010). HITS-CLIP: panoramic views of protein–RNA regulation in living cells. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *1*, 266–286.
- Degner, S.C., Verma-Gaur, J., Wong, T.P., Bossen, C., Iverson, G.M., Torkamani, A., Vettermann, C., Lin, Y.C., Ju, Z., Schulz, D., et al. (2011). CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 9566–9571.
- Delan-Forino, C., Schneider, C., and Tollervey, D. (2017). Transcriptome-wide analysis of alternative routes for RNA substrates into the exosome complex. *PLOS Genet.* *13*, e1006699.
- Deng, W., Lee, J., Wang, H., Miller, J., Reik, A., Gregory, P.D., Dean, A., and Blobel, G.A. (2012). Controlling Long-Range Genomic Interactions at a Native Locus by Targeted Tethering of a Looping Factor. *Cell* *149*, 1233–1244.
- Deng, W., Rupon, J.W., Krivega, I., Breda, L., Motta, I., Jahn, K.S., Reik, A., Gregory, P.D., Rivella, S., Dean, A., et al. (2014). Reactivation of Developmentally Silenced Globin Genes by Forced Chromatin Looping. *Cell* *158*, 849–860.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* *485*, 376–380.
- Dorsett, D., and Merckenschlager, M. (2013). Cohesin at active genes: a unifying theme for cohesin and gene expression from model organisms to humans. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 327–333.
- Downen, J.M., Bilodeau, S., Orlando, D.A., Hübner, M.R., Abraham, B.J., Spector, D.L., and Young, R.A. (2013). Multiple Structural Maintenance of Chromosome Complexes at Transcriptional Regulatory Elements. *Stem Cell Rep.* *1*, 371–378.
- Earnshaw, W.C., and Laemmli, U.K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* *96*, 84–93.

- 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.
- Eeftens, J.M., Bisht, S., Kerssemakers, J., Kschonsak, M., Haering, C.H., and Dekker, C. (2017). Real-time detection of condensin-driven DNA compaction reveals a multistep binding mechanism. *EMBO J.* *36*, 3448–3457.
- Egan, E.D., Braun, C.R., Gygi, S.P., and Moazed, D. (2014). Post-transcriptional regulation of meiotic genes by a nuclear RNA silencing complex. *RNA* *20*, 867–881.
- Ercan, S., and Lieb, J.D. (2009). *C. elegans* dosage compensation: A window into mechanisms of domain-scale gene regulation. *Chromosome Res.* *17*, 215–227.
- Ercan, S., Giresi, P.G., Whittle, C.M., Zhang, X., Green, R.D., and Lieb, J.D. (2007). X chromosome repression by localization of the *C. elegans* dosage compensation machinery to sites of transcription initiation. *Nat. Genet.* *39*, 403–408.
- Erdemir, T., Bilican, B., Cagatay, T., Goding, C.R., and Yavuzer, U. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* C1D is implicated in both non-homologous DNA end joining and homologous recombination. *Mol. Microbiol.* *46*, 947–957.
- Estojak, J., Brent, R., and Golemis, E.A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5820–5829.
- Eychenne, T., Werner, M., and Soutourina, J. (2017). Toward understanding of the mechanisms of Mediator function in vivo: Focus on the preinitiation complex assembly. *Transcription* *8*, 328–342.
- Falk, S., Bonneau, F., Ebert, J., Kögel, A., and Conti, E. (2017). Mpp6 Incorporation in the Nuclear Exosome Contributes to RNA Channeling through the Mtr4 Helicase. *Cell Rep.* *20*, 2279–2286.
- Faure, A.J., Schmidt, D., Watt, S., Schwalie, P.C., Wilson, M.D., Xu, H., Ramsay, R.G., Odom, D.T., and Flicek, P. (2012). Cohesin regulates tissue-specific expression by stabilizing highly occupied cis-regulatory modules. *Genome Res.* *22*, 2163–2175.
- Fazio, T.G., and Panning, B. (2010). Condensin complexes regulate mitotic progression and interphase chromatin structure in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* *188*, 491–503.
- Feigenbutz, M., Garland, W., Turner, M., and Mitchell, P. (2013a). The Exosome Cofactor Rrp47 Is Critical for the Stability and Normal Expression of Its Associated Exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* *8*, e80752.
- Feigenbutz, M., Jones, R., Besong, T.M.D., Harding, S.E., and Mitchell, P. (2013b). Assembly of the Yeast Exoribonuclease Rrp6 with Its Associated Cofactor Rrp47 Occurs in the Nucleus and Is Critical for the Controlled Expression of Rrp47. *J. Biol. Chem.* *288*, 15959–15970.
- Flemming, W. (1965). CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE CELL AND ITS VITAL PROCESSES. *J. Cell Biol.* *25*, 3–69.
- Flynn, R.A., Almada, A.E., Zamudio, J.R., and Sharp, P.A. (2011). Antisense RNA polymerase II divergent transcripts are P-TEFb dependent and substrates for the RNA exosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 10460–10465.

- Forsburg, S.L., and Rhind, N. (2006). Basic Methods for Fission Yeast. *Yeast* Chichester Engl. 23, 173–183.
- Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., Hoon, M. de, Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., and Fagagna, F. d'Adda di (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* 488, 231–235.
- 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.
- Fussner, E., Ching, R.W., and Bazett-Jones, D.P. (2011). Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem. Sci.* 36, 1–6.
- 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.
- Gard, S., Light, W., Xiong, B., Bose, T., McNairn, A.J., Harris, B., Fleharty, B., Seidel, C., Brickner, J.H., and Gerton, J.L. (2009). Cohesinopathy mutations disrupt the subnuclear organization of chromatin. *J. Cell Biol.* 187, 455–462.
- Gassler, J., Brandão, H.B., Imakaev, M., Flyamer, I.M., Ladstätter, S., Bickmore, W.A., Peters, J.-M., Mirny, L.A., and Tachibana, K. (2017). A mechanism of cohesin-dependent loop extrusion organizes zygotic genome architecture. *EMBO J.* 36, 3600–3618.
- Gelpi, C., Algueró, A., Martínez, M.A., Vidal, S., Juárez, C., and Rodríguez-Sánchez, J.L. (1990). Identification of protein components reactive with anti-PM/Scl autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 81, 59–64.
- 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.
- Gibcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* 359.
- Giet, R., and Glover, D.M. (2001). Drosophila Aurora B Kinase Is Required for Histone H3 Phosphorylation and Condensin Recruitment during Chromosome Condensation and to Organize the Central Spindle during Cytokinesis. *J. Cell Biol.* 152, 669–682.
- Gligoris, T.G., Scheinost, J.C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K.-L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2014). Closing the cohesin ring: Structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science* 346, 963–967.
- Gobbini, E., Cassani, C., Villa, M., Bonetti, D., and Longhese, M.P. (2016). Functions and regulation of the MRX complex at DNA double-strand breaks. *Microb. Cell* 3, 329–337.
- Godde, J.S., and Widom, J. (1992). Chromatin structure of *Schizosaccharomyces pombe*: A nucleosome repeat length that is shorter than the chromatosomal DNA length. *J. Mol. Biol.* 226, 1009–1025.
- Golemis, E.A., and Brent, R. (1992). Fused protein domains inhibit DNA binding by LexA. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3006–3014.

- 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. *ELife* *5*, e14864.
- Gottesfeld, J.M., and Forbes, D.J. (1997). Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 197–202.
- Graham, A.C., Kiss, D.L., and Andrulis, E.D. (2009). Core Exosome-independent Roles for Rrp6 in Cell Cycle Progression. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2242–2253.
- Granneman, S., Kudla, G., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2009). Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9613–9618.
- Green, L.C., Kalitsis, P., Chang, T.M., Cipetic, M., Kim, J.H., Marshall, O., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Vagnarelli, P., Samejima, K., et al. (2012). Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. *J Cell Sci* *125*, 1591–1604.
- 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.
- Grigoryev, S.A., and Woodcock, C.L. (2012). Chromatin organization — The 30nm fiber. *Exp. Cell Res.* *318*, 1448–1455.
- Gruber, S. (2011). MukBEF on the march: taking over chromosome organization in bacteria? *Mol. Microbiol.* *81*, 855–859.
- Gruber, S., and Errington, J. (2009). Recruitment of Condensin to Replication Origin Regions by ParB/SpoOJ Promotes Chromosome Segregation in *B. subtilis*. *Cell* *137*, 685–696.
- Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2006). Evidence that Loading of Cohesin Onto Chromosomes Involves Opening of Its SMC Hinge. *Cell* *127*, 523–537.
- Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, A. (1997). A Direct Link between Sister Chromatid Cohesion and Chromosome Condensation Revealed through the Analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* *91*, 47–57.
- Gudipati, R.K., Xu, Z., Lebreton, A., Séraphin, B., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., and Libri, D. (2012). Extensive Degradation of RNA Precursors by the Exosome in Wild-Type Cells. *Mol. Cell* *48*, 409–421.
- Gullerova, M., and Proudfoot, N.J. (2008). Cohesin Complex Promotes Transcriptional Termination between Convergent Genes in *S. pombe*. *Cell* *132*, 983–995.
- Haarhuis, J.H.I., van der Weide, R.H., Blomen, V.A., Yáñez-Cuna, J.O., Amendola, M., van Ruiten, M.S., Krijger, P.H.L., Teunissen, H., Medema, R.H., van Steensel, B., et al. (2017). The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension. *Cell* *169*, 693-707.e14.

- Hadjur, S., Williams, L.M., Ryan, N.K., Cobb, B.S., Sexton, T., Fraser, P., Fisher, A.G., and Merckenschlager, M. (2009). Cohesins form chromosomal *cis*-interactions at the developmentally regulated *IFNG* locus. *Nature* *460*, 410–413.
- Haering, C.H., Löwe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex. *Mol. Cell* *9*, 773–788.
- Haering, C.H., Schoffnegger, D., Nishino, T., Helmhart, W., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2004). Structure and Stability of Cohesin's Smc1-Kleisin Interaction. *Mol. Cell* *15*, 951–964.
- Haering, C.H., Farcas, A.-M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* *454*, 297–301.
- 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.
- Han, J., and van Hoof, A. (2016). The RNA Exosome Channeling and Direct Access Conformations Have Distinct In Vivo Functions. *Cell Rep.* *16*, 3348–3358.
- Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* *442*, 45–50.
- Harlen, K.M., and Churchman, L.S. (2017). The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 263–273.
- Harris, B., Bose, T., Lee, K.K., Wang, F., Lu, S., Ross, R.T., Zhang, Y., French, S.L., Beyer, A.L., Slaughter, B.D., et al. (2014). Cohesion promotes nucleolar structure and function. *Mol. Biol. Cell* *25*, 337–346.
- He, H., Zhang, S., Wang, D., Hochwagen, A., and Li, F. (2016). Condensin Promotes Position Effects within Tandem DNA Repeats via the RITS Complex. *Cell Rep.* *14*, 1018–1024.
- Heale, J.T., Ball, A.R., Schmiesing, J.A., Kim, J.-S., Kong, X., Zhou, S., Hudson, D.F., Earnshaw, W.C., and Yokomori, K. (2006). Condensin I Interacts with the PARP-1-XRCC1 Complex and Functions in DNA Single-Strand Break Repair. *Mol. Cell* *21*, 837–848.
- Heidinger-Pauli, J.M., Ünal, E., Guacci, V., and Koshland, D. (2008). The Kleisin Subunit of Cohesin Dictates Damage-Induced Cohesion. *Mol. Cell* *31*, 47–56.
- Heidinger-Pauli, J.M., Ünal, E., and Koshland, D. (2009). Distinct Targets of the Eco1 Acetyltransferase Modulate Cohesion in S Phase and in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* *34*, 311–321.
- Heidinger-Pauli, J.M., Mert, O., Davenport, C., Guacci, V., and Koshland, D. (2010). Systematic Reduction of Cohesin Differentially Affects Chromosome Segregation, Condensation, and DNA Repair. *Curr. Biol.* *20*, 957–963.
- Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* *2*, 189–194.
- Herzel, L., Ottoz, D.S.M., Alpert, T., and Neugebauer, K.M. (2017). Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 637–650.

Herzog, S., Jaiswal, S.N., Urban, E., Riemer, A., Fischer, S., and Heidmann, S.K. (2013). Functional Dissection of the *Drosophila melanogaster* Condensin Subunit Cap-G Reveals Its Exclusive Association with Condensin I. *PLOS Genet.* *9*, e1003463.

Hieronimus, H., Yu, M.C., and Silver, P.A. (2004). Genome-wide mRNA surveillance is coupled to mRNA export. *Genes Dev.* *18*, 2652–2662.

Hihara, S., Pack, C.-G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., et al. (2012). Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells. *Cell Rep.* *2*, 1645–1656.

Hirano, M. (2002). Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J.* *21*, 5733–5744.

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

Hirano, T., Kobayashi, R., and Hirano, M. (1997). Condensins, Chromosome Condensation Protein Complexes Containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* Homolog of the *Drosophila* Barren Protein. *Cell* *89*, 511–521.

Hiriart, E., Vavasseur, A., Touat-Todeschini, L., Yamashita, A., Gilquin, B., Lambert, E., Perot, J., Shichino, Y., Nazaret, N., Boyault, C., et al. (2012). Mmi1 RNA surveillance machinery directs RNAi complex RITS to specific meiotic genes in fission yeast. *EMBO J.* *31*, 2296–2308.

Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* *117*, 6435–6445.

Hoffelder, D.R., Luo, L., Burke, N.A., Watkins, S.C., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* *112*, 389–397.

Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 529–539.

Hu, B., Itoh, T., Mishra, A., Katoh, Y., Chan, K.-L., Upcher, W., Godlee, C., Roig, M.B., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2011). ATP Hydrolysis Is Required for Relocating Cohesin from Sites Occupied by Its Scc2/4 Loading Complex. *Curr. Biol. CB* *21*, 12–24.

Huang, C.E., Milutinovich, M., and Koshland, D. (2005). Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for SMC complexes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *360*, 537–542.

Huang, J., Marco, E., Pinello, L., and Yuan, G.-C. (2015). Predicting chromatin organization using histone marks. *Genome Biol.* *16*, 162.

Hudson, D.F., Ohta, S., Freisinger, T., Maclsaac, F., Sennels, L., Alves, F., Lai, F., Kerr, A., Rappsilber, J., and Earnshaw, W.C. (2008). Molecular and Genetic Analysis of Condensin Function in Vertebrate Cells. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3070–3079.

Ideue, T., Azad, A.K., Yoshida, J., Matsusaka, T., Yanagida, M., Ohshima, Y., and Tani, T. (2004). The nucleolus is involved in mRNA export from the nucleus in fission yeast. *J. Cell Sci.* *117*, 2887–2895.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4569–4574.

- Iwasaki, O., Tanaka, A., Tanizawa, H., Grewal, S.I.S., and Noma, K. (2010). Centromeric Localization of Dispersed Pol III Genes in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* *21*, 254–265.
- Iwasaki, O., Tanizawa, H., Kim, K.-D., Yokoyama, Y., Corcoran, C.J., Tanaka, A., Skordalakes, E., Showe, L.C., and Noma, K. (2015). Interaction between TBP and Condensin Drives the Organization and Faithful Segregation of Mitotic Chromosomes. *Mol. Cell*.
- Iwasaki, O., Corcoran, C.J., and Noma, K. (2016). Involvement of condensin-directed gene associations in the organization and regulation of chromosome territories during the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* *44*, 3618–3628.
- Jans, J., Gladden, J.M., Ralston, E.J., Pickle, C.S., Michel, A.H., Pferdehirt, R.R., Eisen, M.B., and Meyer, B.J. (2009). A condensin-like dosage compensation complex acts at a distance to control expression throughout the genome. *Genes Dev.* *23*, 602–618.
- Janssen, A., Burg, M. van der, Szuhai, K., Kops, G.J.P.L., and Medema, R.H. (2011). Chromosome Segregation Errors as a Cause of DNA Damage and Structural Chromosome Aberrations. *Science* *333*, 1895–1898.
- Jia, H., Wang, X., Liu, F., Guenther, U.-P., Srinivasan, S., Anderson, J.T., and Jankowsky, E. (2011). The RNA Helicase Mtr4p Modulates Polyadenylation in the TRAMP Complex. *Cell* *145*, 890–901.
- Johzuka, K., and Horiuchi, T. (2009). The cis Element and Factors Required for Condensin Recruitment to Chromosomes. *Mol. Cell* *34*, 26–35.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* *467*, 430–435.
- Kakui, Y., Rabinowitz, A., Barry, D.J., and Uhlmann, F. (2017). Condensin-mediated remodeling of the mitotic chromatin landscape in fission yeast. *Nat. Genet.* *advance online publication*.
- Kalam Azad, A., Ideue, T., Ohshima, Y., and Tani, T. (2003). A mutation in the gene involved in sister chromatid separation causes a defect in nuclear mRNA export in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *310*, 176–181.
- Kanke, M., Nishimura, K., Kanemaki, M., Kakimoto, T., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., and Masukata, H. (2011). Auxin-inducible protein depletion system in fission yeast. *BMC Cell Biol.* *12*, 8.
- Kao, L., Wang, Y.-T., Chen, Y.-C., Tseng, S.-F., Jhang, J.-C., Chen, Y.-J., and Teng, S.-C. (2014). Global Analysis of Cdc14 Dephosphorylation Sites Reveals Essential Regulatory Role in Mitosis and Cytokinesis. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 594–605.
- Kilchert, C., Wittmann, S., and Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 227–239.
- Kim, H.-S., Mukhopadhyay, R., Rothbart, S.B., Silva, A.C., Vanoosthuyse, V., Radovani, E., Kislinger, T., Roguev, A., Ryan, C.J., Xu, J., et al. (2014). Identification of a BET family Bromodomain / Casein Kinase II / TAF-containing complex as a regulator of mitotic condensin function. *Cell Rep.* *6*, 892.
- Kim, J.H., Zhang, T., Wong, N.C., Davidson, N., Maksimovic, J., Oshlack, A., Earnshaw, W.C., Kalitsis, P., and Hudson, D.F. (2013). Condensin I associates with structural and gene regulatory regions in vertebrate chromosomes. *Nat. Commun.* *4*.

- Kim, K.-D., Tanizawa, H., Iwasaki, O., and Noma, K. (2016). Transcription factors mediate condensin recruitment and global chromosomal organization in fission yeast. *Nat. Genet.* *48*, 1242–1252.
- Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeá, E., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* *432*, 517–522.
- 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.
- Kimura, K., and Hirano, T. (2000). Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 11972–11977.
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T. (1998). Phosphorylation and Activation of 13S Condensin by Cdc2 in Vitro. *Science* *282*, 487–490.
- 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.
- Kiss, D.L., and Andrulis, E.D. (2011). The exozyme model: A continuum of functionally distinct complexes. *RNA* *17*, 1–13.
- Køhler, J.B., Tammsalu, T., Jørgensen, M.M., Steen, N., Hay, R.T., and Thon, G. (2015). Targeting of SUMO substrates to a Cdc48–Ufd1–Npl4 segregase and STUbL pathway in fission yeast. *Nat. Commun.* *6*, 8827.
- Kojic, A., Ana, C., Koninck, M.D., Gomez-Lopez, G., Rodriguez-Corsino, M., Dily, F.L., Marti-Renom, M., and Losada, A. (2017). Distinct roles of cohesin-SA1 and cohesin-SA2 in 3D chromosome organization. *BioRxiv* 166264.
- Kolonin, M.G., Zhong, J., and Finley, R.L. (2000). Interaction mating methods in two-hybrid systems. *Methods Enzymol.* *328*, 26–46.
- Kong, X., Stephens, J., Jr, A.R.B., Heale, J.T., Newkirk, D.A., Berns, M.W., and Yokomori, K. (2011). Condensin I Recruitment to Base Damage-Enriched DNA Lesions Is Modulated by PARP1. *PLOS ONE* *6*, e23548.
- Krantz, I.D., McCallum, J., DeScipio, C., Kaur, M., Gillis, L.A., Yaeger, D., Jukofsky, L., Wasserman, N., Bottani, A., Morris, C.A., et al. (2004). Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat. Genet.* *36*, 631–635.
- Kranz, A.-L., Jiao, C.-Y., Winterkorn, L., Albritton, S., Kramer, M., and Ercan, S. (2013). Genome-wide analysis of condensin binding in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* *14*, R112.
- Kruesi, W.S., Core, L.J., Waters, C.T., Lis, J.T., and Meyer, B.J. (2013). Condensin controls recruitment of RNA polymerase II to achieve nematode X-chromosome dosage compensation. *ELife* *2*, e00808.
- 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.
- Laloraya, S., Guacci, V., and Koshland, D. (2000). Chromosomal Addresses of the Cohesin Component Mcd1p. *J Cell Biol* *151*, 1047–1056.

- 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.
- Lejeune, E., Bayne, E.H., and Allshire, R.C. (2010). On the Connection between RNAi and Heterochromatin at Centromeres. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *75*, 275–283.
- Lemay, J.-F., D'Amours, A., Lemieux, C., Lackner, D.H., St-Sauveur, V.G., Bähler, J., and Bachand, F. (2010). The Nuclear Poly(A)-Binding Protein Interacts with the Exosome to Promote Synthesis of Noncoding Small Nucleolar RNAs. *Mol. Cell* *37*, 34–45.
- Lemay, J.-F., Larochele, M., Marguerat, S., Atkinson, S., Bähler, J., and Bachand, F. (2014). The RNA exosome promotes transcription termination of backtracked RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, nsmb.2893.
- Lemieux, C., Marguerat, S., Lafontaine, J., Barbezier, N., Bähler, J., and Bachand, F. (2011). A Pre-mRNA Degradation Pathway that Selectively Targets Intron-Containing Genes Requires the Nuclear Poly(A)-Binding Protein. *Mol. Cell* *44*, 108–119.
- Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G.P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2004). Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* *430*, 573–578.
- Li, L., Lyu, X., Hou, C., Takenaka, N., Nguyen, H.Q., Ong, C.-T., Cubeñas-Potts, C., Hu, M., Lei, E.P., Bosco, G., et al. (2015a). Widespread Rearrangement of 3D Chromatin Organization Underlies Polycomb-Mediated Stress-Induced Silencing. *Mol. Cell* *58*, 216–231.
- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A.Y., Merkurjev, D., Zhang, J., Ohgi, K., Song, X., et al. (2013). Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* *498*, 516–520.
- Li, W., Hu, Y., Oh, S., Ma, Q., Merkurjev, D., Song, X., Zhou, X., Liu, Z., Tanasa, B., He, X., et al. (2015b). Condensin I and II Complexes License Full Estrogen Receptor α -Dependent Enhancer Activation. *Mol. Cell* *59*, 188–202.
- Libri, D. (2015). Endless Quarrels at the End of Genes. *Mol. Cell* *60*, 192–194.
- Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., and Jensen, T.H. (2002). Interactions between mRNA Export Commitment, 3'-End Quality Control, and Nuclear Degradation. *Mol. Cell Biol.* *22*, 8254–8266.
- Lieberman-Aiden, E., Berkum, N.L. van, Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science* *326*, 289–293.
- Lindsay, H.D., Griffiths, D.J.F., Edwards, R.J., Christensen, P.U., Murray, J.M., Osman, F., Walworth, N., and Carr, A.M. (1998). S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* *12*, 382–395.
- Lioy, V.S., Cournac, A., Marbouty, M., Duigou, S., Mozziconacci, J., Espéli, O., Boccard, F., and Koszul, R. (2018). Multiscale Structuring of the *E. coli* Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. *Cell* *172*, 771-783.e18.

- 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.
- Liu, C., Wang, C., Wang, G., Becker, C., Zaidem, M., and Weigel, D. (2016). Genome-wide analysis of chromatin packing in *Arabidopsis thaliana* at single-gene resolution. *Genome Res.* *26*, 1057–1068.
- Liu, H., Rankin, S., and Yu, H. (2013). Phosphorylation-enabled binding of SGO1–PP2A to cohesin protects sororin and centromeric cohesion during mitosis. *Nat. Cell Biol.* *15*, 40–49.
- Liu, J.-J., Bratkowski, M.A., Liu, X., Niu, C.-Y., Ke, A., and Wang, H.-W. (2014). Visualization of distinct substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 95–102.
- Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O.V., Zhou, T.Y., Gassmann, R., Liu, W.T., Ohgi, K.A., Benner, C., Garcia-Bassets, I., Aggarwal, A.K., et al. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* *466*, 508–512.
- Locklear, L., Ridsdale, J.A., Bazett-Jones, D.P., and Davie, J.R. (1990). Ultrastructure of transcriptionally competent chromatin. *Nucleic Acids Res.* *18*, 7015–7024.
- Longworth, M.S., Walker, J.A., Anderssen, E., Moon, N.-S., Gladden, A., Heck, M.M.S., Ramaswamy, S., and Dyson, N.J. (2012). A Shared Role for RBF1 and dCAP-D3 in the Regulation of Transcription with Consequences for Innate Immunity. *PLoS Genet* *8*, e1002618.
- Lopez-Serra, L., Lengronne, A., Borges, V., Kelly, G., and Uhlmann, F. (2013). Budding Yeast Wapl Controls Sister Chromatid Cohesion Maintenance and Chromosome Condensation. *Curr. Biol.* *23*, 64–69.
- Lorch, Y., and Kornberg, R.D. (2015). Chromatin-remodeling and the initiation of transcription. *Q. Rev. Biophys.* *48*, 465–470.
- Lubas, M., Christensen, M.S., Kristiansen, M.S., Domanski, M., Falkenby, L.G., Lykke-Andersen, S., Andersen, J.S., Dziembowski, A., and Jensen, T.H. (2011). Interaction Profiling Identifies the Human Nuclear Exosome Targeting Complex. *Mol. Cell* *43*, 624–637.
- Luo, W., Johnson, A.W., and Bentley, D.L. (2006). The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric–torpedo model. *Genes Dev.* *20*, 954–965.
- Lupo, R., Breiling, A., Bianchi, M.E., and Orlando, V. (2001). *Drosophila* Chromosome Condensation Proteins Topoisomerase II and Barren Colocalize with Polycomb and Maintain Fab-7 PRE Silencing. *Mol. Cell* *7*, 127–136.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P.J., and Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* *58*, 201–216.
- Machín, F., Paschos, K., Jarmuz, A., Torres-Rosell, J., Pade, C., and Aragón, L. (2004). Condensin Regulates rDNA Silencing by Modulating Nucleolar Sir2p. *Curr. Biol.* *14*, 125–130.
- Maeshima, K., and Eltsov, M. (2008). Packaging the Genome: the Structure of Mitotic Chromosomes. *J. Biochem. (Tokyo)* *143*, 145–153.
- Maeshima, K., and Laemmli, U.K. (2003). A Two-Step Scaffolding Model for Mitotic Chromosome Assembly. *Dev. Cell* *4*, 467–480.

- Makino, D.L., Baumgärtner, M., and Conti, E. (2013). Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* 495, 70–75.
- Makino, D.L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgärtner, M., Basquin, C., and Conti, E. (2015). RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* 524, 54–58.
- Marin-Vicente, C., Domingo-Prim, J., Eberle, A.B., and Visa, N. (2015). RRP6/EXOSC10 is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *J Cell Sci* 128, 1097–1107.
- Martienssen, R., and Moazed, D. (2015). RNAi and Heterochromatin Assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a019323.
- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A.V., and Graumann, P.L. (2002). Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J.* 21, 3108–3118.
- Matoba, K., Yamazoe, M., Mayanagi, K., Morikawa, K., and Hiraga, S. (2005). Comparison of MukB homodimer versus MukBEF complex molecular architectures by electron microscopy reveals a higher-order multimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 694–702.
- McManus, C.J., May, G.E., Spealman, P., and Shteyman, A. (2014). Ribosome profiling reveals post-transcriptional buffering of divergent gene expression in yeast. *Genome Res.* 24, 422–430.
- McNicoll, F., Stevense, M., and Jessberger, R. (2013). Chapter One - Cohesin in Gametogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*, P.M. Wassarman, ed. (Academic Press), pp. 1–34.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., and Erickson, H.P. (1998). The Symmetrical Structure of Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) and MukB Proteins: Long, Antiparallel Coiled Coils, Folded at a Flexible Hinge. *J. Cell Biol.* 142, 1595–1604.
- 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.
- Menolfi, D., Delamarre, A., Lengronne, A., Pasero, P., and Branzei, D. (2015). Essential Roles of the Smc5/6 Complex in Replication through Natural Pausing Sites and Endogenous DNA Damage Tolerance. *Mol. Cell* 60, 835–846.
- Merkenschlager, M., and Nora, E.P. (2016). CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 17, 17–43.
- Meyer, B.J. (2010). Targeting X chromosomes for repression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 179–189.
- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: Chromosomal Proteins that Prevent Premature Separation of Sister Chromatids. *Cell* 91, 35–45.
- Michelini, F., Pitchiaya, S., Vitelli, V., Sharma, S., Gioia, U., Pessina, F., Cabrini, M., Wang, Y., Capozzo, I., Iannelli, F., et al. (2017). Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 19, 1400–1411.
- Mikolaskova, B., Jurcik, M., Cipakova, I., Kretova, M., Chovanec, M., and Cipak, L. (2018). Maintenance of genome stability: the unifying role of interconnections between the DNA damage response and RNA-processing pathways. *Curr. Genet.* 1–13.

- Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S., and Veening, J.-W. (2011). SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *81*, 676–688.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'→5' Exoribonucleases. *Cell* *91*, 457–466.
- Mizuguchi, T., Fudenberg, G., Mehta, S., Belton, J.-M., Taneja, N., Folco, H.D., FitzGerald, P., Dekker, J., Mirny, L., Barrowman, J., et al. (2014). Cohesin-dependent globules and heterochromatin shape 3D genome architecture in *S. pombe*. *Nature*.
- Molnar, M., and Kleckner, N. (2008). Examination of Interchromosomal Interactions in Vegetatively Growing Diploid *Schizosaccharomyces pombe* Cells by Cre/loxP Site-Specific Recombination. *Genetics* *178*, 99–112.
- Mora-Bermúdez, F., Gerlich, D., and Ellenberg, J. (2007). Maximal chromosome compaction occurs by axial shortening in anaphase and depends on Aurora kinase. *Nat. Cell Biol.* *9*, 822–831.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* *194*, 795–823.
- Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature* *505*, 367–371.
- Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell* *163*, 1628–1640.
- Murayama, Y., Samora, C.P., Kurokawa, Y., Iwasaki, H., and Uhlmann, F. (2018). Establishment of DNA-DNA Interactions by the Cohesin Ring. *Cell* *172*, 465-477.e15.
- Nakazawa, N., Nakamura, T., Kokubu, A., Ebe, M., Nagao, K., and Yanagida, M. (2008). Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis. *J. Cell Biol.* *180*, 1115–1131.
- 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.
- Nakazawa, N., Sajiki, K., Xu, X., Villar-Briones, A., Arakawa, O., and Yanagida, M. (2015). RNA pol II transcript abundance controls condensin accumulation at mitotically up-regulated and heat-shock-inducible genes in fission yeast. *Genes Cells* *20*, 481–499.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the Genome: Joining, Resolving, and Separating Sister Chromatids During Mitosis and Meiosis. *Annu. Rev. Genet.* *35*, 673–745.
- Naumova, N., Imakaev, M., Fudenberg, G., Zhan, Y., Lajoie, B.R., Mirny, L.A., and Dekker, J. (2013). Organization of the Mitotic Chromosome. *Science* *342*, 948–953.
- Neil, H., Malabat, C., d'Aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M., and Jacquier, A. (2009). Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* *457*, 1038–1042.

- Niki, H., Jaffé, A., Imamura, R., Ogura, T., and Hiraga, S. (1991). The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* *10*, 183–193.
- Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A.A., Mechtler, K., et al. (2010). Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl. *Cell* *143*, 737–749.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I.S., and Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat. Cell Biol.* *4*, 89–93.
- Nora, E.P., Goloborodko, A., Valton, A.-L., Gibcus, J.H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, L.A., and Bruneau, B.G. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* *169*, 930-944.e22.
- Norbury, C.J. (2011). Regional Specialization: The NEXT Big Thing in Nuclear RNA Turnover. *Mol. Cell* *43*, 502–504.
- 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.
- Ocampo-Hafalla, M., Muñoz, S., Samora, C.P., and Uhlmann, F. (2016). Evidence for cohesin sliding along budding yeast chromosomes. *Open Biol.* *6*, 150178.
- Ohta, S., Bukowski-Wills, J.-C., Sanchez-Pulido, L., Alves, F. de L., Wood, L., Chen, Z.A., Platani, M., Fischer, L., Hudson, D.F., Ponting, C.P., et al. (2010). The Protein Composition of Mitotic Chromosomes Determined Using Multiclassifier Combinatorial Proteomics. *Cell* *142*, 810–821.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., and Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* *25*, 451–452.
- Oliveira, R.A., Heidmann, S., and Sunkel, C.E. (2007). Condensin I binds chromatin early in prophase and displays a highly dynamic association with *Drosophila* mitotic chromosomes. *Chromosoma* *116*, 259–274.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). Differential Contributions of Condensin I and Condensin II to Mitotic Chromosome Architecture in Vertebrate Cells. *Cell* *115*, 109–121.
- Ono, T., Fang, Y., Spector, D.L., and Hirano, T. (2004). Spatial and Temporal Regulation of Condensins I and II in Mitotic Chromosome Assembly in Human Cells. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3296–3308.
- Ono, T., Yamashita, D., and Hirano, T. (2013). Condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase. *J Cell Biol* *200*, 429–441.
- Palecek, J.J., and Gruber, S. (2015). Kite Proteins: a Superfamily of SMC/Kleisin Partners Conserved Across Bacteria, Archaea, and Eukaryotes. *Structure* *23*, 2183–2190.
- 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.

- Palozola, K.C., Donahue, G., Liu, H., Grant, G.R., Becker, J.S., Cote, A., Yu, H., Raj, A., and Zaret, K.S. (2017). Mitotic transcription and waves of gene reactivation during mitotic exit. *Science* 358, 119–122.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., et al. (2008). Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell* 132, 422–433.
- Paul, B., and Montpetit, B. (2016). Altered RNA processing and export leads to retention of mRNAs near transcription sites, nuclear pore complexes, or within the nucleolus. *Mol. Biol. Cell* mbc.E16-04-0244.
- Paul, M.R., Markowitz, T.E., Hochwagen, A., and Ercan, S. (2017). Acute condensin depletion causes genome decompaction without altering the level of global gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioRxiv* 195487.
- Paull, T.T., and Deshpande, R.A. (2014). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex: Recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes. *Exp. Cell Res.* 329, 139–147.
- Paulson, J.R., and Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817–828.
- Pek, J.W., and Kai, T. (2011a). A Role for Vasa in Regulating Mitotic Chromosome Condensation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 21, 39–44.
- Pek, J.W., and Kai, T. (2011b). DEAD-box RNA helicase Belle/DDX3 and the RNA interference pathway promote mitotic chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12007–12012.
- 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.
- Petersen, J., and Hagan, I.M. (2003). *S. pombe* Aurora Kinase/Survivin Is Required for Chromosome Condensation and the Spindle Checkpoint Attachment Response. *Curr. Biol.* 13, 590–597.
- Petrova, B., Dehler, S., Kruitwagen, T., Hériché, J.-K., Miura, K., and Haering, C.H. (2013). Quantitative Analysis of Chromosome Condensation in Fission Yeast. *Mol. Cell Biol.* 33, 984–998.
- Petrushenko, Z.M., She, W., and Rybenkov, V.V. (2011). A new family of bacterial condensins. *Mol. Microbiol.* 81, 881–896.
- Pfau, S.J., and Amon, A. (2012). Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man: ‘Exploring aneuploidy: the significance of chromosomal imbalance’ review series. *EMBO Rep.* 13, 515–527.
- 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.* *advance online publication*.
- Piccoli, G.D., Cortes-Ledesma, F., Ira, G., Torres-Rosell, J., Uhle, S., Farmer, S., Hwang, J.-Y., Machin, F., Ceschia, A., McAleenan, A., et al. (2006). Smc5–Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nat. Cell Biol.* 8, 1032–1034.

- Pommier, Y. (2004). Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 4, 429–434.
- Porrua, O., and Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 190–202.
- Potts, P.R., Porteus, M.H., and Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J.* 25, 3377–3388.
- Povirk, L.F. (1996). DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 355, 71–89.
- Prakash, K., and Fournier, D. (2018). Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *Biosystems* 164, 49–59.
- Preker, P., Nielsen, J., Kammler, S., Lykke-Andersen, S., Christensen, M.S., Mapendano, C.K., Schierup, M.H., and Jensen, T.H. (2008). RNA Exosome Depletion Reveals Transcription Upstream of Active Human Promoters. *Science* 322, 1851–1854.
- Proudfoot, N.J. (2016). Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut. *Science* 352, aad9926.
- Raab, J.R., Chiu, J., Zhu, J., Katzman, S., Kurukuti, S., Wade, P.A., Haussler, D., and Kamakaka, R.T. (2012). Human tRNA genes function as chromatin insulators. *EMBO J.* 31, 330–350.
- Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., et al. (2014). A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell* 159, 1665–1680.
- Rao, S.S.P., Huang, S.-C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J.M., Perez, E.M., Kieffer-Kwon, K.-R., Sanborn, A.L., Johnstone, S.E., Bascom, G.D., Bochkov, I.D., et al. (2017). Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell* 171, 305-320.e24.
- Rawlings, J.S., Gatzka, M., Thomas, P.G., and Ihle, J.N. (2011). Chromatin condensation via the condensin II complex is required for peripheral T-cell quiescence. *EMBO J.* 30, 263–276.
- Reis, C.C., and Campbell, J.L. (2007). Contribution of Trf4/5 and the Nuclear Exosome to Genome Stability Through Regulation of Histone mRNA Levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175, 993–1010.
- Remeseiro, S., Cuadrado, A., Carretero, M., Martínez, P., Drosopoulos, W.C., Cañamero, M., Schildkraut, C.L., Blasco, M.A., and Losada, A. (2012). Cohesin-SA1 deficiency drives aneuploidy and tumourigenesis in mice due to impaired replication of telomeres. *EMBO J.* 31, 2076–2089.
- Reyes-Turcu, F.E., Zhang, K., Zofall, M., Chen, E., and Grewal, S.I.S. (2011). Defects in RNA quality control factors reveal RNAi-independent nucleation of heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1132–1138.
- Richard, P., and Manley, J.L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* 23, 1247–1269.

- Robellet, X., Fauque, L., Legros, P., Mollereau, E., Janczarski, S., Parrinello, H., Desvignes, J.-P., Thevenin, M., and Bernard, P. (2014). A Genetic Screen for Functional Partners of Condensin in Fission Yeast. *G3 GenesGenomesGenetics* 4, 373–381.
- 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., Vanoosthuysse, V., and Bernard, P. (2017). The loading of condensin in the context of chromatin. *Curr. Genet.* 63, 577–589.
- Rollins, R.A., Morcillo, P., and Dorsett, D. (1999). Nipped-B, a Drosophila Homologue of Chromosomal Adherins, Participates in Activation by Remote Enhancers in the cut and Ultrabithorax Genes. *Genetics* 152, 577–593.
- Rondón, A.G., Mischo, H.E., Kawauchi, J., and Proudfoot, N.J. (2009). Fail-Safe Transcriptional Termination for Protein-Coding Genes in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* 36, 88–98.
- Rosonina, E., Kaneko, S., and Manley, J.L. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev.* 20, 1050–1056.
- Rougemaille, M., Gudipati, R.K., Olesen, J.R., Thomsen, R., Seraphin, B., Libri, D., and Jensen, T.H. (2007). Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J.* 26, 2317–2326.
- Rowland, B.D., Roig, M.B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouët, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., et al. (2009). Building Sister Chromatid Cohesion: Smc3 Acetylation Counteracts an Antiestablishment Activity. *Mol. Cell* 33, 763–774.
- Rubio, E.D., Reiss, D.J., Welcsh, P.L., Disteché, C.M., Filippova, G.N., Baliga, N.S., Aebersold, R., Ranish, J.A., and Krumm, A. (2008). CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8309–8314.
- Saguez, C., Schmid, M., Olesen, J.R., Ghazy, M.A.E.-H., Qu, X., Poulsen, M.B., Nasser, T., Moore, C., and Jensen, T.H. (2008). Nuclear mRNA Surveillance in THO/sub2 Mutants Is Triggered by Inefficient Polyadenylation. *Mol. Cell* 31, 91–103.
- Saitoh, N., Goldberg, I.G., Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J. Cell Biol.* 127, 303–318.
- Sajiki, K., Hatanaka, M., Nakamura, T., Takeda, K., Shimanuki, M., Yoshida, T., Hanyu, Y., Hayashi, T., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (2009). Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*. *J Cell Sci* 122, 1418–1429.
- 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.
- Sakai, A., Hizume, K., Sutani, T., Takeyasu, K., and Yanagida, M. (2003). Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein–protein assembly. *EMBO J.* 22, 2764–2775.

- Salveti, A., Couté, Y., Epstein, A., Arata, L., Kraut, A., Navratil, V., Bouvet, P., and Greco, A. (2016). Nuclear Functions of Nucleolin through Global Proteomics and Interactomic Approaches. *J. Proteome Res.* *15*, 1659–1669.
- Samejima, I., Matsumoto, T., Nakaseko, Y., Beach, D., and Yanagida, M. (1993). Identification of seven new cut genes involved in *Schizosaccharomyces pombe* mitosis. *J. Cell Sci.* *105*, 135–143.
- Samoshkin, A., Dulev, S., Loukinov, D., Rosenfeld, J.A., and Strunnikov, A.V. (2012). Condensin dysfunction in human cells induces nonrandom chromosomal breaks in anaphase, with distinct patterns for both unique and repeated genomic regions. *Chromosoma* *121*, 191–199.
- Sanyal, A., Lajoie, B.R., Jain, G., and Dekker, J. (2012). The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature* *489*, 109–113.
- Schaaf, C.A., Misulovin, Z., Sahota, G., Siddiqui, A.M., Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Pirrotta, V., Gause, M., and Dorsett, D. (2009). Regulation of the *Drosophila* Enhancer of split and invected-engrailed Gene Complexes by Sister Chromatid Cohesion Proteins. *PLOS ONE* *4*, e6202.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., and Hoof, A. van (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 56–62.
- Schaeffer, D., Clark, A., Klauer, A.A., Tsanova, B., and Hoof, A. van (2010). Functions of the Cytoplasmic Exosome. In *RNA Exosome*, (Springer, New York, NY), pp. 79–90.
- 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.
- Schardin, M., Cremer, T., Hager, H.D., and Lang, M. (1985). Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum. Genet.* *71*, 281–287.
- Scherthan, H., Bähler, J., and Kohli, J. (1994). Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. *J. Cell Biol.* *127*, 273–285.
- Schlackow, M., Nojima, T., Gomes, T., Dhir, A., Carmo-Fonseca, M., and Proudfoot, N.J. (2017). Distinctive Patterns of Transcription and RNA Processing for Human lincRNAs. *Mol. Cell* *65*, 25–38.
- Schmidt, C.K., Brookes, N., and Uhlmann, F. (2009). Conserved features of cohesin binding along fission yeast chromosomes. *Genome Biol.* *10*, R52.
- Schmidt, D., Schwalie, P.C., Ross-Innes, C.S., Hurtado, A., Brown, G.D., Carroll, J.S., Flicek, P., and Odom, D.T. (2010). A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res.* *20*, 578–588.
- Schneider, C., and Tollervey, D. (2013). Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 485–493.
- Schneider, C., Kudla, G., Wlotzka, W., Tuck, A., and Tollervey, D. (2012). Transcriptome-wide Analysis of Exosome Targets. *Mol. Cell* *48*, 422–433.

Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., et al. (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat. Genet.* *42*, 53–61.

Schuch, B., Feigenbutz, M., Makino, D.L., Falk, S., Basquin, C., Mitchell, P., and Conti, E. (2014). The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J.* *33*, 2829–2846.

Schuldiner, O., Berdnik, D., Levy, J.M., Wu, J.S., Luginbuhl, D., Gontang, A.C., and Luo, L. (2008). piggyBac-Based Mosaic Screen Identifies a Postmitotic Function for Cohesin in Regulating Developmental Axon Pruning. *Dev. Cell* *14*, 227–238.

Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, G., Loe-Mie, Y., Fonseca, N.A., Huber, W., Haering, C.H., Mirny, L., et al. (2017). Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature* *551*, 51–56.

Seitan, V.C., Hao, B., Tachibana-Konwalski, K., Lavagnoli, T., Mira-Bontenbal, H., Brown, K.E., Teng, G., Carroll, T., Terry, A., Horan, K., et al. (2011). A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature* *476*, 467–471.

Shaw, peter, and Doonan, J. (2005). The Nucleolus: Playing by Different Rules? *Cell Cycle* *4*, 102–105.

Sheltzer, J.M., Torres, E.M., Dunham, M.J., and Amon, A. (2012). Transcriptional consequences of aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 12644–12649.

Shintomi, K., and Hirano, T. (2011). The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev.* *25*, 1464–1469.

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.

Shiomi, T., Fukushima, K., Suzuki, N., Nakashima, N., Noguchi, E., and Nishimoto, T. (1998). Human dis3p, which binds to either GTP- or GDP-Ran, complements *Saccharomyces cerevisiae* dis3. *J. Biochem. (Tokyo)* *123*, 883–890.

Shobuie, T., Tatebayashi, K., Tani, T., Sugano, S., and Ikeda, H. (2001). The *dhp1+* gene, encoding a putative nuclear 5'→3' exoribonuclease, is required for proper chromosome segregation in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* *29*, 1326–1333.

Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., Wit, E. de, Steensel, B. van, and Laats, W. de (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture–on-chip (4C). *Nat. Genet.* *38*, 1348–1354.

Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* *1*, reviews1011.1.

Stedman, W., Kang, H., Lin, S., Kissil, J.L., Bartolomei, M.S., and Lieberman, P.M. (2008). Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular *c-myc* and *H19/lgf2* insulators. *EMBO J.* *27*, 654–666.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H.A., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-Mediated Abcission Checkpoint Protects against Tetraploidization. *Cell* *136*, 473–484.

- Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A., and Corden, J.L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* *413*, 327–331.
- St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, É., Sauv , 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.* *14*, 874–880.
- Str m, L., Lindroos, H.B., Shirahige, K., and Sjögren, C. (2004). Postreplicative Recruitment of Cohesin to Double-Strand Breaks Is Required for DNA Repair. *Mol. Cell* *16*, 1003–1015.
- Strunnikov, A.V. (2005). A Case of Selfish Nucleolar Segregation. *Cell Cycle* *4*, 113–117.
- 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.
- Sugiyama, T., and Sugioka-Sugiyama, R. (2011). Red1 promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetatively growing fission yeast. *EMBO J.* *30*, 1027–1039.
- Sullivan, N.L., Marquis, K.A., and Rudner, D.Z. (2009). Recruitment of SMC by ParB-parS Organizes the Origin Region and Promotes Efficient Chromosome Segregation. *Cell* *137*, 697–707.
- Sun, M., Schwalb, B., Schulz, D., Pirkl, N., Etzold, S., Larivière, L., Maier, K.C., Seizl, M., Tresch, A., and Cramer, P. (2012). Comparative dynamic transcriptome analysis (cDTA) reveals mutual feedback between mRNA synthesis and degradation. *Genome Res.* *22*, 1350–1359.
- Sun, M., Schwalb, B., Pirkl, N., Maier, K.C., Schenk, A., Failmezger, H., Tresch, A., and Cramer, P. (2013). Global Analysis of Eukaryotic mRNA Degradation Reveals Xrn1-Dependent Buffering of Transcript Levels. *Mol. Cell* *52*, 52–62.
- Sutani, T., and Yanagida, M. (1997). DNA renaturation activity of the SMC complex implicated in chromosome condensation. *Nature* *388*, 798–801.
- 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*.
- Swedlow, J.R., and Hirano, T. (2003). The Making of the Mitotic Chromosome: Modern Insights into Classical Questions. *Mol. Cell* *11*, 557–569.
- 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.
- Tada, K., Susumu, H., Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2011). Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature* *474*, 477–483.

- Takemoto, A., Kimura, K., Yanagisawa, J., Yokoyama, S., and Hanaoka, F. (2006). Negative regulation of condensin I by CK2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* *25*, 5339–5348.
- Takemoto, A., Murayama, A., Katano, M., Urano, T., Furukawa, K., Yokoyama, S., Yanagisawa, J., Hanaoka, F., and Kimura, K. (2007). Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensin I. *Nucleic Acids Res.* *35*, 2403–2412.
- Takemoto, A., Maeshima, K., Ikehara, T., Yamaguchi, K., Murayama, A., Imamura, S., Imamoto, N., Yokoyama, S., Hirano, T., Watanabe, Y., et al. (2009). The chromosomal association of condensin II is regulated by a noncatalytic function of PP2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1302–1308.
- Tanaka, A., Tanizawa, H., Sriswasdi, S., Iwasaki, O., Chatterjee, A.G., Speicher, D.W., Levin, H.L., Noguchi, E., and Noma, K. (2012). Epigenetic Regulation of Condensin-Mediated Genome Organization during the Cell Cycle and upon DNA Damage through Histone H3 Lysine 56 Acetylation. *Mol. Cell* *48*, 532–546.
- Tanaka, T., Cosma, M.P., Wirth, K., and Nasmyth, K. (1999). Identification of Cohesin Association Sites at Centromeres and along Chromosome Arms. *Cell* *98*, 847–858.
- Tanizawa, H., Iwasaki, O., Tanaka, A., Capizzi, J.R., Wickramasinghe, P., Lee, M., Fu, Z., and Noma, K. (2010). Mapping of long-range associations throughout the fission yeast genome reveals global genome organization linked to transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* *38*, 8164–8177.
- Tedeschi, A., Wutz, G., Huet, S., Jaritz, M., Wuensche, A., Schirghuber, E., Davidson, I.F., Tang, W., Cisneros, D.A., Bhaskara, V., et al. (2013). Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation. *Nature* *501*, 564–568.
- 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* *356*, 6516.
- 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.
- Thiebaut, M., Kisseleva-Romanova, E., Rougemaille, M., Boulay, J., and Libri, D. (2006). Transcription Termination and Nuclear Degradation of Cryptic Unstable Transcripts: A Role for the Nrd1-Nab3 Pathway in Genome Surveillance. *Mol. Cell* *23*, 853–864.
- Tian, B., and Manley, J.L. (2017). Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 18–30.
- Tollervey, D. (2004). Molecular biology: Termination by torpedo. *Nature* *432*, 456–457.
- Tomecki, R., Kristiansen, M.S., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, K.M., Szczesny, R.J., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, J.S., Stepień, P.P., et al. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.* *29*, 2342–2357.
- Tong, K., and Skibbens, R.V. (2015). Pds5 regulators segregate cohesion and condensation pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 7021–7026.
- Tonkin, E.T., Wang, T.-J., Lisgo, S., Bamshad, M.J., and Strachan, T. (2004). *NIPBL*, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat. Genet.* *36*, 636–641.

- Torres-Rosell, J., Machín, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J.Z., and Aragón, L. (2005). *SMC5* and *SMC6* genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat. Cell Biol.* *7*, 412–419.
- 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.
- Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Mol. Cell* *28*, 1–13.
- Tsekrekou, M., Stratigi, K., and Chatzinikolaou, G. (2017). The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 1411.
- Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol.* *8*, 1095–1102.
- 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.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M.-A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of Cohesin by the CD Clan Protease Separin Triggers Anaphase in Yeast. *Cell* *103*, 375–386.
- Ünal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., and Koshland, D. (2004). DNA Damage Response Pathway Uses Histone Modification to Assemble a Double-Strand Break-Specific Cohesin Domain. *Mol. Cell* *16*, 991–1002.
- Ünal, E., Heidinger-Pauli, J.M., and Koshland, D. (2007). DNA Double-Strand Breaks Trigger Genome-Wide Sister-Chromatid Cohesion Through Eco1 (Ctf7). *Science* *317*, 245–248.
- Ünal, E., Heidinger-Pauli, J.M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S.P., and Koshland, D.E. (2008). A Molecular Determinant for the Establishment of Sister Chromatid Cohesion. *Science* *321*, 566–569.
- Vagnarelli, P., Hudson, D.F., Ribeiro, S.A., Trinkle-Mulcahy, L., Spence, J.M., Lai, F., Farr, C.J., Lamond, A.I., and Earnshaw, W.C. (2006). Condensin and Repo-Man–PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1133–1142.
- Vanoosthuysse, V., Legros, P., Sar, S.J.A. van der, Yvert, G., Toda, K., Bihan, T.L., Watanabe, Y., Hardwick, K., and Bernard, P. (2014). CPF-Associated Phosphatase Activity Opposes Condensin-Mediated Chromosome Condensation. *PLOS Genet.* *10*, e1004415.
- 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.
- Verdel, A., and Moazed, D. (2005). RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Lett.* *579*, 5872–5878.
- Verzijlbergen, K.F., Nerusheva, O.O., Kelly, D., Kerr, A., Clift, D., Alves, F. de L., Rappsilber, J., and Marston, A.L. (2014). Shugoshin biases chromosomes for biorientation through condensin recruitment to the pericentromere. *ELife* *3*, e01374.

Vian, L., Pękowska, A., Rao, S.S.P., Kieffer-Kwon, K.-R., Jung, S., Baranello, L., Huang, S.-C., El Khattabi, L., Dose, M., Pruett, N., et al. (2018). The Energetics and Physiological Impact of Cohesin Extrusion. *Cell*.

Villa-Hernández, S., and Bermejo, R. (2018). Cohesin dynamic association to chromatin and interfacing with replication forks in genome integrity maintenance. *Curr. Genet.* 1–9.

Volanakis, A., Passoni, M., Hector, R.D., Shah, S., Kilchert, C., Granneman, S., and Vasiljeva, L. (2013). Spliceosome-mediated decay (SMD) regulates expression of nonintronic genes in budding yeast. *Genes Dev.* 27, 2025–2038.

Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.-M. (2000). Two Distinct Pathways Remove Mammalian Cohesin from Chromosome Arms in Prophase and from Centromeres in Anaphase. *Cell* 103, 399–410.

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* jcb.201801048.

Wang, B.-D., Yong-Gonzalez, V., and Strunnikov, A.V. (2004). Cdc14p/FEAR Pathway Controls Segregation of Nucleolus in *S. cerevisiae* by Facilitating Condensin Targeting to rDNA Chromatin in Anaphase. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 960–967.

Wang, D., Mansisidor, A., Prabhakar, G., and Hochwagen, A. (2016). Condensin and Hmo1 Mediate a Starvation-Induced Transcriptional Position Effect within the Ribosomal DNA Array. *Cell Rep.* 14, 1010–1017.

Wang, H., Maurano, M.T., Qu, H., Varley, K.E., Gertz, J., Pauli, F., Lee, K., Canfield, T., Weaver, M., Sandstrom, R., et al. (2012). Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* 22, 1680–1688.

Wang, Q., Sun, Q., Czajkowsky, D.M., and Shao, Z. (2018). Sub-kb Hi-C in *D. melanogaster* reveals conserved characteristics of TADs between insect and mammalian cells. *Nat. Commun.* 9, 188.

Wang, S.-W., Asakawa, K., Win, T.Z., Toda, T., and Norbury, C.J. (2005). Inactivation of the Pre-mRNA Cleavage and Polyadenylation Factor Pfs2 in Fission Yeast Causes Lethal Cell Cycle Defects. *Mol. Cell Biol.* 25, 2288–2296.

Wang, S.-W., Stevenson, A.L., Kearsey, S.E., Watt, S., and Bähler, J. (2008a). Global Role for Polyadenylation-Assisted Nuclear RNA Degradation in Posttranscriptional Gene Silencing. *Mol. Cell Biol.* 28, 656–665.

Wang, S.-W., Stevenson, A.L., Kearsey, S.E., Watt, S., and Bähler, J. (2008b). Global Role for Polyadenylation-Assisted Nuclear RNA Degradation in Posttranscriptional Gene Silencing. *Mol. Cell Biol.* 28, 656–665.

Wang, X., Liu, X., Possoz, C., and Sherratt, D.J. (2006). The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev.* 20, 1727–1731.

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

- Warburton, P.E., Hasson, D., Guillem, F., Lescale, C., Jin, X., and Abrusan, G. (2008). Analysis of the largest tandemly repeated DNA families in the human genome. *BMC Genomics* 9, 533.
- Wasmuth, E.V., Januszyk, K., and Lima, C.D. (2014). Structure of an Rrp6–RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. *Nature* 511, 435–439.
- Wasmuth, E.V., Zinder, J.C., Zattas, D., Das, M., and Lima, C.D. (2017). Structure and reconstitution of yeast Mpp6–nuclear exosome complexes reveals that Mpp6 stimulates RNA decay and recruits the Mtr4 helicase. *ELife* 6, e29062.
- 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.
- West, S., Gromak, N., and Proudfoot, N.J. (2004). Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* 432, 522–525.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871–880.
- Woodward, J., Taylor, G.C., Soares, D.C., Boyle, S., Sie, D., Read, D., Chathoth, K., Vukovic, M., Tarrats, N., Jamieson, D., et al. (2016). Condensin II mutation causes T-cell lymphoma through tissue-specific genome instability. *Genes Dev.* 30, 2173–2186.
- Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D.A., Stocsits, R.R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M.J., et al. (2017). Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *EMBO J.* 36, 3573–3599.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.-C., Dufour, M.-E., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., et al. (2005). Cryptic Pol II Transcripts Are Degraded by a Nuclear Quality Control Pathway Involving a New Poly(A) Polymerase. *Cell* 121, 725–737.
- Xiang, K., Tong, L., and Manley, J.L. (2014). Delineating the Structural Blueprint of the Pre-mRNA 3'-End Processing Machinery. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1894–1910.
- Xiao, T., Wallace, J., and Felsenfeld, G. (2011). Specific Sites in the C Terminus of CTCF Interact with the SA2 Subunit of the Cohesin Complex and Are Required for Cohesin-Dependent Insulation Activity. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2174–2183.
- Xing, H., Vanderford, N.L., and Sarge, K.D. (2008). The TBP–PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action. *Nat. Cell Biol.* 10, 1318–1323.
- Xu, B., Lu, S., and Gerton, J.L. (2014). Roberts syndrome. *Rare Dis.* 2, e27743.
- Xu, Z., Wei, W., Gagneur, J., Perocchi, F., Clauder-Münster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F., Huber, W., and Steinmetz, L.M. (2009). Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast. *Nature* 457, 1033–1037.
- Yamamoto, M. (2010). The selective elimination of messenger RNA underlies the mitosis–meiosis switch in fission yeast. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 86, 788–797.

- Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R., and Yamamoto, M. (2010). Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *EMBO J.* *29*, 2173–2181.
- Yamanaka, S., Mehta, S., Reyes-Turcu, F.E., Zhuang, F., Fuchs, R.T., Rong, Y., Robb, G.B., and Grewal, S.I.S. (2013). RNAi triggered by specialized machinery silences developmental genes and retrotransposons. *Nature* *493*, 557–560.
- Yamashita, A., Shichino, Y., Tanaka, H., Hiriart, E., Touat-Todeschini, L., Vavasseur, A., Ding, D.-Q., Hiraoka, Y., Verdel, A., and Yamamoto, M. (2012). Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. *Open Biol.* *2*, 120014.
- Yanagida, M. (1998). Fission yeast cut mutations revisited: control of anaphase. *Trends Cell Biol.* *8*, 144–149.
- Yanagida, M. (2009). Clearing the way for mitosis: is cohesin a target? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 489–496.
- Yeong, F.M., Hombauer, H., Wendt, K.S., Hirota, T., Mudrak, I., Mechtler, K., Loregger, T., Marchler-Bauer, A., Tanaka, K., Peters, J.-M., et al. (2003). Identification of a Subunit of a Novel Kleisin- β /SMC Complex as a Potential Substrate of Protein Phosphatase 2A. *Curr. Biol.* *13*, 2058–2064.
- Yuen, K.C., Slaughter, B.D., and Gerton, J.L. (2017). Condensin II is anchored by TFIIC and H3K4me3 in the mammalian genome and supports the expression of active dense gene clusters. *Sci. Adv.* *3*.
- Zhang, H., Rigo, F., and Martinson, H.G. (2015). Poly(A) Signal-Dependent Transcription Termination Occurs through a Conformational Change Mechanism that Does Not Require Cleavage at the Poly(A) Site. *Mol. Cell* *59*, 437–448.
- Zhang, T., Paulson, J.R., Bakhrebah, M., Kim, J.H., Nowell, C., Kalitsis, P., and Hudson, D.F. (2016). Condensin I and II behaviour in interphase nuclei and cells undergoing premature chromosome condensation. *Chromosome Res.* *24*, 243–269.
- Zhou, Y., Zhu, J., Schermann, G., Ohle, C., Bendrin, K., Sugioka-Sugiyama, R., Sugiyama, T., and Fischer, T. (2015). The fission yeast MTREC complex targets CUTs and unspliced pre-mRNAs to the nuclear exosome. *Nat. Commun.* *6*, 7050.
- Zofall, M., Fischer, T., Zhang, K., Zhou, M., Cui, B., Veenstra, T.D., and Grewal, S.I.S. (2009). Histone H2A.Z cooperates with RNAi and heterochromatin factors to suppress antisense RNAs. *Nature* *461*, 419–422.
- Zonta, E., Bittencourt, D., Samaan, S., Germann, S., Dutertre, M., and Auboeuf, D. (2013). The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export. *Nucleic Acids Res.* *41*, 554–564.

Résumé

Etude du rôle de Condensine dans le contrôle de l'expression génique chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Condensine est un complexe protéique organisateur du génome qui conduit l'assemblage des chromosomes et promeut leur transmission fidèle en anaphase. De nombreuses études ont rapporté des changements dans les niveaux des ARNs cellulaires quand Condensine est défaillante, suggérant un rôle pour Condensine dans la régulation de l'expression génique. Cependant, les mécanismes sous-jacents sont demeurés énigmatiques, et l'on ignore dans quelle mesure le rôle joué par Condensine dans l'expression génique est lié ou non à sa fonction dans l'organisation des chromosomes. Lors de ma thèse, j'ai étudié l'activité de Condensine dans la régulation de l'expression génique en utilisant la levure *S. pombe* comme organisme modèle. Contrairement à l'idée communément admise, mes résultats montrent que Condensine ne joue aucun rôle direct dans le maintien du transcriptome, ni en interphase, ni en mitose chez cette levure. En accord avec les études précédentes, j'observe des changements de niveau et de qualité des ARNs dans les cellules mutantes pour Condensine au sortir de la mitose ; des ARNs non codants et des ARNs aberrants, étendus en 3', s'accumulent. En revanche, je démontre que ces changements sont la conséquence de défauts de transmission des chromosomes en anaphase. L'inactivation de Condensine cause la non-disjonction de l'ADN ribosomique et du nucléole, entraînant une déplétion de l'ARN-exosome des cellules filles, lesquelles accumulent alors des ARNs normalement dégradés par l'ARN-exosome. De façon cruciale, je montre qu'empêcher les anomalies de migration des chromosomes restaure une expression normale des gènes malgré l'inactivation de Condensine, démontrant que c'est l'instabilité chromosomique qui est source des changements d'expression génique observés quand Condensine est défaillante, et non le complexe Condensine en tant que tel. Ce travail remet en question le concept de régulation de l'expression génique par les complexes Condensine et appelle à la prudence lorsque l'on cherche à étudier les fonctions de ces complexes en dehors de la condensation de la chromatine en mitose.