



HAL
open science

Impact de la protéine télomérique Rap1 sur les condensines chez *Saccharomyces cerevisiae*

Alice Deshayes

► **To cite this version:**

Alice Deshayes. Impact de la protéine télomérique Rap1 sur les condensines chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL004 . tel-04290726

HAL Id: tel-04290726

<https://theses.hal.science/tel-04290726>

Submitted on 17 Nov 2023

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

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

Impact de la protéine télomérique Rap1 sur les condensines chez *Saccharomyces cerevisiae*

*Impact of the telomeric protein Rap1 on condensin in Saccharomyces
cerevisiae*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577 Structure et Dynamique des Système vivant (SDSV)
Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Graduate School : Science de la vie et santé. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Stabilité génétique, cellules souches et radiations (Université Paris-Saclay, Inserm, CEA)**, sous la direction de **Stéphane MARCAND**, directeur de recherche et le co-encadrement de **Stefano MATTAROCCHI**, chargé de recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 Février 2023, par

Alice DESHAYES

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Kerstin BYSTRICKY

Directrice de recherche, Université
de Toulouse

Présidente

Frédéric BECKOUET

Chargé de recherche, HDR,
Université de Toulouse

Rapporteur & Examineur

Sylvie TOURNIER

Chargée de recherche, HDR,
Université Toulouse

Rapporteur & Examinatrice

Frédéric BOCCARD

Directeur de recherche, Université
Paris Saclay

Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury :

Kerstin Bystricky, la présidente du jury, pour l'attention particulière qu'elle m'a portée ainsi qu'à ma soutenance. Merci à Sylvie Tournier et Frederic Beckouët pour leurs rôles de rapporteurs, pour leur intérêt et leurs remarques constructives à l'égard de mon travail. Merci à Frederic Boccard d'avoir accepté d'être examinateur lors de ma soutenance d'avoir rédigé des questions ouvertes et pertinentes qui m'ont faite avancer.

Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse Pascale Lesage, Domenico Libri et Pascal Bernard pour le suivi de mon projet, vous présenter l'avancée de mon travail a été à chaque fois un moment clef dans le déroulé de ma thèse. Merci pour vos conseils, votre implication et vos encouragements.

Je tiens bien évidemment à remercier mon directeur de thèse Stéphane Marcand qui m'a donné cette chance. Merci pour ton encadrement et la confiance que tu as eu dans mon travail, ce qui contribué à pouvoir mener mon projet tout en ayant la liberté d'ouvrir sur plusieurs axes et de les développer par moi-même. Tout cela m'a donné l'occasion d'appréhender le déroulement d'un projet de recherche et de me projeter de façon concrète dans le métier de chercheur. Et c'est cela qui fait de moi, aujourd'hui, la future chercheuse que je suis alors merci beaucoup. Je garde précieusement en tête toutes tes remarques et continuerais à travailler dessus. Merci de faire en sorte que le projet continue après mon départ tout en continuant à partager avec moi à ce sujet ; nos discussions et nos réunions sont vraiment importantes et d'un grand intérêt pour moi. J'espère que cela continuera longtemps.

Vorrei ringraziare il mio co-direttore di tesi Stefano Mattarocci. Sei arrivato nel momento peggiore del mio dottorato, ma il tuo supporto e la tua speciale supervisione mi hanno aiutata a credere in me stessa e mi hanno spronata a portare avanti le mie idee.

Grazie per avermi coinvolta in molti progetti, è stato bello lavorarci con te. Sono stati un'occasione per nutrire la mia curiosità e il mio interesse per altre aree oltre alle condensine. Tutto ciò mi ha portata a scegliere di continuare la mia carriera nella ricerca. Grazie per aver reso questi ultimi anni di tesi così pieni e rumorosi, con esperimenti fatti di corsa, molti betises e altrettanti momenti indimenticabili. Riassumendo: esattamente come piace a me. Mi mancheranno enormemente! Prometto al mio mentore che la gatta frettolosa farà in modo di seguire sempre i tuoi consigli migliori, e di evitare i tuoi peggiori (Ettore)! Da parte tua, promettimi che sarai più tranquillo che potrai, tenendo sempre a mente quello che ti ho detto in questi anni. Se te ne dimentichi, guarda le caramelle!

Je tiens à remercier Sabrina Pobiega alias « Maman Pioupiou » qui m'a vraiment prise sous son aile lors de mon arrivée dans le laboratoire. Merci de m'avoir aidée à m'intégrer et de m'avoir donné de bons conseils afin de vivre au mieux cette thèse. Merci aussi pour nos moments de partage, je sais que ça va te manquer de ne pas voir la FLS débarquer à cause de mes bêtises !

Je remercie aussi Claire Beneut, une ingénieure en or. Claire malgré nos débuts difficiles, une fois qu'on s'est comprises on s'est de suite adoptée ! J'ai vraiment apprécié de travailler à tes cotés sur ce projet et j'espère que, tout comme moi, tu as pu tirer quelques bons enseignements de ce travail en équipe. Merci d'avoir veiller sur moi et de m'avoir dispensé tes nombreuses leçons de morale que j'essayerais d'appliquer dans la mesure du possible bien sûr ... (tu me connais maintenant). Je te remercie de continuer à travailler sur ce projet et à me donner de tes nouvelles régulièrement. J'espère qu'on trouvera une occasion de se revoir !

Merci à Sara, toute nouvelle thésarde arrivée au laboratoire. Merci pour ces bons moments partagés et ton soutien au cours de ces courts dernier mois où nous nous sommes croisées. J'aurais aimé qu'on fasse plus de chemin ensemble ! Prends confiance en toi, de mon côté je suis sûr à 200% que tu réussiras avec brio cette thèse alors n'en doutes pas ! N'hésite pas à revenir vers-moi si tu en ressens le besoin. N'oublie pas de continuer à apprendre le Français, tu en aura bien besoin au cours des prochaines années, et tu peux t'entraîner sur ces quelques lignes.

Je tenais à dédier quelques petits mots aux anciens thésards. Tout d'abord je tiens à remercier mon prédécesseur sur le projet Condensine, Thomas, avec qui j'ai réussi à échanger sur la fin du projet ; merci pour nos discussions et tes conseils, j'espère que cela continuera par la suite. Merci aussi à Florian qui m'a tenu compagnie pendant 2 ans merci pour tes conseils et les leçons de vie apprises à tes côtés, je te souhaite bon courage pour le post doc. Et enfin, merci Hélène, je suis vraiment contente de t'avoir rencontrée brièvement au CEA mais surtout de t'avoir revue à plusieurs reprises sur les congrès, merci pour ta bienveillance à mon égard, tes conseils et ta participation à ma soutenance ; cela m'a vraiment touchée, je te souhaite bonne chance pour la suite.

Merci à toute l'équipe de LION. Merci à : Karine pour ses bons conseils, son regard avisé sur mon projet en particulier, Jamie pour avoir vu rendu la partie microscopie de ce projet possible. Jamie, j'aurais aimé qu'on partage plus sur nos projets mais je te souhaite vraiment plein de bonnes choses pour la fin de ton projet ainsi que pour la rédaction. Je voulais remercier aussi Rafaël, nous sommes arrivés en même temps au CEA, je suis contente d'avoir pu partager de longues discussions sur tout et sur rien durant lesquelles je ne voyais pas le temps passer. Rafaël, merci pour ta gentillesse à mon égard, je te souhaite plein de positif pour la suite au CEA. Merci Clémentine pour l'accès à ton bureau, cet endroit rempli de bonnes paroles et de bonbons. Merci pour tes conseils avisés et pour avoir essayé de me faire entendre raison sur certains points (et je sais que cela n'a pas été évident vue la tête de mule que je suis...). Merci d'avoir écouté toutes mes histoires de chats, plus ennuyantes et folles les unes que les autres. J'ai aimé nos moments en dehors du labo « repas magret », « lavage de chat ». Tout cela va me manquer j'espère te voir bientôt à Marseille !

A toute l'équipe LRGM merci à Eric pour son point de vue réaliste sur mon projet ainsi que pour l'opportunité offerte de faire un lien entre les laboratoires levures via un de vos derniers projets, j'ai vraiment aimé participer à cela. Je remercie aussi Laurent pour toute sa bonne humeur et nos échanges scientifiques. Laurent, j'espère que tu as gardé les feuilles du Phmètre et du Typhoon bien précieusement mais bon, au cas où, je reste joignable pour une aide à distance ! Merci Emilie pour tes encouragements permanents, pour nos discussions personnelles, ta bonne humeur et ton point de vue toujours positif et encourageant qui m'ont beaucoup apporté. Je remercie évidemment Chloé, ma binôme de labo, qui m'a donné un soutien sans faille ! J'ai vraiment aimé nos moments au laboratoire ainsi que nos soirées à se tenir compagnie dans ce deuxième étage bien vide. Chloé, ta présence a vraiment rendu cette thèse joyeuse, merci pour nos discussions autant professionnelles que personnelles, pour m'avoir poussé à tenir les délais, pour m'avoir réconforté dans les moments difficiles, pour nos repas au soleil qui me manquent, nos goûters avec tes supers pâtisseries ; bref, merci d'avoir été là tout simplement. Je suis vraiment navrée de pas être présente pour ta fin de thèse, ne te laisse pas absorber par le stress, aies confiance en toi, en ton travail et ne te laisse pas marcher sur les pieds. Je ne aucun doute de mon côté : ton manuscrit et ta soutenance seront à la hauteur !

J'espère vraiment pouvoir repasser au labo à l'occasion de cette dernière. Je te souhaite plein de courage pour la dernière ligne droite et même si, je sais que, à ce stade ce n'est pas évident, relativise et tout se passera bien. Merci à la petite Emilie pour sa gentillesse : je te souhaite plein de courage pour la suite qui je suis sûr sera enrichissante.

Je tiens à remercier également tous nos collaborateurs :

La plateforme du Cygex en particulier Xavier et Jordane pour la purification de la protéine Rap1. L'équipe de Philippe Passero, en particulier Armelle et Jonathan pour le séquençage du ChEC. Thanks to Cees Dekker lab, particularly Cees, Bryan, Roman and Jaco for the in vitro part, I hope that the combination of our in vitro and in vivo results will give a great interesting and complete paper.

Je remercie nos collaborateurs financiers, le CEA pour avoir financé mes 3 premières années de thèse. La Ligue contre le cancer pour m'avoir permis de faire une quatrième année de thèse, plus que nécessaire pour ce projet, ainsi que l'IINSERM pour le rajout de 2 mois très utiles sur la fin.

Aurélié et Arielle : merci d'avoir toujours été d'une gentillesse incroyable avec moi et avec toutes mes péripéties administratives. Je remercie aussi Luis et Elea pour leur aide sur de nombreux petits points. Je tiens aussi à remercier Pascal et Nathalie pour leur bonne humeur quotidienne, les gentils mots et attentions qu'ils ont eus pour moi.

Je tiens à remercier ma directrice de master enfin, pour avoir porté une attention particulière à mon dossier et m'avoir donné une chance d'arriver jusqu'à la thèse. Je tiens aussi à remercier mon maître de stage de master 1, qui m'a initié au monde de la levure et m'a permis, grâce à son encadrement, d'apprendre à réfléchir par moi-même et à envisager mon parcours dans la biologie fondamentale comme une évidence.

Merci à tous mes amis d'avoir été présents, que se soit durant tout ce parcours ou lors de la soutenance. Votre présence a été vraiment d'un réel soutien, je sais que le parcours reste encore long mais qu'à l'arrivée vous serez encore là et on ne peut rêver meilleur support.

Et pour finir je tiens à remercier toute ma famille d'avoir fait preuve de confiance en moi et d'avoir été d'un réel soutien dans mon parcours. Merci à mes parents d'avoir cru en moi malgré le parcours quelque peu atypique, de m'avoir poussée à continuer en gardant la tête haute tout le long de mes études, de m'avoir encouragée, soutenue et donc d'avoir rendu tout cela possible. Merci à mon mari d'avoir toujours cru en moi et d'avoir rendu ses quatre années de thèse possibles à Paris malgré les moments difficiles, d'avoir pris soin de moi afin que je puisse me concentrer sur mon travail. Mais aussi de m'avoir permis de développer mon énergie afin de pouvoir mener ma vie, autant du point de vue personnel que professionnel. Merci pour tes sacrifices et merci d'avance pour les suivants car je sais que le chemin jusqu'au concours ne va pas être de tout repos. Merci aussi à ma belle-famille de m'avoir permis de garder un peu de vie personnelle de par ses Week ends détente et ses bons petits plats !

Et bien sûr merci à toute ma famille chat qui m'apporte tant de bonheur et aucun moment de répit pour éviter de m'ennuyer !

Merci à vous tous sans vous, c'est sûr, je ne serais pas arrivée jusque-là !

Table des matières

INTRODUCTION.....	3
PREMIERE PARTIE : LE COMPLEXE CONDENSINE	4
I. Structure et fonctionnement des condensines.....	4
1. Les complexes de la famille SMC.....	4
2. Structure générale du complexe condensine de <i>S. cerevisiae</i>	7
a) Les sous-unités de type SMC de condensine.....	7
b) Les sous-unités de type non-SMC de condensine	7
3. La fonction ATPase.....	10
4. Les rôles de condensine.....	13
II. Mécanistique de l'activité de condensine	14
1. Liaison de la condensine à l'ADN.....	14
2. Condensine extrude l'ADN en formant des boucles	19
3. Les différents modèles d'extrusion de boucle proposés.....	20
III. Sites préférentiels de liaison de condensine sur l'ADN	24
1. Recrutement aux régions péri-centromériques.....	24
2. Localisation au niveau de certains gènes.....	25
a) Localisation sur l'ADNr	25
b) Promoteurs des gènes transcrits.....	27
c) Les ADNt	28
d) Le Recombinaison Enhancer.....	28
e) Les fourches de réplication.....	29
IV. Les partenaires de condensine	29
1. Les nucléosomes.....	29
2. La topoisomérase II.....	30
V. La régulation de condensine au cours du cycle cellulaire	31
1. Régulation de l'expression de la sous-unité Ycg1.....	31
2. Régulation post-traductionnelle de condensine.....	31

DEUXIEME PARTIE : LE TELOMERE	35
I. La protéine télomérique Rap1: acteur central dans la fonction de protection des télomères	37
1. Structure de la protéine Rap1	38
2. Liaison de Rap1 à l'ADN	39
3. Rôle de Rap1 dans la protection contre les mécanismes de réparation	42
II. Condensation et ségrégation du télomère.....	44
1. L'organisation des télomères durant le cycle cellulaire	44
2. Possible rôle de la protéine Rap1 dans la condensation durant la mitose	45
 TROISIEME PARTIE : LE CHROMOSOME DICENTRIQUE.....	46
I. La formation du chromosome dicentrique, focus sur les fusions télomère-télomère.....	46
II. Le devenir du chromosome dicentrique en mitose.....	47
1. Le repliement de la chromatine suivit du clivage du pont de chromatine anaphasique	49
2. Mécanisme de sauvetage des fusions télomère-télomère chez <i>S. cerevisiae</i> : localisation préférentielle du point de clivage aux fusions.....	50
 RESULTATS	54
 DISCUSSION.....	87
I. Enrichissement local des condensines à proximité de tandems de Rap1	88
II. Décompaction de la chromatine induite par des tandems de Rap1	89
III. Augmenter l'espace entre les sites Rap1 permettrait la levée du roadblock	90
IV. Positionnement de la cassure des chromosomes dicentriques.....	91
V. « <i>Roadblock</i> » et obstacles stériques	91
VI. « <i>Roadblock</i> » de condensine par Rap1 aux télomères natifs.....	93
VII. Généralisation du modèle de <i>roadblock</i> par Rap1.....	94
 ANNEXE	96
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	124

INTRODUCTION

Première partie : le complexe condensine

I. Structure et fonctionnement des condensines

1. Les complexes de la famille SMC

Durant le processus de division cellulaire, la chromatine va drastiquement être réorganisée afin de permettre la division du matériel génétique. Dans les années 1880, Walther Flemming décrit pour la première fois des changements de conformation de la chromatine pendant le cycle cellulaire et distingue au moins deux stades : (i) l'interphase où la chromatine est sous forme d'amas homogène et (ii) la mitose où la chromatine est individualisée sous forme de chromosome en bâtonnet (**Figure 1**). Il décrira aussi les différents stades de la mitose : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

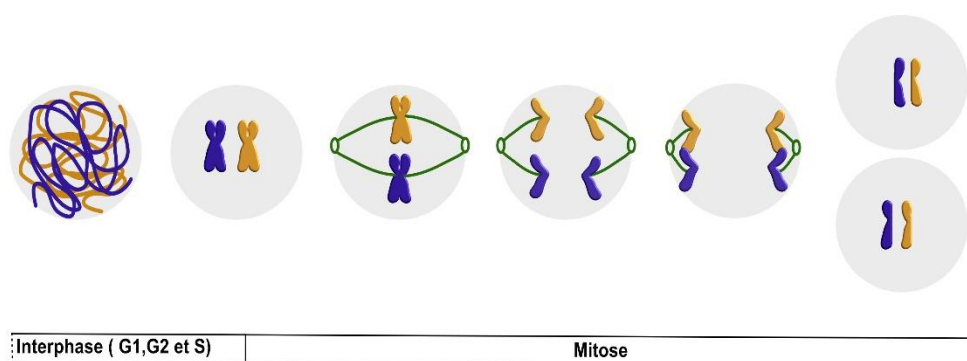


Figure 1 : Schéma résumant les observations de changement de conformation de la chromatine au cours du cycle cellulaire. Le premier stade est représentatif de l'interphase où la chromatine est sous forme d'amas décompactés homogènes. Puis les stades suivants représentent les différentes étapes de la mitose (dans l'ordre prophase, métaphase, anaphase et télophase) où l'ADN est individualisé sous forme de chromosomes en bâtonnet. Et le dernier stade est l'individualisation des deux cellules filles.

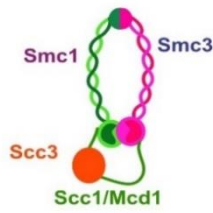
A la suite de cette découverte, le chromosome métaphasique sera mieux caractérisé et il sera admis qu'il existe plusieurs niveaux d'organisation *in vivo* relatif à l'état de condensation tel que la chromatine décondensée ou le chromosome métaphasique. Plusieurs acteurs interviennent dans ce processus dont les histones, autour desquels l'ADN s'enroule, et des complexes de la famille SMC.

Ce groupe de protéines est nommé SMC pour « *Structural Maintenance of Chromosome* ». En 1994, Tatsuya Hirano et Tim Mitchison sont les premiers à purifier à partir d'extraits d'œufs de Xénope deux protéines associées essentielles au maintien de la structure des chromosomes mitotiques *in vitro* (Hirano & Mitchison, 1994). La suite des travaux de l'équipe de Tatsuya Hirano met en évidence trois autres sous-unités se liant au dimère formant un complexe (Kimura & Hirano, 1997) qui fut nommé le complexe condensine. Il a vite été admis que ce complexe est conservé de la levure à l'Homme (Jonathan Baxter et al., 2019; Kimura et al., 1998; Saka et al., 1994; Schmiesing et al., 1998). Chez les vertébrés, il existe 2 complexes, condensines I et II, ayant des rôles distincts en mitose. Chez les levures, un seul complexe condensine est présent. Les complexes SMC se retrouvent aussi chez les procaryotes (par ex. MukBEF chez *E. coli* et Smc chez *B. subtilis*) où ils jouent un rôle dans l'organisation des chromosomes (Lioy et al., 2020).

C'est en 1997 que fut découvert un autre complexe SMC nommé cohésine car responsable de la cohésion des chromatides sœurs (Michaelis et al., 1997). Par la suite, d'autres complexes ont rejoint cette famille tel que Smc5/6 et plus récemment Wadjet (**Figure 2**). Le complexe MRX peut être aussi considéré comme un membre de la famille SMC.

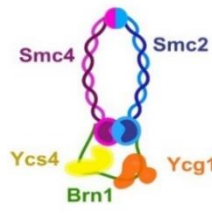
Ici, je me concentrerai sur les condensines du système modèle sur lequel a porté mon travail, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais je pourrai citer des éléments concernant d'autres espèces ou d'autres complexes SMC si cela peut aider à mieux comprendre le fonctionnement des condensines.

Eucaryotes:



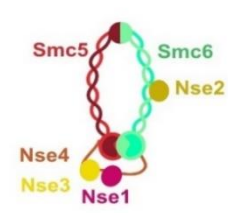
Cohésine:

Impliqué dans: Cohésion des chromatide soeur, l'organisation nucléaire et certains mécanismes de réparation.



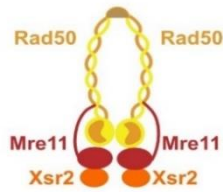
Condensine:

Impliqué dans: Condensation, la ségrégation et l'organisation nucléaire.



Smc5/6:

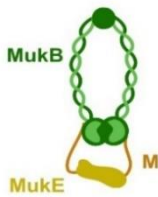
Impliqué dans: Réparation, la ségrégation et l'expression génique



MRX:

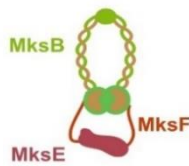
Impliqué dans: NHEJ, résection et la réplication.

Procaryotes:



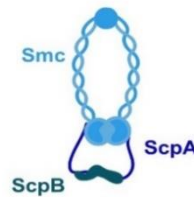
MukBEF:

Organise et individualise les chromosomes chez *E.coli*



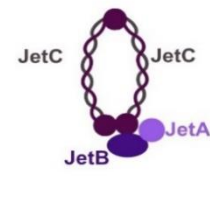
MksBEF:

Organisation et ségrégation des chromosomes



Smc-ScpAB:

Organisation et ségrégation des chromosomes



Wadjet:

Impliqué dans: Clivage d'ADN circulaire

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

Figure 2. Les complexes de la famille SMC. Panel du haut : présentation schématique des différents complexes de la famille des SMC ainsi que leurs rôles principaux respectifs. **Panel du bas :** tableau récapitulatif des correspondances de nomenclature des différentes sous-unités des complexes condensine chez les eucaryotes.

2. Structure générale du complexe condensine de *S. cerevisiae*

a) Les sous-unités de type SMC de condensine

Chaque sous-unité SMC contient deux longues hélices alpha. A leurs extrémité N- et C-terminales se trouvent deux sous-domaines de la tête ATPase contenant respectivement un motif *Walker A* et *Walker B*. Au centre de ces hélices se trouve un sous-domaine permettant leurs repliements. Lors de leur autoassemblage, les deux hélices alpha de chaque sous-unité vont s'enrouler pour former une superhélice (*coiled-coil*) d'une longueur de 50 nm environ (**Figure 3**). Cette longueur est remarquablement conservée chez les protéines de type SMC des bactéries et des eucaryotes, à l'exception de Smc5/6 qui est plus court d'un tour de super-hélice (Bürmann et al., 2017). Les sous-domaines N- et C-terminales s'assemblent pour former le domaine globulaire capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP. Les sous-domaines centraux de chacune des sous-unités SMC s'assemblent afin de former un domaine charnière liant Smc2 et Smc4.

b) Les sous-unités de type non-SMC de condensine

Une fois Smc2 et Smc4 assemblés, le complexe est complété par les sous unités non-SMC qui sont au nombre de trois. La première est la kléisine Brn1 qui fermera le complexe en reliant Smc2 et Smc4 de façon asymétrique (**Figure 3**). La longueur de la kléisine est conservée chez les eucaryotes mais est relativement plus courte chez les procaryotes. Les deux autres sous-unités Ycg1 et Ycs4 sont de type HEAT (acronyme relatif aux 4 protéines où ce motif fut découvert : Huntingtin, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A and the yeast kinase TOR1) car elles présentent ce motif structurel répété. Elles se lient à la kléisine Brn1 et n'ont pas de zone de contact direct entre elles. Ycg1 et Ycs4 possèdent des domaines d'interaction avec Smc4 et Smc2 respectivement (Piazza et al., 2014). Toutes les sous-unités de condensine sont essentielles à la viabilité cellulaire.

En particulier, les deux sous-unités de type HEAT sont essentielles pour (i) l'activité ATPase du complexe, (ii) la liaison avec l'ADN double brin et (iii) la fonction de condensine dans la condensation et la ségrégation (Lavoie et al., 2002; Piazza et al., 2014).

Une fois assemblé, le complexe complet peut adopter différentes configurations qui peuvent varier en fonction de l'activité de condensine. Des observations par AFM (Atomic Force Microscopy) montrent les configurations suivantes (chacune nommée par une lettre relative à la conformation apparente du complexe) :

-La configuration « I » où les supers-hélices de Smc2 et Smc4 sont juxtaposées.

-La configuration « B » représentative d'une inflexion des super-hélices. Une région "coude" située au 2/3 des super-hélices semble plus flexible (Bürmann et al., 2019; Lee et al., 2020). Elle permettrait une courbure prononcée des super-hélices à son niveau. Ce repliement permettrait un contact entre le domaine charnière et les têtes ATPase (Ryu et al., 2020). Une autre étude suggère un repliement moins prononcé permettant seulement un contact entre la super-hélice de Smc2 et le domaine charnière de Smc4 (Lee et al., 2020). La fonction de cette configuration "B" de condensine reste une question en suspens. Cette configuration pourrait être majoritaire en présence d'ATP (Ryu et al., 2020).

- La configuration « O » où la structure des têtes ATPase ouvre les supers-hélices de Smc2 et Smc4.

-La configuration « V » où les têtes ATPase sont éloignées.

-La configuration « P » où seulement une des têtes ATPase est en contact avec le domaine charnière, l'autre tête ATPase restant libre.

Il faut tenir compte que les approches utilisant l'AFM peuvent générer des artefacts. Il est donc essentiel de valider ces configurations par d'autres approches, par exemple par CryoEM et les méthodes de pontage.

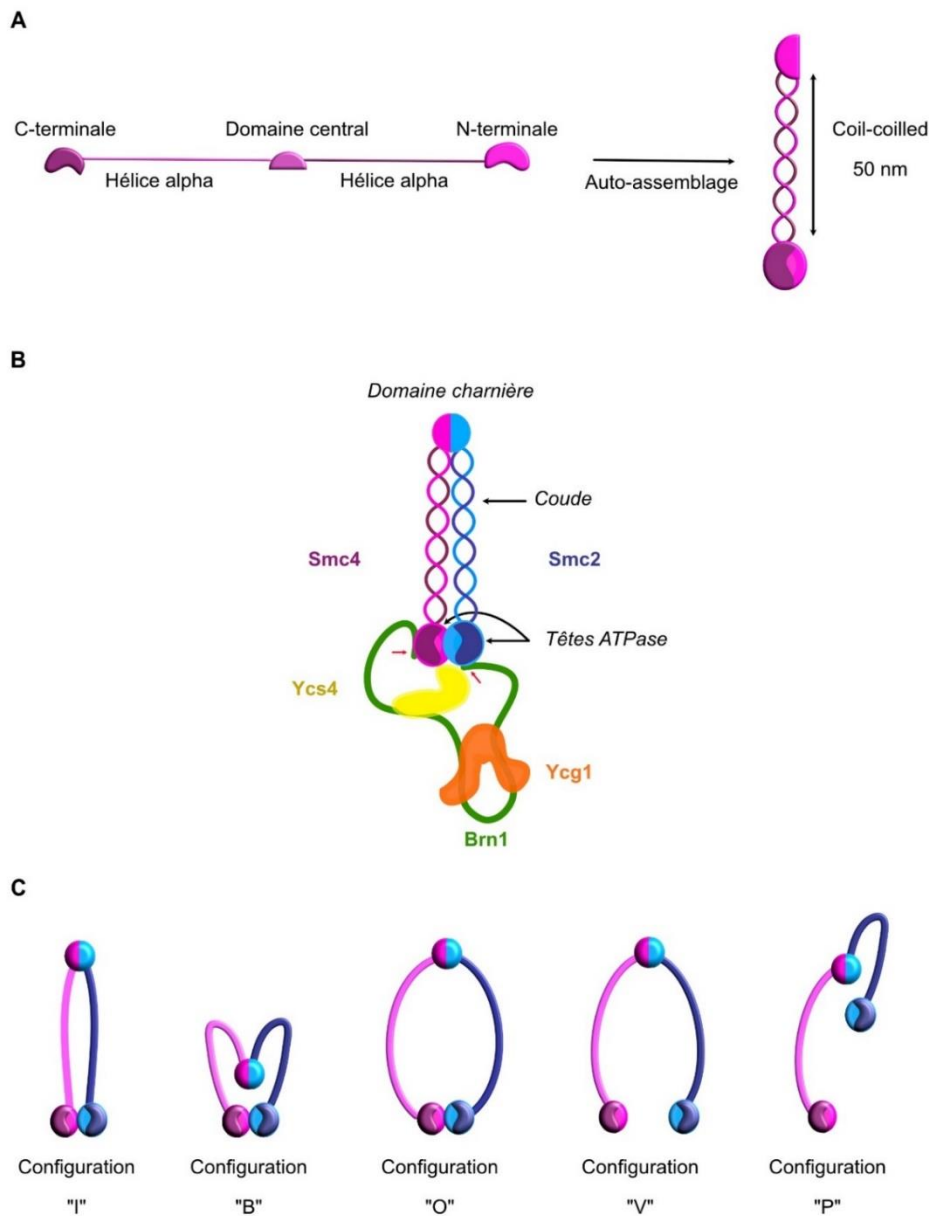


Figure 3. Assemblage et conformation de condensine. (A) Présentation schématique de l'auto-assemblage d'une sous-unité de type SMC afin de former la super-hélice qui aux extrémités comporte un domaine charnière et un domaine globulaire. (B) Représentation schématique du complexe condensine chez *S. cerevisiae*. Le complexe condensine est constitué de deux sous unités de type SMC : Smc2 et Smc4. Ces deux sous unités vont s'assembler par leurs domaines charnières. Au niveau des 2/3 des supers-hélices on y situe un coude créant un point de pliage des supers-hélices. Le complexe est aussi composé de trois sous-unités non-SMC : la kleisine Brn1 et les deux sous-unités de type HEAT Ycg1 et Ycs4. (C) Les différentes configurations du complexe condensine visualisée par AFM.

3. La fonction ATPase

Le complexe condensine possède deux sites fixant l'ATP et possédant une activité ATPase. Ils sont formés lors de l'auto assemblage des parties N- et C-terminales de chaque sous-unité SMC. Chaque site ATPase est constitué d'un motif signature ou C motif, d'un motif *Walker A* et d'un motif *Walker B*. Ces sites ont pour fonction de lier chacun une molécule d'ATP et de l'hydrolyser. *In vitro*, la vitesse moyenne d'hydrolyse est lente, de l'ordre de deux molécules d'ATP par seconde (Ganji et al., 2018).

Le cycle ATPase de condensine est divisé en quatre phases : (i) liaison de l'ATP, (ii) dimérisation (engagement) des deux têtes ATPase, (iii) hydrolyse de l'ATP et (iv) désengagement des deux têtes qui peuvent être en configuration « *apo* » non-engagées (où les deux domaines globulaires sont à proximité mais pas en contact) ou « *apo bridged* » (où les deux domaines globulaires sont séparés par une distance importante et séparés par la sous unité Ycs4) (**Figure 4**).

En présence d'ATP, la conformation majoritaire du complexe observée par AFM est la conformation « B » où les têtes ATPase sont engagées. C'est cette conformation qu'on retrouve de façon majoritaire lorsque le complexe est lié à l'ADN (Ryu et al., 2020).

L'activité ATPase est conservée dans l'évolution et co-évolue en parallèle des protéines régulatrices du complexe afin de permettre un maintien de son activité (Cobbe & Heck, 2006). La fonction ATPase est essentielle *in vivo* pour l'activité de condensation des chromosomes en mitose (Palou et al., 2018; Thadani et al., 2018). Chez la levure *S. cerevisiae*, les mutations dans les domaines ATPase de Smc2 et Smc4 ont pour conséquences des défauts de condensation, de ségrégation, du nombre de copies de l'ADN ribosomique et de viabilité. Une asymétrie des deux têtes ATPase a été montrée pour la condensine humaine (Elbatsh et al., 2019; E. Kim et al., 2020). Une asymétrie est aussi relevée chez la levure *S. cerevisiae*.

En effet, les têtes ATPase de Smc2 et Smc4 sont structurellement différentes car elles ne présentent pas les mêmes angles de liaison par rapport aux supers-hélices de Smc2 et Smc4 mais aussi une liaison différente avec la kleisine Brn1. Ces différences se répercutent sur la liaison de l'ATP et sur la contribution des deux têtes dans leur dimérisation (Hassler et al., 2019). Cette asymétrie permettrait une liaison de l'ATP en deux temps : en premier l'ATP se lierait au domaine ATPase de Smc4, induisant la dimérisation des têtes. Puis la liaison d'un second ATP au niveau du domaine ATPase de Smc2 rendrait ensuite possible l'étape d'hydrolyse.

L'enjeu est de comprendre le lien causal entre la fonction ATPase et l'activité de condensine. Des modèles appuyés par des données structurales et biochimiques proposent que l'activité ATPase permettrait d'induire les changements de conformations permettant l'activité de condensine (Hassler et al., 2019; Shaltiel et al., 2022) (voir Première Partie.I.3).

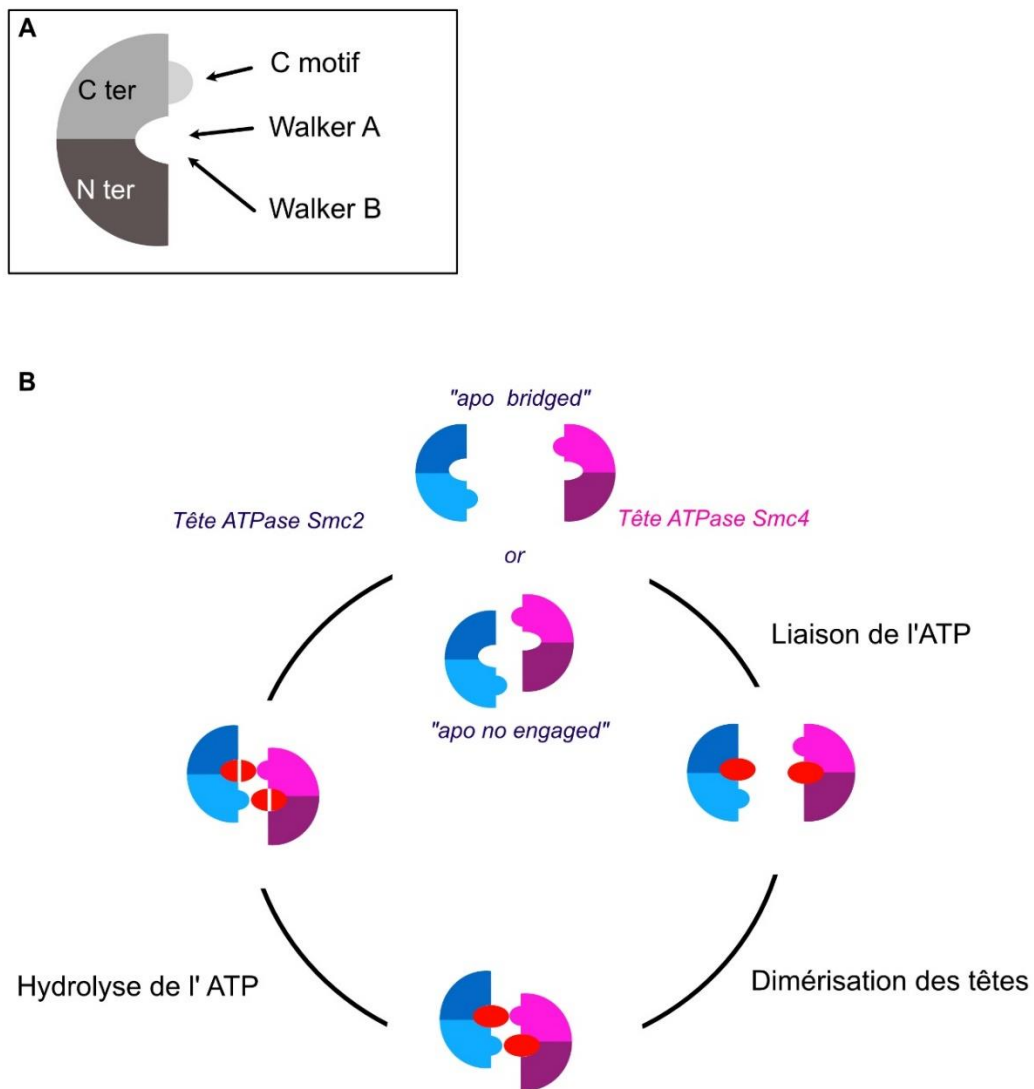


Figure 4 : La fonction ATPase de condensine (A) Schéma représentatif de la composition d'une tête ATPase composée des domaines *Walker A* et *Walker B* ainsi que du C (B) Schéma représentant le cycle ATPase de condensine. Il est composé de 4 étapes : (i) état apo sans ATP (ii) puis vient la liaison de l'ATP (iii) suivie de la dimérisation des 2 têtes ATPase (iiii) pour finir l'hydrolyse de l'ATP qui permettra le retour à l'étape 1.

4. Les rôles de condensine

Condensine a pour rôle principal l'assemblage et la ségrégation des chromosomes mitotiques. Afin que l'ADN de la cellule soit ségrégué correctement, il doit être replié davantage qu'il ne l'est en interphase. L'inactivation de condensine en interphase empêche cette compaction. Puis la compaction dépendante des condensines est maintenue tout au long de la mitose (Cuylen et al., 2011; Lavoie et al., 2002) avec un maximum en anaphase et télophase chez *S. cerevisiae* (Lazar-Stefanita et al., 2017).

Afin de compacter l'ADN, les condensines sont capables de former des boucles d'ADN (Ganji et al., 2018). La formation de boucles permet un rapprochement ou un éloignement de différentes régions chromatiniennes, impactant donc la conformation 3D de l'ADN dans le noyau qui peut être estimée par Hi-C (Ganji et al., 2018; Gibcus et al., 2018).

Condensine participe *in fine* à la ségrégation du matériel génétique de deux façons distinctes : (i) par sa fonction de compaction et (ii) par son rôle dans la séparation des chromatides sœurs. Concernant ce second rôle, les chromatide sœurs sont maintenues attachées par l'action de cohésine. Ces cohésines sont principalement clivées par la séparase lors de la transition métaphase-anaphase, cependant ce clivage peut être imparfait. Condensine agit sur la cohésion résiduelle en transmettant la force exercée par le fuseau mitotique et permet la complète dé-cohésion des chromatides sœurs (Renshaw et al., 2010).

Chez *S. cerevisiae*, condensine joue aussi un rôle dans la maintenance du nombre de copies de l'ADNr (Johzuka & Horiuchi, 2009; Palou et al., 2018), possiblement en régulant la recombinaison entre les copies. Il est possible que condensine soit également essentielle dans le regroupement des ADN de transfert (ADNt) dans le noyau, visible par microscopie (Haeusler et al., 2001).

Des études *in vitro* proposent que la condensine pourrait extruder de l'ADN surenroulé et cette activité permettrait d'absorber les surenroulements (E. Kim et al., 2022).

II. Mécanistique de l'activité de condensine

1. Liaison de la condensine à l'ADN

Les données structurales ont permis de mieux comprendre les différentes interactions de condensine avec l'ADN. Plusieurs interactions ont été identifiées, stables ou transitoires, relevant d'interactions topologiques ou pseudo-topologiques, corrélant avec la dynamique du complexe.

Le complexe condensine crée deux compartiments principaux pour l'ADN. Le premier, nommé compartiment S, en référence à Smc, est formé par les supers-hélices des 2 sous-unités SMC et fermé par l'interaction de leur têtes ATPase et de leur domaine charnière (**Figure 5**). Le second, nommé compartiment K, en référence à la Kleisine, est formé par la kléisine Brn1 et les sous-unités non-SMC Ycg1 et Ycs4, et fermé par les têtes ATPase des sous-unités SMC. Le compartiment K peut être divisé en plusieurs sous-compartiments nommés chambres I, IA et II (**Figure 5**) (Shaltiel et al., 2022). L'ADN peut occuper l'ensemble de ces compartiments et chambres.

Sur le complexe, plusieurs positions d'interaction avec l'ADN ont été identifiées. Certaines sont proposées comme étant des interactions stables permettant un premier ancrage de la condensine à l'ADN. D'autres, plus dynamiques, qualifiées de moteurs et proposées pour être relatives à l'avancé de l'ADN dans la condensine et permettant son activité. Le détail de la mécanistique sera abordé dans les deux chapitres suivants.

Une première interaction condensine-ADN se trouve au sein du compartiment K, dans la chambre II, l'interaction avec l'ADN dite de « *safety belt* » (ceinture de sécurité) est une interaction stable proposée comme interaction d'ancrage du complexe avec l'ADN. Elle implique les sous-unités Ycg1 et Brn1. Ycg1 a une structure en forme de U où viendrait se loger l'ADN grâce à des interactions électrostatiques (Kschonsak et al., 2017). L'utilisation de plusieurs substrats d'ADN double-brin montre une interaction indépendante de la séquence nucléotidique, appuyant le chargement non-spécifique de condensine. Brn1 connecte les deux branches du U, formant comme un verrou afin d'empêcher le désengagement de l'ADN de cette cavité.

Des mutations dans cette ceinture Brn1 ont un effet sur la liaison du complexe à l'ADN ainsi que sur l'hydrolyse de l'ATP (Kschonsak et al., 2017). L'ouverture de la chambre II par clivage (artificiel) de Brn1 libère condensine de son point d'ancrage. Ce clivage permet néanmoins l'avancé de la condensine sur l'ADN via une translocation due à la conservation des interactions dynamiques. Le clivage de la chambre II est suivie de la rupture de la boucle d'ADN en cours d'extrusion (Shaltiel et al., 2022). La perte de Ycg1 ouvre les différentes chambres au sein du compartiment K et a pour conséquence un changement de direction plus fréquent dans l'activité d'extrusion de boucle, ceci peut être expliqué à la non-distinction entre les interactions d'ancrage et moteur qui se trouvent à présent dans une seule et même chambre et pouvant donc être interchangeables.

L'interaction proposée comme le moteur de condensine se situe dans la chambre I et se fait entre Brn1 et Ycs4. L'ouverture de cette chambre, par clivage de Brn1, mène aussi à une rupture de la boucle mais la condensine reste fixée au point d'ancrage avec l'ADN (Shaltiel et al., 2022). Cette interaction permettrait aussi l'entrée active de l'ADN dans le compartiment S en le basculant sur les têtes ATPase, action impliquant un changement conformationnel important de Ycs4.

Le complexe condensine interagirait aussi avec l'ADN au niveau du domaine charnière formé par la jonction des sous-unités SMC Smc2 et Smc4. Les surfaces internes et externes du domaine charnière possèdent des résidus chargés positivement permettant de possibles interactions avec l'ADN (Koide et al., 2021). Lors de la fixation de l'ATP, l'ouverture des bras des sous-unités SMC permet l'accès à la surface interne du domaine charnière pouvant accueillir l'ADN double-brin (Koide et al., 2021; Soh et al., 2015). Cette interaction est faible et sans doute transitoire. Chez *Bacillus subtilis*, la liaison de l'ADN double-brin sur la surface interne du domaine charnière pourrait favoriser le changement de conformation du complexe de la forme fermée (I) à la forme ouverte (O) (Soh et al., 2015; Vazquez Nunez et al., 2021). L'absence ou le maintien en position ouverte du domaine charnière rend le complexe non-fonctionnel et mène à la dissociation de condensine de l'ADN (Cuylen et al., 2011). Il semblerait donc que l'association entre le domaine charnière et l'ADN ne soit pas strictement essentielle pour le fonctionnement du complexe. Cette hypothèse est appuyée par le fait que, chez *Bacillus subtilis*, la substitution du domaine charnière par un crochet Zn^{2+} n'a pas d'incidence majeur sur la fonctionnalité du complexe condensine (Bürmann et al., 2017).

In vitro la présence d'ATP n'est pas essentielle pour la liaison de condensine à l'ADN (Eeftens et al., 2017; Strick et al., 2004). Cependant l'activité ATPase est essentielle pour l'initiation et le maintien de la condensation (Hudson et al., 2008; Kinoshita et al., 2015; Palou et al., 2018; Thadani et al., 2018). La liaison de condensine à l'ADN aiderait à la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP de façon modérée (Piazza et al., 2014). Cette liaison, indépendante de l'ATP, est sensible à de hautes concentrations salines ce qui laisse penser que ces interactions seraient de caractères non-topologiques. Lorsqu'au contraire condensine se lie à l'ADN en présence d'ATP, cette liaison est peu sensible à des concentrations salines élevées, ce qui laisse penser à des interactions de caractères topologiques. Ces données suggèrent qu'en présence ou

non d'ATP les condensines sont capable de se lier à l'ADN mais de façons différentes, et surtout qu'en présence d'ATP la condensine est capable d'interagir de façon plus stable avec l'ADN.

In vivo, des mutations des têtes ATPase Smc2 ou Smc4 inhibant leur dimérisation, la liaison ou l'hydrolyse de l'ATP ou sa stimulation par la liaison à l'ADN ont été testées. Elles provoquent des défauts plus ou moins prononcés de condensation et de ségrégation. Ces mutants ne modifient pas la présence de condensine détectée par ChIP à proximité des centromères en métaphase, où les condensines sont recrutées par l'intermédiaire de la protéine Shugoshine (Sgo1). Seul un mutant impactant la liaison de l'ATP au site Smc4 impacte la liaison à l'ADN (Thadani et al., 2018).

Ce qui soulève la question suivante : quelles interactions détecte-t-on par ChIP ? Est-ce l'interaction d'ancrage et donc le point d'accroche stable entre condensine et l'ADN ? Ou détecte-t-on des interactions dynamiques relatives à l'activité d'extrusion de boucle de condensine ? Ou des interactions indirectes à l'ADN passant par d'autres protéines présente sur l'ADN comme par exemple dans le cas shugoshine (Yahya et al., 2020a) ?

Un premier modèle hypothétique du chargement de condensine sur l'ADN a été proposé (Robellet et al., 2017), inspiré du modèle de chargement des cohésines (Murayama & Uhlmann, 2015). Ce modèle propose une liaison de condensine en deux temps : (i) la condensine se lierait de façon non-topologique par une association électrostatique au niveau de la « *safety belt* » puis, une fois la primo-association établie, (ii) les condensine se lierait de manière topologique par le piégeage de l'ADN dans le compartiment S de façon dépendante de l'ATP (Eeftens et al., 2017; Piazza et al., 2014). Ce modèle reste à démontrer.

Ces dernières années les études structurales et *in vivo* ont permis de mettre en lumière plusieurs points de liaison de condensine et d'avancer sur l'établissement de nouveaux modèles d'action de condensine. Il reste cependant à faire le lien entre la mécanistique et le mécanisme général de prise en charge de la condensation à l'échelle du chromosome par condensine.

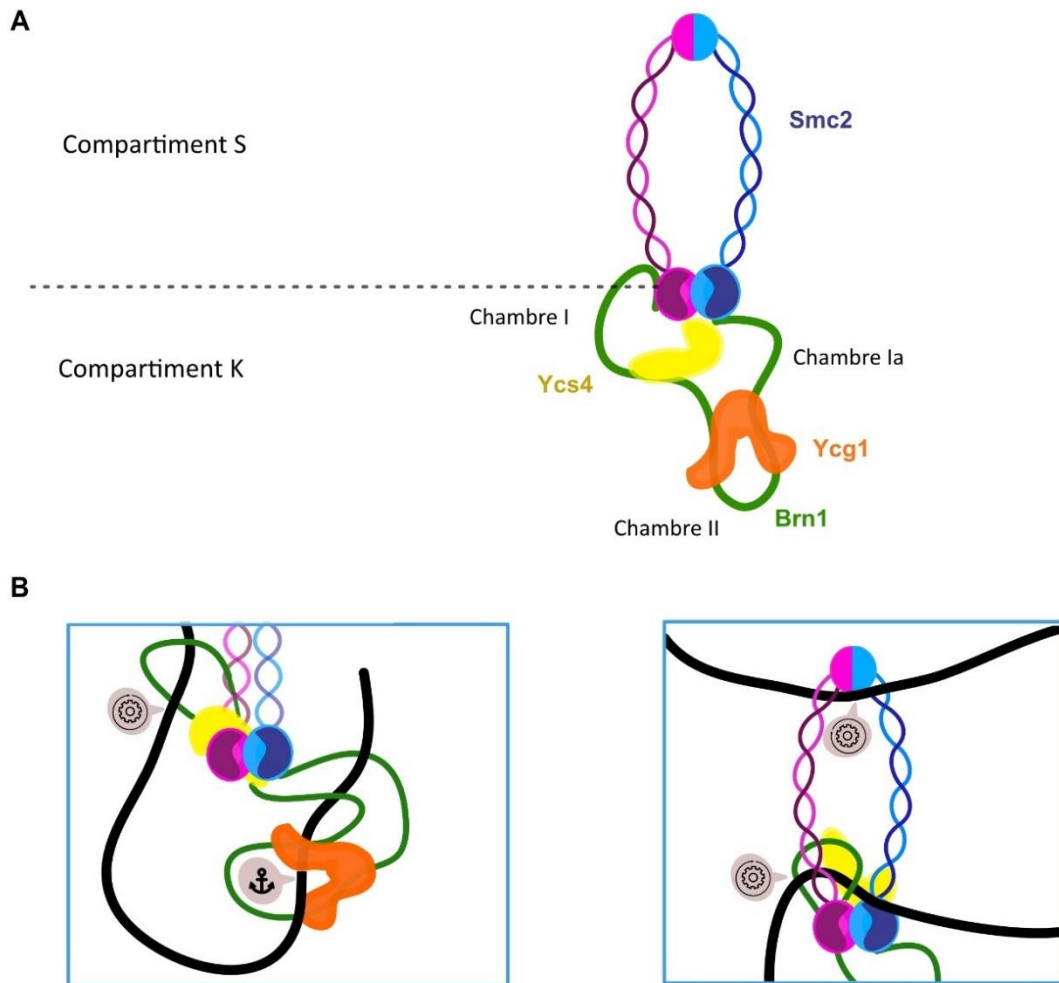


Figure 5. Les interactions condensine/ADN. (A) Schéma représentant les deux différents compartiments de condensine, avec le détail des chambres concernant le compartiment K. (B) Les interactions de l'ADN avec les différents compartiments. Dans le panel de gauche les interactions au niveau du compartiment K. Et le panel de droite représente les interactions de l'ADN dans le compartiment S. L'ancrage représente l'interactions stable d'ancrage avec l'ADN et l'écrou les interactions dynamiques avec l'ADN.

2. Condensine extrude l'ADN en formant des boucles

Depuis la découverte du complexe, deux principaux modèles ont été proposés pour expliquer sa capacité à compacter l'ADN. Le premier modèle est celui de réticulation stochastique où le complexe pourrait s'ouvrir afin de capturer de façon aléatoire deux molécules d'ADN (Cuylen et al., 2011; Thadani et al., 2018). Le second est le modèle d'extrusion de boucle (Goloborodko, Imakaev, et al., 2016; Goloborodko, Marko, et al., 2016; Marko et al., 2019; Nasmyth, 2003; Riggs, 1990) qui consiste, suite au chargement du complexe sur l'ADN, à son passage en plusieurs points afin de former une boucle qui s'agrandira étape par étape, permettant une condensation locale de la chromatine.

C'est en 2018 que le processus d'extrusion de boucle *in vitro* a pu être observé par une analyse sur molécule unique (Ganji et al., 2018). Cette étude a permis d'appuyer de façon concrète le modèle d'extrusion de boucle. Depuis, l'activité d'extrusion de boucle a été observée dans d'autres laboratoires (Sudhakar et al., 2021) et avec différents complexes de la famille des SMC tels que cohésine et Smc5/6 (Davidson et al., 2019; Y. Kim et al., 2019; Pradhan et al., 2021). Parallèlement à ces études appuyant la validité du modèle d'extrusion de boucle, le processus a été caractérisé plus en détail au niveau moléculaire et structurel.

L'initiation et le maintien de la boucle dépend de la fixation et de l'hydrolyse ATP (Ganji et al., 2018; Lee et al., 2020; Terakawa et al., 2017). Dans le processus d'extrusion de boucle, la molécule d'ADN est non-orientée, c'est-à-dire que le complexe peut extruder dans une direction ou dans une autre. Cependant la formation de la boucle se fait de façon unidirectionnelle due à la distinction entre la liaison d'ancrage et la liaison dite moteur (Shaltiel et al., 2022). Le fait que la condensine puisse transloquer sur l'ADN dans un sens ou dans l'autre mène à des divergences ou des convergences entre 2 boucles extrudées par des condensines distinctes (E. Kim et al., 2020).

La visualisation de la formation de la boucle par étude sur molécule unique a mis en évidence la capacité d'une boucle à influencer sur la taille d'une boucle à proximité. Et des structures secondaires tel la boucle Z (**Figure 6**) sont possibles en formant une seconde boucle dans une première boucle (E. Kim et al., 2020).

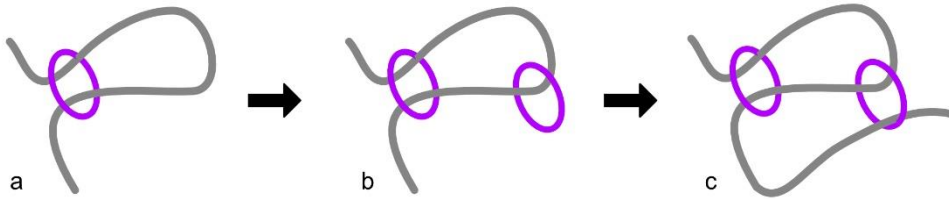


Figure 6 : Schéma représentant la « Z loop ». a) Formation d'une première boucle par un complexe condensine. b) Fixation d'une seconde condensine sur la boucle déjà formée par la première. c) Formation d'une seconde boucle par la seconde condensine.

Une estimation de la taille et de la vitesse d'extrusion de la boucle par le complexe a été faite sur de l'ADN nu (Ganji et al., 2018; Terakawa et al., 2017): 5 à 40 kb par boucle et une vitesse de 63 à 600 pb par seconde demandant 2 molécule d'ATP à chaque étape d'extrusion. Cette vitesse est sensible à la concentration en ATP et à la tension appliquée sur l'ADN (Eeftens et al., 2017; Je-Kyung et al., 2021; Terakawa et al., 2017).

3. Les différents modèles d'extrusion de boucle proposés

Plusieurs mécanismes d'extrusion de boucle ont été proposés pour les condensines. Bien que ces modèles restent hypothétiques ils participent néanmoins à la compréhension du mécanisme d'extrusion de boucle.

« *Inchworm model* » ou modèle du ver

Proposé par (Nichols & Corces, 2018), l'interaction du domaine charnière avec l'ADN est le point d'ancrage de la condensine. Les sous-unités non-SMC ont deux points de liaison avec l'ADN, ce dernier avançant de façon récurrente à chaque nouvelle liaison de l'ATP, agrandissant ainsi la boucle (**Figure 7**). Ce modèle repose cependant sur des interactions stables au niveau du domaine charnière qui ne semblent pas corrélées avec les observations faites par les approches biochimiques et structurales qui privilégient une interaction stable entre Brn1 et Ycg1 et non avec le domaine charnière.

« *Scrunching model* » ou modèle de la marche de la chenille

Dans ce modèle alternatif à l'extrusion de boucle, l'ADN n'est pas à proprement extrudé mais capturé et stabilisé de façon stochastique. Ce modèle présenté par (Terakawa et al., 2017) propose que la condensine se lie de façon stable à l'ADN au niveau de la kléisine puis, de façon transitoire, au niveau du domaine charnière. Cette interaction ADN-charnière est ramenée vers le compartiment K par repliement des sous-unités SMC au niveau du coude. Ce repliement du coude vers les têtes forme une conformation « B » du complexe, observable par AFM (Ryu et al., 2020). Ce changement de conformation permet l'avancée de la boucle étape par étape. Bien que ce modèle semble en accord avec les interactions connues de condensine avec l'ADN et soit appuyé par des observations en AFM, il reste cependant peu défini sur la formation et la stabilisation de la boucle.

« *DNA pumping model* » ou modèle de la pompe à ADN

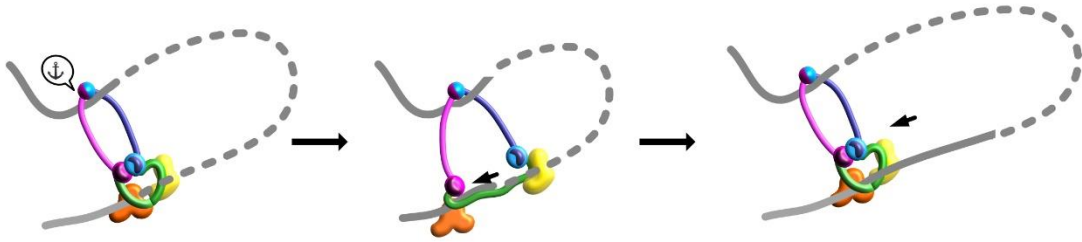
Ce modèle avancé par (Diebold-Durand et al., 2017; Marko et al., 2019) propose une ouverture de la chambre S déclenchée par la liaison de l'ATP. Cette ouverture de la chambre S permet l'entrée par mouvement brownien de l'ADN (incurvé/flexible) dans ce compartiment.

Puis l'hydrolyse de l'ATP induit la fermeture de ce compartiment ainsi que l'ouverture du compartiment K. L'ADN coulisse donc vers le compartiment K, première étape de formation de la boucle. Puis, lors de la prochaine liaison de l'ATP un nouveau cycle s'engage permettant l'agrandissement de la boucle (**Figure 7**). Ce modèle propose une avancée de la boucle par une ouverture entre les deux compartiments. La stabilisation de la boucle n'est cependant pas abordé.

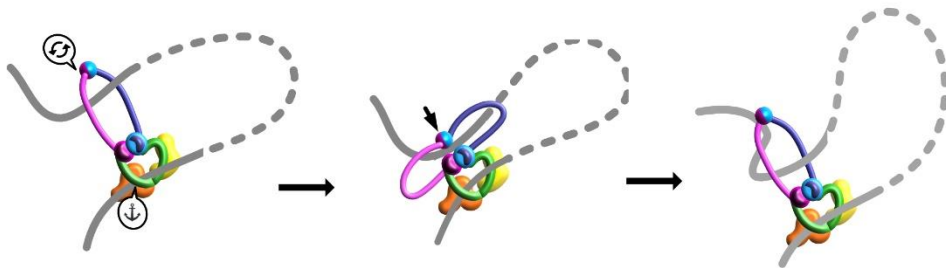
« *Hold and Feed model* » ou modèle tenir et alimenter

Ce modèle proposé par (Shaltiel et al., 2022), implique deux points d'interactions au niveau de la kléisine : (i) un point d'ancrage stable, la « *safety belt* » entre Brn1 et Ycg1, et (ii) un point moteur entre Brn1 et Ycs4. La liaison de l'ATP permettrait l'entrée active de l'ADN dans le compartiment S. Cette entrée se ferait *via* un important changement de conformation de Ycs4. Cette modification de conformation permettrait le basculement de l'ADN sur les têtes ATPase et donc l'entrée d'une demi-boucle d'ADN (**Figure 7**). Puis l'hydrolyse de l'ATP ouvre un passage entre les compartiments K et S permettant l'agrandissement de la boucle initiale. Ce modèle reprend des éléments du modèle précédent (*DNA pumping*) et en amène de nouveaux : (i) la caractérisation par des approches biochimiques d'un point d'ancrage et d'un point moteur et (ii) une proposition de l'entrée active de l'ADN dans le complexe par changement de conformation. Ce modèle est le plus abouti au niveau du mécanisme moléculaire et le plus en accord avec l'ensemble des données existantes à ce jour.

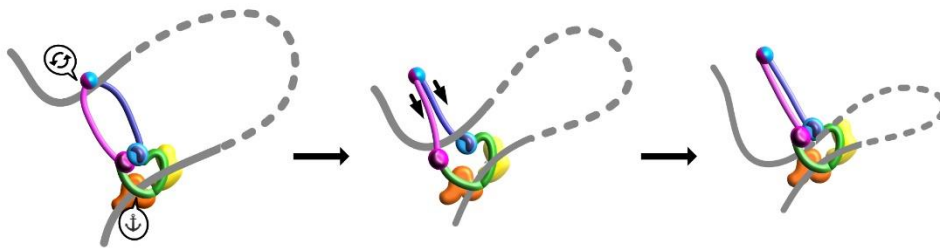
Inchworm model:



Scrunching model:



DNA pumping model:



Hold and Feed model:

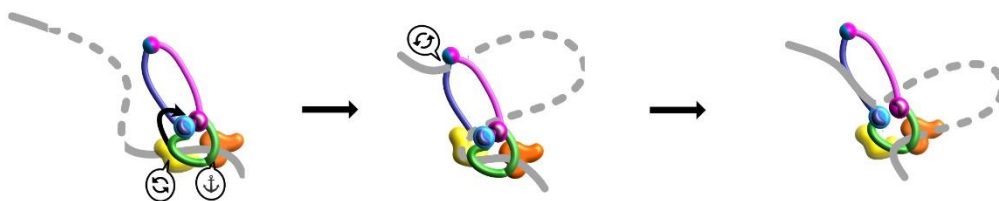


Figure 7. Différents modèles d'extrusion de boucle. Ces derniers varient dans les différents points d'accroche de condensine avec l'ADN mais aussi dans la mécanistique de l'avancée du processus d'extrusion de boucle. Voir texte pour plus de détails.

III. Sites préférentiels de liaison de condensine sur l'ADN

La condensine se lierait donc à l'ADN en prenant un point d'ancrage et formerait des boucles de chromatine à partir de ce point. Comprendre le fonctionnement de condensine *in vivo* passe par l'étude de leur localisation, sachant que, comme abordé précédemment, il peut être difficile de faire la distinction entre le point d'ancrage et le point moteur relatif à l'avancée de la condensine sur l'ADN. Peu d'études ont été faites chez *S. cerevisiae* concernant la localisation de condensine *in vivo* à différentes phases du cycle cellulaire. Dans les prochaines parties je traiterai des localisations ponctuelles de condensine ayant été étudiées.

1. Recrutement aux régions péri-centromériques

Chez *S. cerevisiae*, des données de *Chromatin Immuno Precipitation* (ChIP) ont montrées un enrichissement des condensine saux centromères et aux régions péri-centromériques en prométaphase-métaphase (D'Ambrosio et al., 2008; Leonard et al., 2015a). Cet enrichissement est renforcé en présence de nocodazole, corrélant avec un possible impact de la bi-orientation (Leonard et al., 2015a) et de l'activation du point de contrôle de l'assemblage (SAC). Il diminue lors du passage en anaphase où les condensines sont re-localisées sur les bras des chromosomes (Leonard et al., 2015a).

Un facteur intervenant dans la localisation de condensine aux centromères et péri-centromères en début de mitose est la protéine Sgo1. Elle intervient dans différents processus tel que (i) le maintien de la cohésion des centromères, (ii) la détection de tension sur les microtubules et (iii) la bi-orientation des chromosomes. Sgo1 est localisée aux régions péri-centromérique en métaphase et dégradée en début d'anaphase. Sgo1 interagit directement avec condensine, interaction régulée par la phosphorylation de Sgo1 induite directement par la kinase Mps1 (Yahya et al., 2020b).

Sgo1 aurait aussi un rôle dans le maintien de la kinase Aurora B (Ipl1) aux kinétochores en métaphase (Peplowska et al., 2014), se décrochant en réponse à la tension entraînant alors la dissociation de condensine et d'Aurora B du centromère (Nerusheva et al., 2014.).

2. Localisation au niveau de certains gènes

a) Localisation sur l'ADNr

De par ses séquences répétées, sa forte transcription unidirectionnelle ainsi que sa taille, la ségrégation de l'ADNr est une vraie difficulté lors de la mitose chez la levure. Dans le noyau, la condensine est fortement enrichie au nucléole (Freeman et al., 2000). La condensation de l'ADNr est l'un des premiers éléments ayant permis d'étudier la fonction de condensation des condensines. Chez *S. cerevisiae*, l'ADNr présente plusieurs formes selon son degré croissant de condensation : *puff*, *cluster line* puis *loop* (**Figure 8**). Les condensines sont essentielles pour le passage de la forme *puff* présente en G1 à la forme *cluster line* présente en début de mitose puis en *loop* ainsi que dans le maintien des formes compactées (Lavoie et al., 2004).

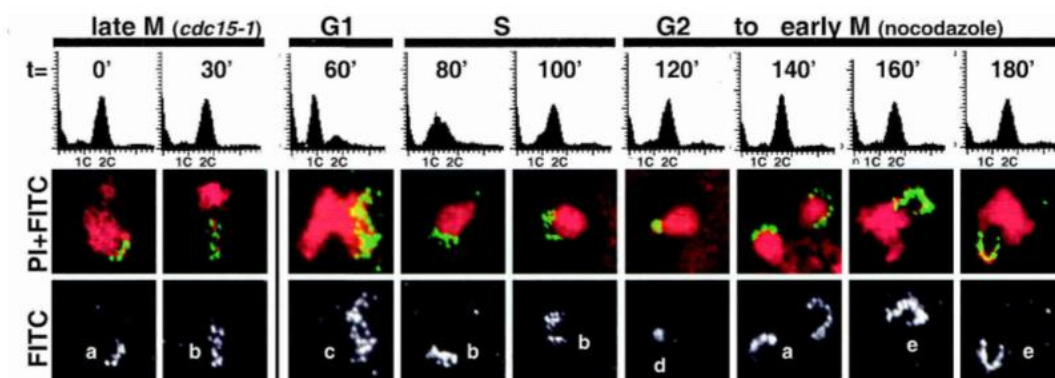


Figure 8 : Intermédiaires de conformation de l'ADNr au cours du cycle cellulaire. Images extraites de Lavoie et al. (2004). **Panel du haut :** Différentes phases du cycle cellulaire. Une souche *cdc15-1* a été utilisée pour synchroniser les cellules en fin de phase M. Après la relâche est effectué à température permissive afin d'obtenir des cellules en G1. Et enfin, du nocodazole a été ajouté à la culture 1 h après la relâche pour les synchroniser en phase M précoce. Les graphiques représentent les résultats de l'analyse par cytométrie. **Panel du bas :** Observation des structures de l'ADNr à différentes phases du cycle cellulaire par FISH (Fluorescent In Situ Hybridation) en utilisant une sonde hybridant l'ADNr (vert) et un marqueur de l'ADN (rouge). On distingue différentes structures de l'ADNr.

Le nombre de copie d'ADNr (100-200) fait du bras droit du chromosome XII le plus long de *S. cerevisiae*. Ceci explique que la ségrégation de l'ADNr dépend de mécanismes plus complexes que pour les autres chromosomes. L'ADNr va être davantage condensé en mitose relativement aux autres chromosomes (Guacci et al., 1994; Harrison et al., 2009; Lavoie et al., 2004; Félix Machín et al., 2005). Cette hyper-condensation en début d'anaphase serait dépendante de la première libération de la phosphatase Cdc14 du nucléole (Amours et al., 2004). Les mutants de Cdc14 induisent des ponts d'anaphase formés par l'ADNr dû à la non-disjonction des chromatides sœurs à ce niveau, alors que les autres chromosomes sont ségrégués correctement (Quevedo et al., 2012). La restauration de l'activité de Cdc14 suffit à corriger ce défaut de ségrégation spécifique à l'ADNr (Félix Machín et al., 2005). Les condensines sont essentielles en anaphase afin de ségréger *a minima* le long bras du chromosome XII contenant l'ADNr et, possiblement, les bras les plus longs d'autres chromosomes. On notera d'ailleurs l'organisation particulière sur ce chromosome en anaphase présentant une boucle reliant le centromère et le centromère proximal à la région gauche proximal du cluster de l'ADNr. Cette structure est perdue lors de l'inactivation de condensine affectant l'organisation du chromosome en anaphase (Lazar-Stefanita et al., 2017).

Concernant la localisation de condensine sur l'ADNr, des données de CHIP révèlent une répartition hétérogène de condensine. Elle est présente aux sites RFB (« *Replication Fork Barrier* »), de façon dépendante de la fixation de Fob1, Tof2 et du complexe monopoline Csm1/Lrs4 (Johzuka & Horiuchi, 2009). Elle est aussi présente sur le NTS1 et le NTS2 ainsi que le long du gène 35S. L'association condensine-35S est régulée négativement par la transcription par l'ARN polymérase I (Johzuka & Horiuchi, 2009). Cdc14 aurait un impact négatif cette transcription. Ce rôle de Cdc14 est essentiel pour une ségrégation correcte (Félix Machín et al., 2006) ainsi que pour l'association de condensine sur l'ADNr (Clemente-Blanco et al. 2009).

En l'absence de Fob1 et de Cdc14, la ségrégation de l'ADNr reste efficace (Felix Machín et al., 2006), ce qui laisse envisager d'autres mécanismes. Plusieurs voies indépendantes agiraient donc dans l'association de condensine à l'ADNr.

b) Promoteurs des gènes transcrits

Chez *S. cerevisiae*, des approches de CHIP montrent une corrélation inverse entre la présence de condensine et cadres de lecture ouverts (« ORF ») (D'Ambrosio et al., 2008), ce qui laisse penser qu'il existe un lien entre la condensine et la transcription. Chez *S. pombe*, l'inhibition de la transcription Pol I est un prérequis pour la correcte ségrégation des chromosomes et la transcription Pol I a un effet antagoniste sur l'accumulation de condensine sur l'ADNr (Clemente-Blanco et al., 2009; Johzuka & Horiuchi, 2007). À l'échelle du génome, la présence de condensine n'est pas corrélée à l'expression génique (Paul et al., 2018). Cependant la condensine serait d'avantage présente aux sites d'initiation des transcrits Pol II, liaison qui diminuerait en réponse à une répression de la transcription (Sutani et al., 2015). Cette présence de condensine aux sites d'initiation pourrait être une conséquence de l'absence de nucléosomes sur ces sites. Cependant, (Rivosecchi et al., 2021) propose que cette corrélation entre la présence de condensine et les sites d'initiation des transcrits Pol II serait due à la création d'une barrière (« roadblock ») formée par l'ARN polymérase. Ce modèle est appuyé par le fait que l'absence de Sen1, protéine requise pour la terminaison des transcrits Pol II, produit une forte accumulation de la Polymérase et des condensines au site de terminaison. L'ajout en fin de gène d'une répétition poly-T, qui supprime le défaut de terminaison de ces transcrit, supprime l'accumulation de la polymérase et des condensines.

c) Les ADNt

Les condensines ont été proposées comme nécessaires dans le regroupement des gènes codant les ADNt visualisés par microscopie (Haeusler et al., 2001). Toutefois, un tel regroupement n'a pu être confirmé par Hi-C (Lazar-Stefanita et al., 2017). Par ChIP, condensine semble aussi préférentiellement localisée sur certains ADNt (D'Ambrosio et al., 2008). Cet enrichissement corrèle avec deux facteurs : (i) le complexe Scc2/4 nécessaire au recrutement des cohésines et (ii) le facteur de transcription TFIIC qui reconnaît le motif B box (GTTCXAXXC) des ADNt de façon indépendante à la transcription. L'absence de Scc2/4 mène à une diminution partielle de la liaison de condensine et de façon directe ou indirecte à une diminution de la condensation (D'Ambrosio et al., 2008). La perte de TFIIC mène elle aussi à une diminution de condensine au niveau des ADNt mais aussi à une diminution générale du niveau de Scc2/4 (D'Ambrosio et al., 2008). Ceci suggère que le facteur TFIIC est impliqué dans le recrutement ou la stabilisation de Scc2/4 et directement ou indirectement de condensine. L'insertion d'un motif B box induit un léger pic de recrutement des condensines. Comme la délétion d'un ADNt ne permet pas de supprimer totalement le recrutement de condensine (D'Ambrosio et al., 2008), on peut donc penser que cette localisation est multifactorielle et que le contexte chromatinien pourrait aussi avoir un impact sur la localisation de condensine.

d) Le Recombinaison Enhancer

L'élément « *enhancer* » de recombinaison (RE) est un élément fonctionnel situé sur le bras gauche du chromosome III. Il intervient dans le changement de conformation du chromosome III afin de procéder au changement de type sexuel se faisant par recombinaison homologue avec une cassette silencieuse (HML alpha ou HMR a) (Belton et al., 2015).

Par ChIP, condensine est fortement enrichie au RE dans les cellules *MATa* (D'Ambrosio et al., 2008; Li et al., 2013). Cette localisation corrèle avec la présence de la déacetylase Sir2 qui permettrait avec condensine la régulation de la structure du chromosome III et le rapprochement

spatial du locus *MATa* de la cassette *HML* (Li et al., 2013, 2019). Le recrutement de condensine au RE, et plus particulièrement au niveau de son segment nommé *RDT1*, serait similaire à celui découvert pour l'ADNr, impliquant une interaction avec Fob1, Tof2 et la monopoline Csm1/Lrs4 (Dinda et al., 2021).

e) *Les fourches de réplication*

Les condensines ont été détectées aux fourches de réplication en phase S en présence d'hydroxyurée, un inhibiteur de la synthèse des dNTP (D'Ambrosio et al., 2008). Aucun rôle n'était connu concernant la fonction de condensine aux fourches de réplication. Des travaux récents proposent que condensine aurait un rôle dans la progression des fourches de réplication en condition de stress réplcatif. Cette localisation serait en partie médiée par la présence du complexe MRX impliqué dans la réponse à ce stress (Axel Delamarre, 2016).

IV. Les partenaires de condensine

1. Les nucléosomes

La localisation de condensine détectée par ChIP montre une distribution en partie répétée, du moins sur certains chromosomes, tous les ~15 kb. Cependant lors de la délétion d'une partie de la séquence cette distribution n'est pas modifié (D'Ambrosio et al., 2008). Aucun facteur montré pour avoir un rôle dans le recrutement de condensine n'explique cette distribution. Condensine pourrait être capable d'interagir avec des variants d'histones dans d'autres espèces (*S. pombe* et *H. sapiens*) (Robellet et al., 2017). Chez *S. cerevisiae* aucune donnée ne va dans ce sens. De plus, le domaine d'interaction de condensine avec les histones n'est pas conservé (Piazza et al., 2013, 2014), laissant penser que ce mécanisme n'est pas conservé.

Chez *S. cerevisiae*, la distribution de condensine pourrait être complémentaire à celui des nucléosomes (Piazza et al., 2014; Toselli-Mollereau et al., 2016). Certains facteurs tels que RSC, Gcn5 et Mts2, qui permettent la déplétion des nucléosomes et donc la création de régions

libres de nucléosomes, favorisent la liaison de condensine (Robellet et al., 2014; Toselli-Mollereau et al., 2016). *In vitro*, condensine peut fixer et extruder l'ADN en présence d'un nucléosome (Kong et al., 2020; Pradhan et al., 2021) mais il n'est pas simple de transposer cette observation à la situation *in vivo* où il n'y pas un mais de nombreux nucléosomes à intervalle régulier. De nouvelles études *in vitro* suggère que cette extrusion d'un nucléosome est un événement minoritaire et requiert une faible tension de l'ADN. Le remodelleur FACT « *Facilitates Chromatin Transcription* » pourrait rendre ce processus d'extrusion d'un (des) nucléosome(s) plus efficace (Shintomi et al., 2015; Sudhakar et al., 2021). Concernant la corrélation entre condensine et nucléosome, il est important de garder en tête que la distribution de condensine détectée par ChIP peut refléter le recrutement ou l'activité de condensine. De ce fait il est difficile d'interpréter si les zones sans nucléosome favoriseraient la fixation initiale de condensine ou si les nucléosomes bloquent/ralentissent l'activité d'extrusion de boucle de condensine. De plus, l'action de la tension générée par condensine sur les nucléosomes n'a pas été explorée. Cela pourrait être un facteur limitant la fixation des nucléosomes par un déroulement de l'ADN les entourant.

En résumé et en conclusion provisoire, condensine pourrait préférer les zones sans nucléosomes pour son chargement et dans certaines conditions, extruder les nucléosomes.

2. La topoisomérase II

La topoisomérase II (Top2) catalyse le clivage de deux brins d'ADN ainsi que leur réunion pour relâcher les tensions topologiques de la molécule d'ADN. Top2 est requise pour la condensation et la ségrégation des chromosomes mitotiques (Uemura et al., 1987). L'inactivation de Top2 montre son rôle essentielle dans le débobinage des super-enroulements de l'ADN en mitose afin de permettre la ségrégation des chromosomes (J. Baxter et al., 2011). Cette action de débobinage permet d'éviter la formation de pont d'anaphase entre les chromatides sœurs (Jonathan Baxter & Diffley, 2008).

Même si les phénotypes liés à l'inactivation de condensine ou de la topoisomérase II semblent proches, ces deux acteurs possèdent bien deux rôles distincts. Appuyé par le fait que l'absence de condensine n'affecte pas l'activité de la topoisomérase (Cuvier & Hirano, 2003). Cependant, bien que le recrutement de condensine ne dépende pas de Top2, la persistance de la liaison de condensine aux chromosomes lors de l'inactivation de Top2 suggère que la localisation transitoire de condensine pendant l'anaphase est affectée par l'activité Top2 (Leonard et al., 2015).

V. La régulation de condensine au cours du cycle cellulaire

La dynamique du complexe et son action en mitose implique une régulation fine de son activité.

1. Régulation de l'expression de la sous-unité Ycg1

Chez *S. cerevisiae*, la sous-unité Ycg1 est la seule sous-unité dont l'expression est régulée au cours du cycle cellulaire (Doughty et al., 2016). Elle atteint son maximum en mitose pour décroître lorsque la cellule revient en G1. Ycg1 est par ailleurs la sous-unité de condensine qui a le plus bas taux d'expression, avec un minimum en interphase permettant de limiter l'action de condensine en dehors de la mitose. Ycg1 est donc la seule sous-unité qui serait régulée au niveau de son expression, et comme son niveau d'expression est le plus bas, cela la rend donc limitante pour la formation du complexe.

2. Régulation post-traductionnelle de condensine

L'activité kinase de CDK (Cdc28) est un déterminant de l'entrée en mitose. CDK phosphoryle la sous-unité Smc4 de condensine (Kimura & Hirano, 1997) (Robelet et al., 2015; Shintomi et al., 2015). L'induction d'une phosphorylation prématurée de Smc4 induit une condensation précoce de la chromatine, suggérant une causalité entre cette phosphorylation et l'activité de condensine (Thadani et al., 2018).

Rendre les sites constitutivement actifs impacte de façon négative la dynamique de la liaison de condensine sur l'ADN, suggérant que des cycles de phosphorylation/déphosphorylation sont nécessaires pour la condensation de la chromatine. Il existe aussi un site de phosphorylation de type CDK au niveau de la ceinture de sécurité formé par Brn1. L'abolition de la phosphorylation de ce site inhibe la liaison de condensine à l'ADN (Kschonsak et al., 2017). La phosphorylation de condensine par CDK est un prérequis pour sa phosphorylation par la kinase Cdc5 (St-Pierre et al., 2009). Cdc5 phosphoryle de façon directe et indirecte toutes les sous-unités de condensine (**Figure 9**). Cette deuxième vague de phosphorylation, significative dans les phases les plus avancées de la mitose (anaphase et télophase), compenserait la baisse de l'activité CDK consécutive à l'entrée en anaphase. Elle induit aussi une augmentation de l'activité de condensine.

Une dernière phosphorylation est possible par la kinase Aurora B (Ip11) (**Figure 9**), une composante du complexe CPC (« *Chromosomal Passenger Complex* »). Elle phosphoryle Ycg1 directement ou indirectement, une phosphorylation requise pour l'hyper-condensation de l'ADNr en anaphase et télophase (Lavoie et al., 2004).

La phosphatase Cdc14 joue aussi un rôle dans la régulation de condensine (**Figure 9**). Tout comme Cdc5, Cdc14 est essentielle pour la sortie de mitose. Cdc14 est séquestrée dans le noyau par formation d'un complexe avec Net1 qui joue le rôle d'inhibiteur. Cdc14 va être actif lors de sa sortie du noyau en début d'anaphase, étape dépendante de Cdc5 nommée FEAR (« *Fourteen Early Anaphase Release* »). Cette relâche favorise la localisation de condensine sur l'ADNr, favorisant sa condensation et sa ségrégation correcte (Amours et al., 2004).

L'activité de condensine est aussi régulée par la ségrégase Cdc48 (**Figure 9**) et ses co-facteurs Ufd1 et Npl4 qui ubiquitylent Ycg1 et Brn1 lors de la mitose. Cdc48 et cette ubiquitination sont essentielles pour la morphogénèse du chromosome. Comme un défaut de Cdc48 augmente la liaison de condensine à l'ADN *in vivo*, la ségrégase pourrait favoriser directement le détachement de condensines de l'ADN (Thattikota et al., 2018a). Donc le défaut de condensation observé dans les mutants de Cdc48 pourrait être la conséquence (i) d'un défaut dans la dynamique de liaison de condensine ou (ii) d'un défaut d'activité de condensine qui, bien que liée à l'ADN, resterait inactive (par ex. bloquée sur certains obstacles). En conclusion, l'interaction et l'activité de condensine sur la chromatine sont des phénomènes dynamiques qui restent en partie à comprendre.

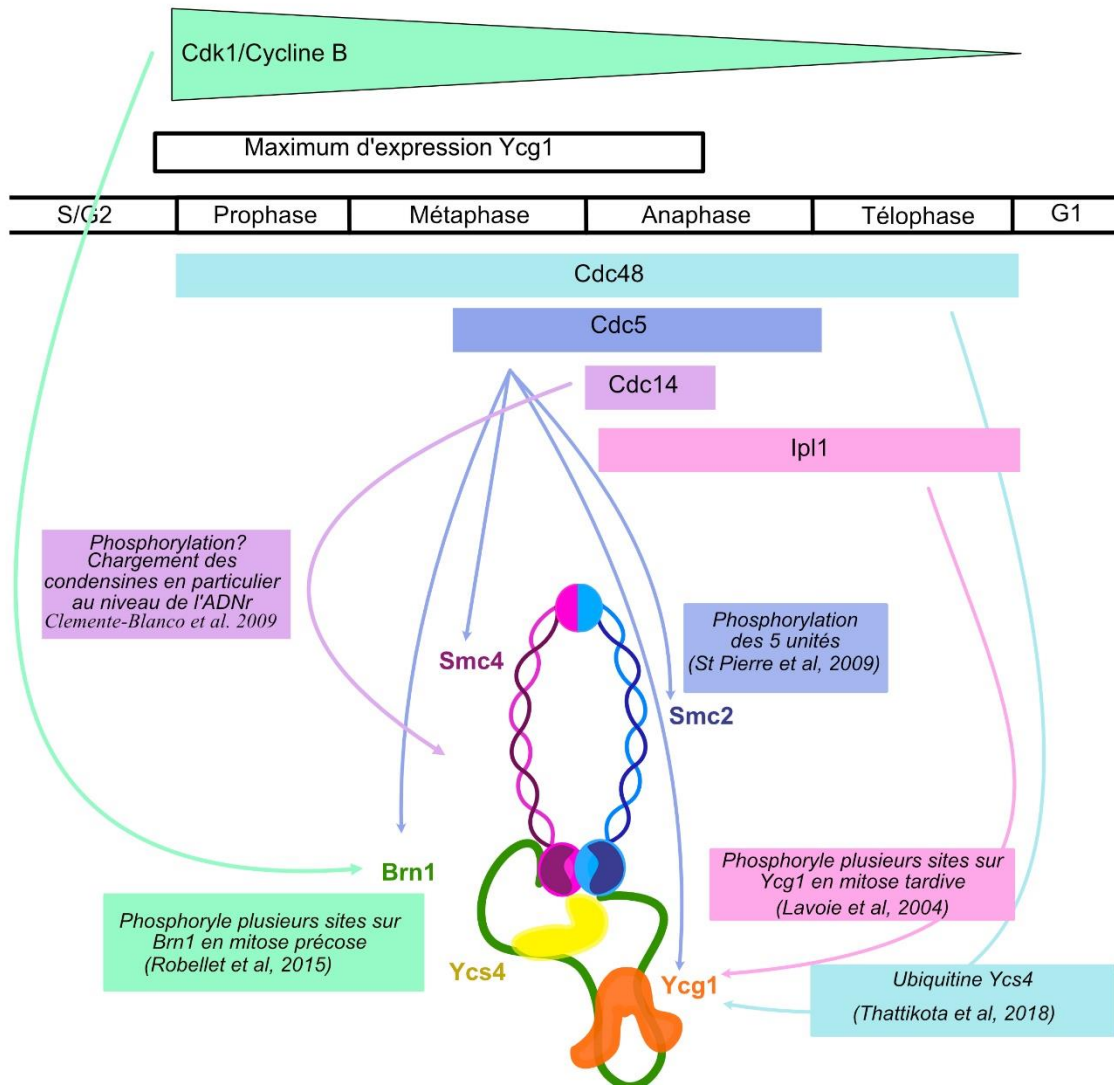


Figure 9 : Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle du complexe condensine durant le cycle cellulaire. Les différents acteurs sont représentés sur ce schéma ainsi que leur action sur le complexe condensine.

Deuxième partie : le télomère

Les télomères sont présents à chaque extrémité des chromosomes et sont essentiels au maintien de l'intégrité du génome. Tous les organismes possédant des chromosomes linéaires sont pourvus de cette structure spécialisée composée de protéines couvrant l'ADN télomérique. Les cellules ayant un dysfonctionnement au niveau des télomères vont s'arrêter dans leur progression du cycle cellulaire ou vont subir un processus de fusion/recombinaison, qui diminue de façon drastique la stabilité du génome.

L'extrémité d'ADN des télomères est similaire structurellement aux extrémités d'ADN créées par des cassures double-brin. Donc, le télomère est une structure qui doit être protégée des mécanismes de réparation. Pour cela, un ensemble de protéines sont présentes aux télomères afin de protéger l'extrémité (**Figure 10**). Une des fonctions de ces protéines télomériques est donc de bloquer les deux voies principales de réparations : (i) la Recombinaison Homologue (HR) et (ii) le Non Homologous End Joining (NHEJ). Concernant le NHEJ, ce mécanisme de réparation procède par re-ligation des deux extrémités d'une cassure. Souvent fidèle et efficace, il implique plusieurs acteurs tels que le complexe MRX^{MRN}, la protéine KU, qui vont se lier à l'ADN cassé et former un pont entre les deux extrémités, puis la ligase Lig4^{Ligase IV} et ses co-facteurs Nej1^{XLF} et Lif1^{XRCC4} vont ensuite les religuer. L'intervention de ce mécanisme à l'extrémité du chromosome mène à des fusions télomère-télomère formant des chromosomes dicentriques (chromosomes avec deux centromères actifs). Ces chromosomes sont des structures très instables qui vont poser problème lors de la division cellulaire (voir Troisième partie.II.1). La stabilité des télomères et du génome nécessite que ces événements restent extrêmement rares, impliquant une répression très forte et permanente du NHEJ.

Chez *S. cerevisiae*, les télomères constituent les 300 ± 50 dernières paires de base du chromosome.

La taille de chacun des 32 télomères (génomme haploïde) n'est pas fixe et peut varier dans une plage étroite. La taille des télomères est contrôlée par deux processus principaux : (i) le raccourcissement dû au problème de réplication des extrémités (processus intrinsèque dépendant de la réplication qui conduit les télomères à être raccourcis à chaque cycle de réplication) et (ii) l'action de l'enzyme télomérase, qui utilise un ARN comme matrice (TLC1) afin d'allonger l'extrémité 3' des télomères.

Les séquences télomériques chez *S. cerevisiae* sont composées de répétitions du motif TG₁₋₃ (plus exactement TG₂₋₃(TG)₁₋₆). L'ADN télomérique est principalement double-brin et avec une petite extension 3' simple-brin variant de 5 nucléotides en moyenne en dehors de la réplication (Soudet et al., 2014).

Chez *S. cerevisiae*, la principale protéine télomérique est Rap1 (« *Repressor Activator Protein 1* ») qui lie directement les séquences télomériques et recrute ses co-facteurs (Rif1, Rif2, Sir3 et Sir4). Le complexe Rap1/Rif1 et Rif2 a un rôle central dans le maintien de l'équilibre de la taille du télomère par l'inhibition de l'action de la télomérase. Cette inhibition est dépendante de la longueur des télomères. Plus un télomère est long, plus grand est le nombre de molécules Rap1/Rif1/Rif2 et donc plus forte l'inhibition de la télomérase. Un raccourcissement, conséquence de la réplication incomplète des extrémités, amène à une diminution du nombre de molécules Rap1/Rif1/Rif2 présentes au télomère et donc à une levée partielle (proportionnelle) de l'inhibition de la télomérase. L'action de l'enzyme permet l'élongation et donc un renforcement de l'inhibition par un plus grand nombre de molécules Rap1/Rif1/Rif2. Ce processus homéostatique permet le maintien de la taille des télomères dans une plage étroite (Marcand et al., 1997; Phane, Marcand et al., 1999; Teixeira et al., 2004).

Comme abordé précédemment, Rap1 est la principale protéine télomérique. Dans les paragraphes suivants je me concentrerai sur Rap1 et ses co-facteurs dans la protection des télomères contre les mécanismes de réparation.

Rappelons juste que d'autres protéines contribuent à la stabilité des télomères indépendamment de Rap1, comme par exemple le complexe Cdc13-Stn1-Ten1 qui lie de façon spécifique l'ADN simple brin 3' sortant.

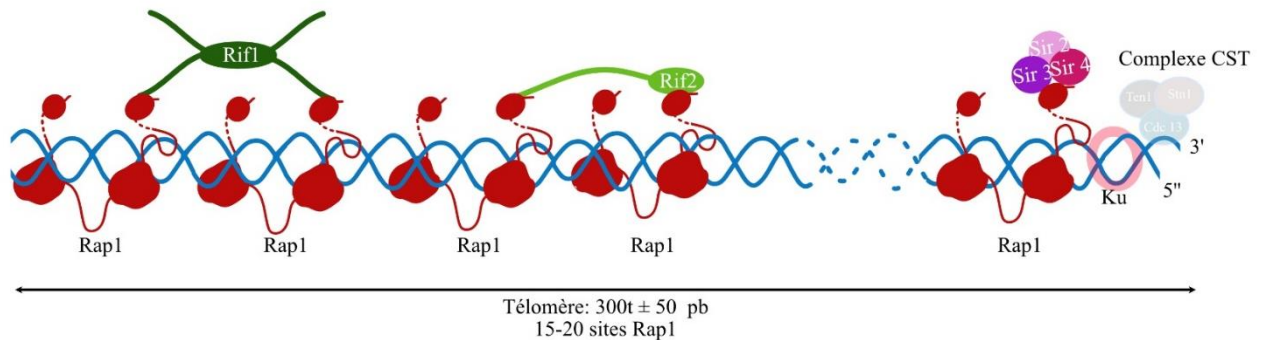


Figure 10. Schéma simplifié de la composition du télomère chez *S. cerevisiae*. Les protéines que j'aborderai principalement pour la suite telles que Rap1 et ses co-facteurs sont mentionnées clairement alors que les autres que je ne mentionnerai que brièvement, voire pas du tout, sont en transparence et sont représentées juste à titre indicatif afin d'avoir une vue d'ensemble sur la structure générale du télomère.

I. La protéine télomérique Rap1: acteur central dans la fonction de protection des télomères

Chez *S. cerevisiae*, la protéine télomérique Rap1 lie directement les répétitions télomériques, et y recrute, entre autres, deux facteurs, Rif2 and Sir4. Ces trois protéines agissent de façon synergique dans la protection des télomères contre les événements de fusion. Dans ce processus Rap1 donc agit à deux niveaux : (i) directement ou (ii) indirectement *via* l'intermédiaire de ses co-facteurs Rif2 et Sir4.

J'aborderai ces deux rôles après une introduction détaillée de Rap1 afin de mieux appréhender ses caractéristiques essentielles pour la compréhension de son rôle de protection ainsi que son impact sur les condensines.

1. Structure de la protéine Rap1

La protéine Rap1 a été identifiée en 1985 par le groupe d'André Sentenac (Huet et al., 1985) et son gène cloné en 1987 par David Shore et Kim Nasmyth (Shore & Nasmyth, 1987). Rap1 est une protéine abondante avec environ 5000 molécules par noyau haploïde, soit une concentration nucléaire proche de 2 μ M (Ho et al., 2018). Rap1 est un facteur conservé dans l'évolution des eucaryotes même si ses modalités de recrutement et de liaison à l'ADN changent selon les espèces (Teixeira & Gilson, 2005). Chez *S. cerevisiae*, Rap1 a deux grands rôles : (i) un rôle essentiel comme facteur pionnier de transcription aux promoteurs de plusieurs centaines de gènes essentiels à la croissance cellulaires et (ii) un rôle comme principale protéine télomérique. Rap1 participe aussi à l'inhibition de la transcription des *loci* silencieux *HML* et *HMR* nécessaires au changement du type de conjugaison.

Rap1 se lie tout le long des séquences télomériques (Conrad et al., 1990; Gilson et al., 1993; Klein et al., 1992). Rap1 lié au télomère a plusieurs fonctions : l'homéostasie de la taille des télomères, l'initiation de l'hétérochromatine subtélomérique, l'inhibition de la résection et l'inhibition du NHEJ (Pardo & Marcand, 2005). C'est sur cette dernière fonction que je me concentrerai. Rap1 de *S. cerevisiae* est une protéine de 827 acides aminés (AA) avec un poids moléculaire de 92 kDa. Elle possède 5 domaines (**Figure 11**) : un domaine BRCT en position N-Terminal, un domaine de liaison à l'ADN en position centrale (DBD), un petit motif dit toxique (TOX) (rendant la surexpression de Rap1 toxique pour la cellule), un motif lié à l'activation de la transcription (ACT) et un domaine C-terminal de structure unique (RCT: Rap1 C Terminal domaine). Les structure des domaines BRCT, DBD et RCT ont été résolues expérimentalement (König et al., 1996; Matot et al., 2012a). Des structures en hélice alpha sont prédites pour les motifs TOX et ACT (Alphafold : <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/C7GPE1>). Les régions encadrant le domaine BRCT sont prédites comme désordonnées.

2. Liaison de Rap1 à l'ADN

La fonction de liaison à l'ADN, assurée par le domaine DBD, joue un rôle central dans toutes les fonctions de Rap1 comme par exemple dans la régulation de la transcription mais aussi dans l'inhibition des mécanismes de réparation. L'impact de Rap1 sur les condensines implique directement le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Des études cristallographiques montrent que ce domaine de 235 AA (positions de 361 à 596) fixe l'ADN avec une affinité semblable à celle de la protéine entière (König et al., 1996). L'affinité du complexe Rap1-ADN estimée par calorimétrie (ITC) est du nM ($K_D \approx 3$ nM) (Matot et al., 2012a). D'autres méthodes ont suggéré une affinité *in vitro* encore plus élevée, de l'ordre de la dizaine de pM (Williams et al., 2010). Le domaine de liaison à l'ADN de Rap1 est composé de deux sous-domaines Myb en tandem, nommés Myb1 et Myb2 relié par un *linker* (Henry et al., 1990; Mukherjee et al., 2012). Myb1 et Myb2 reconnaissent chacun un motif de liaison (hémi-site) et se fixent dans le sillon majeur de l'ADN (**Figure 12**). De plus, l'extrémité C-terminal du domaine de liaison à l'ADN forme une boucle qui s'enroule autour de l'ADN, créant ainsi un loquet verrouillant la protéine à l'ADN. L'absence de cette boucle diminue l'affinité de Rap1 pour son site et a un impact sur la survie cellulaire (Matot et al., 2012a).

Concernant la liaison de Rap1 à l'ADN, on notera une différence importante d'affinité entre les différents sites de liaison de Rap1, les sites présents aux télomères étant plus affins que les sites présents aux promoteurs (Rhee & Pugh, 2011).

Les sites aux promoteurs montrent une importante variabilité de séquence par rapport à d'autres facteurs de transcription (**Figure 12**). Cependant, la spécificité pour chaque site reste élevée due à une répartition sur un plus grand nombre de positions nucléotidiques (Rhee & Pugh, 2011). La disposition des sites Rap1 aux promoteurs est différentes de celle aux télomères. Aux promoteurs seulement 1 ou 2 sites Rap1 sont présents avec un espace moyen de 30 pb entre les 2 sites (Knight et al., 2014).

Aux télomères, on compte 15-20 sites Rap1 (Conrad et al., 1990; Gilson et al., 1993; Ray & Runge, 1999), avec des espacements variables. Chaque domaine Myb est capable de lier le motif GGGTG pour Myb1 et GGTGT pour le Myb2 présents aux télomères (**Figure 12**).

La principale caractéristique de la séquence télomérique de *S. cerevisiae* est qu'elle présente une hétérogénéité (variabilité). Elle s'explique par une flexibilité de la télomérase capable d'initier l'élongation à plusieurs positions sur l'ARN matrice (Förstemann et al., 2001). Conséquence de cette capacité de la télomérase, la répartition et la composition des sites Rap1 peuvent varier. Dans ce contexte, il est possible d'identifier un site canonique respectant le site consensus et des sites non-canoniques divergeant du consensus d'un nucléotide en 5' du site (hémi-site de Myb2) (**Figure 12**). Ces derniers, jusqu'à présent, ne montraient pas d'incidence. Cependant, des études menées récemment au sein de notre laboratoire montrent que, pour l'inhibition du NHEJ, il y aurait une distinction entre le site canonique et les sites non-canoniques, ces derniers pouvant être liés avec une affinité plus faible par Rap1 (Matarocci *et al.* en préparation). Ceci pourrait avoir pour conséquences de rendre plus facile l'éjection de Rap1 par certaines protéines comme MRX et KU, essentielles pour le NHEJ. Aux télomères, les sites canoniques et non-canoniques alternent avec un espace variable entre chacun (**Figure 12**). Leur superposition partielle est fréquente.

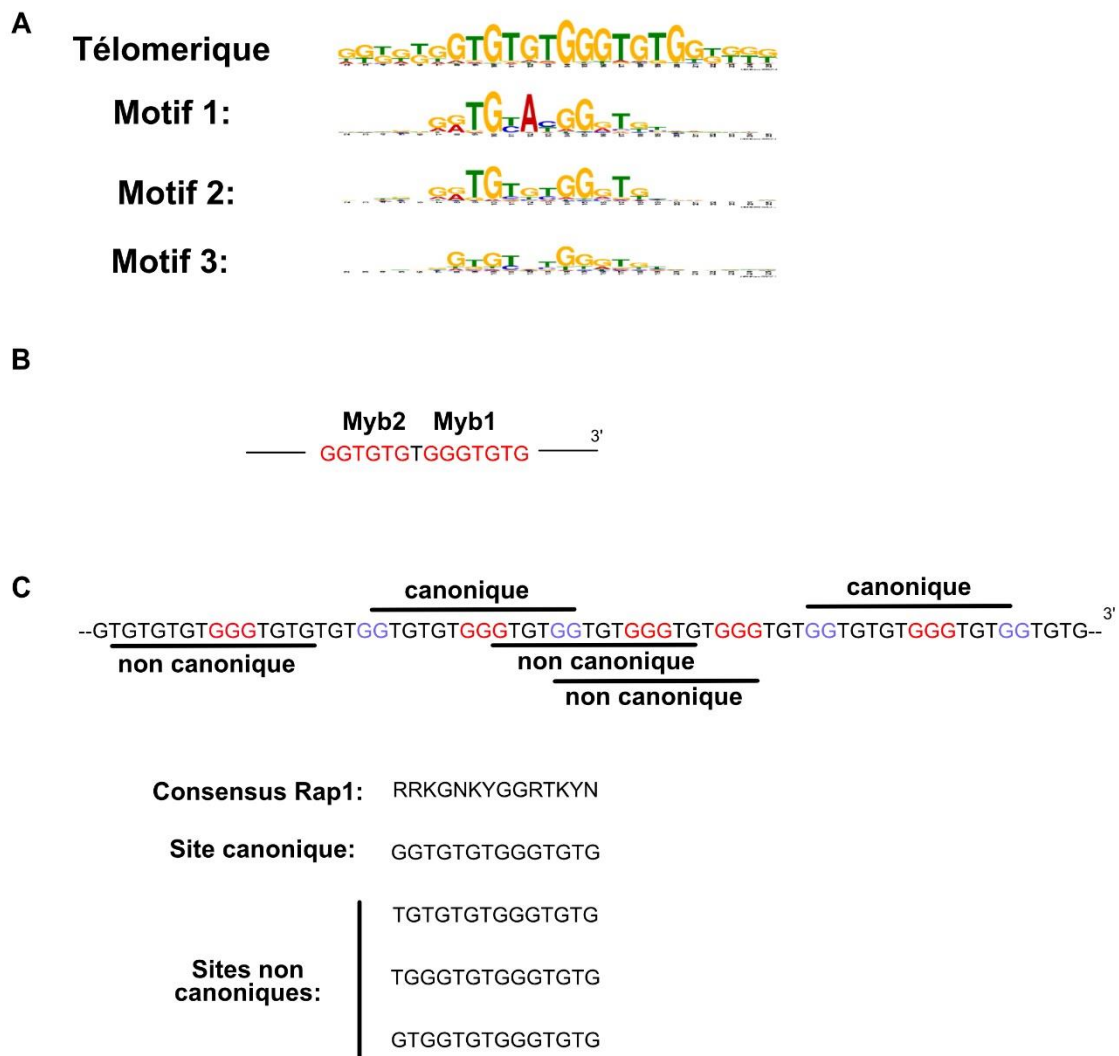


Figure 12. Les différents sites de liaison de Rap1. (A) Issu de (Rhee & Pugh, 2011). Représentation graphique de l'homologie entre les sites de fixation de Rap1. La fréquence de la présence du nucléotide est corrélée à sa taille. La comparaison est faite avec la séquence consensus de Rap1. (B) Distinction des domaines de liaison Myb1 et Myb2. (C) Représentation des sites canonique et non-canoniques ainsi que leurs possible alternance au télomère.

La liaison de Rap1 à l'ADN pourrait se faire à l'aide d'un seul sous-domaine Myb. Cette liaison est moins affine mais permettrait une régulation des différents co-facteurs recrutés par Rap1 en libérant des domaines d'interaction protéique (Bonetti et al., 2020; Del Vescovo et al., 2004; Feldmann et al., 2015; Feldmann & Galletto, 2014).

Concernant le mode de liaison de Rap1 sur l'ADN, il est important de souligner le fait qu'il existe un sens pour la fixation de Rap1 relativement à l'extrémité des télomères : sens télomérique lorsque le brin riche en G est en extrémité 3' et non-télomérique lorsque le brin riche en C est en extrémité 3'. Le sens de la fixation de Rap1 vis-à-vis de l'extrémité du chromosome influe peu sur la régulation de la taille des télomères ainsi que sur la capacité de Rap1 à recruter ses co-facteurs (Grossi et al., 2001; Marcand et al., 1997; Marcand et al., 1999).

Par ailleurs, la fixation de plusieurs sites Rap1 rapprochés en tandem, comme aux télomères, engendre une rigidification de l'ADN visualisable par AFM (Le Bihan et al., 2013). Ils arborent alors une structure en forme de bâtonnet droit. Cette capacité ne semble pas liée à un processus de collaboration directe entre les molécules Rap1 en l'absence de coopérativité pour la fixation de sites en tandem (Williams et al., 2010), bien que cet aspect soit encore souvent discuté.

3. Rôle de Rap1 dans la protection contre les mécanismes de réparation

Chez *S. cerevisiae*, une perte partielle de Rap1 induit un rallongement des télomère et une augmentation des fusions entre télomères, fusions dépendantes du NHEJ (Pardo & Marcand, 2005). D'autre part, un défaut de protection et donc une accumulation de fusions peut être aussi la conséquence de télomères trop courts et d'un nombre moins important de sites Rap1. Ceci illustre l'importance de la taille des télomères sur la protection des extrémités des chromosomes (Pobiega et al., 2021).

Comme mentionné précédemment, Rap1 agit d'au moins trois manières différentes afin d'inhiber le NHEJ aux télomères : (i) par le recrutement de la protéine Rif2, (ii) par le recrutement de la protéine Sir4 et (iii) directement et indépendamment de Rif2 et Sir4 (Marcand et al., 2008; Pardo & Marcand, 2005; Pobięga et al., 2021a).

La première voie implique le domaine RCT de la protéine Rap1 (**Figure 13**) permettant le recrutement du co-facteur Rif2. Notre laboratoire a montré que Rif2 ciblé à une cassure double-brin est capable d'inhiber le NHEJ. Ce résultat montre que Rif2, présent au télomère grâce au recrutement par Rap1, a un rôle d'inhibition du NHEJ au télomère. De façon plus détaillée, un petit motif de Rif2, le motif BAT, porte la fonction inhibitrice de MRX (Khayat et al., 2020; Roisné-Hamelin et al., 2021). Ce motif BAT fixe les têtes ATPase de Rad50 et empêche le complexe MRX d'adopter un état favorable à la liaison sur l'ADN et nécessaire à ses fonctions (Roisné-Hamelin et al., 2021).

L'inhibition du NHEJ aux télomères passe aussi par la protéine Sir4 recrutée par Rap1. Sir4 fait partie du complexe Sir (Sir2/Sir3/Sir4) impliqué dans l'hétérochromatisation de la chromatine subtélomérique aux extrémités des chromosomes. Cependant, l'inhibition du NHEJ par Sir4 aux télomères est indépendante de la fonction de Sir4 dans l'initiation de l'hétérochromatine (Bordelet et al., 2022; Faure et al., 2019; Lescasse et al., 2013; Marcand et al., 2008; Pobięga et al., 2021) Le mécanisme d'action de Sir4 pour l'inhibition du NHEJ n'est pas connu. Rap1 est aussi capable d'inhiber le NHEJ de façon indépendante de Rif2 et Sir4 et de son domaine RCT (Marcand et al., 2008). Par ailleurs, une forme de Rap1 tronquée du domaine RCT est aussi à même d'inhiber le recrutement de MRX aux télomères (Negrini et al., 2007). L'aspect mécanistique de cette 3^{ème} voie reste encore à définir. Nos résultats récents suggèrent que la fixation de Rap1 pourrait à la fois antagoniser la fixation de MRX et modifier le mode fixation de KU aux télomères, deux actions bloquant le NHEJ (Matarrocci *et al.*, en préparation).

Pour conclure c'est bien la synergie des différentes voies établies par Rap1 qui permet une protection stable et quasi-complète des télomères contre les fusions par NHEJ.

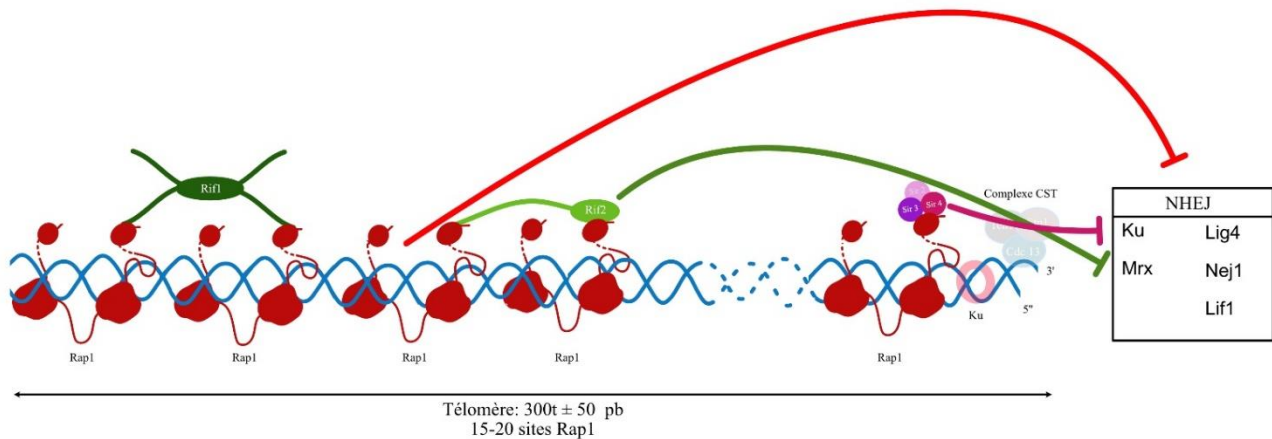


Figure 13. Figure schéma récapitulatif 3 différentes voies passant par Rap1 et ses co-facteurs dans l'inhibition du NHEJ.

II. Condensation et ségrégation du télomère

1. L'organisation des télomères durant le cycle cellulaire

Chez *S. cerevisiae*, les 32 télomères sont regroupés en quelques foyers au cours des phases G1/S/G2. Ces foyers, comprenant plusieurs télomères, sont ancrés à l'enveloppe nucléaire. Ce regroupement et cet ancrage, impliquant un mécanisme complexe, sont dépendants de Sir3 et de Sir4 (Ruault et al., 2011, 2021). Lors de l'entrée en mitose, il y a dans un premier temps la décaténation des chromatide sœurs. Lors de l'entrée en métaphase l'organisation des télomères en foyers est maintenue, illustrée par la présence de contacts télomère-télomère visibles par Hi-C (Colin et al., 2022; Guidi et al., 2015). Puis au cours de l'anaphase, l'élongation du fuseau mitotique initie le processus de ségrégation en appliquant une force d'attraction sur les centromères vers les pôles du fuseau (SPB pour « *Spindle Pole Body* »). Les télomères vont être les derniers à être ségrégés (Renshaw et al., 2010). A cette étape, condensine est essentielle au dégroupement des télomères et donc à leur ségrégation. En l'absence de condensine, les télomères sont mal séparés (Colin et al., 2022; Renshaw et al., 2010).

Les condensines, comme abordé dans la première partie, jouent un rôle clé dans la ségrégation des chromosomes. Condensine pourrait aussi jouer un rôle particulier aux télomères.

2. Possible rôle de la protéine Rap1 dans la condensation durant la mitose

Les télomères, en tant qu'extrémités, soulèvent un problème particulier : quel est le devenir des condensines à l'extrémité ? Continuent-elles leur activité d'extrusion jusqu'à l'extrémité des télomères pour ensuite être décrochées ou s'y stabiliser ? Si la condensation à l'extrémité des chromosomes est importante pour une ségrégation efficace de l'extrémité, des mécanismes particuliers pourraient avoir lieu aux télomères tel que (i) une activité de blocage de l'activité d'extrusion de boucle de condensine à l'extrémité et (ii) un recrutement et/ou dynamique spécifique afin d'initier une condensation s'initiant depuis l'extrémité ?

Le rôle de condensine aux télomères reste mal connu. Récemment plusieurs études ont commencé à aborder l'implication des condensines aux télomères. L'une montre que la protéine télomérique Taz1 agit comme un dispositif de positionnement pour enrichir la condensine au niveau des télomères chez *S. pombe* (Colin et al., 2022). Le second est (Guérin et al., 2019) et va être détaillé ci-dessous afin de remettre en perspective le contexte de mon sujet d'étude.

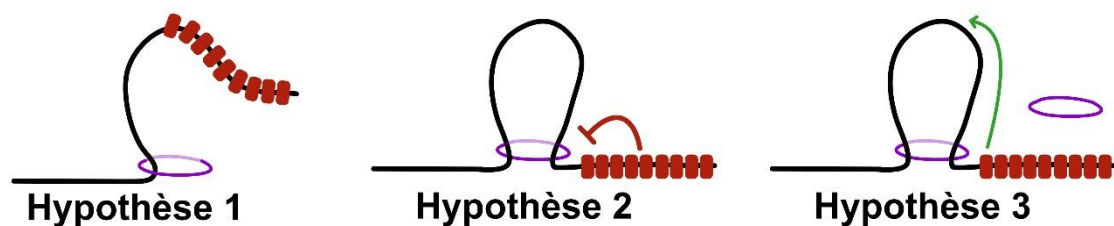


Figure 14. Schéma simplifié abordant les trois principales hypothèses du devenir de l'activité d'extrusion de boucles aux extrémités. En rouge est représenté la protéines télomériques Rap1 et en violet est représentée, de façon simplifiée, le complexe condensine. Dans la première hypothèse l'extrémité n'a pas d'impact sur l'activité de loop extrusion. La seconde propose que l'extrémité bloquerait l'activité d'extrusion de boucle de condensine. Quant à la troisième, elle propose un recrutement de condensine à l'extrémité.

Troisième partie : Le chromosome dicentrique

I. La formation du chromosome dicentrique, focus sur les fusions télomère-télomère

Les chromosomes dicentriques sont des chromosomes avec deux centromères actifs. Ils peuvent avoir différentes origines (**Figure 15**) telles que : (i) la formation d'un néo-centromère, (ii) une duplication de la région contenant le centromère, (iii) une erreur de réparation suite à une cassure double brins, (iv) un défaut de protection aux télomères menant à une fusion télomère-télomère. Dans le cadre de cette étude centrée sur les dicentriques issus de fusions entre télomères, je me consacrerai sur cette dernière possibilité.

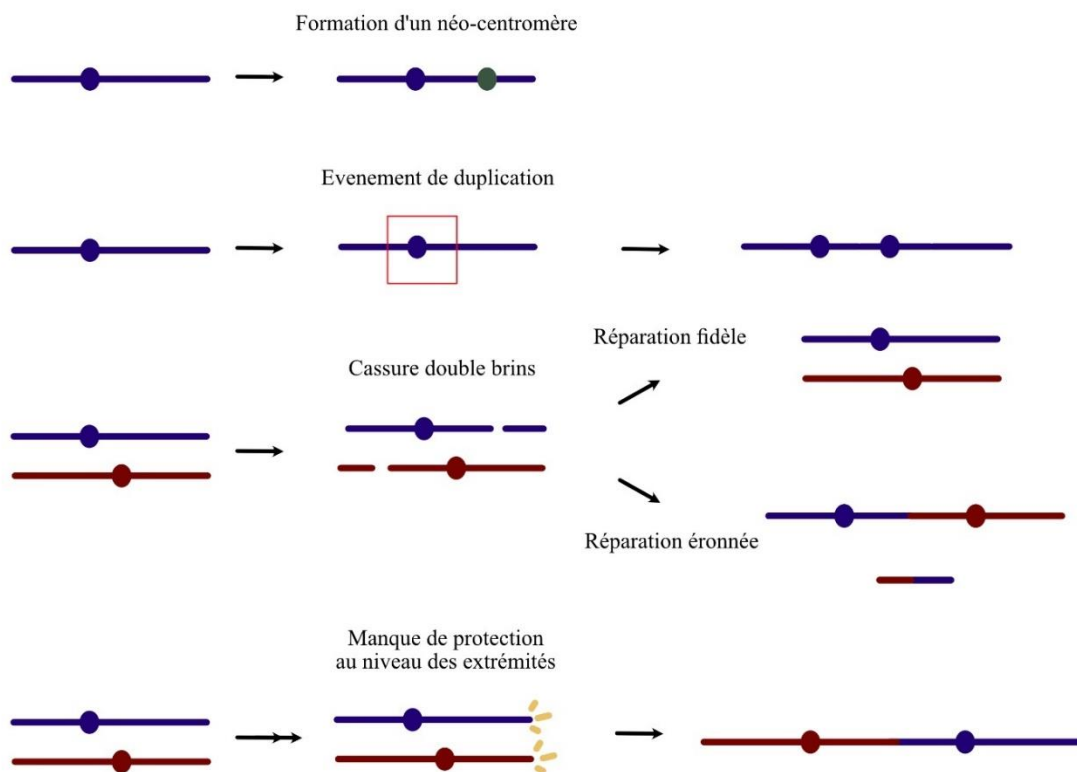


Figure 15 : Schémas montrant les différentes façons de former des chromosomes dicentriques. Voir texte pour plus de détails.

La formation de chromosomes dicentriques est un évènement rare. Par ailleurs, les dicentriques sont instables (Guérin & Marcand, 2022). C'est pour cela que dans le cadre de cette étude un outil est mis en place afin de les étudier (voir détail Guérin et al, 2019 en annexe). Certaines situations augmentent nettement la probabilité de formation d'un chromosome dicentrique ; par exemple l'exposition aux rayonnements ionisants ou à des substances chimiques endommageant l'ADN (Müller & Almouzni, 2017; Pobiega et al., 2021; Suto et al., 2013). Un défaut des protéines présentes aux télomères (voir deuxième partie.I.3) peut favoriser l'apparition de fusions télomère-télomère et donc de chromosomes dicentriques. Une fois le chromosome dicentrique formé, il peut être répliqué. Ce n'est qu'au moment de la ségrégation des chromosomes qu'il va être problématique pour la cellule.

II. Le devenir du chromosome dicentrique en mitose

Lorsqu'un chromosome dicentrique est présent en métaphase, deux solutions équiprobables sont possibles (**Figure 16**) concernant son devenir. Soit les 2 centromères d'une chromatide sœur vont être capturés par le même pôle du fuseau mitotique. Dans ce cas, l'intégralité du chromosome dicentrique va ségréger dans la même cellule et va de nouveau être répliqué et se retrouver en métaphase au même point que lors du cycle précédant. Soit les deux centromères d'une chromatide sœur sont capturés chacun par un pôle distinct du fuseau mitotique. Dans ce cas, un double pont de chromatine anaphasique se forme. Ils seront clivés à la fin de la mitose. Chez les levures, le clivage est couplé au processus d'abscission par septation à la fin de cytotodiérèse (Guérin et al., 2019; Guérin & Marcand, 2022; Lopez et al., 2015).

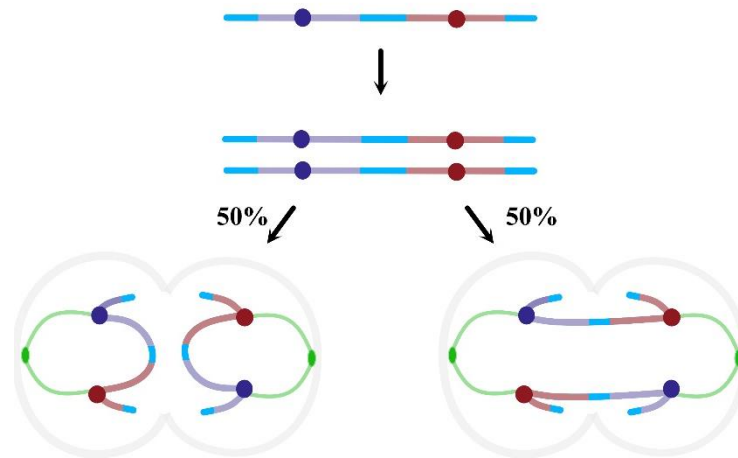


Figure 16. Schéma montrant les deux possibilités de ségrégation du chromosome dicentrique. Une fois le chromosome dicentrique formé par fusion de deux télomères, il est répliqué puis va ségréger soit dans une seule même cellule soit entre les deux et former un pont de chromatine anaphasique.

Le clivage des dicentriques peut mener à la mort cellulaire ou à l'initiation d'un processus important de mutagénèse ayant des répercussions importantes sur la stabilité génétique. En effet un clivage qui aurait lieu ailleurs qu'au site de fusion (exemple flèche grise **Figure 17**), va mener à de nouvelles extrémités non protégées. Ces dernières vont donc être possiblement amenées à fusionner de nouveau et former de nouveau un dicentrique. Ce cycle fut décrit et nommé BFB pour « *Break-Fusion-Bridge* » la première fois dans une étude pionnière de Barbara McClintock (Guérin & Marcand, 2022; McClintock, 1941). Ce cycle a pour conséquence d'augmenter de façon importante le nombre de réarrangements (Figure 14). Pour cette raison au moins, les dicentriques favorisent le processus oncogénique.

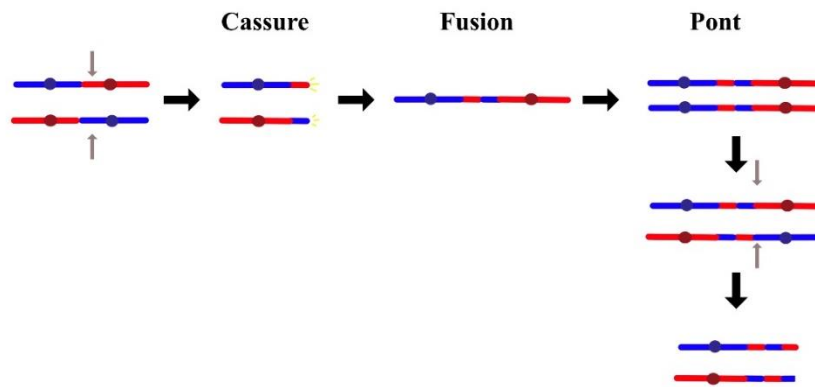


Figure 17. Schéma illustrant le BFB pour Break Fusion Bridge. Une fois le chromosome dicentrique cassé lors de la mitose précédente, il va former de nouveaux des extrémités non protégées. Ces extrémités vont de nouveau fusionner afin de former de nouveau un dicentrique qui va être clivé à la prochaine mitose. Ces cycles BFB induisent rapidement des mutations telles que des délétions et des duplications.

1. Le repliement de la chromatine suivit du clivage du pont de chromatine anaphasique

Avant le clivage par l'abscission, le pont de chromatine anaphasique va être étiré puis être relâché au moment où du désassemblage du fuseau mitotique et du désencrage des pôles du fuseau (auxquels les centromères restent attachés), un évènement qui précède l'abscission de quelques minutes au plus. Ce relâchement mène à un rapide mouvement de repliement de la chromatine localisant les centromères à proximité du site d'abscission. Ce retour rapide (« *Snap Back* »), observable par microscopie (Guérin et al., 2019; Lopez et al., 2015), est dépendant des condensines. C'est la première fois que les condensines sont caractérisées pour être impliquées dans un tel mécanisme. Par la suite, il sera abordé plus en détails leur rôle dans ce mécanisme.

Une fois que ce repliement a eu lieu, la chromatine va être clivée, après la contraction et le désassemblage de l'anneau d'actine de cytotodiérèse, durant l'abscission par la fermeture du septum. La fermeture du septum est strictement nécessaire au clivage. Comment le septum agit sur l'ADN afin de le cliver reste encore une question en suspens.

Une possible explication est que les forces de cisaillement exercées sur la molécule d'ADN incorporée au septum en cours de fermeture soient capables de cliver l'ADN. Le mécanisme de cassure peut être différent chez les plantes et les cellules animales où il pourrait impliquer des nucléases ou des forces de cisaillement exercées par des filaments d'actine (Guérin & Marcand, 2022). Les mécanismes de clivage des ponts de chromatine anaphasiques restent encore à comprendre plus en détails, et l'évolution des outils permettant la création de chromosomes dicentriques devrait y aider dans les années à venir.

2. Mécanisme de sauvetage des fusions télomère-télomère chez *S. cerevisiae* : localisation préférentielle du point de clivage aux fusions

Chez *S. cerevisiae*, un mécanisme de secours permet de cliver les dicentriques issus de fusions entre télomères à proximité du site où la fusion télomère-télomère a eu lieu. Ce clivage permet de retrouver deux chromosomes fonctionnels et distincts et donc un retour au caryotype parentale (**Figure 18**).

Les travaux précédents du laboratoire (Guérin et al., 2019; Lopez et al., 2015; Pobiega & Marcand, 2010), ont permis de caractériser de façon plus précise ce mécanisme. Grâce à l'utilisation d'un centromère conditionnel, des dicentriques conditionnels ont pu être formés afin d'étudier leur devenir à travers le cycle cellulaire. Il a tout d'abord été montré que les chromosomes dicentriques formés par des fusions télomère-télomère se brisent souvent à proximité du point de fusion des télomères au cours de la progression dans la mitose (Pobiega & Marcand, 2010). La perte des séquences télomériques abolit la cassure au point de fusion.

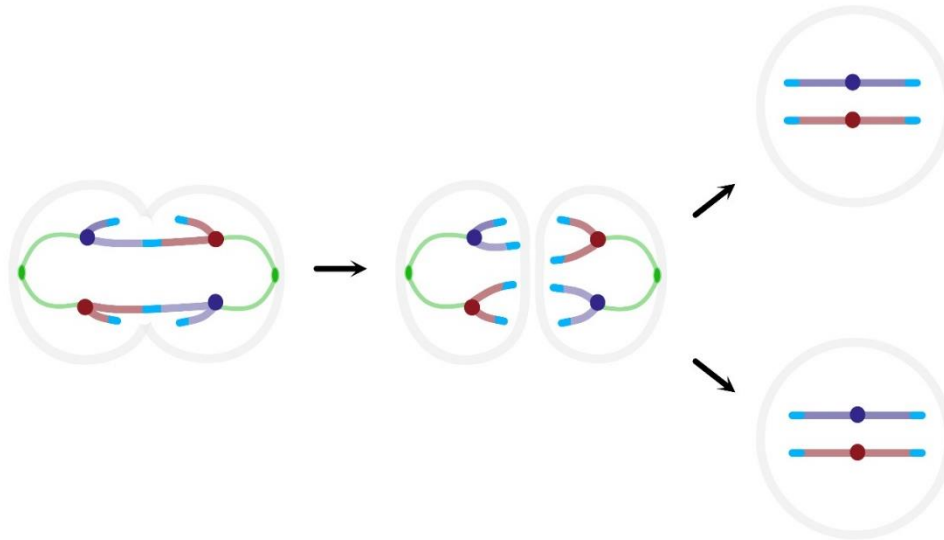


Figure 18 : Illustration du mécanisme de secours. Lorsque le dicentrique, formé par la fusion télomère-télomère, est étiré et forme un pont de chromatine anaphasique il va être clivé majoritairement à l'endroit de la fusion. Ce mécanisme permet de revenir à la situation initiale, avant fusion.

Les dicentriques sans séquences télomériques internes sont alors clivés préférentiellement aux régions péri-centromériques avec un nombre de chance équiprobable pour chaque centromère (**Figure 19**) (Lopez et al., 2015). Ce clivage a lieu durant la cytotélière et est dépendant de la fermeture du septum (Guérin et al., 2019; Lopez et al., 2015). L'élément déterminant pour la position du point de cassure est la présence de la protéine télomérique Rap1 et cela de façon indépendante du contexte local (position relative entre les deux centromères, séquences adjacentes aux sites Rap1). La cassure préférentielle des dicentriques aux sites Rap1 ne dépend ni de Rif1 et Rif2, ni de l'hétérochromatine établie par Sir3 et Sir4 (Guérin et al., 2019). En s'intéressant aux caractéristiques de Rap1 aux télomères, nous avons pu montrer que le nombre de sites Rap1 était un critère important. De plus, l'affinité de Rap1 pour son site est aussi un élément important. En effet, la substitution de Rap1 par la protéine LacI fixant son site *LacO* en tandem avec une haute affinité établit une localisation préférentielle de la cassure. Cet élément montre aussi que l'effet n'est pas spécifique de Rap1. Par la suite nous avons pu aussi tester l'effet de l'espacement entre les sites Rap1.

Il s'avère qu'un espacement très serré des sites est aussi essentiel pour favoriser la cassure aux sites Rap1. Donc le nombre, l'affinité et des sites Rap1 rapprochés sont 3 critères essentiels dans ce mécanisme.

Précédemment, nous avons abordé l'implication des condensines dans le mécanisme de *Snap Back* précédant la cassure. Les condensines sont des extrudeurs de boucles d'ADN capables de compacter la chromatine lors de la mitose (voir première partie.II.2). Elles sont donc capables, par ce processus d'engendrer des mouvements de la chromatine. Nous avons pu montrer que condensine et Rap1 sont essentiels pour la localisation du point de cassure aux sites Rap1 (**Figure 16**) et donc au mécanisme de secours permettant la cassure des chromosomes dicentriques au niveau de la fusion. L'absence de Rap1 ou de condensine change la localisation du point de fusion en le relocalisant à proximité des centromères ou dans une zone centrale à équidistance des 2 centromères respectivement (**Figure 16**).

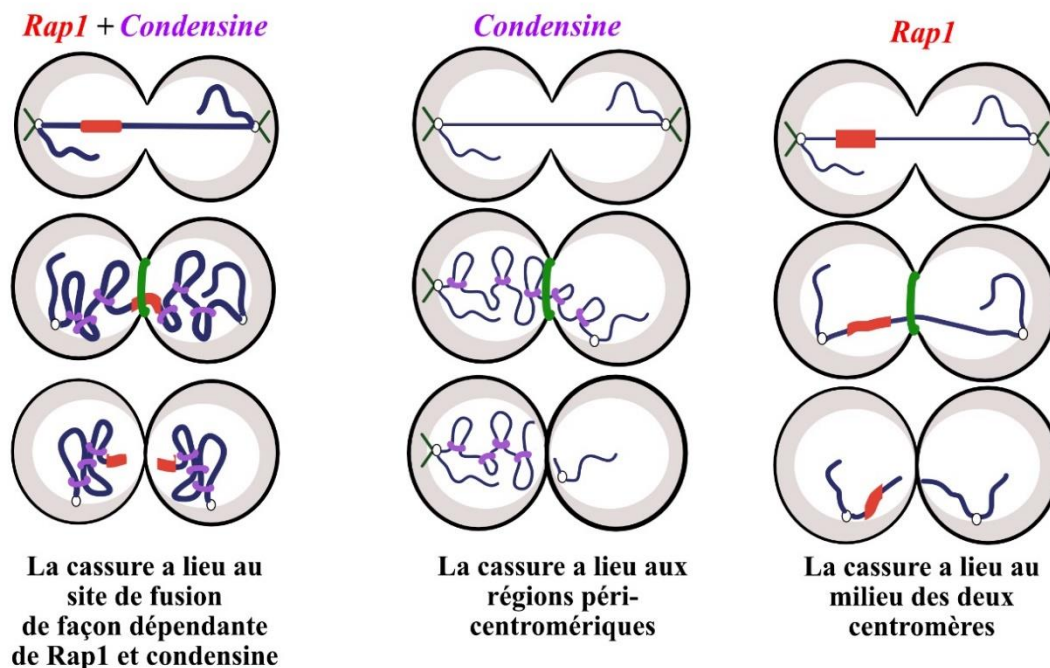


Figure 19. Schéma bilan permettant de visualiser la cassure dans le cas d'une absence de Rap1 ou de condensine. **Panel de gauche :** en absence de Rap1 ou de fusion télomère-télomère, la cassure préférentielle du dicentrique a lieu, de façon équiprobable, au niveau des centromères. **Panel central :** En cas d'absence de condensine, la cassure préférentielle à lieu majoritaire au milieu du chromosome dicentrique entre les deux centromères. **Panel de droite :** Lorsque Rap1 et condensine sont présents, la cassure préférentielle a lieu majoritairement au niveau des sites Rap1.

La perte de l'un des 3 critères essentiels à l'action de Rap1 (nombre élevé de sites, affinité élevée et espacement serré) est équivalente à une absence de Rap1 pour la localisation de la cassure. Ces résultats nous ont amené à penser que Rap1 avait un impact sur les condensines permettant de localiser la cassure préférentielle du dicentrique. C'est dans ce cadre que mon sujet de thèse s'inscrit afin de caractériser l'impact de Rap1 sur les condensines.

RESULTATS

Condensin Loop Extrusion Stalling by the Telomere Protein Rap1

Alice Deshayes¹, Claire Béneut¹, Jamie Phipps¹, Jonathan Heuze², Philippe Pasero²,
Armelle Lengronne², Karine Dubrana¹, Stefano Mattarocci^{1*} and Stéphane Marcand^{1*}

¹ CEA IBFJ/IRCM, Inserm U1274, Université Paris-Saclay, Université Paris-Cité,
Fontenay-aux-Roses, France

² Institut de Génétique Humaine, CNRS, Université de Montpellier, France

*Correspondence: stefano.mattarocci@gmail.com or stephane.marcand@cea.fr

Keywords: Condensin, Telomere, SMC, Chromosome, Mitosis

Abstract

Telomeres present a unique setting where long DNA stretches are tightly covered by sequence-specific DNA binding proteins, making access to telomere DNA a challenge for DNA transactions. Here we address how DNA coverage by the *Saccharomyces cerevisiae* telomere protein Rap1 impacts the activity of a ubiquitous SMC complex, condensin. We found that telomere-like Rap1 arrays lead to an accumulation of condensin at their border and to a local chromatin decompaction. Both effects require a close spacing between the DNA-bound Rap1 molecules. We propose that when a loop-extruding condensin encounters telomeres or telomere-like arrays, it stalls due to an inability to contact DNA covered by Rap1. This stalling leads to condensin dissociation and loop disruption, resulting in a local decompaction until another condensin loads in the region and reaches the array.

INTRODUCTION

Telomeres are essential protein-DNA complexes ensuring that native chromosome ends escape the pathways acting on broken DNA ends. In most eukaryotes, telomere sequences are repetitions of short motifs, mostly double-stranded. Telomeres present a unique setting where long DNA stretches lacking nucleosomes can be tightly covered by sequence-specific DNA binding proteins (Rap1 in budding yeast) (Wellinger and Zakian 2012, Galati et al. 2013, de Lange 2018, Soman et al. 2022). Consequently, access to telomere DNA can be a challenge for most DNA transactions, including DNA replication, DNA repair, transcription and chromosome organisation (Makovets et al. 2004, Miller et al. 2006, Negrini et al. 2007, Marcand et al. 2008, Zimmermann et al. 2014, Goto et al. 2015, Guérin et al. 2019, Maestroni et al. 2020). To shed light on this core telomere feature, here we address how DNA coverage by a telomere protein impacts the activity of a ubiquitous SMC complex, condensin.

SMC complexes are DNA loop extruders folding chromatin into higher order structures (Goloborodko et al. 2016, Ganji et al. 2018, Davidson et al. 2019, Yatskevich et al. 2019, Shaltiel et al. 2022, Liu et al. 2022, Pradhan et al. 2022b, Taschner and Gruber 2022). Among them, condensin folds chromosomes during mitosis (Lazar-Stefanita et al. 2017, Shintomi et al. 2017, Gibcus et al. 2018, Lioy et al. 2018). It is essential to chromosome segregation (Renshaw et al. 2010, Cuylen et al. 2013). Condensin is made of 2 ATPase SMC subunits (Smc2 and Smc4), a kleisin (Brn1 in budding yeast) and two HEAT-repeat subunits (Ycs4 and Ycg1 in budding yeast) (**Fig. 1A**). Yeast condensin acts as a monomer, anchors DNA at the Brn1-Ycg1 interface and from this anchoring point unidirectionally extrudes DNA into loops (Kschonsak et al. 2017, Ganji et al. 2018, Shaltiel et al. 2022, Lee et al. 2022). ATP-dependent conformational changes and multiple dynamic DNA-protein contacts drive loop extrusion (Diebold-Durand et al. 2017, Nomidis et al. 2022, Shaltiel et al. 2022).

How condensin and other SMC handle potential obstacles such as nucleosomes and other DNA-bound proteins and complexes is not well understood. The size of the condensin complex and the need for multiple DNA contacts are two limiting steps that could hinder loop extrusion. *In vitro*, condensin is remarkably efficient at passing point obstacles, including single nucleosomes, RNA polymerases and DNA-anchored beads larger than condensin (Pradhan et al. 2022a). *In vivo*, back-tracking RNA polymerases at

highly transcribed genes could stall condensin, perhaps a consequence of DNA coverage by multiple polymerases in tandem (Brandão et al. 2019, Rivosecchi et al. 2021).

Another precedent suggests that telomere repeats stall condensin (Guérin et al. 2019). This last hypothesis stems from our investigation of dicentric chromosome breakage in *Saccharomyces cerevisiae*. We found that dicentrics generated by accidental telomere-telomere fusions preferentially break at the fusion points (Pobiega and Marcand 2010). This restores the parental karyotype, therefore offering a back-up rescue pathway for telomere protection and genome stability. Dicentric breakage is driven by abscission (septum closure, the final stage of yeast cytokinesis) (Lopez et al. 2015, Guérin et al. 2019, Guérin and Marcand 2022). Breakage at telomere fusions requires two additional factors, condensin and the telomere protein Rap1 bound to telomere or telomere-like tandem arrays. Based on these findings, we hypothesized that condensin stalling by tandems of Rap1 could impact chromosome folding in a way that would favour DNA entrapment and breakage at the abscission point (Guérin et al. 2019).

Here we directly test our hypothesis by addressing how Rap1 impacts condensin activity. We found that telomere-like Rap1 arrays lead to an accumulation of condensin at their border and to a local chromatin decompaction. Both effects require a close spacing between the DNA-bound Rap1 molecules. Based on these results, we propose that when a loop-extruding condensin encounters telomeres or telomere-like arrays, it stalls due to an inability to contact DNA covered by Rap1. This stalling leads to condensin dissociation and loop disruption, resulting in a local decompaction until another condensin loads in the region and reaches the array.

RESULTS

Condensin presence at Rap1-bound arrays in late anaphase

Condensin loop extrusion stalling at telomere-like Rap1-bound tandems should result in a local accumulation of condensin (**Fig. 1B**). To address this model, we used a ChIP approach and mapped condensin-DNA interactions in the vicinity of Rap1 binding sites in tandem whose site density is similar to native telomere sequences (Grossi et al. 2001, Guérin et al. 2019) (**Fig. 1C**). In yeast, condensin-dependent chromosome arm compaction peaks in late anaphase about 20-40 minutes after a release from a *cdc15-2^{ts}* arrest (Lazar-Stefanita et al. 2017). To maximize the odds of condensin encountering the Rap1-bound array, we crosslinked the interactions in synchronized cells 30 minutes after release from a

cdc15-2ts arrest. Relative to a control array not bound by Rap1, an array of 16 closely-spaced Rap1 sites in tandem leads to a 5-fold increased interaction of condensin with the sequence at the border of the array (Fig1D, 6-bp spacing). Condensin-DNA interaction is weaker ~150-300-bp away from the internal array, suggesting an accumulation restricted to the edge of the Rap1 tandem.

If higher condensin-DNA interaction is the consequence of condensin loop extrusion stalling on the Rap1-bound array (Fig. 1B), a lesser density of Rap1 sites could alleviate it by exposing DNA segments within the array that condensin could contact. We tested this prediction using an array of 16 Rap1 sites spaced with a 35-bp linker every two successive sites (Fig 1C). Since Rap1 binds uncooperatively to each site, spacer length should only impact Rap1 density, not its affinity (Williams et al. 2010). Lowering Rap1 density brings down condensin interaction with the adjacent sequence to its basal level (Fig1D). A simple interpretation of these results is that condensin loop extrusion stalls at high-density telomere-like tandems of Rap1 sites. Slightly lowering Rap1 density alleviates stalling and allows condensin to extrude the tandem DNA.

We also detect by ChIP condensin at a native telomere in late anaphase (TEL6R, Sup. Fig. S1), in agreement with previous reports showing that condensin is enriched at the border of native telomeres in budding yeast and fission yeast in mitosis (Leonard et al. 2015, Colin et al. 2022). To further characterize condensin position on chromosomes, we used a complementary approach, ChEC-seq (Zentner et al. 2015, Hafner et al. 2018, Bruzzone et al. 2021). Condensin-subunit Smc4 is tagged with a Ca²⁺-inducible MNase. Increased frequency of DNA cleavage upon Ca²⁺ addition is indicative of Smc4 proximity to DNA and is estimated by the sequencing of the consequent small cleavage products (Fig. 2A, Sup. Fig. S2A). Free MNase provides a control for non-specific cleavage. In cells arrested prior to metaphase by nocodazole, ChEC-seq shows the expected presence of condensin at pericentromeres, where Shugoshin recruits condensin (D'Ambrosio et al. 2008, Bachellier-Bassi et al. 2008, Nerusheva et al. 2014, Leonard et al. 2015, Yahya et al. 2020). Smc4 is also present at the rDNA repeats (Chr. 12) and the recombination enhancer (RE, Chr. 3), two loci where Fob1 recruits condensin (Johzuka and Horiuchi 2009, Lamothe et al. 2020, Dinda et al. 2022) (Fig. 2B, Sup. Fig. S2B). In cells synchronized in late-anaphase, condensin presence at pericentromeres is strongly reduced, the consequence of Shugoshin degradation at the onset of anaphase (Nerusheva et al. 2014, Leonard et al. 2015).

Condensin presence at rDNA repeats and the RE remain high in late anaphase (**Fig. 2B, Sup. Fig. S2B**). Interestingly, ChEC-seq also detects a slight condensin enrichment in the 150 bp adjacent to a tandem array of closely-spaced Rap1 sites in late-anaphase (**Sup. Fig. S3**), in agreement with the previous ChIP results and the prediction that condensin loop extrusion stalls on the array.

...

Rap1-bound array leads to local chromatin decompaction during anaphase

When condensin stalls at Rap1-bound arrays, the arrest might be transient and followed by a rapid condensin dissociation. This scenario predicts that Rap1-bound arrays should cause a local and relative chromatin decompaction in anaphase. We tested this by measuring local chromatin compaction with a microscopy approach. Two positions 48-kb apart on a chromosome arm are tagged with distinct arrays bound by red and green fluorescent proteins respectively (**Fig. 3A & B**). We use the projected 2D distance separating the two spots as a proxy for local chromosome folding. The distance between the two spots is lower in cells in anaphase relative to G1 cells, the expected consequence of higher condensin activity during anaphase (**Fig. 3C**) (Bystricky et al. 2004, Vas et al. 2007, Robellet et al. 2015, Lazar-Stefanita et al. 2017, Lamothe et al. 2020).

Insertion of 16 closely-spaced Rap1 sites half-way between the two fluorescently tagged positions has no impact in G1 cells (**Fig. 3C**). In cells in anaphase, the array increases the distance between the two spots, bringing it to the values measured in G1 cells where condensin is less or not active. This indicates that a Rap1-bound telomere-like array causes a local chromatin unfolding in anaphase. Lowering Rap1 density with a 30-bp linker every two successive sites significantly restores anaphase compaction (**Fig. 3C**). This sensitivity to Rap1 spacing indicates that condensin stalling at the array can be the initial event leading to chromatin unfolding.

Rap1 density threshold for preferential dicentric breakage at Rap1-bound arrays

Our hypothesis is that preferential breakage of dicentric chromosomes near Rap1-bound arrays is a consequence of condensin stalling (Guérin et al. 2019). Therefore, we next used dicentric breakage to explore a gradient of density for Rap1. We inserted 16 Rap1 sites spaced with linkers ranging from 6 to 35-bp in a conditional dicentric chromosome

, whose one centromere can be reversibly inactivated (**Fig. 4A, Sup. Fig. S4 A & B**). To monitor dicentric breakage by abscission, we reactivated the conditional centromere in cells synchronously released from a G1 arrest and harvested cells either prior to mitosis (nocodazole arrest) or past cytokinesis in the next G1 (alpha factor arrest). Chromosome fragments were separated by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) and detected by Southern blot. In the absence of Rap1 tandems between centromeres, breakage preferentially takes place near centromeres (**Fig. 4B**)(Lopez et al.2015, Guérin et al. 2019). High-density arrays (15-bp or less) focus breakage nearby. Intermediate linkers (20 and 25-bp) reduce breakage near the array and linkers of 30 and 35-bp abolish it (**Fig4B & C**). This result suggests that a threshold length below 20-bp is needed to efficiently block condensin *in vivo*. The 35-bp linker sequence contains a *LacO* site. As reported previously (Guérin et al. 2019), ectopic expression of bacterial LacI restores a strong breakage at the 35-bp spaced tandem. A LacI* allele with a reduced affinity for *LacO* weakens this effect (**Fig4B & C**)(Dubarry et al. 2011). Assuming that condensin stalling leads to dicentric breakage at Rap1-bound arrays (see discussion), this further indicates that continuous high-affinity DNA binding over the array is a key feature needed to stall condensin. It also suggests that the accessible DNA required for loop extrusion is rather small, close to 20bp.

DISCUSSION

Model for Rap1 action on condensin loop extrusion activity

Here, we explore how DNA coverage by a telomere protein regulates condensin loop extrusion activity *in vivo*. Our results support the following model: when a loop-extruding condensin encounters telomeres or telomere-like arrays, it stalls (**Fig. 5A**). Condensin stalling leads to condensin dissociation and loop disruption, therefore resulting in a local decompaction until another condensin loads in the region and reaches the array.

Rap1 binds telomere repeats with high affinity (*in vitro* $K_D \approx 3$ nM) and a prolonged residence time (> 30 min.)(Williams et al. 2010, Matot et al. 2012, Lickwar et al. 2012). These two features can be sufficient to prevent by steric hindrance the dynamic condensin-DNA interactions needed for loop extrusion, as long as the DNA covered by Rap1 exceeds the length of condensin SMC coiled coil arms (*i.e.* about 50 nm long, the length of a 150 bp DNA segment or about 8 closely-spaced Rap1 sites). Rap1 binding on closely-spaced tandems also tends to stiffen DNA, generating stick-like structures

(Le Bihan et al. 2013). This stiffening can further oppose DNA grabbing by condensin and therefore loop extrusion, for instance by blocking the ATP/Ycs4-driven DNA entry into the Smc2-Smc4 ring (Ryu et al. 2022, Nomidis et al. 2022, Shaltiel et al. 2022, Lee et al. 2022). Spacers of 20-30 bp between the DNA-bound Rap1 molecules are sufficient to alleviate the roadblock, giving a first estimate of the threshold length necessary for condensin-DNA dynamic attachment points. Since the DNA-Rap1 interface is largely restricted to the major groove (König et al. 1996, Matot et al. 2012), the DNA surface available for interactions between adjacent Rap1 molecules can be slightly larger than deduced from the length separating the sites (in other words, condensin and Rap1 can partially overlap on DNA). Lower Rap1 density is also likely to restore DNA flexibility, therefore further helping condensin to catch DNA within Rap1-bound tandems.

The linker length needed for loop extrusion through Rap1 tandems is close to the average spacing between nucleosomes in *S. cerevisiae* (Brogaard et al. 2012). The tension that condensin might exert on chromatin could slightly uncoil the DNA around the nucleosomes, which might expose it enough for the condensin dynamic attachment points necessary for loop extrusion. Rap1-bound arrays might be a relevant model to address loop extrusion of nucleosome fibres.

The decompaction induced by telomere-like arrays shows that anaphase chromatin locally unfolds in response to condensin stalling. Condensin dissociation is the likely cause of this unfolding. Our results do not rule out the alternative scenario of a loop disruption with condensin remaining anchored at its initial loading site (**Fig. 5A**). Condensin dissociation could be an intrinsic response to stalling or driven by additional factors, such as the Cdc48 segregase, condensin ubiquitylation and condensin poly-sumoylation (Thattikota et al. 2018, Psakhye and Branzei 2021).

Functions at telomeres

Condensin stalling by Rap1 at telomere-telomere fusions favours dicentric breakage near the fusion points. This backs up telomere protection and contributes to genome stability (Pobiega and Marcand 2010). The local chromatin unfolding uncovered here offers a new insight to better explain the underlying mechanism (**Fig. 5B**). During anaphase, centromere linkage to the spindle poles stretches dicentric anaphase bridges. During telophase, mitotic spindle disassembly and spindle poles untethering from the cell cortex

allow condensin to recoil the bridges prior to septum closure (Lopez et al. 2015, Guérin et al. 2019). Condensin stalling at telomere-telomere fusions will favour the folding of the two chromosome regions separated by the fusion into two domains, one in each nuclear lobe. This insulation and the local decompaction of chromatin caused by condensin stalling will favour the lagging of the fusion in the midzone where the septum grows, and therefore, its entrapment and breakage at the abscission site (**Fig. 5B**).

In addition to this telomere-telomere fusion rescue pathway, can condensin stalling and dissociation at unfused native telomeres contribute to telomere segregation? In the absence of stalling, loop extrusion unhindered until the chromosome ends would disrupt the loops, leaving condensins anchored and unproductive at the loop initiation sites. These condensins might constitute obstacles for new attempts at folding the chromosome ends by other condensins. Condensin stalling followed by dissociation seems a more favourable solution since it ensures that the process remains dynamic, allowing the steady extrusion of loops until the telomeres in order to promote the proper segregation of chromosome ends. This hypothesis remains to be explored.

Loop extrusion seems a conserved mechanism within the SMC family (Ganji et al. 2018, Davidson et al. 2019, Liu et al. 2022, Pradhan et al. 2022b, Taschner and Gruber 2022). The covering of DNA by proteins is also a conserved feature of telomeres. For these reasons, the model we propose for condensin and Rap1 in *S. cerevisiae* can have a general significance. It will also help to study how SMC complexes handle nucleosomes and various obstacles on chromatin and to probe how SMC complexes extrude DNA.

MATERIALS & METHODS

Strains

All yeast strains used in this study are listed in **Table S1**.

Cell cycle synchronization

To synchronize cells in late anaphase (ChIP and ChEC-seq experiments), exponentially growing cells carrying the *cdc15-2* thermosensitive allele were arrested at restrictive temperature (36°C) for about 90 minutes prior to be shifted back at permissive temperature (25°C) for 30 minutes (see supplementary information for details).

To assess dicentric breakage, cells growing exponentially in galactose-containing synthetic medium (*CEN6 OFF*) were arrested in G1 with α -factor (10^{-7} M). Cells were released from the G1 arrest with two washes in glucose-containing rich medium (YPD). Half the culture was complemented with nocodazole (5 μ g/mL) to arrest the cells in G2/M. The other half was complemented with α -factor (10^{-7} M) about one hour after the washes to arrest the cells in the next G1.

Pulse-Field Gel Electrophoretic (PFGE) and Southern blot

Yeast DNA embedded in agarose plugs was prepared as described (Guérin et al. 2019) with minor modification (see supplementary information). Pulse-field gel electrophoresis was carried out in a 0,9% agarose gel in $0.5\times$ TBE at 14°C with a CHEF DR III from Bio- Rad a constant switch time of 20 s during 24 h. Gel-Red labeled DNA was detected by a Typhoon scanner. DNA transferred to a nitrocellulose membrane was hybridized with a 32 P-labeled *TUB2* fragment as previously described (Guérin et al. 2019).

Distance measure by microscopy

Exponential growing cells (0.8 OD) in rich medium (YPD) were washed in synthetic medium prior to live-cell imaging with a wide-field inverted microscope (Leica DMI-6000B) equipped with Adaptive Focus Control to eliminate Z drift, a 100×/1.4 NA immersion objective with a Prior NanoScanZ Nanopositioning Piezo Z Stage System, a CMOS camera (ORCA-Flash4.0; Hamamatsu) and a solid-state light source (SpectraX, Lumencore). The system is piloted by MetaMorph software (Molecular Device).

GFP and mCherry two-color images were acquired over 19 focal steps of 0.2µm using solid state 475 and 575nm diodes and appropriate filters (GFP-mRFP filter; excitation: double BP, 450–490/550–590nm and dichroic double BP 500–550/600–665nm; Chroma Technology Corp.). Acquisition of both wavelengths was completed on each focal plane with an exposure time of 50ms, before 0.2µm steps, to minimise the possibility of array movement between acquisitions of each wavelength. A single bright-field image on one focal plane was acquired at each time point with an exposure of 50ms. All images shown are maximum intensity z projections of z-stack images.

Image analysis was achieved following processing with ImageJ Fiji software, using scripts written in ImageJ macro language. Briefly, local maxima that define GFP and mCherry fluorescent array positions were determined from 2D maximal projections of three-dimensional data sets. Fluorescent signals within cells were confirmed manually from 3 color merged images. The distance between the two closest GFP and mCherry maxima was calculated using their extracted XY coordinates in R software (v4.1.1).

ChIP and ChEC

ChIP experiments were carried out as previously described with minor modifications (Lescasse et al. 2013, Roisné-Hamelin et al. 2021).

ChEC-seq experiments were performed as previously described (Hafner et al. 2018) with minor modifications (see supplementary info for details). Library preparation was carried out using the NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina protocol kit (Biolabs) and sequenced using the Illumina single-end Truseq protocol (read length 50 bp). The sequencing data were mapped on HTS station and normalized to total read number. Reads were extended by the read length.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from *Agence Nationale de la Recherche* (ANR-14- CE10-021 DICENS, ANR-15CE12-0007 DNA-Life), *Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer*, *La Ligue contre le Cancer*, CEA Radiation biology programme and GGP CEA EDF programme. A.D. was supported by a PhD fellowship from CEA and *Ligue contre le Cancer* young researcher grant.

REFERENCES

- Bachellier-Bassi S, Gadal O, Bourout G, Nehrbass U. 2008. Cell cycle-dependent kinetochore localization of condensin complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Structural Biology* **162**: 248–259.
- Brandão HB, Paul P, van den Berg AA, Rudner DZ, Wang X, Mirny LA. 2019. RNA polymerases as moving barriers to condensin loop extrusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 20489–20499.
- Brogaard K, Xi L, Wang J-P, Widom J. 2012. A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution. *Nature* **486**: 496–501.
- Bruzzone MJ, Albert B, Hafner L, Kubik S, Lezaja A, Mattarocci S, Shore D. 2021. *ChEC-seq: a robust method to identify protein-DNA interactions genome-wide*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.02.18.431798>.
- Bystricky K, Heun P, Gehlen L, Langowski J, Gasser SM. 2004. Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16495–16500.
- Colin L, Reyes C, Berthezene J, Maestroni L, Modolo L, Toselli E, Chanard N, Schaak S, Cuvier O, Gachet Y, et al. 2022. *Condensin positioning at telomeres by Taz1 promotes telomere disjunction in anaphase*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.03.18.484892>.
- Cuylen S, Metz J, Hruby A, Haering CH. 2013. Entrapment of Chromosomes by Condensin Rings Prevents Their Breakage during Cytokinesis. *Developmental Cell* **27**: 469–478.
- D'Ambrosio C, Schmidt CK, 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**: 2215–2227.

- Davidson IF, Bauer B, Goetz D, Tang W, Wutz G, Peters J-M. 2019. DNA loop extrusion by human cohesin. *Science* **366**: 1338–1345.
- de Lange T. 2018. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet* **52**: 223–247.
- Diebold-Durand M-L, Lee H, Ruiz Avila LB, Noh H, Shin H-C, Im H, Bock FP, Bürmann F, Durand A, Basfeld A, et al. 2017. Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Molecular Cell* **67**: 334-347.e5.
- Dinda M, Fine RD, Saha S, Wang Z, Zang C, Li M, Smith JS. 2022. *Fob1-dependent condensin recruitment and loop extrusion on yeast chromosome III*.
<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.05.12.491704>.
- Dubarry M, Loiodice I, Chen CL, Thermes C, Taddei A. 2011. Tight protein–DNA interactions favor gene silencing. *Genes Dev* **25**: 1365–1370.
- Galati A, Micheli E, Cacchione S. 2013. Chromatin Structure in Telomere Dynamics. *Front Oncol* **3**. article/10.3389/fonc.2013.00046
- Ganji M, Shaltiel IA, Bisht S, Kim E, Kalichava A, Haering CH, Dekker C. 2018. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* **360**: 102–105.
- Gibcus JH, Samejima K, Goloborodko A, Samejima I, Naumova N, Nuebler J, Kanemaki MT, Xie L, Paulson JR, Earnshaw WC, et al. 2018. A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* **359**: eaao6135.
- Goloborodko A, Marko JF, Mirny LA. 2016. Chromosome Compaction by Active Loop Extrusion. *Biophysical Journal* **110**: 2162–2168.
- Goto GH, Zencir S, Hirano Y, Ogi H, Ivessa A, Sugimoto K. 2015. Binding of Multiple Rap1 Proteins Stimulates Chromosome Breakage Induction during DNA Replication ed. J.-Q. Zhou. *PLoS Genet* **11**: e1005283.
- Grossi S, Bianchi A, Damay P, Shore D. 2001. Telomere Formation by Rap1p Binding Site Arrays Reveals End-Specific Length Regulation Requirements and Active Telomeric Recombination. *Mol Cell Biol* **21**: 8117–8128.
- Guérin TM, Béneut C, Barinova N, López V, Lazar-Stefanita L, Deshayes A, Thierry A, Koszul R, Dubrana K, Marcand S. 2019. Condensin-Mediated Chromosome Folding and Internal Telomeres Drive Dicentric Severing by Cytokinesis. *Molecular Cell* **75**: 131-144.e3.

- Guérin TM, Marcand S. 2022. Breakage in breakage–fusion–bridge cycle: an 80-year-old mystery. *Trends in Genetics* **38**: 641–645.
- Hafner L, Lezaja A, Zhang X, Lemmens L, Shyian M, Albert B, Follonier C, Nunes JM, Lopes M, Shore D, et al. 2018. Rif1 Binding and Control of Chromosome-Internal DNA Replication Origins Is Limited by Telomere Sequestration. *Cell Reports* **23**: 983–992.
- Johzuka K, Horiuchi T. 2009. The cis Element and Factors Required for Condensin Recruitment to Chromosomes. *Molecular Cell* **34**: 26–35.
- König P, Giraldo R, Chapman L, Rhodes D. 1996. The Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of Yeast RAP1 in Complex with Telomeric DNA. *Cell* **85**: 125–136.
- Kschonsak M, Merkel F, Bisht S, Metz J, Rybin V, Hassler M, Haering CH. 2017. Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell* **171**: 588-600.e24.
- Lamothe R, Costantino L, Koshland DE. 2020. The spatial regulation of condensin activity in chromosome condensation. *Genes Dev* **34**: 819–831.
- Lazar-Stefanita L, Scolari VF, Mercy G, Muller H, Guérin TM, Thierry A, Mozziconacci J, Koszul R. 2017. Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. *EMBO J* **36**: 2684–2697.
- Le Bihan Y-V, Matot B, Pietrement O, Giraud-Panis M-J, Gasparini S, Le Cam E, Gilson E, Sclavi B, Miron S, Le Du M-H. 2013. Effect of Rap1 binding on DNA distortion and potassium permanganate hypersensitivity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**: 409– 419.
- Lee B-G, Rhodes J, Löwe J. 2022. Clamping of DNA shuts the condensin neck gate. *Proc Natl Acad Sci USA* **119**: e2120006119.
- Leonard J, Sen N, Torres R, Sutani T, Jarmuz A, Shirahige K, Aragón L. 2015. Condensin Relocalization from Centromeres to Chromosome Arms Promotes Top2 Recruitment during Anaphase. *Cell Reports* **13**: 2336–2344.
- Lescasse R, Pobiega S, Callebaut I, Marcand S. 2013. End-joining inhibition at telomeres requires the translocase and polySUMO-dependent ubiquitin ligase Uls1. *EMBO J* **32**: 805–815.

- Lickwar CR, Mueller F, Hanlon SE, McNally JG, Lieb JD. 2012. Genome-wide protein–DNA binding dynamics suggest a molecular clutch for transcription factor function. *Nature* **484**: 251–255.
- Lioy VS, Cournac A, Marbouty M, Duigou S, Mozziconacci J, Espéli O, Boccard F, Koszul R. 2018. Multiscale Structuring of the E. coli Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. *Cell* **172**: 771-783.e18.
- Liu HW, Roisné-Hamelin F, Beckert B, Li Y, Myasnikov A, Gruber S. 2022. DNA-measuring Wadjet SMC ATPases restrict smaller circular plasmids by DNA cleavage. *Molecular Cell* **82**: 4727-4740.e6.
- Lopez V, Barinova N, Onishi M, Pobiega S, Pringle JR, Dubrana K, Marcand S. 2015. Cytokinesis breaks dicentric chromosomes preferentially at pericentromeric regions and telomere fusions. *Genes Dev* **29**: 322–336.
- Maestroni L, Reyes C, Vaurs M, Gachet Y, Tournier S, Géli V, Coulon S. 2020. Nuclear envelope attachment of telomeres limits TERRA and telomeric rearrangements in quiescent fission yeast cells. *Nucleic Acids Research* **48**: 3029–3041.
- Makovets S, Herskowitz I, Blackburn EH. 2004. Anatomy and Dynamics of DNA Replication Fork Movement in Yeast Telomeric Regions. *Mol Cell Biol* **24**: 4019–4031.
- Marcand S, Pardo B, Gratiás A, Cahun S, Callebaut I. 2008. Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres. *Genes Dev* **22**: 1153–1158.
- Matot B, Le Bihan Y-V, Lescasse R, Pérez J, Miron S, David G, Castaing B, Weber P, Raynal B, Zinn-Justin S, et al. 2012. The orientation of the C-terminal domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein is determined by its binding to DNA. *Nucleic Acids Research* **40**: 3197–3207.
- Miller KM, Rog O, Cooper JP. 2006. Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* **440**: 824–828.
- Negrini S, Ribaud V, Bianchi A, Shore D. 2007. DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation. *Genes Dev* **21**: 292–302.

Nerusheva OO, Galander S, Fernius J, Kelly D, Marston AL. 2014. Tension-dependent removal of pericentromeric shugoshin is an indicator of sister chromosome biorientation. *Genes Dev* **28**: 1291–1309.

Nomidis SK, Carlon E, Gruber S, Marko JF. 2022. DNA tension-modulated translocation and loop extrusion by SMC complexes revealed by molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Research* **50**: 4974–4987.

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

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

Pradhan B, Kanno T, Igarashi MU, Baaske MD, Kei Wong JS, Jeppsson K, Björkegren C, Kim E. 2022b. *The Smc5/6 complex is a DNA loop extruding motor*.
<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.05.13.491800>.

Psakhye I, Branzei D. 2021. SMC complexes are guarded by the SUMO protease Ulp2 against SUMO-chain-mediated turnover. *Cell Reports* **36**: 109485.

Renshaw MJ, Ward JJ, Kanemaki M, Natsume K, Nédélec FJ, Tanaka TU. 2010. Condensins Promote Chromosome Recoiling during Early Anaphase to Complete Sister Chromatid Separation. *Developmental Cell* **19**: 232–244.

Rivosecchi J, Jost D, Vachez L, Gautier FD, Bernard P, Vanoosthuyse V. 2021. RNA polymerase backtracking results in the accumulation of fission yeast condensin at active genes. *Life Sci Alliance* **4**: e202101046.

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

Roisné-Hamelin F, Pobiega S, Jézéquel K, Miron S, Dépagne J, Veaute X, Busso D, Du M-HL, Callebaut I, Charbonnier J-B, et al. 2021. Mechanism of MRX inhibition by Rif2 at telomeres. *Nat Commun* **12**: 2763.

- Ryu J-K, Rah S-H, Janissen R, Kerssemakers JWJ, Bonato A, Michieletto D, Dekker C. 2022. Condensin extrudes DNA loops in steps up to hundreds of base pairs that are generated by ATP binding events. *Nucleic Acids Research* **50**: 820–832.
- Shaltiel IA, Datta S, Lecomte L, Hassler M, Kschonsak M, Bravo S, Stober C, Ormanns J, Eustermann S, Haering CH. 2022. A hold-and-feed mechanism drives directional DNA loop extrusion by condensin. *Science* **376**: 1087–1094.
- Shintomi K, Inoue F, Watanabe H, Ohsumi K, Ohsugi M, Hirano T. 2017. Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science* **356**: 1284–1287.
- Soman A, Korolev N, Nordenskiöld L. 2022. Telomeric chromatin structure. *Current Opinion in Structural Biology* **77**: 102492.
- Taschner M, Gruber S. 2022. *DNA segment capture by Smc5/6 holo-complexes*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.10.09.511515>.
- Thattikota Y, Tollis S, Palou R, Vinet J, Tyers M, D'Amours D. 2018. Cdc48/VCP Promotes Chromosome Morphogenesis by Releasing Condensin from Self-Entrapment in Chromatin. *Molecular Cell* **69**: 664-676.e5.
- Vas ACJ, Andrews CA, Kirkland Matesky K, Clarke DJ. 2007. In Vivo Analysis of Chromosome Condensation in *Saccharomyces cerevisiae* ed. K. Bloom. *MBoC* **18**: 557–568.
- Wellinger RJ, Zakian VA. 2012. Everything You Ever Wanted to Know About *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres: Beginning to End. *Genetics* **191**: 1073–1105.
- Williams TL, Levy DL, Maki-Yonekura S, Yonekura K, Blackburn EH. 2010. Characterization of the Yeast Telomere Nucleoprotein Core. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 35814–35824.
- Yahya G, Wu Y, Peplowska K, Röhrl J, Soh Y-M, Bürmann F, Gruber S, Storchova Z. 2020. Phospho-regulation of the Shugoshin - Condensin interaction at the centromere in budding yeast ed. C.S. Campbell. *PLoS Genet* **16**: e1008569.
- Yatskevich S, Rhodes J, Nasmyth K. 2019. Organization of Chromosomal DNA by SMC Complexes. *Annu Rev Genet* **53**: 445–482.

Zentner GE, Kasinathan S, Xin B, Rohs R, Henikoff S. 2015. ChEC-seq kinetics discriminates transcription factor binding sites by DNA sequence and shape in vivo. *Nat Commun* **6**: 8733.

Zimmermann M, Kibe T, Kabir S, de Lange T. 2014. TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes Dev* **28**: 2477–2491.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Condensin enrichment at the border of Rap1-bound arrays. (A) *S. cerevisiae* condensin subunits. **(B)** Working hypothesis for condensin stalling at a Rap1- bound array. **(C)** Schema of the Rap1 arrays inserted in chromosome 7 and the positions of qPCR used for ChIP. **(D)** ChIP analysis of Smc2-Myc in cells synchronized in late anaphase. Mean and SD IP/Input values.

Figure 2. ChEC-Seq analysis of genome-wide condensin position before and after anaphase onset. (A) Schema of the ChEC-Seq method. Smc4 protein is tagged with a Ca²⁺ inducible version of MNase (micrococcal nuclease). MNase is activated by adding Ca²⁺ to digitonin-permeabilized cells arrested in G2/M (nocodazole arrest) or synchronized in late anaphase (released from a *cdc15-2^{ts}* arrest). Small MNase cleavage products are detected by deep sequencing. **(B)** Representative Smc4-MNase ChEC results on chromosomes 3 and 16. Free MNase controls for non-specific cleavage.

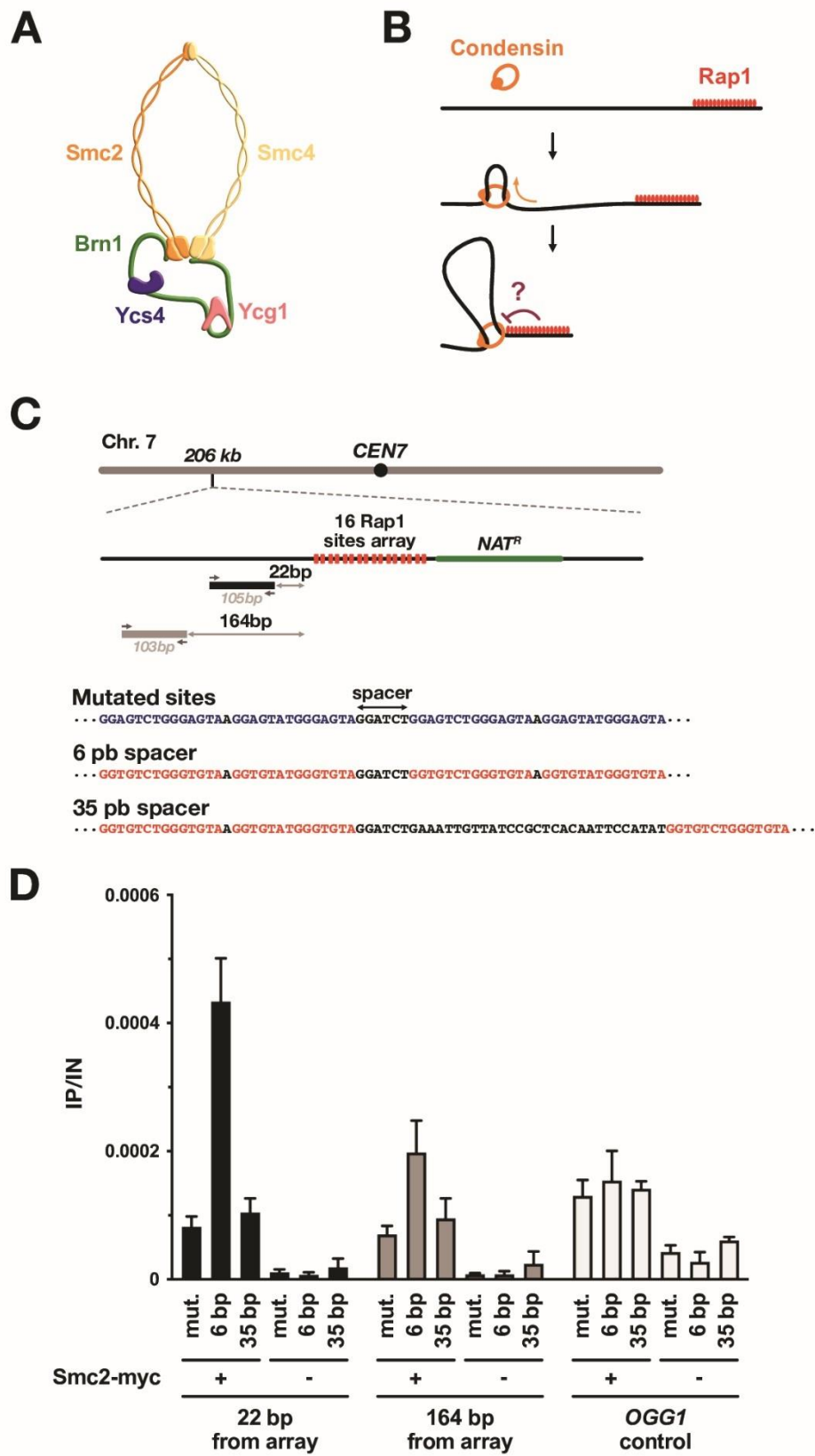
Figure 3. A telomere-like Rap1-bound array causes a local chromatin decompaction in anaphase. (A) Schema of the microscopy assay used to estimate local chromatin compaction in live cells. Tandem arrays of 256 *LacO* sites and 128 *TetO* sites are 48-kb apart in chromosome 3 right arm in cells expressing LacI-mCherry and TetR- GFP. Rap1 sites tandem arrays are half-way between the two fluorescently tagged positions. The GFP labelling of the actomyosin ring protein Myo1 provides a marker to distinguish cells in anaphase and telophase from cells in G1. **(B)** Representative images of cells at distinct cell cycle stages. In anaphase, the two sister chromatids are separated and the actomyosin ring is open. In telophase, the ring is contracting. In G1 cells, the ring is disassembled. **(C)** Distance between the two fluorescent spots in G1 cells in anaphase/telophase cells. Black line: median value. Statistical significance: Kolmogorov- Smirnov test.

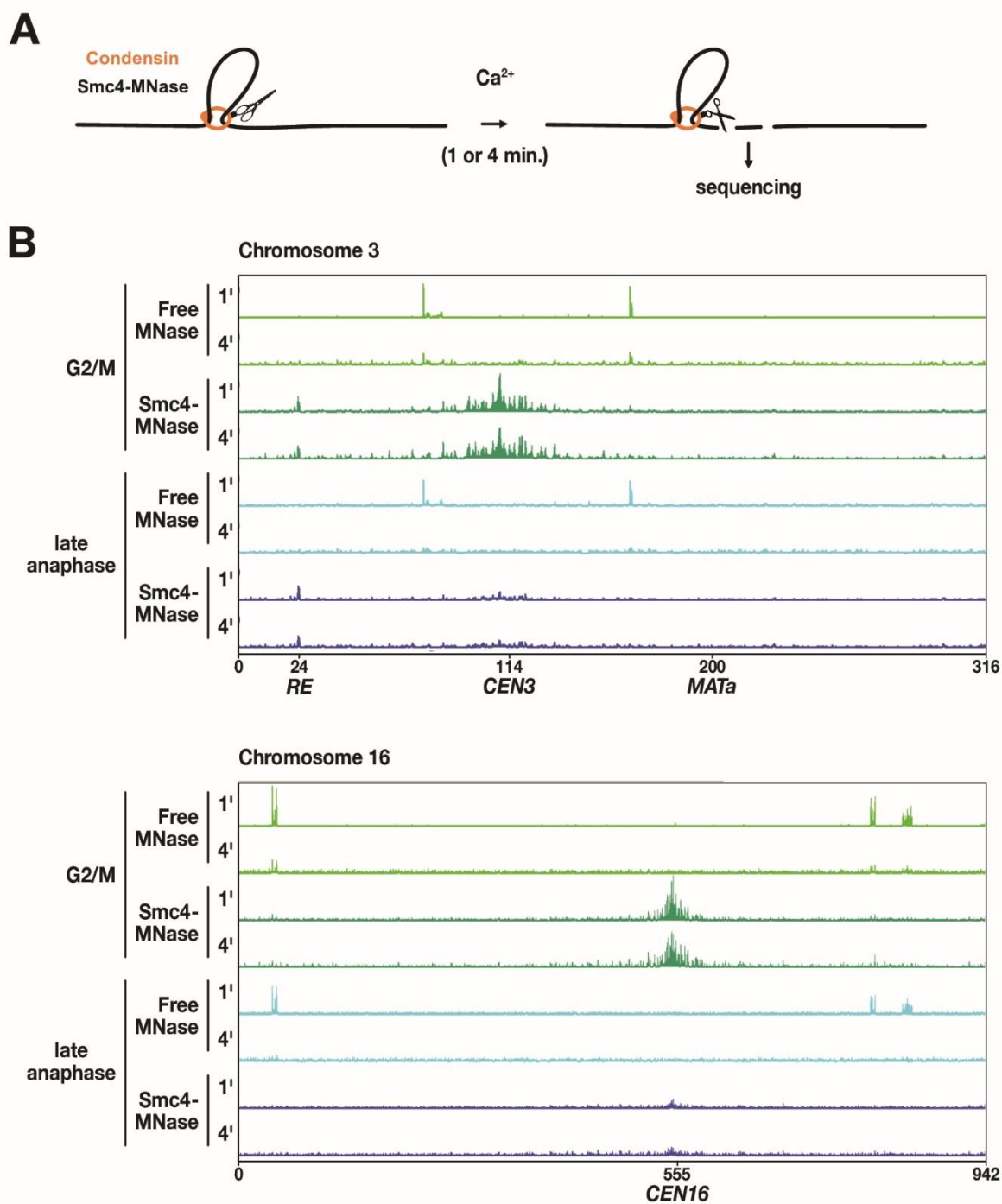
Figure 4. Rap1 density required for preferential dicentric breakage at Rap1- bound arrays. (A) Dicentrics were generated through the insertion of an etopic centromere (*CEN4*) in chromosome 6 right arm by homologous recombination. Chromosome 6 centromere (*CEN6*) is conditional, inactive in galactose-containing

medium, active in glucose-containing medium. Rap1 sites tandem arrays are half-way between the two centromeres. **(B)** Cells with a conditional dicentric were grown exponentially in galactose-containing medium, synchronized in G1 with alpha-factor, released in glucose-containing medium, and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed through mitosis to be blocked in the next G1 with alpha-factor (next G1). Chromosomes were separated by PFGE and probed with a fragment from chromosome 6 left arm. **(C)** Quantification of dicentric breakage at the Rap1-bound arrays. N = 3. Each single experiment shown in **Sup. Fig. S4A**.

Figure 5. (A) Model for condensin stalling and dissociation at telomeres and telomere-like arrays. **(B)** Model for the preferential breakage of dicentric chromosomes near telomere-telomere fusions. Cell wall and septum in grey. Spindle pole bodies in brown. See discussion for details.

Figure 1





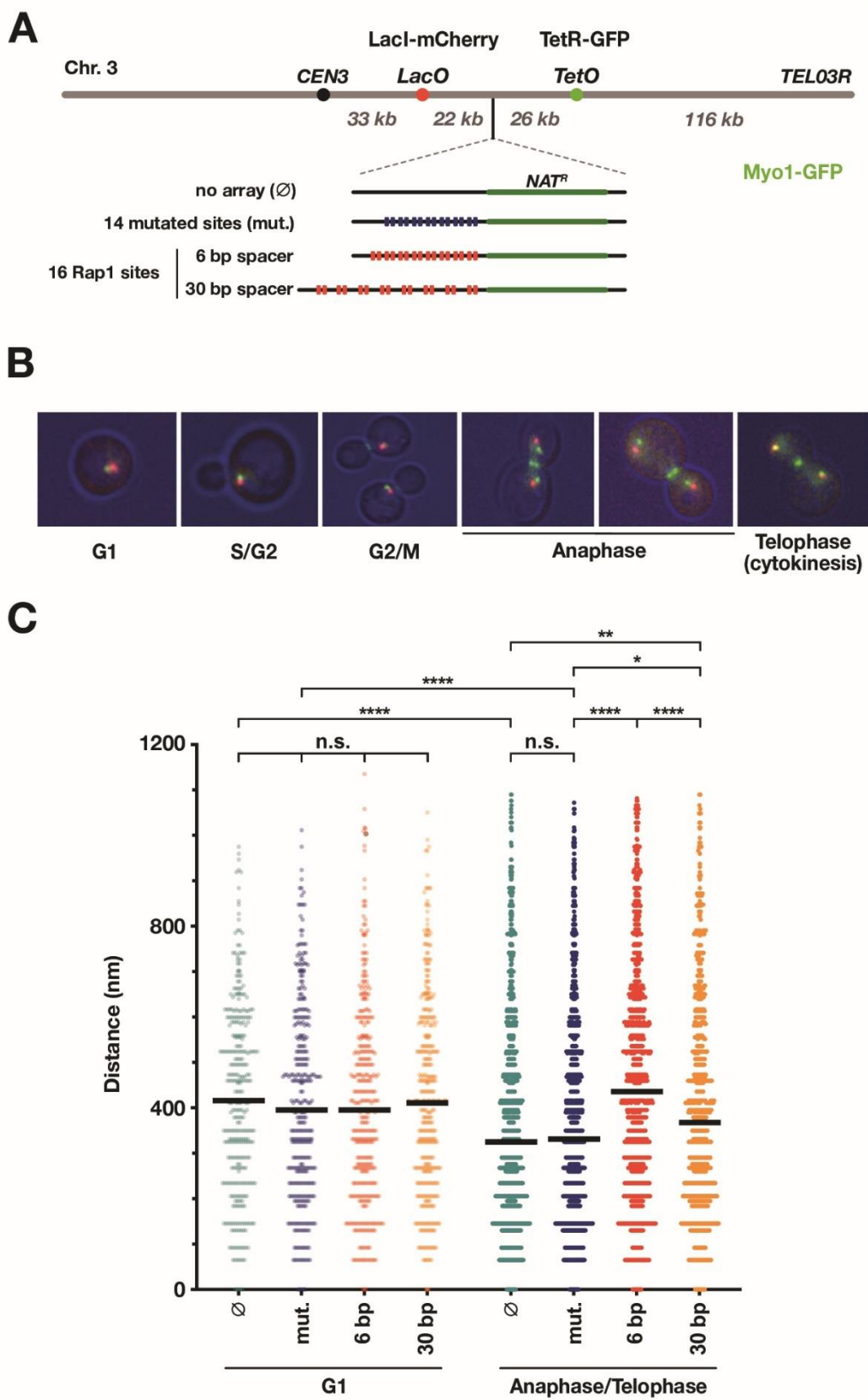
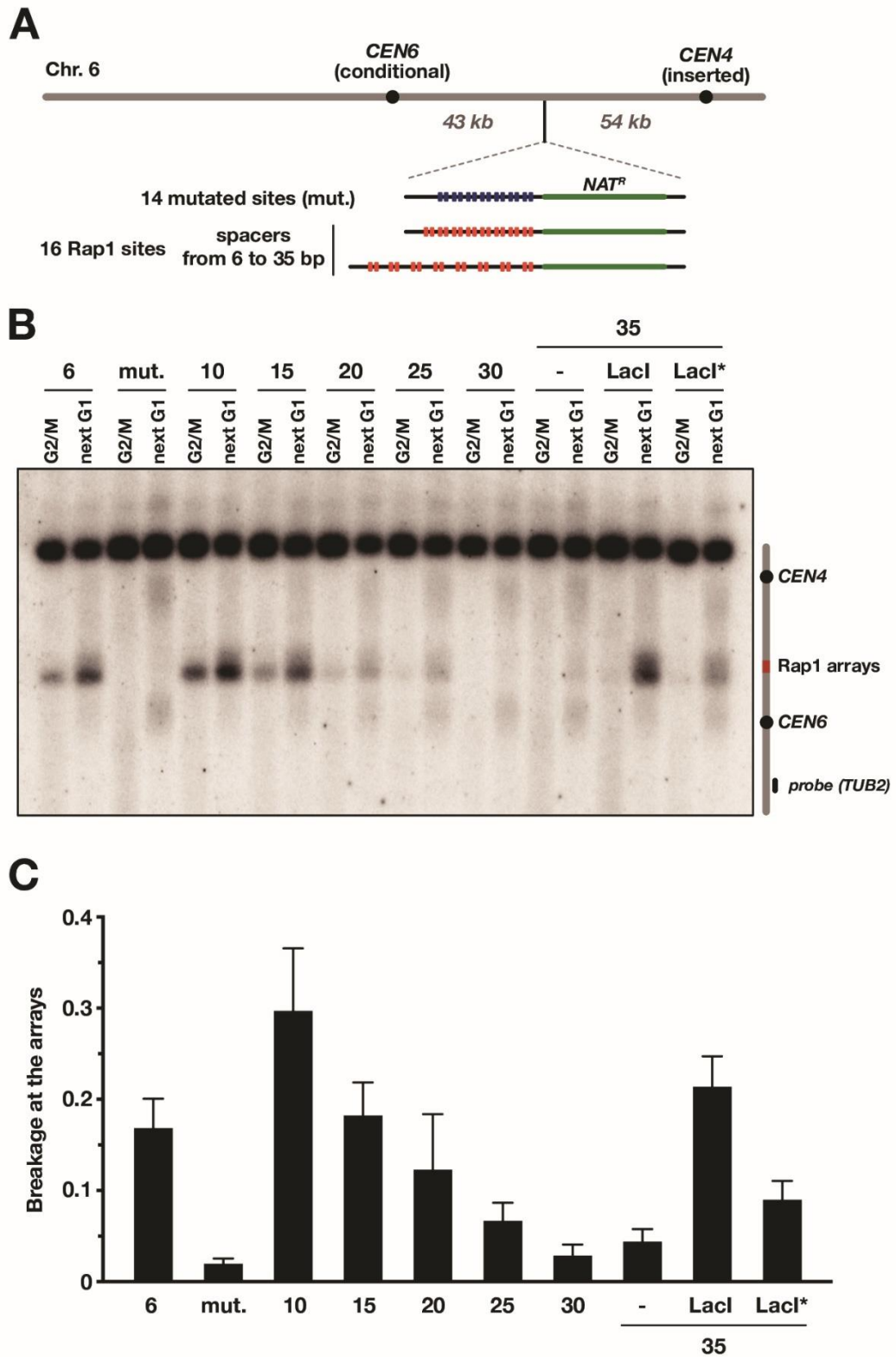
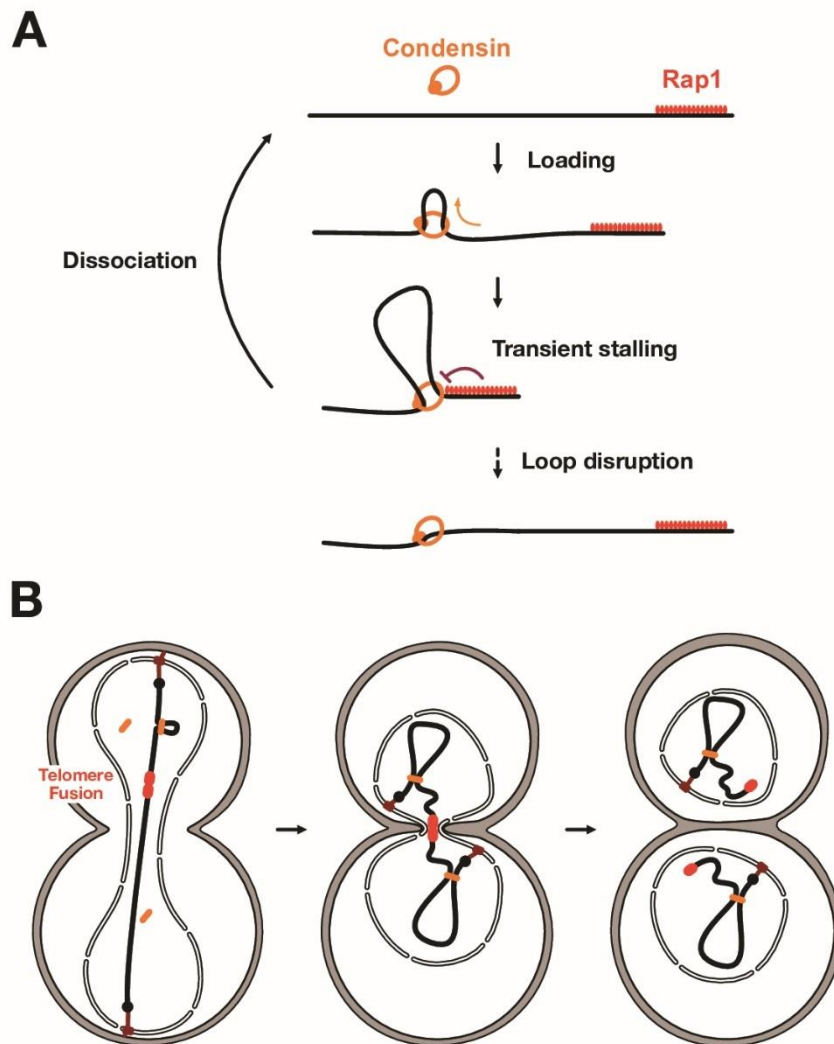


Figure 4





SUPPLEMENTARY FIGURES

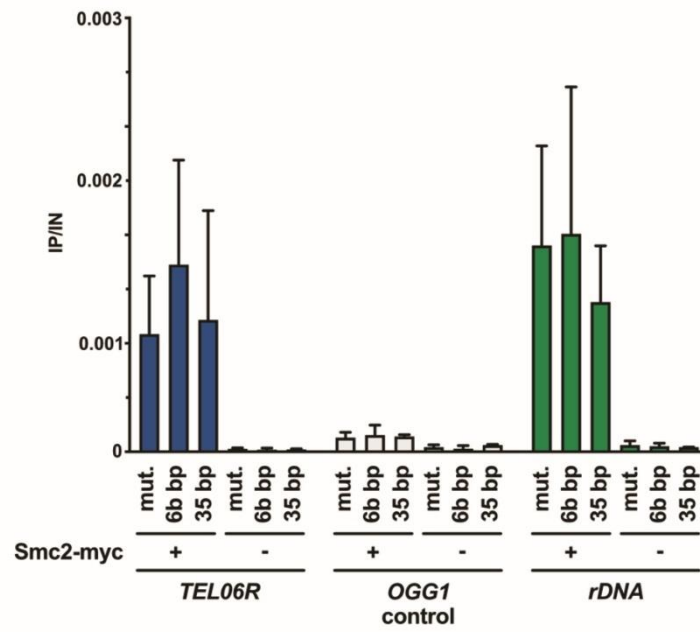


Figure S1. Condensin enrichment at TEL06R and rDNA. ChIP analysis of Smc2-Myc in cells synchronized in late anaphase. Mean and SD IP/Input values. *TEL06R* PCR probe is adjacent to the TG₁₋₃ telomere repeats, rDNA PCR probe is within the *NTS1* region. *OGG1* control: same data as in **Fig. 1D**.

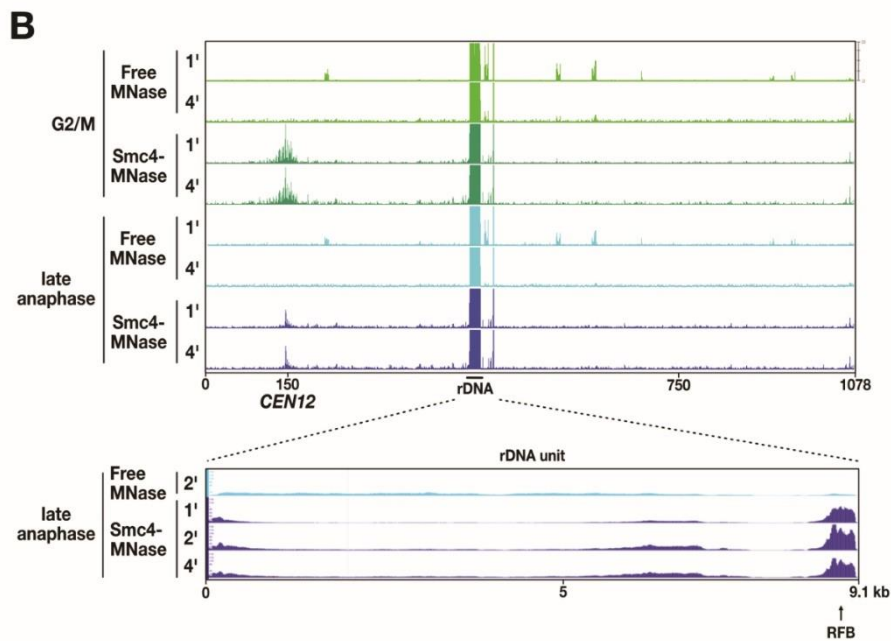
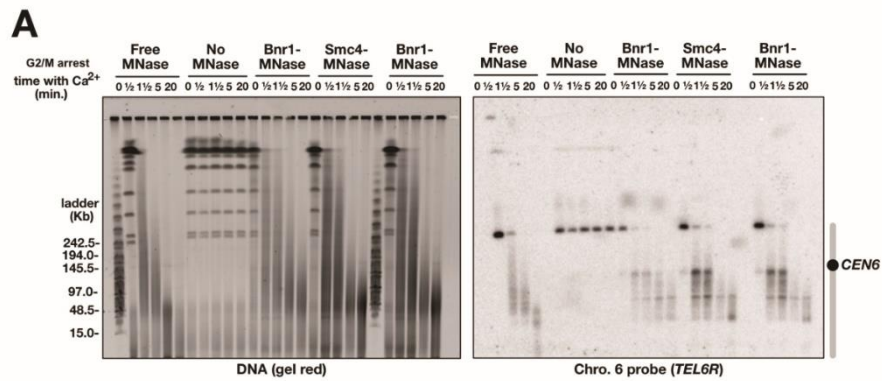


Figure S2. ChEC-PFGE and ChEC-seq on condensin. (A) ChEC-PFGE assay. Left panel: gel red DNA staining. Right panel: Southern blot probed with a *TEL06R* fragment. Free MNase controls for non-specific MNase cleavage. No MNase controls for DNA stability in response to cell permeabilization and Ca²⁺ addition. **(B)** Smc4-MNase ChEC-seq results on chromosomes 12. Free MNase controls for non-specific cleavage.

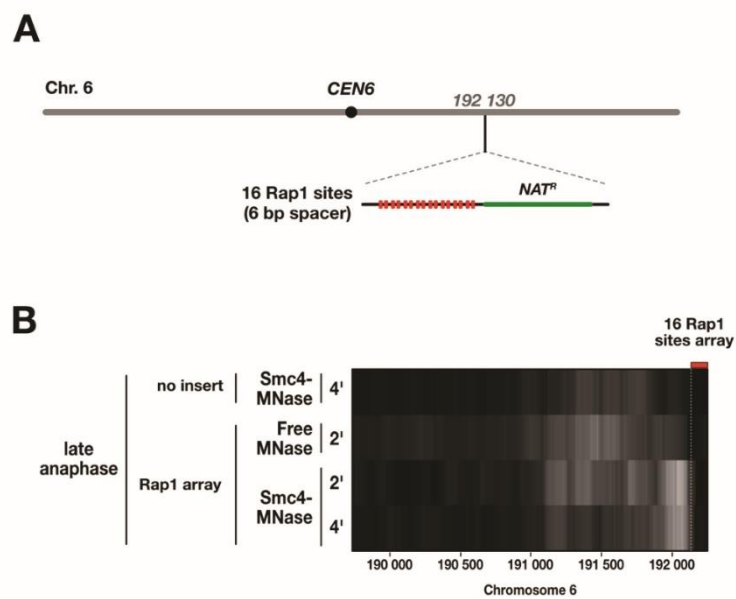


Figure S3. ChEC-seq on condensin at a Rap1-bound array. (A) Schema of the Rap1 sites inserted in chromosome 6. **(B)** Smc4-MNase ChEC-seq results on the left border of the Rap1-bound array.

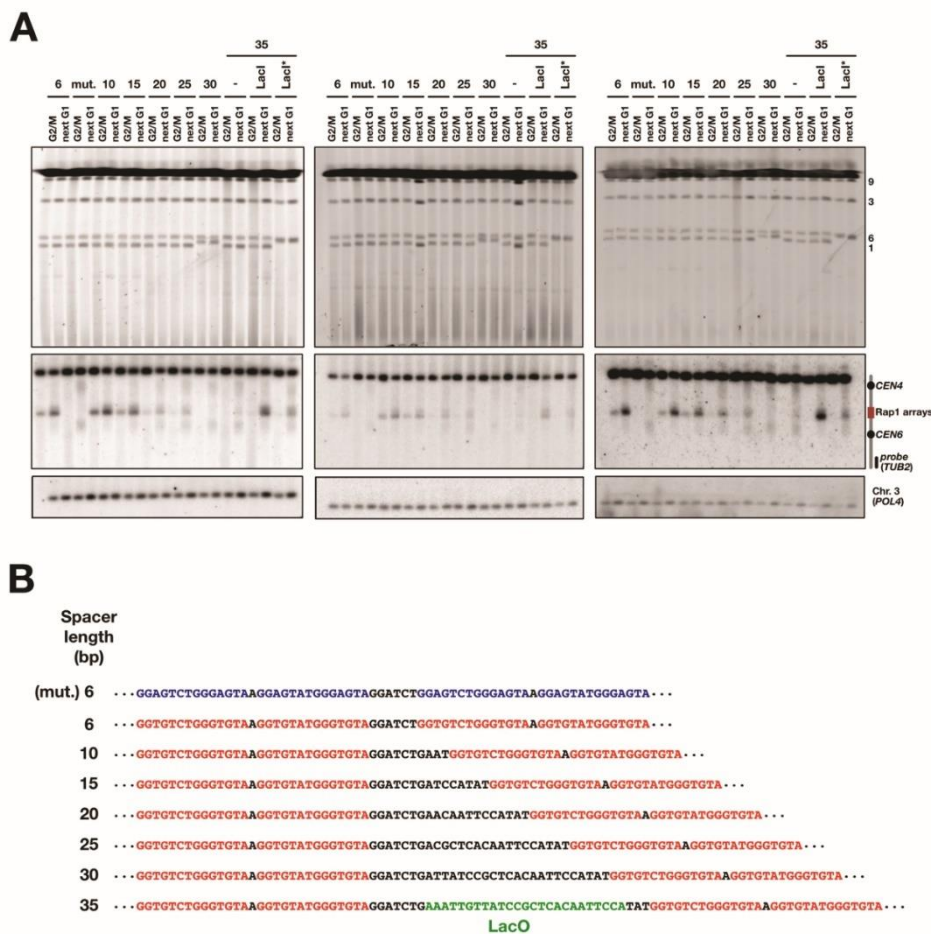


Figure S4. Rap1 density required for preferential dicentric breakage at Rap1-bound arrays. (A) Cells with a conditional dicentric were grown exponentially in galactose-containing medium, synchronized in G1 with alpha-factor, released in glucose-containing medium, and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed through mitosis to be blocked in the next G1 with alpha-factor (next G1). Chromosomes were separated by PFGE and probed with a fragment from chromosome 6 left arm (*TUB2*). Membranes were reprobed with a fragment from chromosome 3 (*POL4*) for normalisation. **(B)** Spacer sequences with Rap1 tandem arrays.

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Strain construction

For the microscopy assay, all strains used are isogenic to JKM139 (*MAT α ade1 leu2- 3,112 lys5 trp1::hisG ura3-52 hml::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GALHO*) and are listed in **Sup. Table S1**. In order to integrate the *TetO* array, an *HPH* targeting module was amplified by PCR with tailed primers and integrated at position 197344 on chromosome III, 3.2kb upstream of the *HOcs* of the MAT locus. A plasmid harboring an array of *TetO* repeats, pSR13 (Rohner et al. 2008) was linearized with *AscI* and used to replace the *KAN-MX4* targeting module close to *MAT α* locus. The *LacO* arrays were targeted at position 148157 by replacing a *KANMX* cassette by an array of 256 *LacO* linked to *TRP1* and optimized in order to increase its stability (Rohner et al. 2008). The visualization of the operator array was visualized by the binding of the repressor-GFP fusion protein to the operators. TetR-GFP and LacO-mCherry were integrated into the *LEU2* and *URA3* loci respectively.

Cell cycle synchronization in late anaphase

cdc15-2^{ts} cell cultures are grown until OD 0.7 at 25°C in YPD and then placed in 50-ml tubes in a thermomixer at 31°C under agitation (400rpm) for 5 minutes. Temperature is gradually increased by one degree every 5 minutes from 31°C to 36°C. Cells are maintained at 36°C for 90 minutes and then centrifuged, resuspended in pre-warmed medium (25°C) and incubated at 25°C for 30 minutes prior to crosslinking (ChIP) or permeabilization (ChEC).

ChIP

Cells synchronized in late anaphase are crosslinked for 10min with 1% formaldehyde under agitation. Cell lysis and sonication are, respectively, performed using Precellys (Bertin technologies) and Bioruptor Pico from Diagenode. Immunoprecipitation is performed with 1 μ l of the 4A6 anti-Myc monoclonal antibody (Millipore) and 50 μ l of Magnetic Dynabeads PanMouse IgG (INVITROGEN) per sample. After the washes, elution of the proteins and reversal of crosslinks steps, samples are treated with RNase A (20mg/ml) and pronase (20mg/ml) followed by DNA purification with GeneJet purification kit (Thermoscientific). Input and immunoprecipitated DNA concentrations

are determined by qPCR. Relative quantification using a standard curve method is performed, and the occupancy level for a specific fragment is defined as the ratio of immunoprecipitated over total DNA.

ChEC-seq assay

25 ml of exponential cells (0.7 OD) were washed 2 times with a ChEC solution (15 mM Tris pH 7.5, 80 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.2 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1x complete EDTA-free mini protease inhibitors, 1 mM PMSF) and then permeabilized in 800 ul of same solution + with 0.1 % digitonin at 30°C for 5 min in agitation (700 rpm, thermoblocker). Then, CaCl₂ was added (8mM) in order to activated the MNase (from the free-MNase or Smc4-MNase constructs) and 150 ul of samples were taken at different time-points. Reaction was stopped by adding EGTA (50 mM) and samples taken on ice until the past time point was taken. The samples are pelleted (2 min at 4000 rpm) and frozen at -80°C. DNA was extracted using the MasterPure™ Yeast DNA Purification kit (Epicentre), treated with RNase A at 200 µg/ml for 20 min at 37°C, then size-selected on Ampure XP beads (Agencourt). The supernatant, containing small fragments, was recovered followed by the library preparation.

Reference

Rohner S, Gasser SM, Meister P. 2008. Modules for cloning-free chromatin tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **25**: 235–239.

Dans cette partie, vous trouverez la première version de l'article présentant mes résultats de thèse traitant de l'impact de la protéine Rap1 sur les condensines chez *S. cerevisiae*. Cette version sera possiblement amenée à être complétée par les travaux de nos collaborateurs.

DISCUSSION

I. Enrichissement local des condensines à proximité de tandems de Rap1

Nous avons pu montrer un enrichissement de condensine aux bords de l'insertion de sites Rap1 en tandem serré (6 pb). Comme cet enrichissement relatif disparaît lorsque les sites Rap1 sont espacés de 35 pb, il pourrait être la conséquence d'un « *roadblock* » de condensine. Un « *roadblock* » implique la notion d'une barrière stoppant l'action en cours. Condensine a besoin de prendre un point d'accroche stable sur l'ADN (la « *safety belt* » à l'interface Brn1-Ycg1) (Kschonsak et al., 2017) puis de plusieurs points d'accroche dynamiques permettant la réitération du processus de loop extrusion. Les données précédentes de ChIP-seq ainsi que nos données de ChEC-seq reflètent au moins en partie le recrutement de condensine (D'Ambrosio et al., 2008; Leonard et al., 2015a). Par exemple, elles mettent en avant l'enrichissement de condensine au voisinage des centromères (dépendant de Shugoshin) ou aux répétitions d'ADNr (dépendant de Fob1 et de la monopoline). Nos données montrent qu'il serait aussi possible de visualiser par ChIP un enrichissement de condensine comme conséquence de son activité. Cet enrichissement faible et spécifique reflèterait la dynamique du processus. La sensibilité à l'espacement des sites et le caractère très local de l'enrichissement suggèrent aussi que le signal détecté par ChIP est la conséquence d'un blocage de l'avancé de condensine par Rap1. Utiliser Rap1 comme « *roadblock* » permettrait d'enrichir cet événement et de capturer condensine lorsqu'elle se fige au niveau de l'obstacle. Il serait intéressant de tester si l'intensité de ce « *roadblock* » augmente si on se met dans une région où il y a un recrutement plus important de condensine (par exemple, à proximité de l'*enhancer* de recombinaison sur le bras gauche du chromosome 3).

II. Décompaction de la chromatine induite par des tandems de Rap1

Nous avons montré que des sites Rap1 en tandem modifient la conformation 3D de la chromatine. L'insertion des sites mène à une décondensation en anaphase/télophase. Cette décondensation est assez importante car indistinguable de l'état décondensé de la phase G1.

Cette décompaction peut être la conséquence d'une dissociation de condensine ou d'un désassemblage de la boucle. Le désassemblage de la boucle pourrait se faire par l'arrêt des interactions transitoires de condensine. Dans ce cas de figure, le complexe resterait accroché à l'ADN *via* son point d'accroche stable (la « *safety belt* »).

On notera que dans l'approche de microscopie que nous avons utilisée, nous n'excluons pas un effet des protéines TetR et LacI fixées aux tandems *tetO* et *LacO* sur la structure du chromosome. Ces deux points fluorescents pourraient créer un contexte spécifique amplifiant l'effet du « *roadblock* » de Rap1. Un élément de réponse pourrait être apporté en réduisant l'affinité du LacI et du TetR pour leurs sites par ajout d'une concentration d'IPTG et de doxycycline (tout en veillant à conserver une affinité suffisante pour visualiser les deux points ; une alternative est l'emploi d'allèle *LacI** dont l'affinité réduite est suffisante pour la détection d'un tandem de *LacO* et diminue fortement l'intensité du point chaud de cassure dans un chromosome dicentrique (Guérin et al., 2019)).

Bien que l'effet de décompaction ne soit pas observé en phase G1, il est possible que l'insertion de sites Rap1 en tandem ait un effet additionnel indépendant de condensine sur la conformation de la chromatine. Observé par AFM, Rap1 fixé en tandem serré induit une rigidification de l'ADN (longueur de ~100 nm pour 16 sites Rap1) (Le Bihan et al., 2013). Cette rigidification pourrait contribuer en partie à la distance entre les deux spots.

Par la suite il sera important de vérifier la part de la compaction observée en anaphase-télophase qui dépend de condensine en inactivant condensine à l'aide d'un allèle dégron. De plus, il serait également intéressant de tester l'effet de Rap1 sur d'autres SMC telles que cohésine en phase G2/M où elle est présente sur l'ensemble des chromosomes et contribue à leur repliement (Dauban et al., 2020).

III. Augmenter l'espacement entre les sites Rap1 permettrait la levée du roadblock

Augmenter l'espacement entre les sites Rap1 amène à une perte de la cassure d'un chromosome dicentrique préférentiellement aux sites Rap1. Nous avons testé plusieurs espacements allant de 6 à 35 pb avec une résolution de 5 pb et avons clairement observé un seuil pour la cassure aux sites Rap1. Cette dernière diminue fortement entre 15 et 20 pb et s'efface complètement entre 25 et 30 pb.

Deux hypothèses non-exclusives pourraient expliquer ce résultat. La première est qu'il est possible que l'espacement des sites Rap1 permette de libérer un espace sur l'ADN permettant à condensine de prendre ses points d'accroche dynamiques nécessaires au processus d'extrusion de boucle et donc d'extruder les sites Rap1. Ces points d'accroche dynamiques pourraient se situer à la charnière Smc2-Smc4 (Koide et al., 2021; Soh et al., 2015) ou à l'interface Brn1-Ycs4 (Shaltiel et al., 2022). On soulignera que l'espace nécessaire n'est pas exactement déterminé car Rap1 occupe principalement le grand sillon de l'ADN laissant en partie le petit sillon accessible à d'autres interactions. Des analyses structurales pourraient permettre de quantifier la surface d'ADN minimale nécessaire.

La deuxième hypothèse est que la rigidification de l'ADN induite par la liaison de Rap1 sur des tandems (Le Bihan et al., 2013) empêche l'entrée de l'ADN dans la chambre S de condensine.

Au-delà d'une contribution au mécanisme d'action de condensine, il est intéressant de relever que l'espacement de 15-20 pb est proche de l'espacement moyen entre nucléosomes chez *S. cerevisiae* (Mavrich et al., 2008). De plus il est possible d'imaginer que condensine exerçant une tension sur la chromatine pourrait débobiner un peu l'ADN autour des nucléosomes afin de prendre les points d'accroche nécessaires à l'extrusion de boucle. Ce processus pourrait expliquer la courte pause observée *in vitro* avant l'extrusion d'un nucléosome (Pradhan et al., 2022). Cela peut être un élément clef à étudier afin de comprendre comment condensine compacte la fibre nucléosomale.

IV. Positionnement de la cassure des chromosomes dicentriques

Dans nos précédents travaux (Guérin et al., 2019), nous avons montré que pour la cassure préférentielle d'un chromosome dicentrique aux fusions télomère-télomère chez *S. cerevisiae*, Rap1 et condensine sont deux acteurs essentiels.

Dans cette nouvelle étude, nous proposons un mécanisme d'action de Rap1 sur condensine. Rap1 en tandem agirait comme un « *roadblock* » pour condensine la bloquant dans un premier temps aux bords du tandem liant les répétitions serrés de Rap1 puis menant à une dissociation de condensine de l'ADN ou un désassemblage de la boucle en cours d'extrusion. Ce mécanisme pourrait donc créer un contexte local chromatinien détendu de part et d'autre du tandem Rap1 et donc rendre plus probable la capture de la chromatine à cet endroit lors de la fermeture du septum (abscission).

V. « *Roadblock* » et obstacles stériques

Nous proposons un modèle pour un « *roadblock* » de l'activité de condensine. En présence d'un obstacle, condensine buterait sur ce dernier menant à un enrichissement transitoire. Puis après une pause, condensine pourrait passer l'obstacle ou non. Dans ce dernier cas, la condensine

serait soit dissociée soit la boucle en cours d'extrusion serait désassemblée. Le mécanisme d'extrusion de boucle étant plausiblement conservé chez les différents complexes SMC (Davidson et al., 2019; Ganji et al., 2018; Kyung et al., 2021; Pradhan et al., 2022; Taschner & Gruber, 2022), nous pouvons penser que ce modèle est un modèle général pouvant être pertinent pour tous les complexes SMC des eucaryotes, archées et procaryotes.

Une autre étude *in vivo* montre un enrichissement de condensine au bord d'un obstacle chez *S. pombe* (Rivosecchi et al., 2021). Ici c'est un retour de l'ARN polymérase lors de la transcription de gènes actifs qui induit un enrichissement de condensine.

In vitro, plusieurs autres obstacles potentiels ont été testés. L'extrusion d'un nucléosome a été testée par différentes manières en molécule unique et avec des pinces magnétiques optiques avec des résultats contradictoires. En molécule unique (*Single Molecule Assay*), condensine extrude plusieurs nucléosomes dans 80% des cas sans incidence sur la vitesse, la processivité et la position du nucléosome (Kong et al., 2020). Par pinces magnétiques optiques, l'extrusion d'un nucléosome par condensine échoue dans 80% des cas mais cette barrière est levée en présence d'un remodelleur de la chromatine (FACT) (Sudhakar et al., 2021). Une troisième étude ayant testé différents obstacles dont un nucléosome en molécule unique montre que dans la plupart des cas, après un temps de pause variable, condensine extrude ces obstacles (Pradhan et al., 2021). Cela inclut des obstacles de taille plus importante que la chambre S des condensines, ce qui soulève le fait que soit la technique comporte certains biais soit qu'il existe un mode alternatif de la capture de l'ADN par condensine. Ces études montrent globalement qu'aucun obstacle étudié jusqu'à présent est efficace pour bloquer efficacement l'extrusion de boucle par condensine. Cependant, Rap1 en tandem n'a pas les mêmes caractéristiques que les obstacles testés. Ce dernier combine plusieurs critères importants tel que : (i) son temps long de résidence sur l'ADN (>30 min.) et (ii) une très forte affinité (*in vitro* $K_D \sim 3$ nM)

indépendante du nombre de site Rap1 et leur espacement (absence de coopérativité entre les sites) (Matot et al., 2012b; Williams et al., 2010). Une collaboration en cours avec le laboratoire de Cees Dekker (Delphes, Pays-Bas) permettra de tester la capacité de Rap1 en tandem à bloquer l'action de condensine *in vitro* en molécule unique.

VI. « Roadblock » de condensine par Rap1 aux télomères natifs

Les extrémités des chromosomes posent un problème unique pour l'extrusion de boucle de condensine. Quel est le devenir de condensine lorsqu'elle atteint l'extrémité ?

Nos données montrent que Rap1 est un obstacle à l'extrusion de boucle. Qu'en est-il concernant Rap1 aux télomères natifs ? Nos données de ChIP montre un enrichissement assez important de condensine au télomère *TEL06R*, tandis que nos données de ChEC-seq ne semblent pas montrer d'enrichissement (des analyses statistiques doivent être menées afin de confirmer le résultat). Ces résultats nous amènent à penser qu'aux télomères, une décondensation locale est possible suite à un décrochage récurrent de condensine. Un télomère serait l'équivalent d'un nœud à la fin d'une corde afin d'empêcher les condensines d'extruder l'extrémité. Cette solution peut être favorable dans la mesure où elle maintient la dynamique du processus. Le décrochage de condensine en réponse à l'arrêt au télomère pourrait faciliter l'extrusion jusqu'au télomère d'une nouvelle boucle par une autre condensine chargée en amont et donc de conserver un certain niveau de condensation à l'extrémité. Ce modèle reste à explorer.

On peut penser qu'une décondensation trop prononcée de l'extrémité des chromosomes puisse être néfaste pour la cellule. Cela pourrait mener à un défaut de ségrégation des télomères en anaphase et donc un risque de clivage lors de l'abscission.

En supposant que condensine prenne un point d'ancrage distribué de façon régulière tout le long du chromosome, quelle serait la conséquence d'une absence de blocage aux télomères ?

Pour étudier ce point, une première possibilité serait d'espacer les sites Rap1 d'un télomère (en remplaçant la séquence native par un tandem espacé) et d'en étudier l'impact sur la ségrégation par des approches de génétique (perte du télomère) ou de microscopie (retard de ségrégation). Cependant créer un télomère avec des sites Rap1 espacés amène un certain nombre de complications. Il est difficile de prédire si cette structure sera suffisamment stable pour être étudiée. Une solution serait alors de l'induire et d'en observer l'effet sur un nombre restreint de divisions. Une deuxième possibilité serait de tester la présence de condensine, toujours aux télomères *TEL06R* par CHIP, en jouant sur la longueur du télomère en utilisant des mutants *tel1Δ* ou *yku70Δ* et des mutants *rif1Δ* ou *rif2Δ* qui, respectivement, diminuent ou augmentent la taille des télomères donc le nombre de molécules Rap1 en tandem. Dans ces conditions, on s'attend donc, respectivement, à une perte d'enrichissement ou un gain d'enrichissement si l'enrichissement observé par CHIP à *TEL06R* est bien la conséquence d'un « roadblock ».

Un dernier point reste à aborder dans ce paragraphe : des régulateurs de condensine peuvent-ils être impliqués dans la dissociation de condensine en réponse au blocage de l'extrusion de boucle afin de favoriser la dynamique de condensine ? Il sera intéressant d'explorer l'implication de la ségrégase Cdc48 précédemment impliqué dans le décrochage de condensine de la chromatine (Thattikota et al., 2018b).

VII. Généralisation du modèle de *roadblock* par Rap1

Il serait intéressant de savoir si Rap1 en tandem agit sur d'autres complexes SMC. Le fait que le mécanisme d'extrusion de boucle soit conservé parmi les complexes SMC laisse supposer que cela pourrait être le cas.

Dans le cadre d'un autre projet mené au laboratoire, j'ai pu participer à l'étude de l'inhibition par Rap1 et indépendante de Rif2 du complexe MRX, un complexe très proche des SMC.

Nos résultats (non publiés) montrent que Rap1 bloque l'interaction de MRX avec l'extrémité d'ADN et que ce blocage est aussi sensible aux mêmes paramètres : nombre de sites, affinité, espacement entre les sites. Le mécanisme d'inhibition de MRX par Rap1 pourrait donc assez similaire à l'inhibition de condensine : couverture et rigidification de l'ADN sur une certaine distance le rendant inaccessible au complexe. Ces derniers résultats laissent penser que Rap1 pourrait effectivement agir sur d'autres SMC.

Pour conclure, nos travaux nous ont amené à proposer le modèle suivant: lorsque la condensine, en cours de l'extrusion de boucle, rencontre des télomères ou Rap1 fixé en tandem, elle se bloque. Ce blocage est suivi d'une décompaction locale de l'ADN qui peut s'expliquer par la dissociation de condensine ou le désassemblage de la boucle en cours d'extrusion. Le modèle d'extrusion de boucle étant conservé (Davidson et al., 2019; Ganji et al., 2018; Kyung et al., 2021; Pradhan et al., 2022; Taschner & Gruber, 2022) ainsi que le recouvrement de l'ADN télomérique par des protéines, cela nous laisse penser que ce modèle pourrait s'appliquer de façon général à d'autres SMC chez différentes espèces. Ce modèle pourra aussi permettre d'étudier comment les complexes SMC gèrent les obstacles présents sur l'ADN et servir d'outil afin d'étudier le mécanisme de fonctionnement des protéines SMC.

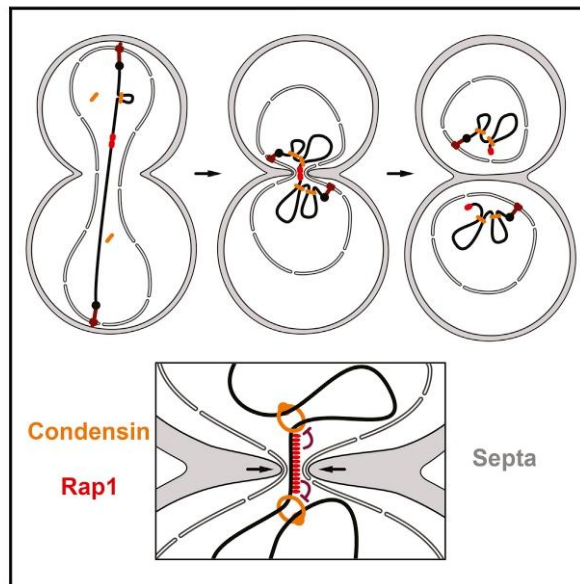
ANNEXE

Dans cette annexe, vous trouverez l'article auquel j'ai participé et qui porte sur le repliement des chromosomes dicentriques, médié par la condensine, ainsi que sur l'impact de Rap1 sur leur cassure par la cytodièrese.

Molecular Cell

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

Graphical Abstract



Authors

Thomas M. Guérin, Claire Béneut, Natalja Barinova, ..., Romain Koszul, Karine Dubrana, Stéphane Marcand

Correspondence

stephane.marcand@cea.fr

In Brief

Preferential breakage of dicentric chromosomes at telomere fusions backs up in yeast the essential protective function of telomeres. Guérin et al. show that this rescue pathway depends on tight Rap1 DNA binding at the fusion and condensin-dependent dicentric refolding prior to DNA breakage at the abscission site.

Highlights

- Rap1 and condensin promote dicentric breakage at telomere fusions
- Condensin refolds stretched dicentric bridges prior to their breakage by septation
- Breakage hotspots result from a higher chance of being entrapped at the abscission site
- Rap1 bound in tandem with close spacing may stall condensin by steric hindrance



Guérin et al., 2019, *Molecular Cell* 75, 131–144
 July 11, 2019 © 2019 Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.021>

CellPress

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

Thomas M. Guérin,¹ Claire Béneut,¹ Natalja Barinova,¹ Virginia López,¹ Luciana Lazar-Stefanita,² Alice Deshayes,¹ Agnès Thierry,² Romain Koszul,² Karine Dubrana,¹ and Stéphane Marcand^{1,3,*}

¹CEA Paris-Saclay, Unité Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, INSERM U1274, Université de Paris, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-roses, France

²Institut Pasteur, Unité Régulation Spatiale des Génomes, CNRS UMR 3525, Sorbonne Université, Paris, France

³Lead Contact

*Correspondence: stephane.marcand@cea.fr

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.021>

SUMMARY

In *Saccharomyces cerevisiae*, dicentric chromosomes stemming from telomere fusions preferentially break at the fusion. This process restores a normal karyotype and protects chromosomes from the detrimental consequences of accidental fusions. Here, we address the molecular basis of this rescue pathway. We observe that tandem arrays tightly bound by the telomere factor Rap1 or a heterologous high-affinity DNA binding factor are sufficient to establish breakage hotspots, mimicking telomere fusions within dicentrics. We also show that condensins generate forces sufficient to rapidly re-fold dicentrics prior to breakage by cytokinesis and are essential to the preferential breakage at telomere fusions. Thus, the rescue of fused telomeres results from a condensin- and Rap1-driven chromosome folding that favors fusion entrapment where abscission takes place. Because a close spacing between the DNA-bound Rap1 molecules is essential to this process, Rap1 may act by stalling condensins.

INTRODUCTION

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

et al., 2015; Maciejowski et al., 2015; Mohebi et al., 2015; Pampalona et al., 2016).

The newly broken ends can cause cell death or be subjected to DNA repair processes. Because they can enter into breakage-fusion-bridge cycles and lead to chromothripsis, dicentrics are a threat to cell viability and a source of extensive genome instability and mutagenesis (Beyer and Weinert, 2016; Maciejowski et al., 2015; McClintock, 1941). In normal contexts, dicentrics are rare. First, DNA repair is usually accurate enough to avoid chromosome translocations (Bétermier et al., 2014). Second, non-homologous end joining (NHEJ) is inhibited at telomeres, preventing telomere fusions that would generate dicentrics (Benarroch-Popivker et al., 2016; Lescasse et al., 2013; Reis et al., 2012; van Steensel et al., 1998). Finally, mechanisms ensure that epigenetic centromeres do not form at the wrong locations (Müller and Almouzni, 2017). However, there are contexts where dicentrics occur more frequently. The first described is exposure to ionizing radiations (Muller and Altenburg, 1930). Generating multiple and simultaneous double-strand breaks, they favor erroneous NHEJ repair between breaks, giving rise to dicentric and acentric chromosomes at a remarkably high frequency (Kaddour et al., 2017; M'kacher et al., 2014; Suto, 2016). Human oncogenesis is another context where dicentric occurrence is prevalent. In cells having bypassed senescence, extensive telomere shortening results in frequent end-to-end fusions and dicentric chromosomes. This leads to transient but substantial genome instability from which can emerge malignant cells with mutations and gene copy number alterations allowing an escape from the controls preventing cancer (Maciejowski and de Lange, 2017).

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



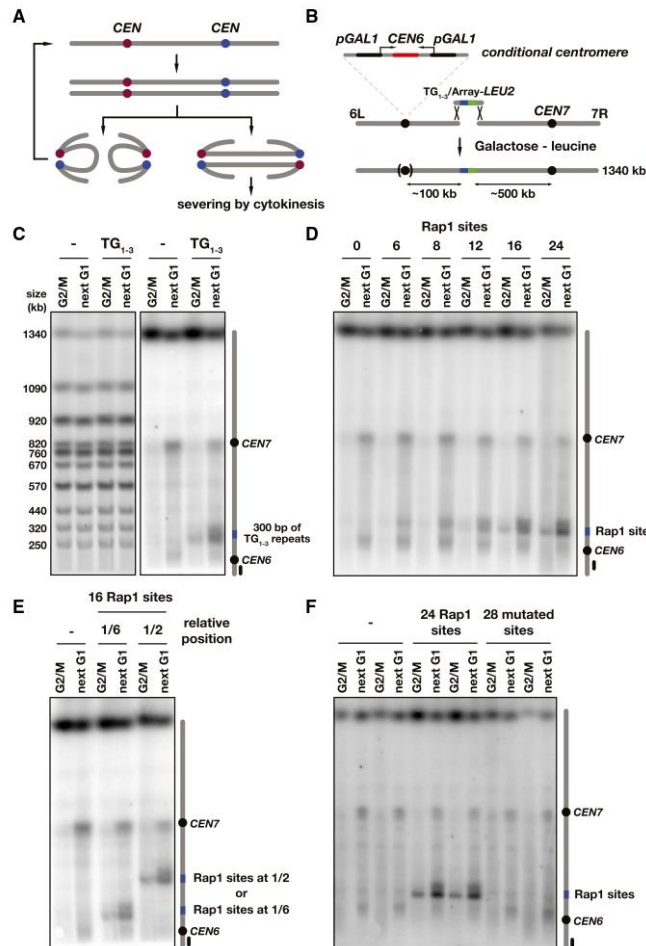


Figure 1. Preferential Dicentric Breakage at Rap1-Bound Tandem Arrays

(A) Segregation of a dicentric formed in G1. In anaphase, the two centromeres of each sister chromatid can migrate to the same pole, thus propagating the dicentric intact to the next generation in the two offspring. Alternatively, the centromeres of each sister chromatid can migrate to opposite poles, forming two anaphase bridges, which are severed at cytokinesis.

(B) Fusion of chromosome 6 right arm to the left arm of chromosome 7 by homologous recombination.

(C) Preferential breakage at internal telomere repeats. Cells having a 6+7 dicentric, with or without 300 bp of telomeric repeats inserted at the junction between chromosomes 6 and 7, were grown exponentially in galactose-containing medium, synchronized in G1 with α -factor, released in glucose-containing medium, and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed through mitosis to be blocked in the next G1 with α -factor (next G1). Chromosomes were separated by PFGE (left panel, GelRed labeled) and probed with a fragment from chromosome 6 left arm (right panel).

(D) Preferential breakage at internal arrays of Rap1 binding sites. The experiment was performed as above with cells possessing a 6+7 dicentric with 0-24 Rap1 binding sites in tandem inserted at the junction between chromosomes 6 and 7. The upward smear at Rap1 arrays is likely due to partial 5' resection of the broken ends in G1-arrest cells (López et al., 2015).

(E) Preferential breakage at Rap1 binding sites inserted in between centromeres. Cells possess a 6+7 dicentric with no inserted Rap1 site (-), 16 Rap1 binding sites inserted at the junction between chromosomes 6 and 7 (1/6), or 16 Rap1 binding sites inserted within chromosome 7 left arm (1/2).

(F) Lack of breakage at mutated Rap1 sites. Cells possess a 6+7 dicentric with no inserted Rap1 site (-), 24 Rap1 binding sites (24), or 28 mutated sites unable to bind Rap1 (28 mut). Both tandem arrays are inserted at the junction between chromosomes 6 and 7. Rap1 site: 5'-GG(T)GT(C/A)TGGG(T)GTA-3'. Mutated site: 5'-GGAGT(C/A)TGGGAGTA-3'. GelRed-labeled PFGE is shown in Figure S2.

In *S. cerevisiae*, dicentrics lacking telomere fusion break with greater likelihood near centromeres (López et al., 2015; Song et al., 2013). Whether it occurs at telomere fusions, at pericentromeres, or somewhere in between centromeres, the severing of dicentrics does not occur in response to chromatin stretching. Instead, dicentric breakage requires cytokinesis (López et al., 2015). Preferential breakage at pericentromeres or telomere fusions may result from their preferential entrapment by the closing septum. In agreement with this model, dicentric centromeres rapidly converge toward each other by an unknown mechanism after spindle disassembly and the onset of cytokinesis (López et al., 2015). This movement brings the centromeres and the intercentromeric chromatin in close proximity

to the plane of cytokinesis. It could involve condensin, the loop-extruding motor required for chromosome arm segregation and telomere disjunction in anaphase (Ganji et al., 2018; Lazar-Stefanita et al., 2017; Renshaw et al., 2010; Reyes et al., 2015; Sun et al., 2018).

Here, we addressed what causes the preferential breakage of dicentrics at telomere fusions and the rapid movement of dicentric centromeres following the onset of cytokinesis. We found that simple arrays of closely spaced binding sites for the telomere-binding factor Rap1 or the heterologous high-affinity DNA-binding factor IacI are sufficient to mimic the breakage hotspot established by telomere fusions within dicentrics. Condensins drive the dicentric-induced post-anaphase recoiling and are

essential for dicentric breakage at centromere-proximal regions. Preferential breakage at Rap1-bound arrays also requires condensin. Together these results show that preferential breakage at telomere fusions is the consequence of a condensin-driven chromosome folding that is imposed by the tight binding of Rap1 to DNA and favors entrapment by the septum at the completion of cytokinesis.

RESULTS

Dicentrics Preferentially Break at Internal Telomeres

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

To study dicentric breakage, we created conditional dicentric chromosomes with a conditional centromere (Hill and Bloom, 1989; López et al., 2015). In short, the native centromere of chromosome 6 (*CEN6*) is flanked by two galactose-inducible promoters. On galactose, *CEN6* is mostly inactive and detached from the kinetochore microtubule. When transcription is turned off by glucose, the centromere is rapidly reattached to a microtubule and its function is restored (Tanaka et al., 2005). Fusing by homologous recombination the end of chromosome 6 right arm (6R) to the end of chromosome 7 left arm (7L) generates 6+7 dicentrics whose centromeres are 600 kb apart (Figure 1B; Figure S1A). These conditional dicentrics are stably propagated as long as *CEN6* is inactivated by galactose. First, we tested two configurations of 6+7 dicentrics: one lacking internal telomere repeats and one with 300 bp of direct (non-palindromic) TG₁₋₃ telomere repeats inserted at the junction between the two fused chromosomes. Both dicentrics have lost the native 7L subtelomere and kept the native 6R subtelomere.

To look at dicentric breakage during a single cell cycle, cells grown in the presence of galactose were synchronized in G1 and released from the arrest in a glucose-containing medium. Cells were either blocked at the G2/M transition or allowed to progress through mitosis until they were blocked again in the next G1. Intact and broken chromosomes were separated by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and hybridized with a probe from one side of the dicentric. In the absence of internal telomere repeats, pericentromeres are the preferred breakage positions (Figure 1C), as previously observed (López et al., 2015). The insertion of direct telomere repeats is sufficient to create a hotspot of breakage (Figure 1C). This shows that the head-to-head palindrome formed by the fusion is not essential in favoring dicentric breakage. Note that in cells arrested prior to mitosis (G2/M), a fraction of the dicentric molecules are already broken at the position where internal telomeres are inserted. This background of breakage stems mostly from residual *CEN6* activity in a galactose-containing medium (Figure S1B) (Pobiega and Marcand, 2010).

Dicentrics Preferentially Break at Rap1-Bound Tandem Arrays

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

To test whether the position of the Rap1 sites within a dicentric influences their ability to establish a breakage hotspot, we compared the impact of a 16 Rap1 binding sites array inserted closer to one centromere (1/6) or halfway between the centromeres within chromosome 7 left arm (1/2). As shown in Figure 1E, breakage frequencies at these inserted positions are indistinguishable. This shows that the ability of Rap1 sites to establish a breakage hotspot is largely independent of the surrounding chromatin environment.

Next, we asked whether Rap1 binding to its sites is essential to establish a breakage hotspot. Because Rap1 is also a transcription factor essential for viability (Candelli et al., 2018; Knight et al., 2014; Kubik et al., 2018; Lickwar et al., 2012), we used two complementary approaches to address this issue. First, we tested a tandem array of 28 mutated sites with base changes disrupting the Rap1 consensus binding site, while conserving its G-richness. This array is unable to establish a hotspot of breakage (Figure 1F). Second, we assessed where a dicentric with internal telomere repeats breaks when the Rap1 level is reduced approximately 10-fold with the help of an inducible degron (Figure S1C). A lower Rap1 level decreases breakage specifically at internal telomere repeats, not near centromeres (Figure S1D). Together these results indicate that tandem arrays bound by Rap1 are sufficient to establish a breakage hotspot within a dicentric chromosome.

Dicentrics Preferentially Break at *lacO* Arrays Bound by *lacI*

We then asked how Rap1 can impact dicentric breakage. At telomeres, Rap1 recruits the Rif1, Rif2, Sir3, and Sir4 proteins, which are important for telomere protection and telomere length homeostasis (Wellinger and Zakian, 2012). In cells lacking one or several of these proteins or the associated protein Sir2, internal telomere repeats still generate a dicentric breakage hotspot (Figure S3A), showing that they are not essential to this process. Because Sir2, Sir3, and Sir4 are essential yeast heterochromatin components, it also rules out heterochromatin as the structure favoring dicentric breakage at internal telomere repeats.

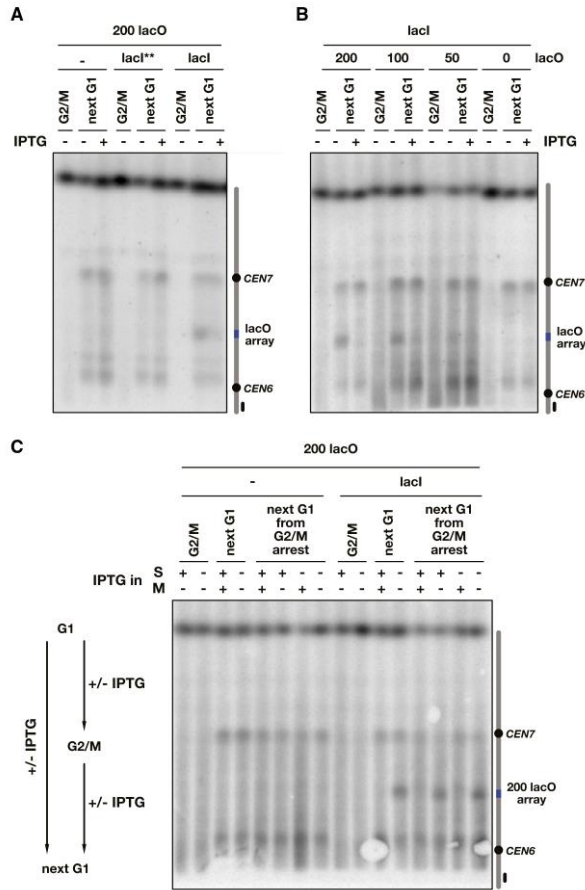


Figure 2. Preferential Dicentric Breakage at lacO Arrays Bound by lacI

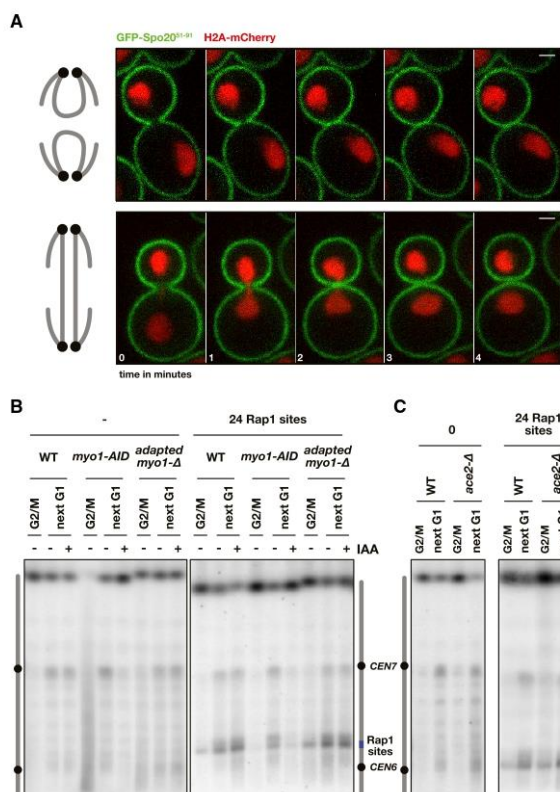
(A) Breakage at a lacO array bound by lacI. Cells proceeded through mitosis with or without 2 mM IPTG. Cells possess a 6+7 dicentric with 200 lacO sites inserted within chromosome 7 left arm. Low-affinity lacI** and high-affinity lacI are expressed from an integrated plasmid.

(B) Breakage at a lacO array depends on the array size. Cells expressing lacI possess a 6+7 dicentric with 0–200 lacO sites. (C) Breakage at a lacO array requires lacI binding during progression through mitosis. Cells possessing a 6+7 dicentric with 200 lacO sites and either an empty vector (–) or an integrated plasmid expressing lacI (lacI) were released in glucose from G1 with or without IPTG and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed to the next G1 (next G1). Cells blocked in G2/M were released with or without IPTG and blocked in the next G1 (next G1 from G2/M arrest). GelRed-labeled PFGE is shown in Figure S2.

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

How tight protein-DNA interactions may directly favor dicentric breakage is unclear. They might be important at the time of breakage at the end of cytokinesis. By challenging replication fork progression (Dubary et al., 2011; Goto et al., 2015; Koc et al., 2016), they may also leave a mark in S phase that later influences where dicentrics are severed by cytokinesis. Inhibiting the lacI-lacO interaction with IPTG offers an opportunity to test the latter hypothesis. As shown in Figure 2C, when IPTG is added after S phase to cells released from a G2/M arrest, preferential breakage at the lacO array is lost. By contrast, when cells are exposed to IPTG during S phase only until G2/M (a situation where array replication will not be challenged by tight binding), breakage at the lacO array during mitosis is as frequent as in cells unexposed to IPTG. This lacO array is adjacent to an early replication origin (ARS707) (Müller et al., 2014), and previous works showed that tightly bound lacO arrays can replicate early in S phase (Ebrahimi and Donaldson, 2008; Ebrahimi et al., 2010). These results indicate that lacI interaction during progression through mitosis is sufficient for the establishment of a dicentric breakage hotspot at a lacO array, irrespective of its interaction during S phase. Thus, replication challenges at the bound array are unlikely causes for preferential breakage within dicentrics. The question remains as to what structure created by protein-bound tandem arrays favors breakage. To address this issue, we next asked which step of cytokinesis is essential to sever dicentrics.

A hallmark of Rap1 is to bind its sites with a high affinity ($K_D \sim 20$ pM) (Matot et al., 2012; Williams et al., 2010). For instance, this property allows Rap1 to roadblock RNA polymerase II (Pol II) transcription (Candelli et al., 2018; Challal et al., 2018). If tight Rap1-DNA interaction is sufficient to establish a dicentric breakage hotspot, its effect should be mimicked by other tight DNA binders. We tested this hypothesis with a heterologous DNA-binding protein, lacI, known for its high affinity to its site lacO ($K_D \sim 10$ pM; Falcon and Matthews, 1999). Arrays of lacO were inserted within a dicentric. As shown in Figure 2A, an unbound array of 200 lacO or the same array bound by a mutant lacI with a reduced DNA binding affinity (lacI**; Dubarry et al., 2011; see STAR Methods) does not impact dicentric breakage. By contrast, the same array of 200 lacO bound by a lacI protein with high DNA binding affinity (lacI) establishes a breakage hotspot. Its intensity is severely diminished by addition



Diceric Breakage Requires Only Septation, Not the Actomyosin Ring Contraction or the following Cell Separation

During yeast cytokinesis, the contraction of an actomyosin ring guides septation. Once contracted to a 100- to 200-nm diameter, the ring disassembles to allow the further growth of the septum to fill the remaining hole (Bi and Park, 2012; Onishi et al., 2013; Weiss, 2012). Our previous observations by transmission electron microscopy showed that, in cells with a dicentric, the closing septum can pinch the nuclear envelope (López et al., 2015). This can also be seen at lower resolution by time-lapse microscopy in live cells where histones and the plasma membrane are labeled with fluorophores (Figure 3A; Figure S3B). In cells where dicentric anaphase bridges are formed, the two nuclei are connected and are abnormally close to each other at the time of ingression and separate shortly after. Although diffraction prevents a precise definition of the timing of abscission completion, the two events seem coincident with our time resolution. This (and similar observations by Amaral et al., 2016) further suggests that breakage is induced after ring disassembly by septum closure.

Figure 3. Diceric Breakage by Septation

(A) Diceric-induced chromatin pitching by septation. Cells possessing a dicentric 6+7 without inserted tandem array were grown exponentially at 30°C in galactose-containing medium and switch to glucose 30 min before imaging at 30°C. One image is taken every minute. Plasma membrane is labeled with TTYeGFP-Spo20⁶¹⁻⁹¹ and nucleosomes with a Hta1-mCherry tag. Scale bar, 1 μm (pixel size: 52 nm). The scheme on the left represents the chromatids (gray) conformation that does not create (upper image) or creates (lower image) an anaphase bridge.

(B) Dicerics still break in cells carrying out septation without a contractile actomyosin ring. Wild-type (WT), *myo1-AID*, and adapted *myo1-Δ* cells possessing a 6+7 dicentric with no inserted Rap1 site (-) or an array of 24 Rap1 binding sites inserted at the junction between chromosomes 6 and 7 (24 Rap1 sites) proceeded through mitosis with or without 2 mM IAA.

(C) Dicerics still break in cell-separation-defective cells. WT and *ace2-Δ* cells possessing a 6+7 dicentric with no inserted Rap1 site (-) or an array of 24 Rap1 binding sites inserted at the junction between chromosomes 6 and 7 (24 Rap1 sites) proceeded through mitosis with or without 2 mM IAA. GelRed-labeled PFGE is shown in Figure S2.

Therefore, diceric breakage should require only septation, but not the preceding ring contraction or the following cell separation. To test this prediction, we first looked at breakage in a context where cytokinesis is independent of the actomyosin ring.

In the absence of the myosin Myo1, the actomyosin ring is not assembled and septation is significantly impaired. Myo1 depletion with an auxin-inducible degron (*myo1-AID* + indole-3-acetic acid [IAA]) results in a sharp decrease in diceric breakage at pericentromeres (Figure 3B, left panel, as reported previously) (López et al., 2015) and at a Rap1-bound tandem array (Figure 3B, right panel). Cells completely lacking Myo1 (*myo1-Δ*) grow very poorly because of frequent failure at cytokinesis.

Upon continuous selection, they acquire mutations and gene copy number changes that promote cell wall biogenesis and restore an efficient and timely cytokinesis through the growth of a compensatory septum in the absence of a contractile actomyosin ring (Bi et al., 1998; Rancati et al., 2008) (Figure S3B). Conditional dicerics were created in these adapted *myo1-Δ* cells carrying out cytokinesis only through septation. As shown in Figure 3B (left and right panels), diceric breakage occurs in *myo1-Δ* cells as in wild-type cells. Therefore, septation is sufficient to sever dicerics, and actomyosin ring contraction can be bypassed.

Next, we asked whether cell separation contributes to diceric breakage. Following abscission, degradation and rearrangement of polysaccharide chains within the septum allow cell separation. The transcription factor Ace2 activates the expression of genes encoding septum remodeling enzymes carrying out this process. Its absence prevents or severely delays cell separation (Brace et al., 2019; Voth et al., 2005; Weiss, 2012). In cells lacking Ace2, dicerics break as in normal cells (Figure 3C, left and right panels). We conclude that breakage does

not need the post-abscission septum remodeling leading to cell separation. Together these results further support the hypothesis that septum closure severs dicentric. Two scenarios can be postulated. The lateral forces applied by septum closure could be sufficient to cause DNA cleavage. Alternatively, a nuclease could cleave DNA in response to septum closure. The implication of a nuclease is reminiscent of recent observations in animal cells. In human cells, the cytosolic exonuclease TREX1 can enter a ruptured nucleus and process dicentric bridges (Maciejowski et al., 2015). In *Caenorhabditis elegans*, the endonuclease LEM-3^{Ankle1} is brought to DNA bridges by actomyosin contraction and contributes to their resolution (Hong et al., 2018a). These nucleases have no known ortholog in yeast. Instead, we tested the implication of Yen1 and Mus81, two endonucleases active in late mitosis and implicated with LEM-3 in the resolution of recombination intermediates in *C. elegans* (Hong et al., 2018b). Their absence in yeast does not prevent dicentric breakage (Figure S3C), indicating that unidentified nucleases or physical forces break DNA at abscission.

Centromeres Relocation to the Bud Neck and Breakage Near Centromeres Require Condensin

Dicentric anaphase bridges cause a relocation of the centromeres and the centromere-linked spindle pole bodies (SPBs; yeast's centrosome equivalent) toward the bud neck during septation (Amaral et al., 2016; López et al., 2015; Thrower and Bloom, 2001) (Figure 4A, bottom panel; Figure S4A). This movement occurs relatively late during cytokinesis, often after actomyosin ring disassembly (López et al., 2015). In cells without dicentric, SPBs also relocate at this time, but only slightly to the cell middle, not to the bud neck (Figure 4A, top panel; Figure S4B). The initial trigger is likely to be the same event in both cases, mitotic spindle disassembly or SPB release from an attachment to the cell cortex. In the absence of chromatin bridges, the nuclei and the SPBs regain their position in the middle of the cell. In the presence of dicentric bridges, recoiling of the stretched chromatin into a non-stretched state would cause rapid SPB relocation to the bud neck. In addition, active chromatin compaction by condensin could contribute to this process (Ganji et al., 2018; Lavoie et al., 2004; Lazar-Stefanita et al., 2017; Renshaw et al., 2010). To test the role of condensin in dicentric centromere relocation, we created a conditional 6+7 dicentric in cells carrying an auxin-inducible degron of Smc2, a SMC subunit of yeast condensin (Figures S4C and S4D).

First, we monitored SPBs movement during the mitosis that follows *CEN6* reactivation and auxin (IAA) addition (Figure 4B; Figure S5). As previously observed, in a wild-type context, SPBs snap back toward each other at the end of furrow ingression in nearly half the cells with a dicentric, the fraction where anaphase bridges are formed. Interestingly, SPB snap-back is often asymmetrical with one pole moving to the bud neck before the other (Figure S4E), suggesting that the movement trigger is an event that can impact one of the SPBs earlier than the other (for instance, an earlier release from cell cortex attachment or a precocious recoiling in one nuclear lobe). In Smc2-defective cells, the frequency of dicentric-induced

SPBs snap-back is markedly decreased ($p < 0.001$, χ^2 with a threshold for the shortest SPB-SPB distance at 2 μm) (Figure 4B). In cells without dicentric, Smc2 loss does not change the SPB dynamics.

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

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

Breakage Near Centromeres in Shorter Dicentrics Still Requires Condensin

To further explore the importance of chromosome condensation on dicentric breakage positions, we addressed the severing of dicentrics with shorter distances between centromeres for which the dependence on condensin could be less pronounced. In this setting, a short fragment carrying a centromere is inserted in chromosome 6 at either 100 or 45 kb from the conditional *CEN6* centromere. In wild-type cells, the ectopic centromere establishes a hotspot of breakage indistinguishable from the hotspot adjacent to native centromeres (López et al., 2015) (Figure 5A). In *smc2-AID* cells depleted of Smc2 by IAA addition, breakage positions move away from the centromeres toward the median part of the dicentrics. Interestingly, breakage at centromeres is less frequent in untreated *smc2-AID* cells (-IAA) compared with wild-type cells, indicating that condensin function is already partially impaired in non-induced conditions (a similar but less pronounced shift is noticeable with longer dicentrics; Figure 4E). In conclusion, condensins are essential to break in pericentromeric regions even when the centromeres are relatively close to each other.

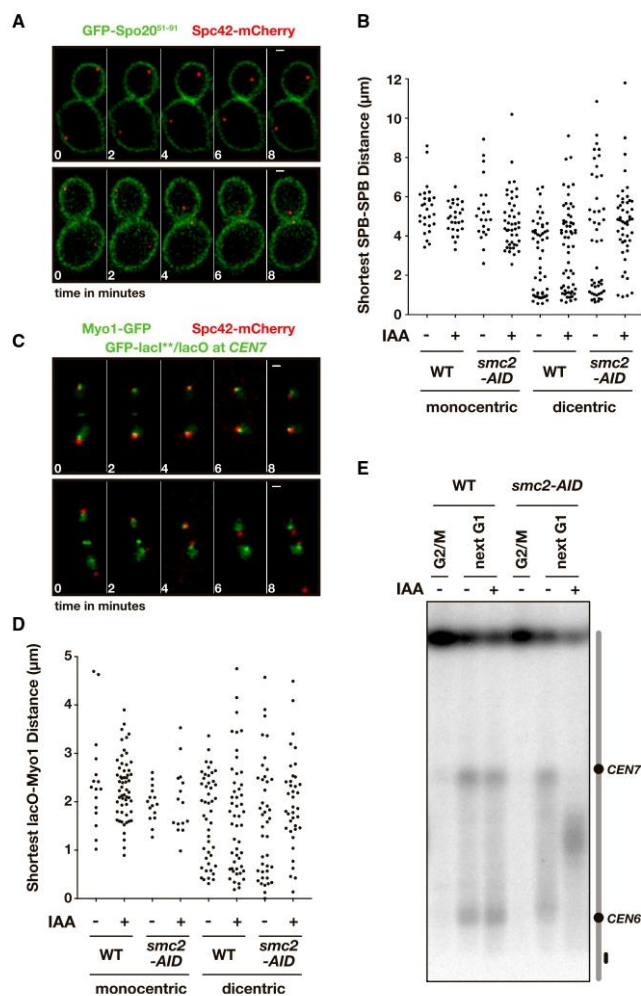


Figure 4. Centromere Relocation to the Bud Neck and Breakage Near Centromeres Require Condensin

(A) Example of dicentric-induced SPBs relocation to the bud neck shortly after cytokinesis onset. Wild-type cells possessing a 6+7 dicentric without inserted tandem array were grown in galactose-containing medium and switched to glucose 30 min before imaging at 30°C. One image is taken every 2 min. Plasma membrane is labeled with TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ and the SPBs with a Spc42-mCherry tag. Scale bars, 1 μm (pixel size: 65 nm). Upper panel: example of normal (monocentric-like) SPBs dynamics during septation. Lower panel: example of dicentric-induced SPBs snap-back during septation.

(B) Condensin depletion reduces the frequency of the dicentric-induced SPBs snap-back. TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ Spc42-mCherry wild-type and *smc2-AID* cells possessing a dicentric 6+7 were grown in galactose-containing medium and switched to glucose with or without 2 mM IAA 30 min before imaging at 30°C. Monocentric cells were directly imaged in glucose-containing medium with or without 2 mM IAA. For each condition, the shortest distance between the two SPBs reached during the 4 min following ingress onset is plotted. Data from individual cells are shown in Figure S6.

(C) Example of dicentric-induced centromere relocation to the bud neck shortly after cytokinesis onset. Wild-type cells possessing a 6+7 dicentric were imaged as in (A). The contractile actomyosin ring is labeled with a Myo1-GFP tag, the SPBs with a Spc42-mCherry tag, and the *CEN7* centromere with a lacO array inserted ~15 kb from *CEN7* and bound by a low-affinity GFP-lacI^{**}. Upper panel: example of normal (monocentric-like) centromere dynamics. Lower panel: example of dicentric-induced centromere relocation.

(D) Condensin depletion allows dicentric centromeres to remain more often away from the bud neck after ingress onset. Wild-type and *smc2-AID* cells either monocentric or possessing a 6+7 dicentric were imaged as in (B). For each condition, the shortest distance between the lacO spots and the position of Myo1 reached during the 4 min following actomyosin ring disassembly is plotted.

(E) Breakage near centromeres requires condensin. Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+7 dicentric with no inserted tandem array proceeded through mitosis with or without 2 mM IAA. GelRed-labeled PFGE is shown in Figure S2.

Preferential Breakage at Rap1 Sites Requires Condensin

We then asked whether preferential breakage at a Rap1-bound tandem array requires condensin. When Rap1 sites are inserted closer to one of the centromeres (relative position 1/6, intercentromeric distance 600 kb), Smc2 loss strongly diminishes breakage frequency at the Rap1 sites (Figure 5B). This indicates that condensins are essential to the establishment by Rap1 of a breakage hotspot, at least when the Rap1 sites are off-center. However, Rap1-bound arrays could remain a breakage hotspot in condensin-defective cells when located within the middle part

of the intercentromeric region where breakage now mostly occurs. Therefore, we next tested whether a Rap1-bound tandem array located within this middle region is still preferentially severed in the absence of condensin.

In cells where tandem Rap1 sites are inserted halfway between the centromeres of 6+7 dicentric (relative position 1/2), breakage positions relocate to the middle part of the intercentromeric region in response to condensin loss (Figure 5C). The overlap with the Rap1 sites conceals the change in breakage frequency that may occur at the Rap1 sites. To circumvent this limitation, we established a stronger hotspot in a shorter

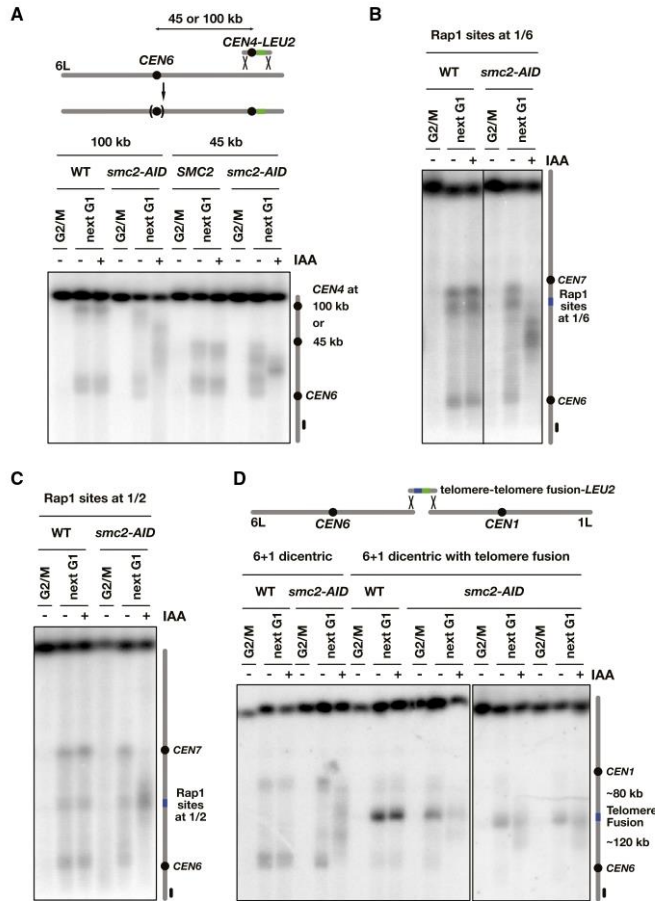


Figure 5. Preferential Breakage at the Pericentromeres of Shorter Dicentric and at Tandem Rap1 Sites Require Condensin

(A) Condensin loss displaces breakage positions away from centromeres in shorter dicentric. Dicentric were generated through *CEN4* insertion in chromosome 6 right arm by homologous recombination (López et al., 2015). Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a dicentric with a *CEN6-CEN4* distance of 100 or 45 kb proceeded through mitosis with or without 2 mM IAA. Chromosomes separated by PFGE were probed with a fragment from chromosome 6 left arm.

(B) Breakage at off-center Rap1 sites requires condensin. Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+7 dicentric with 12 Rap1 binding sites inserted within chromosome 7 left arm at ~100 kb from *CEN7* proceeded through mitosis with or without 2 mM IAA.

(C) Breakage at centered Rap1 sites in the absence of condensin. Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+7 dicentric with 12 Rap1 binding sites inserted within chromosome 7 left arm at ~300 kb from *CEN7* proceeded through mitosis with or without 2 mM IAA. Left and right panels: two independent experiments.

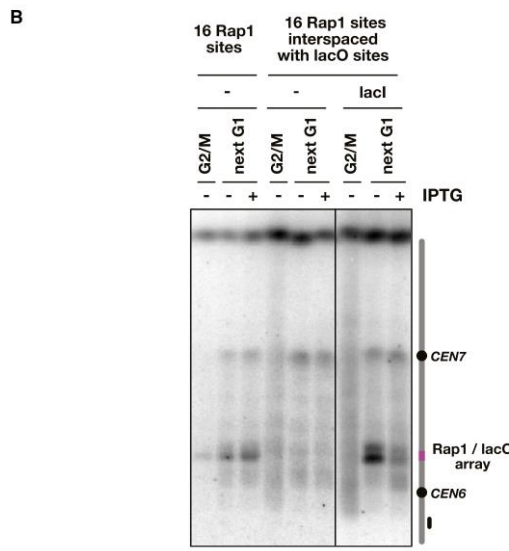
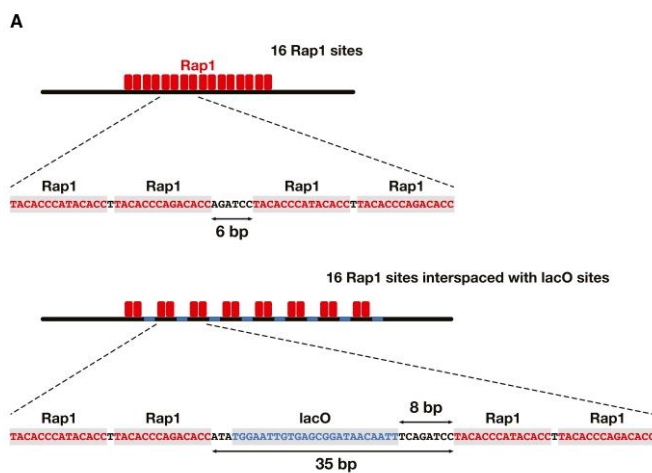
(D) Breakage at a telomere fusion located within the median region of a dicentric requires condensin. Dicentric were generated through a fusion of chromosome 6 right end and chromosome 1 right end by homologous recombination. Left panel: wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+1 dicentric with or without a head-to-head telomere fusion inserted at the junction between chromosomes 6 and 1 proceeded through mitosis with or without 2 mM IAA. The inserted telomere fusion contains ~400 bp of telomere repeats. Right panel: independent duplicates of the *smc2-AID* context with telomere fusion. GelRed-labeled PFGE is shown in Figure S2.

dicentric (Figure 5D). In this setting, chromosome 6 right arm is fused to the right arm of chromosome 1 with or without a cloned telomere fusion of ~400 bp at the junction. The distance between the fusion and *CEN6* or *CEN1* is ~120 and ~80 kb, respectively. In wild-type cells, the telomere fusion establishes a strong breakage hotspot. In the absence of telomere fusion, breakage occurs more frequently in the pericentromeric regions and relocates to the middle part of the intercentromeric region in condensin-defective cells (Figure 5D). When the telomere fusion is present, condensin loss also causes a marked reduction of breakage at the fusion (Figure 5D). Breakage at fusion is less frequent in untreated *smc2-AID* cells (-IAA) compared with wild-type cells, consistent again with a partial condensin loss of function in non-induced conditions. Thus, preferential breakage at a Rap1-bound array requires condensin even

when the array is located within the median region where dicentric break in condensin-defective cells.

Close Spacing between Tandem Rap1 Sites Is Essential to Establish a Breakage Hotspot

The preferential breakage at Rap1-bound arrays appears as the consequence of a propensity to be entrapped at the abscission site when cytokinesis is completed. Because this preferential entrapment is also condensin dependent, it may be caused by a constraint imposed by Rap1 binding on condensin activity. One hypothesis is that Rap1-bound arrays can stall condensin activity by outcompeting DNA binding over the entire tandem arrays. A prediction of this model is that increasing the distance between the bound molecules should allow condensin to bind within the array and to pass through it unchallenged.



To address this hypothesis, we inserted a tandem array of 16 interspaced Rap1 binding sites within a 6+7 dicentric. In this setting, eight clusters of two closely spaced Rap1 sites are separated by larger 35-bp linkers whose sequences harbor a single lacO site (Figure 6A); in the control closely spaced array, successive sites are separated by 1 or 6 bp. As shown in Figure 6B, this interspaced array in the absence of lacI fails to establish a breakage hotspot, indicating that a close spacing of the Rap1 sites is essential to impact dicentric breakage. Inter-

Figure 6. Close Spacing between Tandem Rap1 Sites Is Essential to Establish a Breakage Hotspot
 (A) Top panel: closely spaced Rap1 sites are alternatively separated by 1 and 6 bp. Bottom panel: in the interspaced array, the Rap1 sites are alternatively separated by 1 and 35 bp. A lacO site is present within this larger linker.
 (B) Preferential breakage at internal arrays of Rap1 binding sites with close spacing. Cells possess a 6+7 dicentric with 16 Rap1 binding sites in tandem (without or with lacO sites in between) inserted at the junction between chromosomes 6 and 7. Cells proceeded through mitosis with or without 2 mM IPTG. High-affinity lacI is expressed from an integrated plasmid. GelRed-labeled PFGE is shown in Figure S2.

estingly, lacI presence transforms the same array into a strong breakage hotspot. This property requires high affinity of lacI for its site, because reducing this affinity with IPTG weakens the hotspot (Figure 6B), again indicating the importance of a close spacing of tightly bound proteins on DNA to favor breakage within a dicentric. These results match our initial hypothesis that Rap1 acts through a stalling of condensin by steric hindrance.

Finally, the impact of tightly bound arrays on condensin could be associated to changes in tri-dimensional chromosomal folding, as seen previously for the rDNA at the scale of chromosome 12 (Lazar-Stefanita et al., 2017). To test whether Rap1- or lacI-bound arrays alter chromosome conformation, we applied chromosome conformation capture (Hi-C) to cells without dicentric arrested in late anaphase. The binding of lacI reduces the contact frequencies between sequences positioned on either side of the lacO array, but whether Rap1 can exert a similar insulating effect is less clear (Figures S6A and S6B). The sensitivity of the Hi-C assay combined with the limited mappability of the sequenced reads on these repeated regions may be a limiting factor (Swygert et al., 2019). For instance, the frequent short-range cis-contact events involving short-range distances may generate noise concealing the detection of condensin-dependent contacts that would be impacted by Rap1. In support of this interpretation, condensin loss has no obvious impact on short-range (~50 kb) contact frequencies over the entire genome (Figures S6C and S6D), although chromosome 12 loses its conformation as described previously (Lazar-Stefanita et al., 2017). Methodological developments or

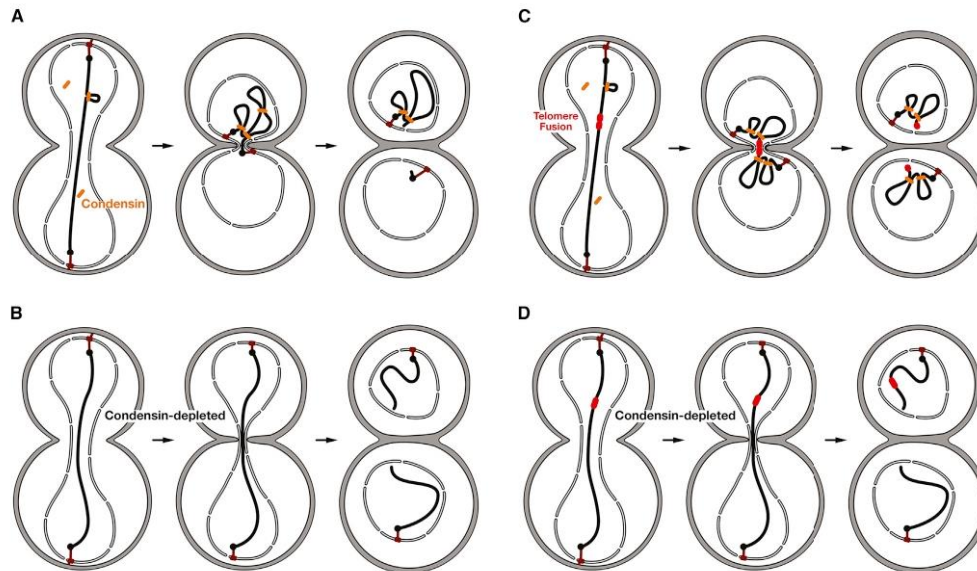


Figure 7. Models for Dicentric Dynamics, Refolding, and Breakage in Budding Yeast

(A) Model for dicentric preferential breakage at pericentromeres. Condensin molecules are in orange, chromatin and centromeres in blue, SPBs and microtubules in brown, nuclear envelop and plasma membrane in black, and cell wall and septum in gray. For simplicity, only one chromatid is drawn. The number and dynamics of the condensin molecules involved in dicentric refolding are unknown.

(B) Model for dicentric breakage in the condensin-depleted cells.

(C) Model for dicentric preferential breakage at telomere fusions.

(D) Model for the breakage of dicentrics with a telomere fusion in the condensin-depleted cells. The proposed scenarios are described in the Discussion.

alternative approaches will be needed to further explore this issue.

DISCUSSION

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

Condensin-Driven Dicentric Recoiling

Dicentric anaphase bridges recoil just prior to breakage at the completion of cytokinesis (Figure 7A). Our findings reveal that this recoiling of stretched chromatin fibers requires condensin, the SMC protein complex compacting chromosome in mitosis (Cheng et al., 2015; Ganji et al., 2018; Gibcus et al., 2018; Kschonsak et al., 2017; Lazar-Stefanita et al., 2017; Nasmyth, 2017; Renshaw et al., 2010; Shintomi et al., 2017). This shows that condensin remains active until the end of mitosis, and that extensive chromosome compaction by condensin is

not restricted to the rDNAs in yeast, as originally thought (e.g., Hirano, 2017). It extends previous observations on condensin-dependent recoiling of yeast chromosome arms in early anaphase (Renshaw et al., 2010) and unambiguously shows that condensin can generate forces sufficient to pull and rapidly compact yeast chromatin severalfold *in vivo*.

During anaphase, the elongated spindle and possibly the SPB attachment to the cell cortex oppose the condensation of dicentric bridges. Once these antagonists expire, compaction is restored through the same protein complex that condenses chromosome arms earlier in mitosis. This adaptability likely depends on the observed dynamic interaction between condensin and chromatin *in vivo*, with frequent loading and unloading (Renshaw et al., 2010; Robellet et al., 2015; Thadani et al., 2018; Thattikota et al., 2018). From anaphase onset through the completion of cytokinesis, condensin-dependent chromatin loops may constantly form and come apart to establish a steady-state level of compaction. The recoiling of dicentric bridges would therefore be a return to equilibrium that manifests an activity present on all chromosome arms at this time.

In vitro, yeast condensin extrudes loops of naked DNA at rates up to ~ 1 kb/s (Ganji et al., 2018). At this rate, the observed recoiling of 600-kb dicentric bridges in less than a few minutes

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

Interestingly, condensins acting on dicentric chromatids are strong enough to pull along the SPBs and through them the other chromosomes within the nucleus. Because this movement is relatively slow at a molecular scale (10–100 nm/s), the force needed to oppose the viscous drag is likely small (i.e., <1 pN) (Bloom, 2008). Therefore, it should not be a challenge to the kinetochore-microtubule connection, whose strength is estimated at ~10 pN (Miller et al., 2016) and is compatible with the known strength of single condensin molecules, which *in vitro* can oppose tension on DNA up to 2 pN (Eeftens et al., 2017; Ganji et al., 2018).

Preferential Entrapment of Pericentromeres and Rap1/lacI-Bound Arrays

Condensin loss prevents the relocation of centromeres to the bud neck at the end of septation (Figure 7B). As a consequence, it prevents the severing of dicentrics near centromeres and favors breakage in the median region, linking the spatial proximity to the bud neck at the time of abscission to the probability of being severed by septation. Thus, dicentric breakage hotspots result from a higher chance to be entrapped at the abscission site.

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

Can a similar model explain the frequent entrapment of Rap1 site tandem arrays, including telomere fusions? Because the Rap1 effect can be mimicked by the heterologous DNA binding factor lacI, its key attribute in this process is that it binds DNA

tightly with close spacing. In addition, the preferential entrapment of Rap1-bound arrays depends on condensin, indicating that Rap1 may act by impacting condensin activity (Figures 7C and 7D). One possibility is that, as suggested for the rDNA (Lazar-Stefanita et al., 2017), Rap1-bound arrays create a roadblock for condensins (Figure S7A). How condensin acts is as yet unknown, but it may proceed through the recurrent formation of small intermediate loops, each one involving multiple condensin contacts with DNA and short-range DNA bending (Diebold-Durand et al., 2017; Ganji et al., 2018; Kschonsak et al., 2017; Marko et al., 2019) (Figure S7B). Rap1/lacI bound on high-affinity sites in tandem with a close spacing may antagonize condensin-DNA interactions by steric hindrance, thereby impeding loop extrusion through the bound arrays. Increasing the spacing between the bound sites would release condensin from this impediment (Figure S7B). In addition, Rap1 binding on tandem arrays is known to stiffen DNA *in vitro*, generating stick-like structures that would be, for 16 sites in tandem, longer than condensin (~100 versus ~50 nm) (Le Bihan et al., 2013). This stiffening may also oppose the transient bending required for loop extrusion, although this too remains to be determined. Condensin stalling at a bound tandem array could promote independent folding of each side of the array in the two nuclear lobes or perhaps a local decondensation around the array that in the context of a dicentric would favor its entrapment at the abscission site (Figures 7C and 7D). An alternative model for condensin proposes loop formation by stochastic pairwise interactions reinforcing spatial proximity and therefore condensation (Cheng et al., 2015). It would be interesting to explore whether Rap1/lacI-bound arrays could also challenge this self-reinforcing mechanism. The impact of condensin stalling at native telomeres also has yet to be addressed. Finally, the impact of high-affinity lacI also advocates the use of a low-affinity lacI allele when using lacO arrays to track chromosome mobility, as previously recommended (Dubarry et al., 2011).

Breakage by Septum Closure

Once DNA is entrapped at the abscission site, how can cytokinesis sever it? Actomyosin ring contraction and the post-abscission septum remodeling leading to cell separation are not needed for dicentric breakage. The severing of DNA is likely to result from the closing septum pinching the nucleus and the dicentric bridges. An unidentified nuclease could be brought or activated by septation. An alternative scenario is that physical shearing forces are sufficient to break DNA entrapped at abscission. These forces could stem from the growth of the polysaccharide chains that build the septum, approximately a few tens of pN for each sugar monomer added (Cabib and Arroyo, 2013; Proctor et al., 2012). If dicentric bridges are transiently embedded into this dynamic, dense, and crosslinked network, the forces from the motion of individual chains could apply stochastically on the DNA molecule at multiple points and be additive to some extent, as in a linear random walk model. This would be sufficient to generate shearing forces above the few hundred pN needed to break covalent bonds in the DNA backbone. In this scenario, dicentric bridges would rapidly shear off once the septum has closed on them. DNA severing by shearing forces

could be ubiquitous in species with a septum such as budding yeasts, fission yeasts, and bacteria, all known to break lagging chromatin at cytokinesis (Baxter and Diffley, 2008; Cuylen et al., 2013; Hirano et al., 1986; Hocquet et al., 2018; Quevedo et al., 2012). In addition, shearing forces could break other accidentally entrapped macromolecules that could otherwise challenge abscission. Relying on physical forces would be an effective way to proceed because the lack of chemical specificity would allow this mechanism to act regardless of the nature of the hindrance. It will be thought-provoking to explore this hypothesis.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Strains and plasmids
- METHOD DETAILS
 - Cell cycle synchronization and protein degradation
 - PFGE and Southern blot
 - Time-lapse microscopy
 - Hi-C libraries generation and sequencing
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.021>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Angela Taddei for *lacI*, *lacI^{tr}*, and *lacO* array plasmids and suggestions; Frank Uhlmann and Thomas Kuhlman for the G20 plasmid; Helle Ulrich for the AID tool kit; Didier Busso and Eléa Dizet (CIGEX platform) for the Rap1 sites plasmids; Pascale Lesage for the anti-Dps1 antibody; Rémi Montagne for assistance with the Hi-C data; Romain Le Bars (IMAGE-GIF platform) and Lamya Irbah (IRCM microscopy platform) for assistance with higher-resolution microscopy; Dan Throsby for text editing; and John Marko, Damien D'Amours, Sarah Lambert, François-Xavier Barre, Pablo Radicella, Eric Coïc, Laurent Maloisel, Paul-Henri Roméo, Mathias Toulouze, and Maoussi Lhuillier-Akakpo for fruitful discussions and suggestions. This work was supported by funding to S.M. from Fondation ARC, EDF, CEA Radiobiology call, DRF-Impulsion (4D-DSB-DIC), and ANR (DICENS-ANR-14-CE10-0021-01); to K.D. from the European Research Council under the Seventh Framework Program (FP7/2007 2013/ERC grant agreement 281287); and to R.K. from the European Research Council under the Horizon 2020 Program (ERC grant agreement 260822). T.M.G. was supported by a PhD fellowship from CEA, ANR, and a Fondation ARC young researcher grant.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, T.M.G. and S.M.; Methodology, T.M.G., R.K., K.D., and S.M.; Investigation & Validation, T.M.G., C.B., N.B., V.L., L.L.-S., A.D., A.T., and S.M.; Supervision, R.K. and S.M.; Project Administration, S.M.; Funding Acquisition, R.K., K.D., and S.M.; Writing – Original Draft, S.M.; Writing – Review & Editing, T.M.G., C.B., R.K., K.D., and S.M.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: August 28, 2018

Revised: February 12, 2019

Accepted: May 13, 2019

Published: June 13, 2019

REFERENCES

- Amaral, N., Vendrell, A., Funaya, C., Idrissi, F.-Z., Maier, M., Kumar, A., Neurohr, G., Colomina, N., Torres-Rosell, J., Geli, M.-I., and Mendoza, M. (2016). The Aurora-B-dependent NoCut checkpoint prevents damage of anaphase bridges after DNA replication stress. *Nat. Cell Biol.* 18, 516–526.
- Baxter, J., and Diffley, J.F.X. (2008). Topoisomerase II inactivation prevents the completion of DNA replication in budding yeast. *Mol. Cell* 30, 790–802.
- Benarroch-Popivker, D., Pisano, S., Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Kaur, P., Bauwens, S., Djerbi, N., Latrick, C.M., Fraissier, V., Pei, B., et al. (2016). TRF2-Mediated Control of Telomere DNA Topology as a Mechanism for Chromosome-End Protection. *Mol. Cell* 61, 274–286.
- Bétermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet.* 10, e1004086.
- Beyer, T., and Weinert, T. (2016). Ontogeny of Unstable Chromosomes Generated by Telomere Error in Budding Yeast. *PLoS Genet.* 12, e1006345.
- Bi, E., and Park, H.-O. (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* 191, 347–387.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D.J., Salmon, E.D., McMillan, J.N., Yeh, E., and Pringle, J.R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J. Cell Biol.* 142, 1301–1312.
- Bloom, K.S. (2008). Beyond the code: the mechanical properties of DNA as they relate to mitosis. *Chromosoma* 117, 103–110.
- Brace, J.L., Doerfler, M.D., and Weiss, E.L. (2019). A cell separation checkpoint that enforces the proper order of late cytokinetic events. *J. Cell Biol.* 218, 150–170.
- Cabib, E., and Arroyo, J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 648–655.
- Candelli, T., Challal, D., Briand, J.-B., Boulay, J., Porrua, O., Colin, J., and Libri, D. (2018). High-resolution transcription maps reveal the widespread impact of roadblock termination in yeast. *EMBO J.* 37, e97490.
- Challal, D., Barucco, M., Kubik, S., Feuerbach, F., Candelli, T., Geoffroy, H., Benaksas, C., Shore, D., and Libri, D. (2018). General Regulatory Factors Control the Fidelity of Transcription by Restricting Non-coding and Ectopic Initiation. *Mol. Cell* 72, 955–969.e7.
- Cheng, T.M.K., Heeger, S., Chaleil, R.A.G., Matthews, N., Stewart, A., Wright, J., Lim, C., Bates, P.A., and Uhlmann, F. (2015). A simple biophysical model emulates budding yeast chromosome condensation. *eLife* 4, e05565.
- Cournac, A., Marie-Nelly, H., Marbouty, M., Koszul, R., and Mozziconacci, J. (2012). Normalization of a chromosomal contact map. *BMC Genomics* 13, 436.
- 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.
- Diebold-Durand, M.-L., Lee, H., Ruiz Avila, L.B., Noh, H., Shin, H.-C., Im, H., Bock, F.P., Bümann, F., Durand, A., Basfeld, A., et al. (2017). Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Mol. Cell* 67, 334–347.e5.
- Dubarry, M., Loïdice, I., Chen, C.L., Thermes, C., and Taddei, A. (2011). Tight protein-DNA interactions favor gene silencing. *Genes Dev.* 25, 1365–1370.

- Ebrahimi, H., and Donaldson, A.D. (2008). Release of yeast telomeres from the nuclear periphery is triggered by replication and maintained by suppression of Ku-mediated anchoring. *Genes Dev.* **22**, 3363–3374.
- Ebrahimi, H., Robertson, E.D., Taddei, A., Gasser, S.M., Donaldson, A.D., and Hiraga, S. (2010). Early initiation of a replication origin tethered at the nuclear periphery. *J. Cell Sci.* **123**, 1015–1019.
- 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.
- Falcon, C.M., and Matthews, K.S. (1999). Glycine insertion in the hinge region of lactose repressor protein alters DNA binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 30849–30857.
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., and Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* **360**, 102–105.
- Gilbcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M.T., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* **359**, eaao6135.
- Goto, G.H., Zencir, S., Hirano, Y., Ogi, H., Ivessa, A., and Sugimoto, K. (2015). Binding of Multiple Rap1 Proteins Stimulates Chromosome Breakage Induction during DNA Replication. *PLoS Genet.* **11**, e1005283.
- Grossi, S., Bianchi, A., Damay, P., and Shore, D. (2001). Telomere formation by rap1p binding site arrays reveals end-specific length regulation requirements and active telomeric recombination. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8117–8128.
- Hill, A., and Bloom, K. (1989). Acquisition and processing of a conditional dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1368–1370.
- Hirano, T. (2017). Capturing condensin in chromosomes. *Nat. Genet.* **49**, 1419–1420.
- Hirano, T., Funahashi, S., Uemura, T., and Yanagida, M. (1986). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cutmutants that block nuclear division but not cytokinesis. *EMBO J.* **5**, 2973–2979.
- Hocquet, C., Robellet, X., Modolo, L., Sun, X.-M., Burny, C., Cuylen-Haering, S., Toselli, E., Claudier-Münster, S., Steinmetz, L., Haering, C.H., et al. (2018). Condensin controls cellular RNA levels through the accurate segregation of chromosomes instead of directly regulating transcription. *eLife* **7**, e38517.
- Hong, Y., Sonnevile, R., Wang, B., Scheidt, V., Meier, B., Woglar, A., Demetriou, S., Labib, K., Jantsch, V., and Gartner, A. (2018a). LEM-3 is a mid-body-tethered DNA nuclease that resolves chromatin bridges during late mitosis. *Nat. Commun.* **9**, 728.
- Hong, Y., Velkova, M., Silva, N., Jagut, M., Scheidt, V., Labib, K., Jantsch, V., and Gartner, A. (2018b). The conserved LEM-3/Ankle1 nuclease is involved in the combinatorial regulation of meiotic recombination repair and chromosome segregation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **14**, e1007453.
- Hou, H., and Cooper, J.P. (2018). Stretching, scrambling, piercing and entangling: Challenges for telomeres in mitotic and meiotic chromosome segregation. *Differentiation* **100**, 12–20.
- Kaddour, A., Colicchio, B., Buron, D., El Maalouf, E., Laplagne, E., Borie, C., Ricoul, M., Lenain, A., Hempel, W.M., Morat, L., et al. (2017). Transmission of Induced Chromosomal Aberrations through Successive Mitotic Divisions in Human Lymphocytes after In Vitro and In Vivo Radiation. *Sci. Rep.* **7**, 3291.
- Knight, B., Kubik, S., Ghosh, B., Bruzzone, M.J., Geertz, M., Martin, V., Dénervaud, N., Jacquet, P., Ozkan, B., Rougemont, J., et al. (2014). Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes Dev.* **28**, 1695–1709.
- Koc, K.N., Singh, S.P., Stodola, J.L., Burgers, P.M., and Galletto, R. (2016). Pif1 removes a Rap1-dependent barrier to the strand displacement activity of DNA polymerase δ . *Nucleic Acids Res.* **44**, 3811–3819.
- Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., and Haering, C.H. (2017). Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell* **171**, 588–600.e24.
- Kubik, S., O'Duibhir, E., de Jonge, W.J., Mattarocci, S., Albert, B., Falcone, J.-L., Bruzzone, M.J., Holstege, F.C.P., and Shore, D. (2018). Sequence-Directed Action of RSC Remodeler and General Regulatory Factors Modulates +1 Nucleosome Position to Facilitate Transcription. *Mol. Cell* **71**, 89–102.e5.
- Kuilman, T., Maiolica, A., Godfrey, M., Scheidel, N., Aebersold, R., and Uhlmann, F. (2015). Identification of Cdk targets that control cytokinesis. *EMBO J.* **34**, 81–96.
- Lau, I.F., Filipe, S.R., Soballe, B., Økstad, O.-A., Barre, F.-X., and Sherratt, D.J. (2003). Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol. Microbiol.* **49**, 731–743.
- 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.
- Lazar-Stefanita, L., Scolari, V.F., Mercy, G., Müller, H., Guérin, T.M., Thierry, A., Mozziconacci, J., and Koszul, R. (2017). Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. *EMBO J.* **36**, 2684–2697.
- Le Bihan, Y.-V., Matot, B., Pietremont, O., Giraud-Panis, M.-J., Gasparini, S., Le Cam, E., Gilson, E., Scavi, B., Miron, S., and Le Du, M.-H. (2013). Effect of Rap1 binding on DNA distortion and potassium permanganate hypersensitivity. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 409–419.
- Lescasse, R., Pobjega, S., Callebaut, I., and Marcand, S. (2013). End-joining inhibition at telomeres requires the translocase and polySUMO-dependent ubiquitin ligase Uls1. *EMBO J.* **32**, 805–815.
- Lickwar, C.R., Mueller, F., Hanlon, S.E., McNally, J.G., and Lieb, J.D. (2012). Genome-wide protein-DNA binding dynamics suggest a molecular clutch for transcription factor function. *Nature* **484**, 251–255.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961.
- López, V., Barinova, N., Onishi, M., Pobjega, S., Pringle, J.R., Dubrana, K., and Marcand, S. (2015). Cytokinesis breaks dicentric chromosomes preferentially at pericentromeric regions and telomere fusions. *Genes Dev.* **29**, 322–336.
- M'kacher, R., Maalouf, E.E.L., Ricoul, M., Heidingsfelder, L., Laplagne, E., Cucu, C., Hempel, W.M., Colicchio, B., Dieterlen, A., and Sabatier, L. (2014). New tool for biological dosimetry: reevaluation and automation of the gold standard method following telomere and centromere staining. *Mutat. Res.* **770**, 45–53.
- Maciejowski, J., and de Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 175–186.
- Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P.J., and de Lange, T. (2015). Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell* **163**, 1641–1654.
- Marko, J.F., De Los Rios, P., Barducci, A., and Gruber, S. (2019). DNA-segment-capture model for loop extrusion by structural maintenance of chromosome (SMC) protein complexes. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/325373>.
- Matot, B., Le Bihan, Y.V., Lescasse, R., Pérez, J., Miron, S., David, G., Castaing, B., Weber, P., Raynal, B., Zinn-Justin, S., et al. (2012). The orientation of the C-terminal domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein is determined by its binding to DNA. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3197–3207.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**, 234–282.
- Miller, M.P., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2016). A TOG Protein Confers Tension Sensitivity to Kinetochore-Microtubule Attachments. *Cell* **165**, 1428–1439.
- Mohebi, S., Mizuno, K., Watson, A., Carr, A.M., and Murray, J.M. (2015). Checkpoints are blind to replication restart and recombination intermediates that result in gross chromosomal rearrangements. *Nat. Commun.* **6**, 6357.
- Morawska, M., and Ulrich, H.D. (2013). An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast* **30**, 341–351.
- Müller, S., and Almouzni, G. (2017). Chromatin dynamics during the cell cycle at centromeres. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 192–208.

- Muller, H.J., and Altenburg, E. (1930). The Frequency of Translocations Produced by X-Rays in *Drosophila*. *Genetics* 15, 283–311.
- Müller, C.A., Hawkins, M., Retkute, R., Malla, S., Wilson, R., Blythe, M.J., Nakato, R., Komata, M., Shirahige, K., de Moura, A.P.S., and Nieduszynski, C.A. (2014). The dynamics of genome replication using deep sequencing. *Nucleic Acids Res.* 42, e3.
- Nasmyth, K. (2017). How are DNAs woven into chromosomes? *Science* 358, 589–590.
- Onishi, M., Ko, N., Nishihama, R., and Pringle, J.R. (2013). Distinct roles of Rho1, Cdc42, and Cyk3 in septum formation and abscission during yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* 202, 311–329.
- Pampalona, J., Roscioli, E., Silkworth, W.T., Bowden, B., Genescà, A., Tusell, L., and Cimini, D. (2016). Chromosome Bridges Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment throughout Mitosis and Rarely Break during Anaphase. *PLoS ONE* 11, e0147420.
- Pobiega, S., and Marcand, S. (2010). Dicentric breakage at telomere fusions. *Genes Dev.* 24, 720–733.
- Proctor, S.A., Minc, N., Boudaoud, A., and Chang, F. (2012). Contributions of turgor pressure, the contractile ring, and septum assembly to forces in cytokinesis in fission yeast. *Curr. Biol.* 22, 1601–1608.
- Quevedo, O., Garcia-Luis, J., Matos-Perdomo, E., Aragón, L., and Machin, F. (2012). Nondisjunction of a single chromosome leads to breakage and activation of DNA damage checkpoint in G2. *PLoS Genet.* 8, e1002509.
- Rancati, G., Pavelka, N., Fleharty, B., Noll, A., Trimble, R., Walton, K., Perera, A., Staehling-Hampton, K., Seidel, C.W., and Li, R. (2008). Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor. *Cell* 135, 879–893.
- Reis, C.C., Batista, S., and Ferreira, M.G. (2012). The fission yeast MRN complex tethers dysfunctional telomeres for NHEJ repair. *EMBO J.* 31, 4576–4586.
- Renshaw, M.J., Ward, J.J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nédélec, F.J., and Tanaka, T.U. (2010). Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation. *Dev. Cell* 19, 232–244.
- Reyes, C., Serrurier, C., Gauthier, T., Gachet, Y., and Toumier, S. (2015). Aurora B prevents chromosome arm separation defects by promoting telomere dispersion and disjunction. *J. Cell Biol.* 208, 713–727.
- Robellet, X., Thattikota, Y., Wang, F., Wee, T.-L., Pascariu, M., Shankar, S., Bonnell, E., Brown, C.M., and D'Amours, D. (2015). A high-sensitivity phospho-switch triggered by Cdk1 governs chromosome morphogenesis during cell division. *Genes Dev.* 29, 426–439.
- Rohner, S., Gasser, S.M., and Meister, P. (2008). Modules for cloning-free chromatin tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 25, 235–239.
- Shintomi, K., Inoue, F., Watanabe, H., Ohsumi, K., Ohsugi, M., and Hirano, T. (2017). Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science* 356, 1284–1287.
- Song, W., Gawel, M., Dominska, M., Greenwell, P.W., Hazkani-Covo, E., Bloom, K., and Petes, T.D. (2013). Nonrandom distribution of interhomolog recombination events induced by breakage of a dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194, 69–80.
- Sun, M., Biggs, R., Hornick, J., and Marko, J.F. (2018). Condensin controls mitotic chromosome stiffness and stability without forming a structurally contiguous scaffold. *Chromosome Res.* 26, 277–295.
- Suto, Y. (2016). Review of Cytogenetic analysis of restoration workers for Fukushima Daiichi nuclear power station accident. *Radiat. Prot. Dosimetry* 171, 61–63.
- 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. (2019). Condensin-dependent chromatin compaction represses transcription globally during quiescence. *Mol. Cell* 73, 533–546.e4.
- Tanaka, K., Mukae, N., Dewar, H., van Bruegel, M., James, E.K., Prescott, A.R., Antony, C., and Tanaka, T.U. (2005). Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature* 434, 987–994.
- Thadani, R., Kamenz, J., Heeger, S., Muñoz, S., and Uhlmann, F. (2018). Cell-Cycle Regulation of Dynamic Chromosome Association of the Condensin Complex. *Cell Rep.* 23, 2308–2317.
- Thattikota, Y., Tollis, S., Palou, R., Vinet, J., Tyers, M., and D'Amours, D. (2018). Cdc48/VCP Promotes Chromosome Morphogenesis by Releasing Condensin from Self-Entrapment in Chromatin. *Mol. Cell* 69, 664–676.e5.
- Thrower, D.A., and Bloom, K. (2001). Dicentric chromosome stretching during anaphase reveals roles of Sir2/Ku in chromatin compaction in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 12, 2800–2812.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401–413.
- Voth, W.P., Olsen, A.E., Sbia, M., Freedman, K.H., and Stillman, D.J. (2005). ACE2, CBK1, and BUD4 in budding and cell separation. *Eukaryot. Cell* 4, 1018–1028.
- Weiss, E.L. (2012). Mitotic exit and separation of mother and daughter cells. *Genetics* 192, 1165–1202.
- Wellinger, R.J., and Zakian, V.A. (2012). Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics* 191, 1073–1105.
- Williams, T.L., Levy, D.L., Maki-Yonekura, S., Yonekura, K., and Blackburn, E.H. (2010). Characterization of the yeast telomere nucleoprotein core: Rap1 binds independently to each recognition site. *J. Biol. Chem.* 285, 35814–35824.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse monoclonal anti-Myc 4A6	Millipore	Cat#05-724; RRID:AB_11211891
Mouse monoclonal anti-HA 12CA5	Sigma-Aldrich	11583816001; RRID:AB_514505
Goat polyclonal anti-Rap1	Santa Cruz	discontinued
Mouse polyclonal anti-Dps1	Gift from Pascale Lesage	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Indole-3-acetic acid (IAA) sodium salt (Auxin)	Sigma-Aldrich	I2886
isopropyl β -D-1 thio galactopyranoside (IPTG)	Sigma-Aldrich	15502
alpha-factor	Sigma-Aldrich	T6901
Nocodazole	Sigma-Aldrich	M1404
GelRed	Biotium	41003-1
Zymolyase-100T	MP Biomedical	32093
Proteinase K	Invitrogen	P/N 100005393
dCTP-alpha-32P 6000 Ci/mmol	PerkinElmer	BLU-513Z
Deposited Data		
Original data presented in this manuscript	This study	https://doi.org/10.17632/3hcgk2n27j.1
HiC whole genome and high-resolution maps	This study	https://doi.org/10.17632/2hdp26c722.1
HiC sequencing data	This study	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA542278
Experimental Models: Organisms/Strains		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , see Table S1	This study	N/A
Oligonucleotides		
To generate the <i>TUB2</i> probe TUB2#1 AACTGGTGCACTTAATCGCTGAAT TUB2#2 ACGGTGTCAGAAGCTTCGGAGAG	This study	N/A
Software and Algorithms		
ImageJ	Wayne Rasband	https://imagej.nih.gov/ij/
Metamorph	Molecular Devices	https://www.moleculardevices.com
Prism8	Fitme	https://fitme.com/fr/logiciels/prism/

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and request for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Stéphane Marcand (stephane.marcand@cea.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Strains and plasmids

The strains used in this study are listed in Table S1. To fuse the chromosome 6 right end to the chromosome 7 left end at *ADH4*, cells were transformed with XhoI NotI cut plasmid sp1003 (deleting the distal end of 6R from coordinate 268139; López et al., 2015), sp625 (including the entire 6R subtelomere without TG₁₋₃ repeats), sp626 (including the entire 6R subtelomere and 300 bp of TG₁₋₃ repeats) and plasmids pCB22, pCB3, pCB23, pCB4 and pCB24 with 6 to 24 Rap1 sites respectively derived from sp1003. To fuse the chromosome 6 right end to the chromosome 1 right end at *IMD1*, cells were transformed with XhoI NotI cut plasmid pCB26 (including the entire 6R subtelomere without TG₁₋₃ repeats) and sp630 (including the entire 6R subtelomere and a telomere-telomere fusion with approximately 450 bp of TG₁₋₃ repeats). Integration is relatively inefficient but remarkably specific, probably due to the simultaneous

double selection on galactose plates lacking leucine. The *CEN4-kLEU2* cassette was inserted in the chromosome 6 right arm through a PCR-mediated transformation as previously described (Longtine et al., 1998; López et al., 2015). The inserted Rap1 sites (underlined) are tandem arrays of the GATCCTACACCCATACACCTTACACCCAGACACCA sequence (Grossi et al., 2001). The mutated Rap1 sites are tandem arrays of the GATCCTACTCCCATACTCCTTACTCCCAGACTCCA sequence. The Rap1 sites (underlined) interspaced with lacO sites (bold) are a tandem array of the GATCCTACACCCATACACCTTACACCCAGACACCATATG **GAATTGTGAGCGGATAACAATT**CA sequence.

The smc2-AID allele was created with plasmid pHyg-AID^{-9myc::NAT} or pHyg-AID^{-9myc::HPH} and *osTIR1* inserted at *URA3* after digestion of PNHK53 by Stul (Morawska and Ulrich, 2013). The *SPC42-yeGFP* and *MYO1-TTyeGFP* alleles were created with plasmids pYM26 and sp585, respectively, and the *SPC42-mCherry* allele was created with the plasmid pFA6-mCherry-HPHB-MX6. The TTyeGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ plasma membrane marker (Kuilman et al., 2015) is expressed from a plasmid integrated at the *URA3* locus.

The GFP-lacI^{**} and lacI-mCherry alleles were integrated at the *URA3* locus with plasmids sp613 (GFP-lacI^{**}, *HIS3* promoter) and pAT165 (lacI-mCherry, *ADH1* promoter) (Dubarry et al., 2011). Both proteins are C-terminal truncated lacI ending at Leu³⁵⁰ and lacking the tetramerization sequence. The affinity of the lacI^{**} allele is lowered by the insertion of three glycines replacing Gln⁶⁰ in the hinge region, downstream of the DNA binding domain (Dubarry et al., 2011; Falcon and Matthews, 1999). In addition, the GFP tag in amino-terminal position can further decrease lacI^{**} interaction with lacO. The mCherry tag of the high-affinity lacI is in carboxy-terminal position.

The lacO arrays (Lau et al., 2003) were integrated in chromosome 7 at coordinate 484500 (16.5 kb from *CEN7*) and coordinate 166500 (~330 kb from *CEN7*) with plasmids pAT381 (200 sites split in two blocks of 100 sites separated by ~800 bp; a gift from Angela Taddei, (Dubarry et al., 2011)), sp629 (100 sites) and sp628 (50 sites) as described in Rohner et al. (2008). The 16 Rap1 sites-NAT cassette was inserted through a PCR-mediated transformation in chromosome 7 at coordinates 413049 (at position 1/6) or coordinates 206707 (at position 1/2). Gene deletions were obtained through a PCR-mediated transformation as described in Longtine et al. (1998). To generate a *myo1-Δ* strain, we first generated a diploid by crossing *bud4⁻* strain Lev752 and *BUD4⁺* strain 134-1a (López et al., 2015). One copy of *MYO1* was deleted. Viable *BUD4⁺ myo1-Δ* spores were backcrossed twice in the W303 background and restricted several times to select for normal growth, generating strains YTG84 and YTG87. Video-microscopy with the TTyeGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ plasma membrane marker confirmed the normal timing and efficiency of cytokinesis in these *myo1-Δ* strains.

METHOD DETAILS

Cell cycle synchronization and protein degradation

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

PFGE and Southern blot

Yeast DNA embedded in agarose plugs was prepared as follows. About 1-2.10⁸ cells were harvested, washed with 1 mL of 1% Triton, 250 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5) and frozen at -80°C. Pellets were resuspended in 120 μ L of 50 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5), quickly warmed to 42°C and mixed with 200 μ L of prewarmed 1% agarose LMP. The suspension was distributed into 80 μ L wells placed on a cool surface. The plugs were extruded and incubated overnight at 37°C in 1 mL of 500 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5), 40 μ g/mL of Zymolyase-100T (MP Biomedical 32093). The following day, plugs were incubated 6h at 53°C in 1 mL of 500 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8.0), 1% N-Laurylsarcosyl, 0.5 mg/mL Proteinase K (Invitrogen P/N 100005393). Plugs were washed for 30 minutes three times in 1 mL of 50 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5). Pulse-field electrophoresis was carried out in a 0.9% agarose gel in 0.5 \times TBE at 14°C with a CHEF DR III from Bio-Rad with a switch time ramping up from 60 to 120 s in 24 h (to resolve the whole karyotype), with a switch time ramping up from 15 to 30 s in 24 hours (to resolve fragments from 20 to 400 kb; Figure 5A) or a switch time ramping up from 20 to 40 s in 24 hours (to resolve fragments from 50 to 600 kb; Figure 5D). Chromosomes were labeled with gelred and scanned (Figure S2) prior to blotting. The template for the Southern blot probe is a gel-purified PCR product of the *TUB2* gene amplified from yeast genomic DNA. Large chromosomes, including 6+7 dicentrics, can be fragmented during plug preparation, generating a smearing signal, a technical issue more frequent with G2/M arrested samples (for instance Figure 3B left panel *myo1-AID* cells in G2/M or Figure 5B right panel WT cells in G2/M).

Time-lapse microscopy

The higher resolution live-cell images of Figure 3A were acquired using an inverted Spinning Disk microscope (Nikon Eclipse Ti-E-aid and Yokogawa CSU-X1-A1) equipped with a perfect focus system, a 100x APO TIRF/1.49NA immersion objective, a Prime 95B camera (Photometrics) and a Live-SR module (Roper). The system is piloted by MetaMorph software (Molecular Device). Cells were grown exponentially in synthetic medium and plated on synthetic medium 1% agarose pads before imaging at 30°C. GFP and mCherry images were acquired sequentially with an exposure of 50 msec using 491 nm (Cobolt Calypso, 100 mW) and 561 nm

(Cobolt Jive, 150 mW) lasers, filters used were [BP 470/40, DM 495 nm, BP 520/35 (Nikon) and BP 560/40, DM 595 nm, BP 630/60 (Nikon) and dichroic triple BP 405/491/561 nm (Semrock)]. Further processing was done using ImageJ software (National Institute of Health).

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

Hi-C libraries generation and sequencing

Aliquots of $1-3 \times 10^9$ cells in 150 mL YPD/synthetic medium were fixed in 3% formaldehyde (Sigma) for 20 min at room temperature and quenched with 25 mL glycine 2.5 M for 20 min at 4° C. Hi-C libraries were generated as described (Lazar-Stefanita et al., 2017), except that cells were disrupted using a Precellys apparatus (instead of being processed through zymolyase treatment) and that biotin-labeled fragments were selectively captured by Dynabeads Myone Streptavidin C1 (Invitrogen). The resulting libraries were sequenced on a NextSeq500 Illumina apparatus. Contact maps were generated and normalized as described (Cournac et al., 2012).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis and data visualization were performed with PRISM (<https://ritme.com/fr/logiciels/prism/>).

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Raw data are available at <https://doi.org/10.17632/3hcgk2n27j.1>

Hi-C whole genome and high-resolution maps are available at <https://doi.org/10.17632/2hdp26c722.1> and Hi-C sequencing data are available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA542278>

Molecular Cell, Volume 75

Supplemental Information

Condensin-Mediated Chromosome

Folding and Internal Telomeres Drive

Dicentric Severing by Cytokinesis

Thomas M. Guérin, Claire Béneut, Natalja Barinova, Virginia López, Luciana Lazar-Stefanita, Alice Deshayes, Agnès Thierry, Romain Koszul, Karine Dubrana, and Stéphane Marcand

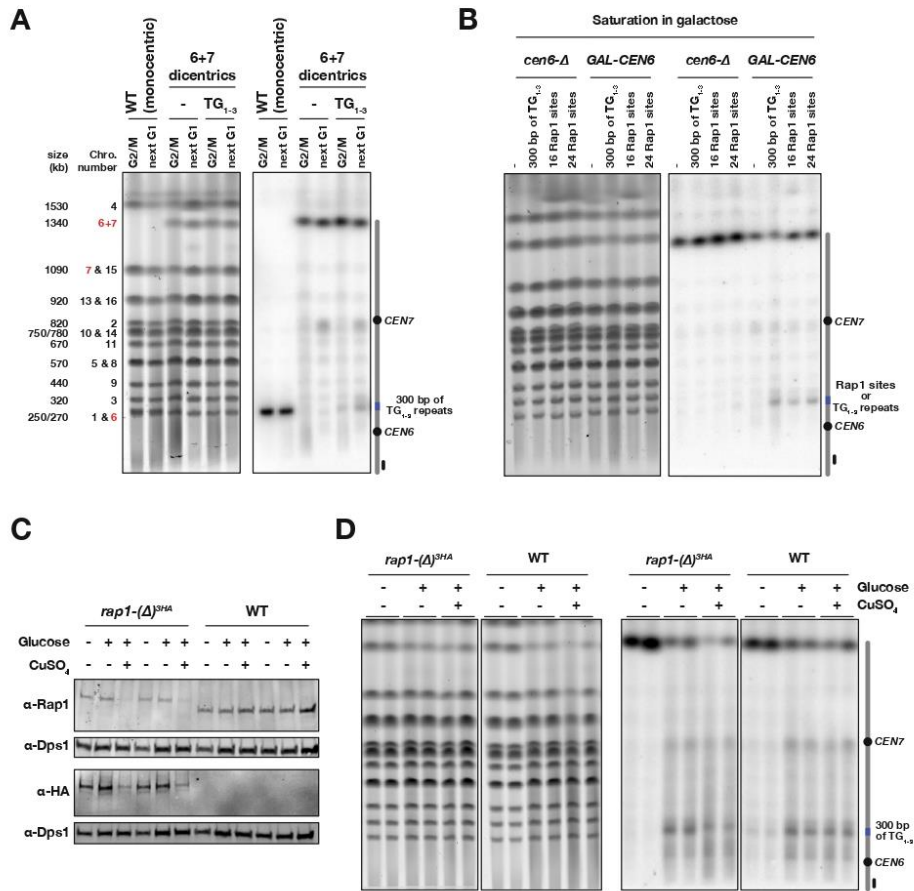


Figure S1. Related to Figure 1. Breakage at Rap1-bound arrays. (A) WT (monocentric) cells and cells possessing a 6+7 dicentric, with or without 300 bp of telomeric repeats inserted at the junction between chromosomes 6 and 7, were grown exponentially, synchronized in G1 with α -factor, released in glucose-containing medium and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed through mitosis to be blocked in the next G1 with α -factor (next G1). Chromosomes were separated by PFGE (left panel, GelRed labelled) and probed with a fragment from chromosome 6 left arm (right panel). (B) Cells possess either a *CEN6*-deleted 6+7 chromosome fusion (*CEN6* is deleted with a loxP/CRE cassette (Pobiega and Marcand, 2010)) or a 6+7 chromosome fusion with a conditional *pGAL1-CEN6-pGAL1* centromere and either no insert or 300bp of telomeric repeats, 16 Rap1 sites or 24 Rap1 sites at the junction between chromosomes 6 and 7. Cells were grown overnight in galactose-containing medium. Chromosomes were separated by PFGE, labeled with GelRed, and probed with a fragment from the chromosome 6 left arm. (C) Wildtype and *rap1-Δ^{3HA}* cells possessing a 6+7 dicentric with 300bp telomeric repeat strains at the junction between chromosomes 6 and 7 were grown asynchronously in galactose-containing medium, switched to glucose-containing medium with or without 200 μ M CuSO₄ and harvested after one population doubling. Proteins extracted by urea were analyzed by western blot. Membranes were probed with antibodies against HA or Rap1 and against Dps1 for loading control, scanned and analyzed with an Odyssey imaging system. (D) Rap1 depletion reduces breakage at internal telomeric repeats. Chromosomes were separated by PFGE, labelled with GelRed (bottom panel), blotted and probed with a fragment from chromosome 6 left arm (top panel).

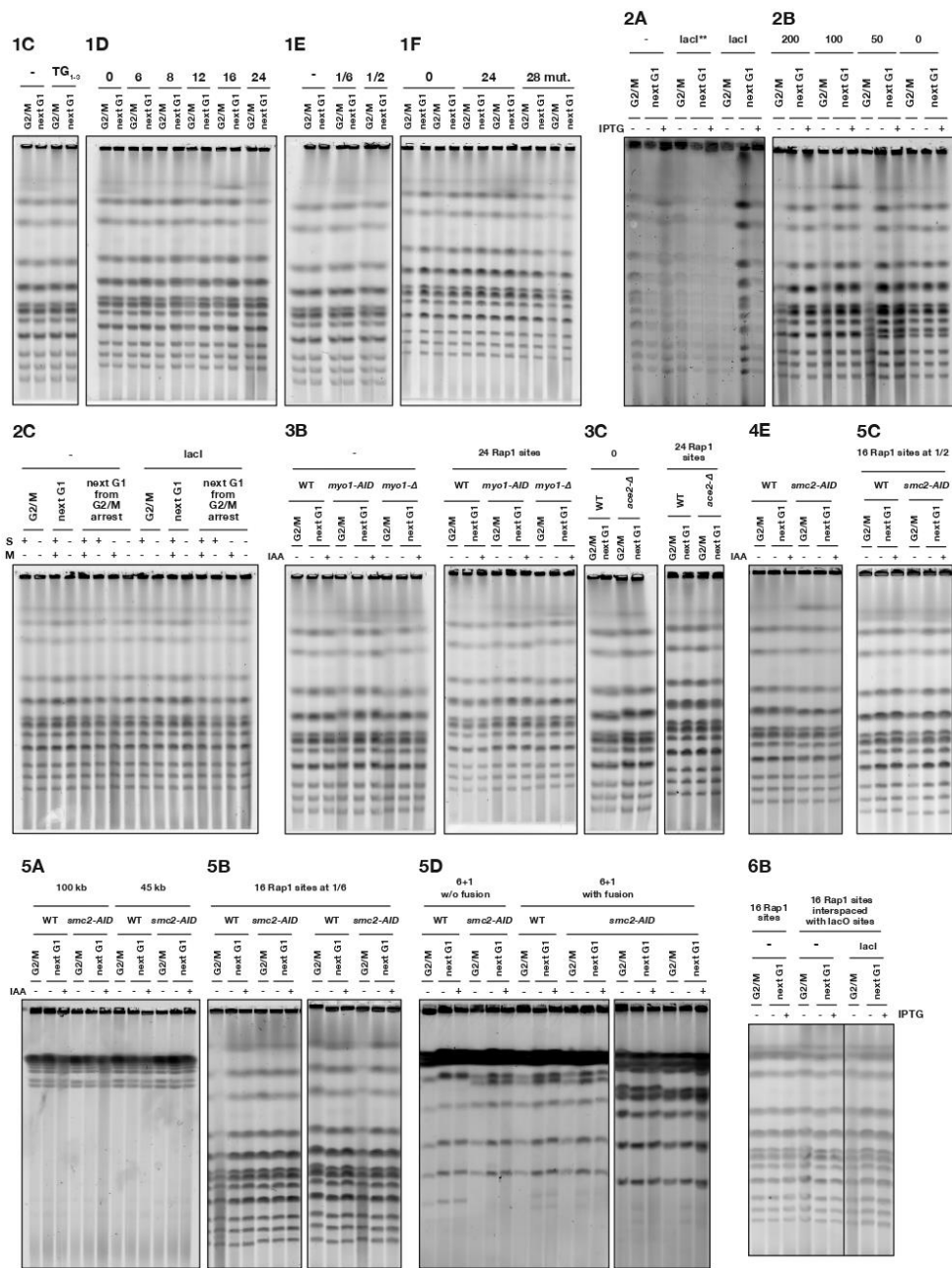


Figure S2. Related to Figures 1-6. Chromosomes were separated by PFGE and labelled with GelRed prior to blotting. These gels correspond to the Southern blots shown in Figures 1-6.

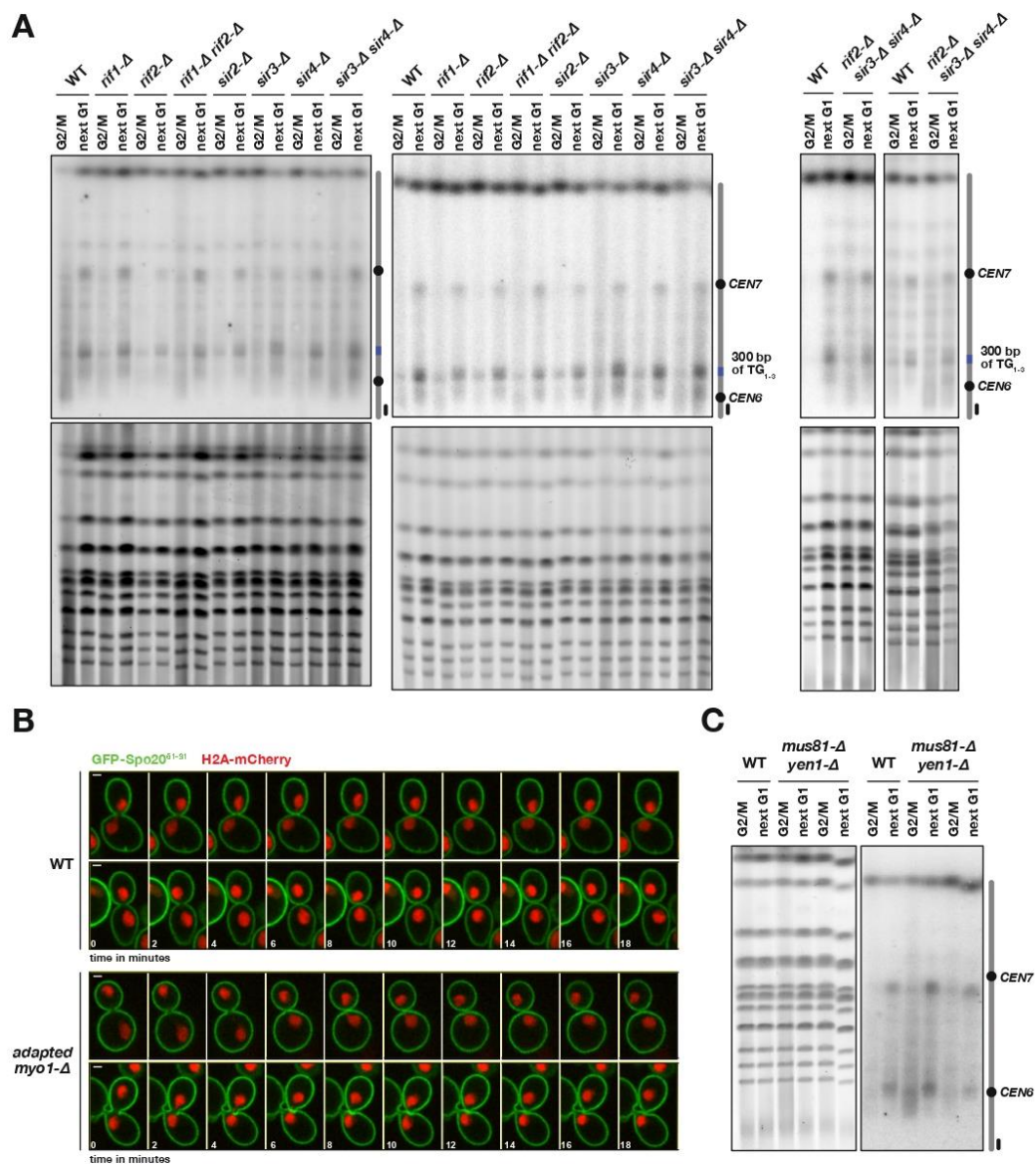


Figure S3. Related to Figures 1 and 3. (A) Rif1, Rif2, Sir2, Sir3 and Sir4 losses do not impact dicentric breakage. Wild Type, *rif1-Δ*, *rif2-Δ*, *rif1-Δ rif2-Δ*, *sir2-Δ*, *sir3-Δ*, *sir4-Δ*, *sir3-Δ sir4-Δ* and *rif2-Δ sir3-Δ sir4-Δ* (triple-mutant) cells having a 6+7 dicentric with 300bp telomeric repeat strains at the junction between chromosomes 6 and 7 were treated as in Figure 1C. The two panels represent two independent experiments. (B) Septation in adapted *myo1-Δ* cells. Wild-Type and adapted *myo1-Δ* cells possessing a dicentric 6+7 without inserted tandem array were grown exponentially at 30°C in galactose-containing medium and switch to glucose 30 minutes before imaging at 30°C. One image taken every two minutes. Plasma membrane is labelled with TTYeGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ and nucleosomes with a HTA1-mCherry tag. Scale bar, 1μm. (C) Mus81 and Yen1 losses do not impact dicentric breakage. Wild Type cells and *mus81-Δ yen1-Δ* double-mutant cells (two strains) having a 6+7 dicentric were treated as in Figure 1C.

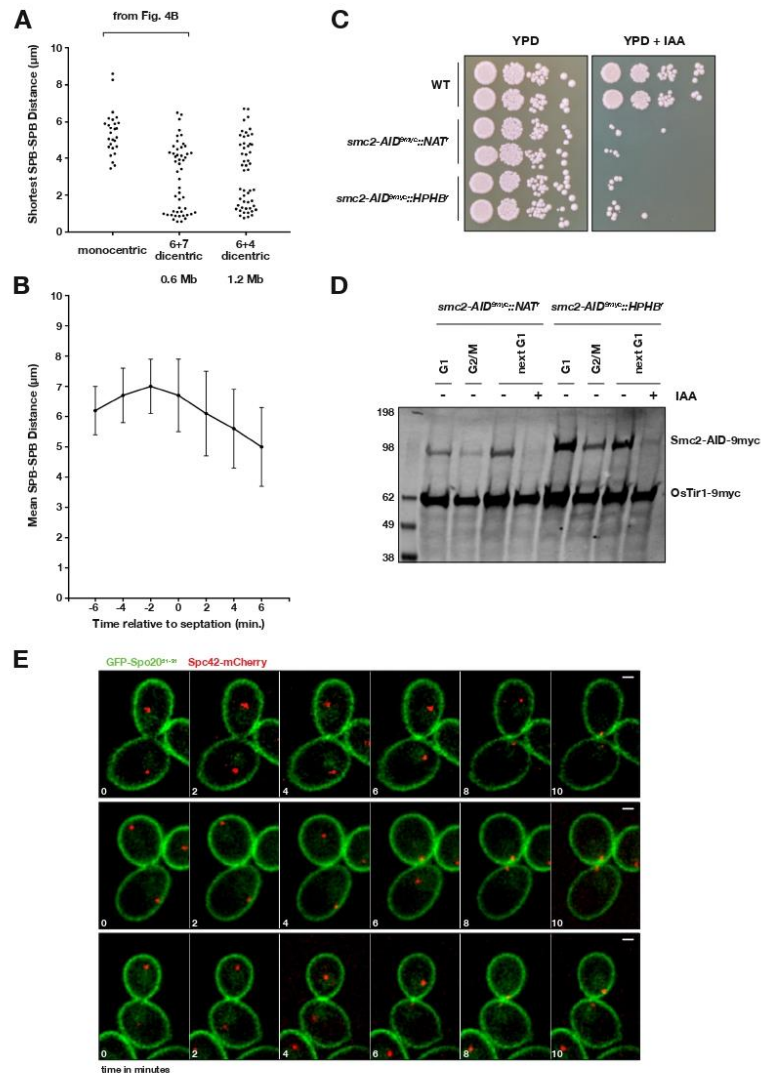


Figure S4. Related to Figure 4. SPB dynamics following the onset of cytokinesis and conditional condensin loss through *smc2* auxin-inducible alleles. (A) TTYeGFP-Spo2051-91 Spc42-mCherry wild-type cells possessing a dicentric 6+7 (0.6 Mb between the two centromeres) or a dicentric 6+4 (1.2 Mb between the two centromeres) were grown in galactose-containing medium and switch to glucose 30 minutes before imaging at 30°C. Monocentric cells were directly imaged in glucose-containing medium. For each condition, the shortest distance between the two SPBs reached during the four minutes following ingresson onset is plotted. (B) SPB dynamics in monocentric wild-type cells. Distances in μm between the two SPBs are measured every 2 minutes during late anaphase until 6 minutes after septation onset. Time 0 marks the first image with a closing septum. Average and standard deviation from 26 cells (from Figure S10 WT -IAA). (C) Loss of viability in response to Smc2 loss. 10-fold serial dilution of wildtype, *smc2-AID^{9myc}::NAT^r* and *smc2-AID^{9myc}::HPHB'* cells on rich medium with or without 2mM IAA. (D) Loss of Smc2-AID in response to IAA. Cells were grown exponentially in galactose-containing medium, synchronized in G1 with α -factor (G1), released in glucose-containing medium and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed through mitosis with or without IAA (final concentration 2mM) and then blocked in the next G1 with α -factor (next G1). Proteins extracted by urea were analyzed by western blot. Membranes were probed with antibodies against MYC and scanned with an Odyssey imaging system. All cells express a myc-tagged version of OsTir1. (E) Examples of an asymmetric dicentric-induced snap back. TTYeGFP-Spo2051-91 Spc42-mCherry wild-type cells possessing a dicentric 6+7 strain were grown exponentially in galactose-containing medium and shifted in glucose 30 minutes prior to image acquisition. One image every 2 minutes. Scale bar, 1 μm .

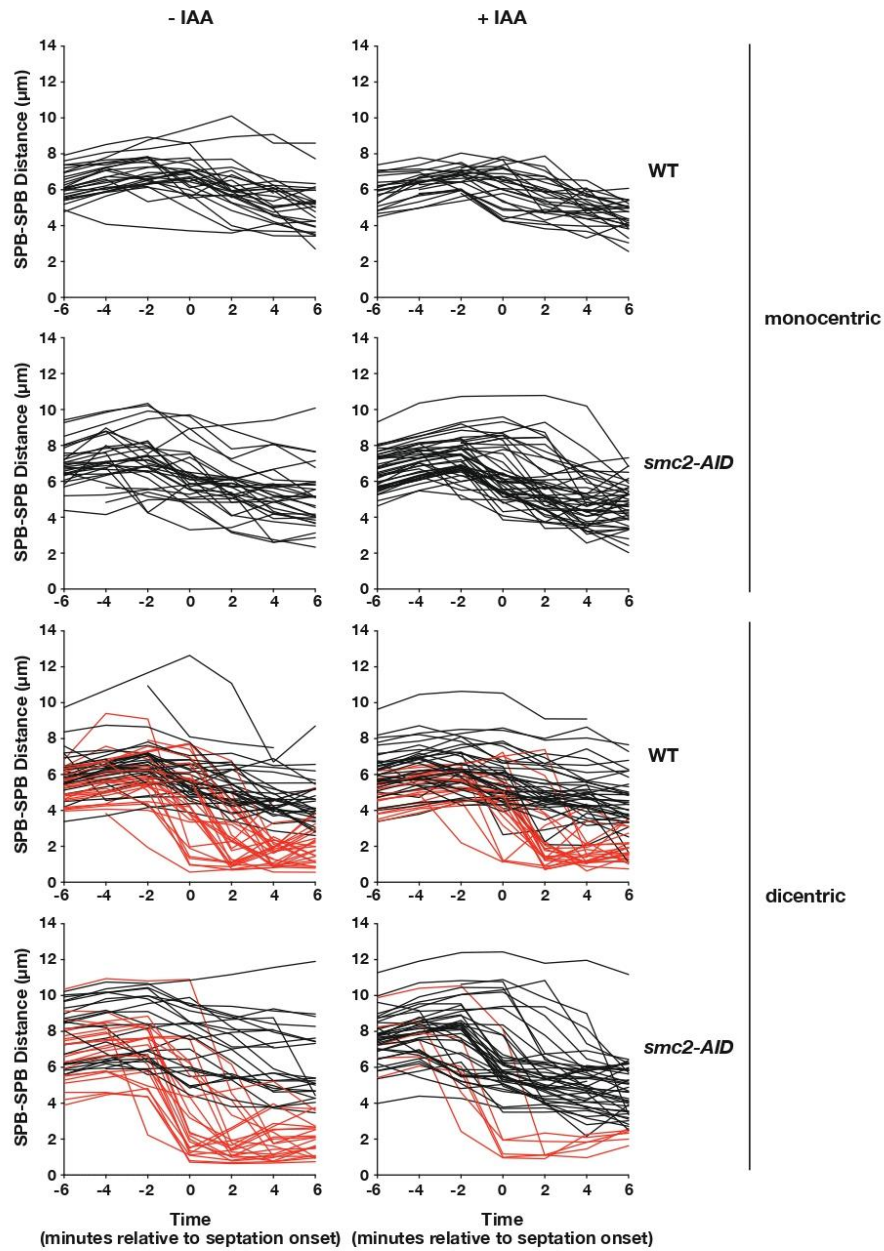


Figure S5. Related to Figure 4. Impact of condensin loss on dicentric-induced SPB dynamics. TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ Spc42-mCherry wild-type and *smc2-AID* cells possessing a dicentric 6+7 were grown in galactose-containing medium and switch to glucose 30 minutes with or without 2mM IAA before imaging at 30°C. Monocentric cells were directly imaged in glucose-containing medium with or without 2mM IAA. Distances in μm between the two SPBs are measured every 2 minutes during late anaphase until 6 minutes after septation onset. Time 0 marks the first image with a closing septum. Cells where SPBs snap back (red lines) are defined as the ones where the distance between the two SPBs is inferior to $2\mu\text{m}$ after ingresson onset. Among the *smc2-AID* cells with a dicentric exposed to IAA, a limited convergence of the SPBs is often observed at the time of ingresson, a movement possibly caused by passive chromatin recoiling in the absence of condensin or by the action of an insufficient number of condensin molecules on unfolded bridges.

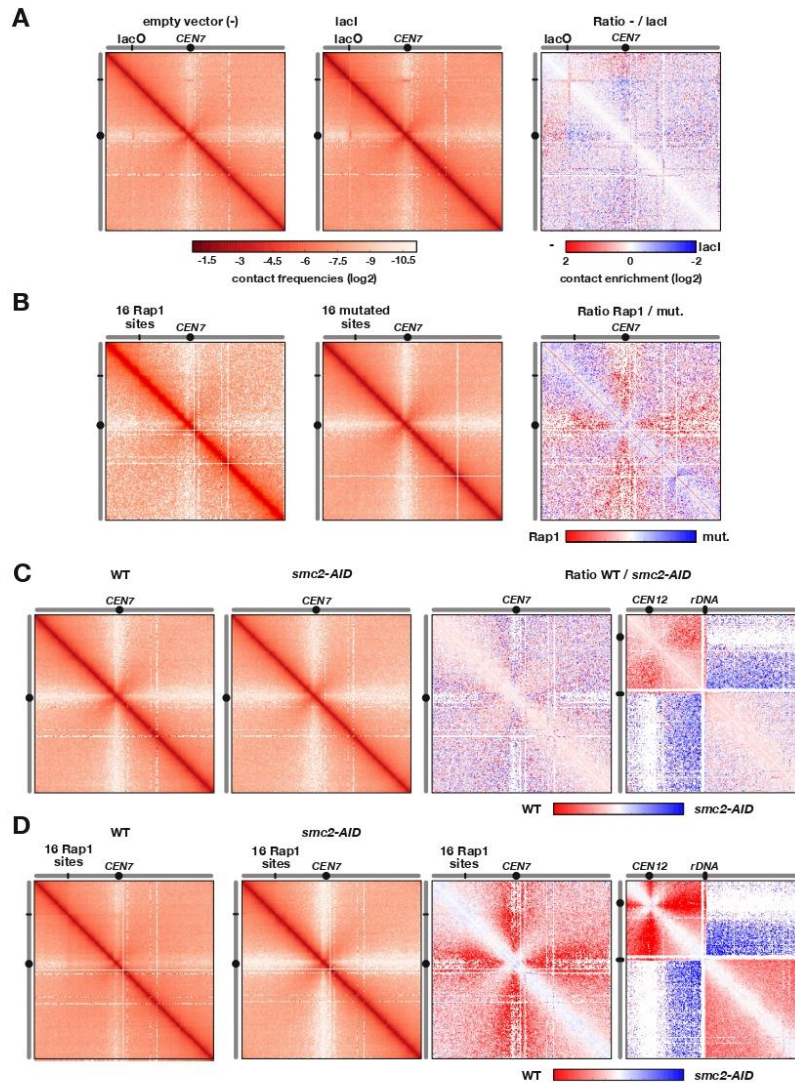


Figure S6. Related to Figure 5. Chromosome 7 contact maps and ratio from anaphase arrested cells with lacO and Rap1 arrays. (A) Monocentric *cdc15-2^{ts}* cells with a 200 lacO array inserted at position 166500 in chromosome 7 left arm and either an empty vector or a vector expressing lacI were arrested in late anaphase at 36°C. After harvest, cells were treated as described in (Lazar-Stefanita et al., 2017). The contact maps shown (left and middle panels) cover chromosome 7. Bin size = 5 kb. The red to white colour scale reflects high to low contact frequencies (log2). Right panel: Log-ratio between each pair of maps for chromosome 7. The blue to red colour scale reflects the enrichment in contact in one population with respect to the other. (B) Monocentric *cdc15-2^{ts}* cells with a tandem array of 16 mutated sites (left panel) or 16 sites Rap1 (middle panel) inserted at position 206707 in chromosome 7 left arm were arrested in late anaphase at 36°C. (C) Wild-type (left panel) and *smc2-AID* (middle panel) monocentric *cdc15-2^{ts}* cells were arrested in late anaphase at 36°C with 2mM IAA. The contact maps shown (left and middle panels) cover chromosome 7. Bin size = 5 kb. The red to white colour scale reflects high to low contact frequencies (log2). Right panel: Log-ratio between each pair of maps for chromosome 7 and 12. The blue to red colour scale reflects the enrichment in contact in one population with respect to the other. (D) Wild-type and *smc2-AID* monocentric *cdc15-2^{ts}* cells with a tandem array of 16 sites Rap1 inserted at position 206707 in chromosome 7 left arm were arrested in late anaphase at 36°C with 2mM IAA. Log-ratio between each pair of maps for chromosome 7 and 12. Two independent experiments are shown.

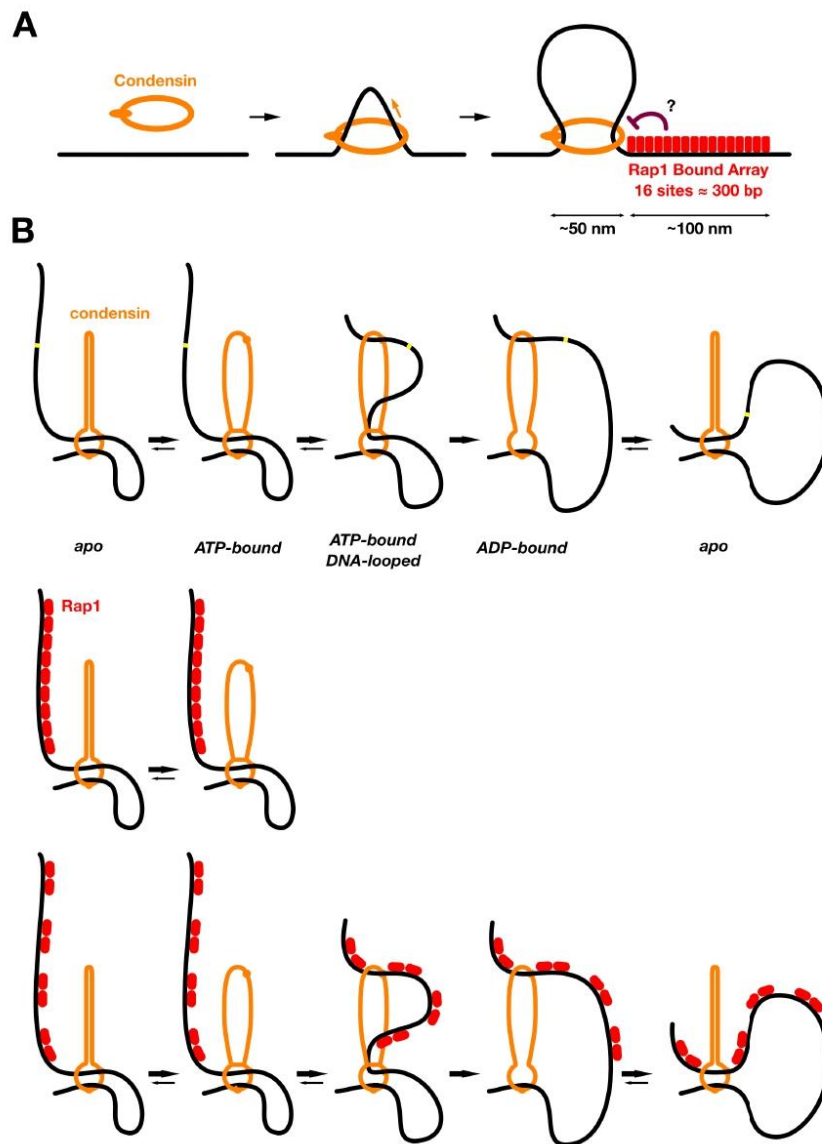


Figure S7. Related to Figure 6 and to Discussion. A speculative model for condensin stalling by Rap1-bound arrays. **(A)** Rap1-bound arrays longer than condensin may stall loop extrusion when encountering condensin. **(B)** Rap1-bound arrays may antagonize the formation of small intermediate loops during the loop extrusion reaction. Top panel: a model for loop extrusion by condensin from (Diebold-Durand et al., 2017) and (Marko et al., 2018). In the ATP-bound conformation, a small loop generated by Brownian motion passes through the “upper” open compartment formed by the two coiled-coil domains. DNA-condensin interaction at the hinge domain stabilizes this intermediate loop. The two following steps, ATP hydrolysis and ADP release, ensure its translocation. Middle panel: model for condensin stalling at Rap1-bound arrays. A Rap1-bound array longer than condensin ($>\approx$ 50 nm or \approx 8 Rap1 sites in tandem) may stall the ATP-bound step by outcompeting the predicted DNA interaction with the hinge domain and by stiffening DNA. Bottom panel: Increased spacing between the Rap1-bound sites allows DNA-condensin interaction within the array and therefore its proper translocation.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Amours, D. D. ¹, Stegmeier, F., & Amon, A. (2004). Cdc14 and Condensin Control the Dissolution of Cohesin-Independent Chromosome Linkages at Repeated DNA. *Cell*, *117*, 455–469.
- Baxter, J., Sen, N., López Martínez, V., Monturus De Carandini, M. E., Schwartzman, J. B., Diffley, J. F. X., & Aragón, L. (2011). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science*, *331*(6022), 1328–1332.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1201538/SUPPL_FILE/BAXTER.SOM.PDF
- Baxter, Jonathan, & Diffley, J. F. X. (2008). Topoisomerase II Inactivation Prevents the Completion of DNA Replication in Budding Yeast. *Molecular Cell*, *30*(6), 790–802.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.019>
- Baxter, Jonathan, Oliver, A. W., & Schalbetter, S. A. (2019). Are SMC Complexes Loop Extruding Factors? Linking Theory With Fact. *BioEssays*, *41*(1). <https://doi.org/10.1002/bies.201800182>
- Belton, J. M., Lajoie, B. R., Audibert, S., Cantaloube, S., Lassadi, I., Goiffon, I., Baù, D., Marti-Renom, M. A., Bystricky, K., & Dekker, J. (2015). The Conformation of Yeast Chromosome III Is Mating Type Dependent and Controlled by the Recombination Enhancer. *Cell Reports*, *13*(9), 1855–1867. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.10.063>
- Bonetti, D., Rinaldi, C., Vertemara, J., Notaro, M., Pizzul, P., Tisi, R., Zampella, G., & Longhese, M. P. (2020). DNA binding modes influence Rap1 activity in the regulation of telomere length and MRX functions at DNA ends. *Nucleic Acids Research*, *48*(5), 2424.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ1203>
- Bordelet, H., Costa, R., Brocas, C., Dépagne, J., Veaute, X., Busso, D., Batté, A., Guérois, R., Marcand, S., & Dubrana, K. (2022). Sir3 heterochromatin protein promotes non-homologous end joining by direct inhibition of Sae2. *The EMBO Journal*, *41*(1), e108813.
<https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108813>
- Bürmann, F., Basfeld, A., Vazquez Nunez, R., Diebold-Durand, M. L., Wilhelm, L., & Gruber, S. (2017). Tuned SMC Arms Drive Chromosomal Loading of Prokaryotic Condensin. *Molecular Cell*, *65*(5), 861–872.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.026>
- Bürmann, F., Lee, B. G., Than, T., Sinn, L., O'Reilly, F. J., Yatskevich, S., Rappsilber, J., Hu, B., Nasmyth, K., & Löwe, J. (2019). A folded conformation of MukBEF and cohesin. *Nature Structural and Molecular Biology*, *26*(3), 227–236. <https://doi.org/10.1038/S41594-019-0196-Z>
- Clemente-Blanco, A., Mayán-Santos, M., Schneider, D. A., Machín, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., & Aragón, L. (2009). Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* *2009* 458:7235, *458*(7235), 219–222. <https://doi.org/10.1038/nature07652>
- Cobbe, N., & Heck, M. M. S. (2006). The evolution of ATPase activity in SMC proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *63*(3), 685–696. <https://doi.org/10.1002/PROT.20795>
- Colin, L., Reyes, C., Berthezene, J., Maestroni, L., Modolo, L., Toselli, E., Chanard, N., Schaak, S., Cuvier, O., Gachet, Y., Coulon, S., Bernard, P., & Tournier, S. (2022). Condensin positioning at telomeres by Taz1 promotes telomere disjunction in anaphase. *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2022.03.18.484892>
- Conrad, M. N., Wright, J. H., Wolf, A. J., & Zakian, V. A. (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: Overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell*, *63*(4), 739–750. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90140-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90140-A)
- Cuvier, O., & Hirano, T. (2003). A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *Journal of Cell Biology*, *160*(5), 645–655.
<https://doi.org/10.1083/JCB.200209023>
- Cuylen, S., Metz, J., & Haering, C. H. (2011). Condensin structures chromosomal DNA through

- topological links. *Nature Structural & Molecular Biology* 2011 18:8, 18(8), 894–901.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2087>
- 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 and Development*, 22(16), 2215–2227. <https://doi.org/10.1101/gad.1675708>
- Dauban, L., Montagne, R., Thierry, A., Lazar-Stefanita, L., Bastié, N., Gadal, O., Cournac, A., Koszul, R., & Beckouët, F. (2020). Regulation of Cohesin-Mediated Chromosome Folding by Eco1 and Other Partners. *Molecular Cell*, 77(6), 1279-1293.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.019>
- Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., & Peters, J. M. (2019). DNA loop extrusion by human cohesin. *Science*, 366(6471), 1338–1345.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ3418/SUPPL_FILE/AAZ3418S9.MOV
- Del Vescovo, V., De Sanctis, V., Bianchi, A., Shore, D., Di Mauro, E., & Negri, R. (2004). Distinct DNA Elements Contribute to Rap1p Affinity for its Binding Sites. *Journal of Molecular Biology*, 338(5), 877–893. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2004.03.047>
- Diebold-Durand, M. L., Lee, H., Ruiz Avila, L. B., Noh, H., Shin, H. C., Im, H., Bock, F. P., Bürmann, F., Durand, A., Basfeld, A., Ham, S., Basquin, J., Oh, B. H., & Gruber, S. (2017). Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Molecular Cell*, 67(2), 334-347.e5. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.06.010>
- Dinda, M., Fine, R. D., Saha, S., Wang, Z., Zang, C., Li, M., & Smith, J. S. (2021). Fob1-dependent condensin recruitment and loop extrusion on yeast chromosome III. *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2022.05.12.491704>
- Doughty, T. W., Arsenault, H. E., & Benanti, J. A. (2016). *Levels of Ycg1 Limit Condensin Function during the Cell Cycle*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006216>
- Eeftens, J. M., Bisht, S., Kerssemakers, J., Kschonsak, M., Haering, C. H., & Dekker, C. (2017). Real-time detection of condensin-driven DNA compaction reveals a multistep binding mechanism. *The EMBO Journal*, 36(23), 3448–3457. <https://doi.org/10.15252/embj.201797596>
- Elbatsh, A. M. O., Kim, E., Eeftens, J. M., Raaijmakers, J. A., van der Weide, R. H., García-Nieto, A., Bravo, S., Ganji, M., uit de Bos, J., Teunissen, H., Medema, R. H., de Wit, E., Haering, C. H., Dekker, C., & Rowland, B. D. (2019). Distinct Roles for Condensin's Two ATPase Sites in Chromosome Condensation. *Molecular Cell*, 76(5), 724-737.e5.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.09.020>
- Faure, G., Jezequel, K., Roisne-Hamelin, F., Bitard-Feildel, T., Lamiable, A., Marcand, S., & Callebaut, I. (2019). Discovery and evolution of new domains in yeast heterochromatin factor Sir4 and its partner ESC1. *Genome Biology and Evolution*, 11(2), 572–585.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evz010>
- Feldmann, E. A., De Bona, P., & Galletto, R. (2015). The wrapping loop and Rap1 C-terminal (RCT) domain of yeast Rap1 modulate access to different DNA binding modes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11455–11466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637678>
- Feldmann, E. A., & Galletto, R. (2014). The DNA-Binding Domain of Yeast Rap1 Interacts with Double-Stranded DNA in Multiple Binding Modes. *Biochemistry*, 53(48), 7471.
<https://doi.org/10.1021/BI501049B>
- Förstemann, K., Förstemann, F., & Lingner, J. (2001). Molecular Basis for Telomere Repeat Divergence in Budding Yeast. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 21(21), 7277–7286.
<https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7277-7286.2001>

- Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., & Strunnikov, A. (2000). The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *The Journal of Cell Biology*, *149*(4), 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*(6384), 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 (New York, N.Y.)*, *359*(6376). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO6135>
- Gilson, L., Jaffar, S., Mwankusye, S., & Teuscher, T. (1993). Assessing prescribing practice: A tanzanian example. *The International Journal of Health Planning and Management*, *8*(1), 37–58. <https://doi.org/10.1002/HPM.4740080105>
- Goloborodko, A., Imakaev, M. V., Marko, J. F., & Mirny, L. (2016). Compaction and segregation of sister chromatids via active loop extrusion. *ELife*, *5*(MAY2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.14864>
- Goloborodko, A., Marko, J. F., & Mirny, L. A. (2016). Chromosome Compaction by Active Loop Extrusion. *Biophysical Journal*, *110*(10), 2162–2168. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.02.041>
- Grossi, S., Bianchi, A., Damay, P., & Shore, D. (2001). Telomere Formation by Rap1p Binding Site Arrays Reveals End-Specific Length Regulation Requirements and Active Telomeric Recombination. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(23), 8117. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8117-8128.2001>
- Guacci, V., Hogan, E., & Koshland, D. (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *The Journal of Cell Biology*, *125*(3), 517. <https://doi.org/10.1083/JCB.125.3.517>
- Guérin, T. M., Béneut, C., Barinova, N., López, V., Lazar-Stefanita, L., Deshayes, A., Thierry, A., Koszul, R., Dubrana, K., & Marcand, S. (2019). Condensin-Mediated Chromosome Folding and Internal Telomeres Drive Dicentric Severing by Cytokinesis. *Molecular Cell*, *75*(1), 131-144.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.021>
- Guérin, T. M., & Marcand, S. (2022). Breakage in breakage-fusion-bridge cycle: an 80-year-old mystery. *Trends in Genetics : TIG*, *38*(7), 641–645. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2022.03.008>
- Guidi, M., Ruault, M., Marbouty, M., Loïodice, I., Cournac, A., Billaudeau, C., Hocher, A., Mozziconacci, J., Koszul, R., & Taddei, A. (2015). Spatial reorganization of telomeres in long-lived quiescent cells. *Genome Biology*, *16*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13059-015-0766-2/FIGURES/6>
- Haeusler, R. A., Pratt-Hyatt, M., Good, P. D., Gipson, T. A., & Engelke, D. R. (2001). Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes Numerous levels of preferential DNA positioning within nuclei have now been described (Heun et al. *Bartova and Kozubek*. <https://doi.org/10.1101/gad.1675908>
- Harrison, B. D., Hoang, M. L., & Bloom, K. (2009). Persistent mechanical linkage between sister chromatids throughout anaphase. *Chromosoma*, *118*(5), 633–645. <https://doi.org/10.1007/S00412-009-0224-6>
- Hassler, M., Shaltiel, I. A., Kschonsak, M., Metz, J., Hennig, J., & Haering Correspondence, C. H. (2019). Structural Basis of an Asymmetric Condensin ATPase Cycle. *Molecular Cell*, *74*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.037>

- Henry, Y. A. L., Chambers, A., Tsang, J. S. H., Kingsman, A. J., & Kingsman, S. M. (1990). Characterisation of the DNA binding domain of the yeast RAP1 protein. *Nucleic Acids Research*, 18(9), 2617–2623. <https://doi.org/10.1093/NAR/18.9.2617>
- Hirano, T., & Mitchison, T. J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell*, 79(3), 449–458. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90254-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90254-2)
- Ho, B., Baryshnikova, A., & Brown, G. W. (2018). Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Systems*, 6(2), 192–205.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2017.12.004/ATTACHMENT/4C1993DB-397D-482E-A098-0AF19A942262/MMC11.ZIP>
- Hudson, D. F., Ohta, S., Freisinger, T., MacIsaac, F., Sennels, L., Alves, F., Lai, F., Kerr, A., Rappsilber, J., & Earnshaw, W. C. (2008). An InCytos from MBC Selection: Molecular and Genetic Analysis of Condensin Function in Vertebrate Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19(7), 3070. <https://doi.org/10.1091/MBC.E08-01-0057>
- Huet, J., Cottrelle, P., Cool, M., Vignais, M. L., Thiele, D., Marck, C., Buhler, J. M., Sentenac, A., & Fromageot, P. (1985). A general upstream binding factor for genes of the yeast translational apparatus. *The EMBO Journal*, 4(13 A), 3539–3547. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1985.TB04114.X>
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., & Kobayashi, T. (2010). Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science*, 327(5966), 693–696. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1179044/SUPPL_FILE/IDE_SOM.PDF
- Je-Kyung, R., Sang-Hyun, R., Janissen, R., Kerssemakers, J. W. J., & Dekker, C. (2020). Resolving the step size in condensin-driven DNA loop extrusion identifies ATP binding as the step-generating process. In *bioRxiv* (p. 2020.11.04.368506). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.11.04.368506>
- Johzuka, K., & Horiuchi, T. (2007). RNA polymerase I transcription obstructs condensin association with 35S rRNA coding regions and can cause contraction of long repeat in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 12(6), 759–771. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2443.2007.01085.X>
- Johzuka, K., & Horiuchi, T. (2009). The cis element and factors required for condensin recruitment to chromosomes. *Molecular Cell*, 34(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.02.021>
- Khayat, F., Cannavo, E., Alshmary, M., Foster, W. R., Chahwan, C., Maddalena, M., Smith, C., Oliver, A. W., Watson, A. T., Carr, A. M., Cejka, P., Bianchi, A., & Cannavo, E. (2020). Inhibition of MRN activity by a telomere protein motif. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24047-2>
- Kim, E., Gonzalez, A. M., Pradhan, B., van der Torre, J., & Dekker, C. (2022). Condensin-driven loop extrusion on supercoiled DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(7), 719–727. <https://doi.org/10.1038/S41594-022-00802-X>
- Kim, E., Kerssemakers, J., Shaltiel, I. A., Haering, C. H., & Dekker, C. (2020). DNA-loop extruding condensin complexes can traverse one another. *Nature*, 579(7799), 438–442. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2067-5>
- Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I. J., & Yu, H. (2019). Human cohesin compacts DNA by loop extrusion. *Science*, 366(6471), 1345–1349. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ4475>
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., & Hirano, T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science*, 282(5388), 487–490. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5388.487/SUPPL_FILE/981578.XHTML

- Kimura, K., & Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: A biochemical implication for chromosome condensation. *Cell*, *90*(4), 625–634. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80524-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80524-3)
- Kinoshita, K., Kobayashi, T. J., & Hirano, T. (2015). Balancing Acts of Two HEAT Subunits of Condensin I Support Dynamic Assembly of Chromosome Axes. *Developmental Cell*, *33*(1), 94–106. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2015.01.034>
- Klein, F., Laroche, T., Cardenas, M. E., Hofmann, J. F. X., Schweizer, D., & Gasser, S. M. (1992). Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *Journal of Cell Biology*, *117*(5), 935–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.5.935>
- Knight, B., Kubik, S., Ghosh, B., Bruzzone, M. J., Geertz, M., Martin, V., Enervaud, N. D., Jacquet, P., Ozkan, B., Rougemont, J., Maerkl, S. J., Elix Naef, F., & Shore, D. (2014). Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes & Development*, 1695–1709. <https://doi.org/10.1101/gad.244434.114>
- Koide, H., Kodera, N., Bisht, S., Takada, S., & Terakawa, T. (2021). Modeling of DNA binding to the condensin hinge domain using molecular dynamics simulations guided by atomic force microscopy. *PLoS Computational Biology*, *17*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1009265>
- Kong, M., Cutts, E. E., Pan, D., Beuron, F., Kaliyappan, T., Xue, C., Morris, E. P., Musacchio, A., Vannini, A., & Greene, E. C. (2020). Human Condensin I and II Drive Extensive ATP-Dependent Compaction of Nucleosome-Bound DNA. *Molecular Cell*, *79*(1), 99-114.e9. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.04.026>
- König, P., Giraldo, R., Chapman, L., & Rhodes, D. (1996). The Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of Yeast RAP1 in Complex with Telomeric DNA. *Cell*, *85*(1), 125–136. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81088-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81088-0)
- 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 Article 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>
- Kyung, J., Wing, H., Groot, de, Ryu, J.-K., Bouchoux, C., Wing Liu, H., Kim, E., Minamino, M., de Groot, R., Katan, A. J., Bonato, A., Marenduzzo, D., Michieletto, D., Uhlmann, F., & Dekker, C. (2021). Bridging-induced phase separation induced by cohesin SMC protein complexes. *Sci. Adv*, *7*, 5905. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5905>
- Lavoie, B. D., Hogan, E., & Koshland, D. (2002). In vivo dissection of the chromosome condensation machinery: reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *The Journal of Cell Biology*, *156*(5), 805–815. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109056>
- Lavoie, B. D., Hogan, E., & Koshland, D. (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes and Development*, *18*(1), 76–87. <https://doi.org/10.1101/gad.1150404>
- Lazar-Stefanita, L., Scolari, V. F., Mercy, G., Muller, H., Guérin, T. M., Thierry, A., Mozziconacci, J., & Koszul, R. (2017). Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. *The EMBO Journal*, *36*, 2684–2697. <https://doi.org/10.15252/embj.201797342>
- Le Bihan, Y. V., Matot, B., Pietrement, O., Giraud-Panis, M. J., Gasparini, S., Le Cam, E., Gilson, E., Sclavi, B., Miron, S., & Le Du, M. H. (2013). Effect of Rap1 binding on DNA distortion and potassium permanganate hypersensitivity. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *69*(3), 409–419.

<https://doi.org/10.1107/S0907444912049311/CB5017SUP1.PDF>

- Lee, B. G., Merkel, F., Allegretti, M., Hassler, M., Cawood, C., Lecomte, L., O'Reilly, F. J., Sinn, L. R., Gutierrez-Escribano, P., Kschonsak, M., Bravo, S., Nakane, T., Rappsilber, J., Aragon, L., Beck, M., Löwe, J., & Haering, C. H. (2020). Cryo-EM structures of holo condensin reveal a subunit flip-flop mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology*, *27*(8), 743–751. <https://doi.org/10.1038/S41594-020-0457-X>
- Leonard, J., Sen, N., Torres, R., Sutani, T., Jarmuz, A., Shirahige, K., & Aragón, L. (2015a). Condensin Relocalization from Centromeres to Chromosome Arms Promotes Top2 Recruitment during Anaphase. *Cell Reports*, *13*(11), 2336–2344. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.041>
- Leonard, J., Sen, N., Torres, R., Sutani, T., Jarmuz, A., Shirahige, K., & Aragón, L. (2015b). Condensin Relocalization from Centromeres to Chromosome Arms Promotes Top2 Recruitment during Anaphase. *Cell Reports*, *13*(11), 2336–2344. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.11.041>
- Lescasse, R., Pobiega, S., Callebaut, I., & Marcand, S. (2013). End-joining inhibition at telomeres requires the translocase and polySUMO-dependent ubiquitin ligase Uls1. *EMBO Journal*, *32*(6), 805–815. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2013.24>
- Li, M., Fine, R. D., Dinda, M., Bekiranov, S., & Smith, J. S. (2019). A Sir2-regulated locus control region in the recombination enhancer of *Saccharomyces cerevisiae* specifies chromosome III structure. *PLoS Genetics*, *15*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008339>
- Li, M., Valsakumar, V., Poorey, K., Bekiranov, S., & Smith, J. S. (2013). *Genome-wide analysis of functional sirtuin chromatin targets in yeast*. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-5-r48>
- Lioy, V. S., Junier, I., Lagage, V., Vallet, I., & Boccard, F. (2020). Distinct Activities of Bacterial Condensins for Chromosome Management in *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Reports*, *33*(5). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108344>
- Lopez, V., Barinova, N., Onishi, M., Pobiega, S., Pringle, J. R., Dubrana, K., & Marcand, S. (2015). Cytokinesis breaks dicentric chromosomes preferentially at pericentromeric regions and telomere fusions. *Genes and Development*, *29*(3), 322–336. <https://doi.org/10.1101/gad.254664.114>
- Machín, Félix, Torres-Rosell, J., De Piccoli, G., Carballo, J. A., Cha, R. S., Jarmuz, A., & Aragón, L. (2006). Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction. *Journal of Cell Biology*, *173*(6), 893–903. <https://doi.org/10.1083/JCB.200511129>
- Machín, Félix, Torres-Rosell, J., Jarmuz, A., & Aragón, L. (2005). Spindle-independent condensation-mediated segregation of yeast ribosomal DNA in late anaphase. *The Journal of Cell Biology*, *168*(2), 209–219. <https://doi.org/10.1083/JCB.200408087>
- Marcand, S., Gilson, E., & Shore, D. (1997). A Protein-Counting Mechanism for Telomere Length Regulation in Yeast. *Science*, *275*(5302), 986–990. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5302.986>
- Marcand, S., Pardo, B., Gratias, A., Cahun, S., & Callebaut, I. (2008). Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres. *Genes & Development*, *22*(9), 1153–1158. <https://doi.org/10.1101/GAD.455108>
- Marko, J. F., De Los Rios, P., Barducci, A., & Gruber, S. (2019). DNA-segment-capture model for loop extrusion by structural maintenance of chromosome (SMC) protein complexes. *Nucleic Acids Research*, *47*(13), 6956–6972. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz497>
- Matot, B., Le Bihan, Y. V., Lescasse, R., Pérez, J., Miron, S., David, G., Castaing, B., Weber, P., Raynal, B., Zinn-Justin, S., Gasparini, S., & Le Du, M. H. (2012a). The orientation of the C-terminal domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein is determined by its binding to

- DNA. *Nucleic Acids Research*, 40(7), 3197. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1166>
- Matot, B., Le Bihan, Y. V., Lescasse, R., Pérez, J., Miron, S., David, G., Castaing, B., Weber, P., Raynal, B., Zinn-Justin, S., Gasparini, S., & Le Du, M. H. (2012b). The orientation of the C-terminal domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein is determined by its binding to DNA. *Nucleic Acids Research*, 40(7), 3197. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1166>
- Mavrich, T. N., Ioshikhes, I. P., Venters, B. J., Jiang, C., Tomsho, L. P., Qi, J., Schuster, S. C., Albert, I., & Pugh, B. F. (2008). A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Research*, 18(7), 1073–1083. <https://doi.org/10.1101/GR.078261.108>
- McClintock, B. (1941). THE STABILITY OF BROKEN ENDS OF CHROMOSOMES IN ZEA MAYS. *Genetics*.
- Michaelis, C., Ciosk, R., & Nasmyth, K. (1997). Cohesins: Chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91(1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)80007-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80007-6)
- Mukherjee, K., Mani Pandey, D., & Saran Vidyarthi, A. (2012). Hypothesis Volume 8(18) Molecular Dynamics Simulation of Rap1 Myb-type domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Print Bioinformatics*, 8(18), 881. <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>
- Müller, S., & Almouzni, G. (2017). Chromatin dynamics during the cell cycle at centromeres. *Nature Reviews Genetics* 2017 18:3, 18(3), 192–208. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.157>
- Murayama, Y., & Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell*, 163(7), 1628–1640. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.11.030>
- Nasmyth, K. (2003). Disseminating the Genome: Joining, Resolving, and Separating Sister Chromatids During Mitosis and Meiosis. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Genet.35.102401.091334>, 35, 673–745. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.35.102401.091334>
- Negrini, S., Ribaud, V., Bianchi, A., & Shore, D. (2007). DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation. *Genes & Development*, 21(3), 292–302. <https://doi.org/10.1101/GAD.400907>
- Nerusheva, O. O., Galander, S., Fernius, J., Kelly, D., & Marston, A. L. (n.d.). *Tension-dependent removal of pericentromeric shugoshin is an indicator of sister chromosome biorientation*. <https://doi.org/10.1101/gad.240291>
- Nichols, M. H., & Corces, V. G. (2018). A tethered-inchworm model of SMC DNA translocation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(10), 906–910. <https://doi.org/10.1038/S41594-018-0135-4>
- Palou, R., Dhanaraman, T., Marrakchi, R., Pascariu, M., Tyers, M., & D'Amours, D. (2018). Condensin ATPase motifs contribute differentially to the maintenance of chromosome morphology and genome stability. *PLoS Biology*, 16(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2003980>
- Pardo, B., & Marcand, S. (2005). Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *The EMBO Journal*, 24(17), 3117. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600778>
- Paul, M. R., Markowitz, T. E., Hochwagen, A., & Ercan, S. (2018). Condensin Depletion Causes Genome Decompaction Without Altering the Level of Global Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 210(1), 331–344. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.118.301217>

- Peplowska, K., Wallek, A. U., & Storchova, Z. (2014). Sgo1 Regulates Both Condensin and Ipl1/Aurora B to Promote Chromosome Biorientation. *PLoS Genetics*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004411>
- Phane Marcand, S., Brevet, V., & Gilson, E. (1999). Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *The EMBO Journal*, *18*(12), 3509–3519.
- Piazza, I., Haering, C. H., & Rutkowska, A. (2013). Condensin: crafting the chromosome landscape. *Chromosoma* *2013* *122*:3, *122*(3), 175–190. <https://doi.org/10.1007/S00412-013-0405-1>
- Piazza, I., Rutkowska, A., Ori, A., Walczak, M., Metz, J., Pelechano, V., Beck, M., & Haering, C. H. (2014). Association of condensin with chromosomes depends on DNA binding by its HEAT-repeat subunits. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(6), 560–568. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2831>
- Pobiega, S., Alibert, O., & Marcand, S. (2021). A new assay capturing chromosome fusions shows a protection trade-off at telomeres and NHEJ vulnerability to low-density ionizing radiation. *Nucleic Acids Research*, *49*(12), 6817–6831. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB502>
- Pobiega, S., & Marcand, S. (2010). Dicentric breakage at telomere fusions. *Genes & Development*, *24*(7), 720–733. <https://doi.org/10.1101/GAD.571510>
- Pradhan, B., Barth, R., Kim, E., Davidson, I. F., Bauer, B., Laar, T. van, Yang, W., Ryu, J.-K., Torre, J. van der, Peters, J.-M., & Dekker, C. (2021). SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size. *BioRxiv*, 2021.07.15.452501. <https://doi.org/10.1101/2021.07.15.452501>
- Pradhan, B., Barth, R., Kim, E., Davidson, I. F., Bauer, B., van Laar, T., Yang, W., Ryu, J. K., van der Torre, J., Peters, J. M., & Dekker, C. (2022). SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size. *Cell Reports*, *41*(3). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2022.111491>
- Quevedo, O., García-Luis, J., Matos-Perdomo, E., & Aragón N L, Machín, F. (2012). Nondisjunction of a Single Chromosome Leads to Breakage and Activation of DNA Damage Checkpoint in G2. *PLoS Genet*, *8*(2), 1002509. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002509>
- Ray, A., & Runge, K. W. (1999). Varying the number of telomere-bound proteins does not alter telomere length in *tel1Δ* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(26), 15044–15049. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15044>
- Renshaw, M. J., Ward, J. J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nédélec, F. J., & Tanaka, T. U. (2010). Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation. *Developmental Cell*, *19*(2), 232–244. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.07.013>
- Rhee, H. S., & Pugh, B. F. (2011). Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell*, *147*(6), 1408–1419. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.013>
- Riggs, A. D. (1990). DNA methylation and late replication probably aid cell memory, and type I DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *326*(1235), 285–297. <https://doi.org/10.1098/RSTB.1990.0012>
- Rivosecchi, J., Jost, D., Vachez, L., Gautier, D. R., Bernard, P., & Vanoosthuyse, V. (2021). RNA polymerase backtracking results in the accumulation of fission yeast condensin at active genes. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101046>
- 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: Genes, Genomes, Genetics*, *4*(2), 373–381. <https://doi.org/10.1534/G3.113.009621/-/DC1>

- Robellet, X., Vanoosthuyse, V., & Bernard, P. (2017). The loading of condensin in the context of chromatin. *Current Genetics*, *63*(4), 577–589. <https://doi.org/10.1007/S00294-016-0669-0>
- Roisné-Hamelin, F., Pobiega, S., Jézéquel, K., Miron, S., Dépagne, J., Veaute, X., Busso, D., Du, M. H. Le, Callebaut, I., Charbonnier, J. B., Cuniasse, P., Zinn-Justin, S., & Marcand, S. (2021). Mechanism of MRX inhibition by Rif2 at telomeres. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-23035-W>
- Ruault, M., De Meyer, A., Loïodice, I., & Taddei, A. (2011). Clustering heterochromatin: Sir3 promotes telomere clustering independently of silencing in yeast. *The Journal of Cell Biology*, *192*(3), 417–431. <https://doi.org/10.1083/JCB.201008007>
- Ruault, M., Scolari, V. F., Lazar-Stefanita, L., Hocher, A., Loïodice, I., Koszul, R., & Taddei, A. (2021). Sir3 mediates long-range chromosome interactions in budding yeast. *Genome Research*, *31*(3), 411–425. <https://doi.org/10.1101/GR.267872.120/-/DC1>
- Ryu, J. K., Katan, A. J., van der Sluis, E. O., Wisse, T., de Groot, R., Haering, C. H., & Dekker, C. (2020). The condensin holocomplex cycles dynamically between open and collapsed states. *Nature Structural and Molecular Biology*, *27*(12), 1134–1141. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0508-3>
- 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. *The EMBO Journal*, *13*(20), 4938–4952. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1994.TB06821.X>
- Schmiesing, J. A., Ball, A. R., Gregson, H. C., Alderton, J. M., Zhou, S., & Yokomori, K. (1998). Identification of two distinct human SMC protein complexes involved in mitotic chromosome dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(22), 12906–12911. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.22.12906>
- Shaltiel, I. A., Datta, S., Lecomte, L., Hassler, M., Kschonsak, M., Bravo, S., Stober, C., Ormanns, J., Eustermann, S., & Haering, C. H. (2022). A hold-and-feed mechanism drives directional DNA loop extrusion by condensin. *Science*, *376*(6597), 1087–1094. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABM4012>
- Shintomi, K., Takahashi, T. S., & Hirano, T. (2015). Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. *Nature Cell Biology* *2014 17:8*, *17*(8), 1014–1023. <https://doi.org/10.1038/ncb3187>
- Shore, D., & Nasmyth, K. (1987). Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*, *51*(5), 721–732. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90095-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90095-X)
- Soh, Y. M., Bürmann, F., Shin, H. C., Oda, T., Jin, K. S., Toseland, C. P., Kim, C., Lee, H., Kim, S. J., Kong, M. S., Durand-Diebold, M. L., Kim, Y. G., Kim, H. M., Lee, N. K., Sato, M., Oh, B. H., & Gruber, S. (2015). Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding. *Molecular Cell*, *57*(2), 290–303. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.11.023>
- Soudet, J., Jolivet, P., & Teixeira, M. T. (2014). Elucidation of the DNA end-replication problem in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, *53*(6), 954–964. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.030>
- St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, É., Sauv , V., Ratsima, H., & D’Amours, D. (2009). Polo Kinase Regulates Mitotic Chromosome Condensation by Hyperactivation of Condensin DNA Supercoiling Activity. *Molecular Cell*, *34*(4), 416–426. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.013>
- Strick, T. R., Kawaguchi, T., & Hirano, T. (2004). Real-time detection of single-molecule DNA

- compaction by condensin I. *Current Biology*, *14*(10), 874–880.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.038>
- Sudhakar, S., Fisher, G. L., Gutierrez-Escribano, P., Garcia-Luis, J., Cutts, E., Cawood, C., Aragon, L., & Rueda, D. S. (2021). Condensin compacts DNA in 15 nm steps and requires FACT for extrusion on chromatin. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.09.15.460217>
- Sutani, T., Sakata, T., Nakato, R., Masuda, K., Ishibashi, M., Yamashita, D., Suzuki, Y., Hirano, T., Bando, M., & Shirahige, K. (2015). Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. *Nature Communications*, *6*.
<https://doi.org/10.1038/NCOMMS8815>
- Suto, Y., Hirai, M., Akiyama, M., Kobashi, G., Itokawa, M., Akashi, M., & Sugiura, N. (2013). Biodosimetry of restoration workers for the Tokyo electric power company (TEPCO) Fukushima Daiichi nuclear power station accident. *Health Physics*, *105*(4), 366–373.
<https://doi.org/10.1097/HP.0B013E3182995E42>
- Taschner, M., & Gruber, S. (2022). DNA segment capture by Smc5/6 holo-complexes. *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511515>
- Teixeira, M. T., & Gilson, E. (2005). Telomere maintenance, function and evolution: The yeast paradigm. *Chromosome Research*, *13*(5), 535–548. <https://doi.org/10.1007/S10577-005-0999-0/METRICS>
- Teixeira, M. Teresa, Arneric, M., Sperisen, P., & Lingner, J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and -nonextendible states. *Cell*, *117*(3), 323–335. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00334-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00334-4)
- Terakawa, T., Bisht, S., Eeftens, J. M., Dekker, C., Haering, C. H., & Greene, E. C. (2017). The condensin complex is a mechanochemical motor that translocates along DNA. *Science (New York, N.Y.)*, *358*(6363), 672–676. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN6516>
- Thadani, R., Kamenz, J., Heeger, S., Muñoz, S., & Uhlmann, F. (2018). Cell-Cycle Regulation of Dynamic Chromosome Association of the Condensin Complex. *Cell Reports*, *23*(8), 2308–2317.
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.04.082>
- Thattikota, Y., Tollis, S., Palou, R., Vinet, J., Tyers, M., & D'Amours, D. (2018a). Cdc48/VCP Promotes Chromosome Morphogenesis by Releasing Condensin from Self-Entrapment in Chromatin. *Molecular Cell*, *69*(4), 664–676.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.030>
- Thattikota, Y., Tollis, S., Palou, R., Vinet, J., Tyers, M., & D'Amours, D. (2018b). Cdc48/VCP Promotes Chromosome Morphogenesis by Releasing Condensin from Self-Entrapment in Chromatin. *Molecular Cell*, *69*(4), 664–676.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.030>
- 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. *The EMBO Journal*, *35*(14), 1565. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201592849>
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., & Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell*, *50*(6), 917–925. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90518-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90518-6)
- Vazquez Nunez, R., Polyhach, Y., Soh, Y. M., Jeschke, G., & Gruber, S. (2021). Gradual opening of Smc arms in prokaryotic condensin. *Cell Reports*, *35*(4), 109051.
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109051>
- Williams, T. L., Levy, D. L., Maki-Yonekura, S., Yonekura, K., & Blackburn, E. H. (2010). Characterization of the Yeast Telomere Nucleoprotein Core. *Journal of Biological Chemistry*,

285(46), 35814–35824. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.170167>

Yahya, G., Wu, Y., Peplowska, K., Röhrl, J., Soh, Y. M., Bürmann, F., Gruber, S., & Storchova, Z. (2020a). Phospho-regulation of the Shugoshin - Condensin interaction at the centromere in budding yeast. *PLoS Genetics*, *16*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008569>

Yahya, G., Wu, Y., Peplowska, K., Röhrl, J., Soh, Y. M., Bürmann, F., Gruber, S., & Storchova, Z. (2020b). Phospho-regulation of the Shugoshin - Condensin interaction at the centromere in budding yeast. *PLoS Genetics*, *16*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008569>

Titre : Impact de la protéine télomérique Rap1 sur les condensines chez *S. cerevisiae*

Mots clés : Condensine, Télomere, SMC, Chromosome, Mitose

Résumé : La condensine replie les chromosomes mitotiques. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, condensine coopère également avec la protéine télomérique Rap1 dans le cadre d'un mécanisme de secours permettant de résoudre les dicentriques issus de fusions accidentelles entre les télomères (Guérin et al. 2019). Rap1, lié en tandem, et condensine favorisent ensemble la localisation spatiale des télomères fusionnés au site d'abscission où a lieu la rupture des dicentriques. Les caractéristiques nécessaires pour un sauvetage efficace sont les suivantes : plusieurs molécules Rap1 liées en tandem avec une haute affinité et une haute densité. Le recouvrement continu de l'ADN peut agir comme une barrière stérique sur l'activité d'extrusion de boucle de condensine. Dans ce scénario, l'augmentation de l'espacement entre les molécules Rap1 liées à l'ADN libère un espace sur l'ADN permettant sa capture par condensine afin de l'extruder. À l'appui de cette hypothèse, l'interaction condensine-ADN est enrichie à la frontière des répétitions Rap1 seulement lorsque les molécules Rap1 en tandem sont très proches.

Quel pourrait être l'impact sur le repliement de la chromatine ? En utilisant une approche de microscopie, nous avons trouvé que Rap1 lié en tandem avec une haute densité mène à une décompaction locale de la chromatine. Cette décompaction est spécifique à l'anaphase/télophase, au moment où l'activité de la condensine est élevée, mais non en G1 où l'activité de la condensine est faible ou absente. L'augmentation de l'espacement entre les molécules Rap1 liées à l'ADN restaure partiellement la compaction de la chromatine. Ceci suggère que la décompaction est une conséquence du blocage de la condensine sur le tandem. L'ensemble de ces résultats nous amène à proposer le modèle suivant. Lorsque la condensine commence à extruder l'ADN et rencontre un tandem de haute densité lié par Rap1, l'extrusion de boucle bloque en raison de l'impossibilité de capturer l'ADN libre en aval. Ce blocage peut conduire à la dissociation de la condensine ou au désassemblage de la boucle et, par conséquent, à la décompaction de la chromatine.

Title : Impact of the telomeric protein Rap1 on condensin in *S. Cerevisiae* .

Keywords : Condensin, Telomere, SMC, Chromosome, Mitosis

Abstract: Condensin folds mitotic chromosomes. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, condensin also cooperates with the main telomere factor Rap1 to rescue dicentrics stemming from accidental fusions between telomeres (Guérin et al. 2019). Rap1 bound in tandem and condensin promote the spatial localization of fused telomeres at the abscission site where dicentric breakage takes place. Features needed for an efficient rescue are multiple Rap1 molecules bound in tandem with high affinity and high density. The continuous covering of DNA may act as a steric roadblock on condensin loop extrusion activity. In this scenario, increasing the spacing between the DNA-bound Rap1 molecules allows condensin to grab DNA within the array and therefore to extrude it. Supporting this hypothesis, condensin-DNA interaction increases at the border of

Rap1-bound arrays only when the Rap1 molecules are closely spaced. What could be the impact on chromatin folding ? Using a microscopy approach, we found that high-density Rap1-bound tandem arrays lead to local chromatin decompaction in anaphase/telophase when condensin activity is high but not in G1 when condensin activity is low or absent. Increasing the spacing between the DNA-bound Rap1 molecules partially restores chromatin compaction, suggesting that decompaction is a consequence of condensin blockage on the array. Together these results lead us to propose the following model. When an extruding condensin encounters a high-density Rap1-bound tandem, loop extrusion stalls due to failure to capture downstream free DNA.