



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Lise DAUBAN

Le 30 septembre 2019

**Organisation du génome par le complexe cohésine chez la levure
Saccharomyces cerevisiae**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :

LBME - Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes

Thèse dirigée par

Olivier GADAL et Frederic BECKOUET

Jury

Mme Armelle LENGRONNE, Rapporteur

Mme Pei-Yun Jenny WU, Rapporteur

M. Frédéric BANTIGNIES, Rapporteur

M. Pierre-Emmanuel GLEIZES, Examinateur

Mme Karine DUBRANA, Examinatrice

M. Yannick GACHET, Examinateur

M. Olivier GADAL, Directeur de thèse

M. Frédéric BECKOUET, Co-directeur de thèse



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Lise DAUBAN

Le 30 septembre 2019

**Organisation du génome par le complexe cohésine chez la levure
Saccharomyces cerevisiae**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :

LBME - Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes

Thèse dirigée par

Olivier GADAL et Frederic BECKOUET

Jury

Mme Armelle LENGRONNE, Rapporteur

Mme Pei-Yun Jenny WU, Rapporteur

M. Frédéric BANTIGNIES, Rapporteur

M. Pierre-Emmanuel GLEIZES, Examinateur

Mme Karine DUBRANA, Examinatrice

M. Yannick GACHET, Examinateur

M. Olivier GADAL, Directeur de thèse

M. Frédéric BECKOUET, Co-directeur de thèse

Remerciements

Ces quatre années de thèse ont été pour moi quatre années intenses, riches sur le plan humain et scientifique et dont je garderai de merveilleux souvenirs. Comme tout bon thésard qui se respecte j'ai croisé la joie, le stress, l'exaltation, la déception, l'euphorie, l'épuisement et même un peu de fierté. Je me suis épanouie, j'ai appris à me dépasser un peu plus chaque jour et cela n'aurait pas été possible sans toutes les personnes qui m'ont accompagnées. La thèse est une expérience basée sur le partage, l'échange et la transmission du savoir, qui s'effectue grâce au soutien de toute une équipe de recherche, des copains, des copines et de tant d'autres. Je voudrais donc par ses quelques lignes remercier toutes les personnes, qui m'ont permis des près ou de loin de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions. Merci à toutes celles et ceux qui ont croisé mon chemin pour quelques jours, quelques mois ou quelques années, qui m'ont aidé et supporté et qui ont pris part à cette belle aventure.

Tout d'abord je tiens à remercier Armelle Lengronne, Pei-Yun Jenny Wu et Frédéric Bantignies pour avoir accepté de lire et commenter mon manuscrit de thèse malgré son épaisseur un peu imposante. Je remercie également Karine Dubrana et Yannick Gachet qui ont fait partie de mon comité de thèse et qui m'ont suivi au cours de ces quatre années. Merci pour vos commentaires, votre aide et vos conseils.

Je voudrais ensuite remercier la première personne qui m'a permis de franchir les portes de l'IBCG, Pascal Le Bourgeois. Merci pour ce tout premier stage au LMGM, eh oui c'est bien dans ce petit labo du 3^{ème} étage que tout a commencé. Tu m'as donné mon premier aperçu du métier de chercheur, tu m'as transmis le goût de la paillasse et de la science en général et pour ça je t'en remercie. C'est aussi grâce à toi que je suis entrée, quelques mois plus tard, dans cette fameuse équipe des Gadaux.

J'en viens donc, tout naturellement, à remercier chaleureusement mon équipe d'accueil (ODN pour les uns, Gadaux pour les autres) au grand complet.

Tout d'abord merci à Olivier qui m'a encadré du premier jour de mon stage de M1 jusqu'au dernier jour de ma thèse. Au cours de ces années tu t'es rendu disponible quand j'en avais besoin, que ce soit pour m'aider à comprendre mes tableaux de croisements ou pour me soutenir dans les derniers moments de l'écriture de ce manuscrit, ton soutien a été fort appréciable donc merci. Je n'oublierai évidemment pas nos plus les quelques heures de discussions que nous avons pu avoir au fil des années jusqu'à parfois tard le soir...

Fred, ces quelques mots seront loin d'être suffisants pour te dire combien j'ai apprécié travailler à tes côtés durant ces dernières années. Merci pour ton investissement sans limites que ce soit dans ce beau projet cohésine comme dans la science en général. Merci pour cet exemple que j'essaierai de suivre au mieux. Je n'oublierai pas ces centaines de discussions et toutes ces heures passées à essayer de comprendre et d'analyser les données de Hi-C ou à traquer l'apparition de petits buds sur les shmoos après un arrêt avec un alpha-facteur douteux. Quelques-unes de tes phrases fétiches resteront ancrées en moi dont la plus célèbre « Do it again, do it properly » ; je tâcherais de la graver dans ma mémoire pendant longtemps. Je tiens également à te remercier pour m'avoir toujours soutenue, épaulée, motivée que ce soit dans des moments de joie comme dans des

moments plus difficiles, tu as été d'un soutien sans failles et je ne sais pas où j'en serais aujourd'hui sans tous tes conseils. MERCI.

Je remercie également Marta pour ton rire contagieux, ta bonne humeur imperturbable au fil des jours et des années et aussi pour tous tes petits conseils naturo-écolos ! Ce fut un réel plaisir de travailler et d'évoluer à tes côtés. J'espère que tu persévèreras avec le psoralen et bien sûr que tu continueras la piscine après mon départ, peut-être même que Fred acceptera de t'accompagner cette fois... !

Cette équipe ne serait pas la même sans une seconde présence féminine, Isabelle. Merci pour avoir passé du temps à relire ce manuscrit (plus les rapports, plus les papiers, plus tout le reste) et pour tes commentaires toujours justes et précis. Merci également pour m'avoir appris toutes ces astuces concernant le FISH, on y est finalement arrivées !

Merci à Christophe Dez pour toutes tes petites attentions au fil des ans, que ce soit un compliment sur une robe, un gâteau le jour mon anniversaire ou un petit cadeau à la fin de la rédaction, c'est touchant et ça fait toujours très plaisir ! Merci d'avoir été là toutes ces années, et grâce à toi je me souviendrai de toujours préciser ma question biologique dans mes présentations.

Christophe Normand, figure incontournable, à l'apparence ronchon mais pas tant que ça en fait, merci pour tous tes conseils, en bio mol notamment et surtout en clonage. Merci également pour tes lab meeting réalisés avec une touche d'accent indien, j'ai depuis tout compris au positionnement des tRNA dans le noyau.

Et enfin et grand Merci à mon compagnon de paillasse, Tommy ! Qu'est-ce que j'ai apprécié manipuler sur la paillasse à côté de la tienne, les PCR, les clonages et les transfos de levure ne sont plus pareils depuis que tu es parti... J'espère qu'on aura bientôt l'occasion de préparer de nouvelles cellules compétentes côte à côte et bien évidemment d'aiguiser nos talents d'entomologistes.

Je n'oublie pas tous les étudiants que nous avons accueilli toutes ces années Nathalie, Ellen, Marie-K, Nicolas, Mélanie, Emma, Mathilde, Carla, Alice, Sarah, Margaux, Lilian et les autres qui ont tous apporté leur grain de bonne humeur dans l'équipe et sans qui quelques fous rires n'auraient pas vu le jour.

Je souhaite également remercier Romain Koszul pour sa confiance et pour son investissement qui ont permis de mettre en place une belle collaboration entre deux laboratoires qui j'espère perdurera. Merci également aux membres de son équipe, Axel, Rémi et Agnès, pour votre contribution active dans le projet et pour ces heures passées à nous expliquer les dessous des analyses bio-informatiques que ce soit à distance ou lors de nos visites à Paris.

Je tiens également à remercier Alain Kamgoué pour tout le temps que tu as investi à écrire, modifier, réécrire et remodifier des scripts pour l'analyse 3D de l'ADN ribosomique et ce toujours avec le sourire et dans la bonne humeur, quel plaisir ! Tu m'as aussi appris à décoder les bases du langage Python, merci beaucoup, il m'apparaît depuis bien moins effrayant.

Le laboratoire et la thèse en général n'auraient pas la même saveur s'il n'y avait pas tous les copains thésards autour. Merci à vous, Sylvain, Thomas, Cécilia, Duy Khanh, Ramtin, Clément, Jade, Maral, Ludmila, Barbara, Alex, David, Emilie, Emma, Manon, Léo mais aussi Ahmad et tous ceux que j'oublie. Merci de m'avoir accueillie dans cette grande famille des joueurs de tarot, merci pour tous ces Upsi, toutes ces soirées, tous ces gouters, toutes ces bières, toutes ces séances de piscines avec plus ou moins de participants, tous ces fous rires et tout votre soutien (autant moral que physique...), merci pour toute votre joie et votre bonne humeur. Ce fut un réel plaisir de

partager tous ces bons moments avec vous, le tour d'Europe des copains, c'est pour bientôt j'espère !

Merci également à Tiphaine qui a su m'épauler et trouver les mots justes et réconfortant pendant les moments un peu difficiles de la rédaction. Merci également pour toutes tes blagues scientifiques ou non qui n'ont jamais manqué de me faire bien rire !

Merci à mes copines de toujours Mine et Chatoune et à ma racaille préférée, John. Beaux temps et mauvais temps vous êtes à mes côtés, prêts à écouter mes histoires improbables, et pour ça : merci.

De manière plus générale je tiens à remercier l'ensemble du LBME et du CBI. Ce laboratoire offre un cadre accueillant et confortable pour les thésards et je m'y suis véritablement épanouie. Merci à Cathy, Safi, Isabelle, Nathalie et Marie pour votre patience et pour tous vos efforts quand on a besoin rapidement et de manière un peu imprévue d'un ordre de mission ! Merci également à Alain et Bertrand qui s'évertuent chaque jour à faire du labo un endroit plus agréable à vivre, votre travail est précieux, merci.

Dans un autre registre, un merci tout particulier à Steph et Odile pour vos mots doux et pour tous nos papotages autour des bijoux, des robes, collants, chaussures et autres chiffons, oui oui ça aussi c'est important !

Merci également à David pour toutes ces conversations sur la pluie, le beau temps, la vie, la famille ou la science. Tes yeux très perspicaces ont su décrypter mes moments de doutes et tu as toujours trouvé les mots pour me remettre dans le droit chemin. J'attends avec impatience la visite de toute la famille à Amsterdam.

Je tiens également à remercier d'une part Gilles Charvin et Sandrine Morlot et d'autre part Bassam Hajj et Laura Cancianini pour m'avoir accueilli dans vos laboratoires respectifs pour quelques jours. Ces semaines à Strasbourg et Paris ont été pour moi plus qu'enrichissantes, scientifiquement et humainement. Elles m'ont permis d'entrevoir de nouveaux horizons et je vous en suis très reconnaissante.

Enfin je terminerai ces remerciements par les personnes les plus chères à mon cœur, ma famille. Merci à Papa, Maman évidemment mais bien sur Jean-Baptiste, Angèle et Julie : vous avez toujours été là pour moi et votre présence à mes côtés est essentielle. *Merci* pour tous et pour chacun des moments de joies et de bonheur que nous avons et que nous continuerons à partager. Plus largement je tiens à remercier toute ma famille, Mamie, Ménou, Tonton Claude, Pascal, Natha, Malou, Maxime, Rémy, Julien, Bertrand, Clément, Etienne, Guillaume et tous les autres. Je ne pourrais énumérer tous ces merveilleux souvenirs que nous avons forgés, ici ou là-bas, en plein jour ou au milieu de la nuit, autour de multiples jeux de sociétés, de soirées arrosées, de randonnées, ou simplement sur un canapé à regarder le temps passer. On n'a pas souvent ni l'occasion ni l'habitude de se le dire alors j'en profite ici pour vous remercier du fond du cœur pour votre soutien, vos attentions, vos rires, vos joies et pour tout votre amour.

A tous et à toutes, merci

RESUME

La cohésine est un complexe protéique conservé dans l'évolution composé d'un anneau capable d'embrasser l'ADN et de protéines auxiliaires régulant son interaction avec la chromatine. D'une part, la cohésine confère la cohésion des chromatides sœurs nécessaire à leur ségrégation, d'autre part elle établit et maintient des boucles de chromatine. Ces boucles sont requises pour la formation de domaines topologiques, l'expression génique et la stabilité du génome. Cependant les mécanismes régissant leur formation ne sont pas entièrement élucidés. Selon le modèle d'extrusion de boucles, la cohésine capturerait des boucles de petites tailles et les élargirait en extrudant l'ADN à travers son anneau. Dans ce modèle, la taille des boucles dépendrait à la fois du temps de résidence des cohésines sur l'ADN et de leur processivité. Étudier la régulation des cohésines est donc fondamental pour comprendre la biologie des chromosomes. Dans cette étude nous avons montré que les bras des chromosomes mitotiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae* étaient organisés sous forme de boucles de chromatine dépendantes des cohésines. Nous avons étudié le rôle des sous-unités régulatrices des cohésines, Pds5, Wpl1 et Eco1 dans la formation de ces boucles. Nos données montrent que Pds5 inhibe leur expansion, *via* Wpl1 et Eco1. Comme décrit chez les mammifères, Wpl1 les abolit en dissociant les cohésines des chromosomes. En revanche, nos résultats suggèrent qu'Eco1 entraverait la translocation des cohésines sur l'ADN, nécessaire pour l'agrandissement des boucles. Nous avons ensuite analysé le rôle de ces protéines dans l'organisation de l'ADN ribosomique (ADNr), séquence enrichie en cohésines, hautement transcrite et isolée du reste du génome. Pds5 semble avoir un rôle central dans l'organisation de cette séquence, qui ne dépendrait pas de Wpl1 ou d'Eco1. Afin d'analyser de manière fine les réorganisations spatiales de l'ADNr, nous avons développé une analyse d'image dédiée permettant de sonder l'organisation de cette fibre en trois dimensions. Nous avons révélé une structure sous-jacente de l'ADNr composée d'une succession de domaines organisés spatialement par les cohésines. Cette étude ouvre des perspectives vers une meilleure compréhension de la régulation des cohésines dans l'organisation du génome.

ABSTRACT

Cohesin is an evolutionary-conserved complex composed of a ring capable of DNA entrapment and of auxiliary proteins regulating its association with chromatin. On the one hand, cohesin confers sister chromatid cohesion required for their proper segregation and on the other hand it establishes and maintains chromatin looping. Chromatin loops are crucial for assembly of topological domains, gene expression and genome stability. However, mechanisms driving their establishment remain to be elucidated. According to loop extrusion model, cohesin would capture small loops and enlarge them by extruding DNA throughout its ring. This model predicts that loop size would depend on both cohesin residence time on DNA and on its processivity. Deciphering cohesin regulation is thus fundamental to understand chromosome biology. In this study, we showed that mitotic chromosome arms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* are organised in cohesin-dependent chromatin loops. We studied the role of cohesin regulatory subunits Pds5, Wpl1 and Eco1 on loop establishment. Our data show that Pds5 inhibits loop expansion *via* Wpl1 and Eco1. As previously described in mammals, Wpl1 counteracts loop expansion by dissociating cohesin from DNA. Our results suggest that Eco1 would inhibit cohesin translocation on DNA, required for loop expansion. We then studied how these proteins contribute to the organisation of the ribosomal DNA array (rDNA), a cohesin-rich, highly transcribed sequence segregated away from the rest of the genome. Our data point toward a central role for Pds5 in organising this genomic region, independently of Wpl1 and Eco1. To study in detail rDNA spatial organisation, we developed a dedicated image analysis to assess its organisation in three dimensions. We have unveiled an underlying organisation for rDNA, made by a succession of small domains spatially organised by cohesin. This study opens large perspectives towards a better understanding of cohesin regulation in genome organisation.

MOTS-CLEFS

Organisation du génome, cohésine, ADN ribosomique, cycle cellulaire,
Saccharomyces cerevisiae

Table des matières

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION	17
CHAPITRE I : ARCHITECTURE DU CHROMOSOME	19
A. <i>La double hélice d'ADN</i>	19
B. <i>Les histones</i>	21
a. Le nucléosome	23
b. Les modifications post-traductionnelles d'histones	23
c. Les variants d'histones	25
d. L'histone H1	27
C. <i>La fibre de 10 nm</i>	29
D. <i>De la fibre de 10 nm et vers au-delà</i>	33
a. Arrangement supra-nucléosomaux	33
b. Boucles de chromatine	35
c. Euchromatine et hétérochromatine	35
i. Chez les mammifères	35
ii. Chez la drosophile <i>D. melanogaster</i>	39
iii. Chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	41
CHAPITRE II : LE CYCLE CELLULAIRE	45
A. <i>Préambule</i>	45
B. <i>Généralités chez les métazoaires</i>	47
a. L'interphase	47
b. La mitose	51
c. La régulation du cycle cellulaire	55
i. Les cyclines	55
ii. Les points de contrôle (« checkpoints »)	55
C. <i>Le cycle cellulaire chez la levure S. cerevisiae</i>	57
a. Les différences avec le cycle cellulaire des métazoaires	59
b. Détail des méthodes de synchronisation utilisées dans l'étude	61
i. Synchronisation en G1	61
ii. Synchronisation en G1/S	63
iii. Synchronisation en mitose, sans réplication	65
iv. Synchronisations en mitose	65

CHAPITRE III : UN COMPLEXE DE LA FAMILLE DES SMCs : LA COHESINE	69
A. <i>Préambule</i>	69
B. <i>La découverte des SMCs</i>	71
C. <i>Les cohésines</i>	75
a. Un complexe multiprotéique	77
i. L'anneau tripartite	77
ii. Les protéines auxiliaires	77
iii. Différents modèles de conformation de l'anneau	81
b. L'association des cohésines à l'ADN	83
c. Un anneau avec une porte d'entrée	85
d. Un anneau avec deux portes de sortie	87
D. <i>Les rôles des cohésines</i>	89
a. La cohésion	89
i. Chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	89
ii. Chez les mammifères	93
b. L'organisation du génome	95
c. Cohésion vs. organisation du génome	101
CHAPITRE IV : L'ARCHITECTURE NUCLEAIRE	105
A. <i>Préambule</i>	105
B. <i>Les méthodes d'analyse des repliements de la chromatine</i>	107
a. FISH, FROS et ANCH-OR	107
b. Les C-techniques	109
c. Le SPRITE	117
d. Le GAM	121
C. <i>Les repliements de la chromatine chez les métazoaires</i>	123
a. Les TADs	123
i. Un TAD, qu'es aquò ?	123
ii. Les séquences insultrices	125
iii. Les modèles de formation des TADs	131
Par extrusion de boucles par les cohésines	131
Par la transcription	131
iv. Quelle fonction pour les TADs établis par les cohésines et CTCF ?	133
v. Les TADs chez <i>D. melanogaster</i>	135
vi. Visualisation des TADs en cellules uniques	139
b. Les compartiments chromatiniens A et B	143
c. Compétition entre les TADs et les compartiments	145
d. Les chromosomes mitotiques	147
e. Les territoires chromosomiques	155

<i>D. Chez la levure</i>	159
a. La conformation « <i>Rabl-like</i> » des chromosomes	159
i. Les centromères	161
ii. Les télomères	163
iii. Le nucléole	163
iv. L'enveloppe et les pores nucléaires	167
b. Les repliements intra-chromosomiques	169
i. Chez <i>S. cerevisiae</i>	169
ii. Chez <i>S. pombe</i>	173
c. L'ADN ribosomique	175
i. Aperçu de la biogénèse des ribosomes	177
ii. Architecture de l'ADNr	177
iii. Organisation au cours du cycle cellulaire par les SMCs	187
RESULTATS	195
CHAPITRE I : LA COHESINE ORGANISE LES CHROMOSOMES	197
A. <i>Préambule</i>	197
B. <i>Publication : Regulation of cohesin-mediated mitotic chromosome folding by Eco1 and other partners</i>	199
C. <i>Résultats supplémentaires</i>	201
CHAPITRE II : LA COHESINE ORGANISE L'ADNR	207
A. <i>Une analyse d'image dédiée pour sonder l'organisation 3D de l'ADNr</i>	207
a. <i>Préambule</i>	207
b. <i>Publication : Quantification of the dynamic behaviour of ribosomal DNA genes and nucleolus during yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cell cycle</i>	208
c. <i>Discussion</i>	209
B. <i>Un rôle additionnel de Pds5 dans l'organisation de l'ADNr</i>	215
a. <i>Préambule</i>	215
b. <i>Résultats supplémentaires</i>	217
c. <i>Discussion</i>	225
DISCUSSION	235
ÉLUCIDER LE MECANISME D'ACTION D'ECO1 DANS L'ORGANISATION DU GENOME	239
A. <i>Eco1 organise-t-elle le génome indépendamment de la réplication ?</i>	239
B. <i>Eco1 organise-t-elle le génome en mitose ?</i>	241
C. <i>Le rôle d'Eco1 dans l'organisation du génome nécessite-t-il son activité acétyl-transférase ?</i>	243
a. <i>Hypothèse 1 : L'activité acétyl-transférase d'Eco1 est requise pour l'organisation du génome</i>	245
i. <i>Eco1 acétyle Pds5</i>	245
ii. <i>Eco1 acétyle les histones</i>	245
b. <i>Hypothèse 2 : L'activité acétyl-transférase d'Eco1 n'est pas requise pour l'organisation du génome</i>	247

i. Eco1 déstabilise l'interface Smc3-Scc1	247
L'ORGANISATION DE L'ADNR PAR LES COMPLEXES SMCS	251
A. <i>Réciprocité entre cohésines et condensines à l'ADNr</i>	251
a. Les cohésines bloquent la progression des condensines sur l'ADN	251
b. Les cohésines sont dérégulées dans le double mutant <i>wpl1Δ, eco1-AID</i>	253
B. <i>L'ADNr comme modèle de l'organisation du génome ?</i>	255
ANNEXES	257
ANNEXE I : PARTIE RESULTATS, STABILISATION DES COHESINES EN G1, SOUCHES ET METHODES	259
ANNEXE II : PARTIE RESULTATS, UN ROLE ADDITIONNEL DE PDS5 DANS L'ORGANISATION DE L'ADNR, SOUCHES ET METHODES	261
ANNEXE III: MEETING REPORT FROM THE FIRST EUROPEAN ODDPOLIS MEETING: TOULOUSE 2018	265
BIBLIOGRAPHIE	267

Liste des figures et des tables

Avant-Propos

Figure 1 : La levure <i>S. cerevisiae</i> comme organisme modèle.	12
-------------------------------------------------------------------	----

Introduction

Chapitre I

Figure 2 : Différentes conformations de la double hélice d'ADN.	18
Figure 3 : Structure du nucléosome.	22
Figure 4 : Structure d'un nucléosome lié à l'histone linker H1.	26
Figure 5 : Flexibilité de la fibre de 10 nm.	30
Figure 6 : Les différents niveaux de compaction, de la double hélice d'ADN au chromosome mitotique.	32
Figure 7 : Les boucles de chromatine compactent le génome.	34
Figure 8 : Hétérochromatine et euchromatine.	36

Chapitre II

Figure 9 : Les différentes étapes du cycle cellulaire.	46
Figure 10 : Schéma décrivant les étapes de la réplication de l'ADN lors de la phase S.	48
Figure 11 : Les étapes de la mitose lors de la division des cellules de mammifère.	52
Figure 12 : Activité des cyclines au cours du cycle cellulaire.	54
Table I : Méthodes de synchronisation classiquement utilisées chez <i>S. cerevisiae</i> et dans différents organismes modèles de laboratoire.	60

Chapitre III

Figure 13 : Récapitulatif des synchronisations de levure utilisées dans l'étude.	62
Figure 14 : La famille des complexes SMCs.	68
Figure 15 : Étapes clés de la découverte de l'architecture des SMCs.	72
Table II : Équivalence des noms des sous-unités des cohésines dans différents organismes modèles.	74
Figure 16 : Schéma de la cohésine associée à ses partenaires.	76
Figure 17 : Différents modèles de conformation de l'anneau de SMCs.	80
Figure 18 : Les mécanismes d'entrée et de sortie de l'ADN de l'anneau de cohésine.	84
Figure 19 : Associations topologique et non topologique des cohésines à l'ADN.	86
Figure 20 : Établissement et abolition de la cohésion chez <i>S. cerevisiae</i> .	88
Figure 21 : Établissement et abolition de la cohésion chez les mammifères.	92
Figure 22 : Modèles de formation des boucles de chromatine par les cohésines.	94
Figure 23 : Différents modèles de translocation des cohésines sur l'ADN.	96

Chapitre IV

Figure 24 : Différentes techniques pour l'étude de l'organisation du génome par microscopie à fluorescence.	106
Figure 25 : Schéma des principales étapes des C-techniques.	108
Figure 26 : Technique de SPRITE.	118
Figure 27 : Technique de GAM.	120
Figure 28 : Les chromosomes sont organisés en TADs.	124

Figure 29 : Conséquences de l'invalidation de CTCF, des cohésines ou de Wpl1 sur la formation des TADs.	126
Figure 30 : Modèle de l'extrusion de boucles par les cohésines.	130
Figure 31 : Nature des TADs chez la drosophile <i>D. melanogaste</i> .	136
Figure 32 : Analyse des TADs en cellules uniques par technique de Hi-M.	138
Figure 33 : Les compartiments A et B.	144
Figure 34 : Compétition entre les TADs et les compartiments pour l'organisation du génome.	146
Figure 35 : Image par MET d'un chromosome métaphasique en milieu hypotonique.	148
Figure 36 : Modélisation de l'extrusion de boucles pour la compaction des chromosomes métaphasiques.	150
Figure 37 : Compaction des chromosomes métaphasiques par les condensines I et II.	152
Figure 38 : Les territoires chromosomiques.	158
Figure 39 : La conformation « <i>Rabl-like</i> » des chromosomes.	160
Figure 40 : Schéma de la biogénèse des ribosomes.	176
Figure 41 : Le locus d'ADNr chez <i>S. cerevisiae</i> .	178
Figure 42 : Protéines enrichies aux séquences IGS1 et IGS2.	180
Figure 43 : Organisation de l'ADNr au cours du cycle cellulaire.	186

Résultats

Figure 44 : Modèle de réorganisation de l'ADNr au cours du cycle cellulaire par les cohésines et les condensines.	190
Figure 45 : Les contacts à longue distance sont favorisés lorsque les cohésines sont stabilisées par invalidation de Wpl1 en G1.	200
Figure 46 : Wpl1 inhibe l'expansion des boucles de chromatine dépendantes des cohésines en G1.	202
Figure 47 : Effets différentiels de l'invalidation de Wpl1 en G1 ou en mitose sur les contacts chromosomiques.	204
Figure 48 : Les cohésines maintiennent l'organisation mitotique de l'ADNr.	216
Figure 49 : Avant la réplication, l'ADNr forme une ligne semblable à celle observée en mitose.	218
Figure 50 : Pds5 est requis pour organiser l'ADNr mitotique.	220
Figure 51 : Pds5 n'est pas requis pour maintenir l'organisation de l'ADNr mitotique.	222
Figure 52 : En absence de Pds5, l'ADNr est hyper-condensé avant la réplication.	224
Figure 53 : La déplétion de Wpl1 et d'Eco1 en G1 ne conduit pas à la formation d'un « <i>puff</i> » en mitose.	226
Figure 54 : Modèle d'organisation de l'ADNr par les condensines et les cohésines au cours du cycle cellulaire.	228

Liste des abréviations

3C	<i>Chromosome Conformation Capture</i>
4C	<i>Circular 3C</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	ADN ribosomique
APC	<i>Anaphase Promoting Complex</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
Cdc	<i>Cell Division Cycle</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CF	<i>Core Factor</i>
ChIP	<i>Chromatin ImmunoPrécipitation</i>
CKI	<i>CDK Inhibitor</i>
CTCF	<i>CCCTC binding Factor</i>
FISH	<i>Fluorescent in Situ Hybridization</i>
Fob1	<i>Fork blocking protein</i>
FROS	<i>Fluorescent Reporter Operator System</i>
<i>GAM</i>	<i>Genome Architecture Mapping</i>
HAWKs	<i>HEAT proteins Associated With Kleisins</i>
Hi-C	<i>High throughput 3C</i>
Hi-M	<i>High-throughput microscopy</i>
HMG	<i>High Mobility Group</i>
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
IGS	<i>InterGenic Spacer</i>
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MPT	Modification Post-Traductionnelle
NPC	<i>Nuclear Pore Complexes</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pol I	ARN polymérase I
Pol II	ARN polymérase II
Pol III	ARN polymérase III
RENT	<i>REgulator of Nucleolar silencing and Telophase exit</i>
RFB	<i>Replication Fork Barrier</i>
SIM	<i>Structured Illuminated Microscopy</i>
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
SPB	<i>Spindle Pole Body</i>
<i>SPRITE</i>	<i>Split-Pool Recognition of Interactions by Tag Extension</i>
STORM	<i>STochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
TAD	<i>Topologically Associating Domain</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
UAF	<i>Upstream Activating Factor</i>

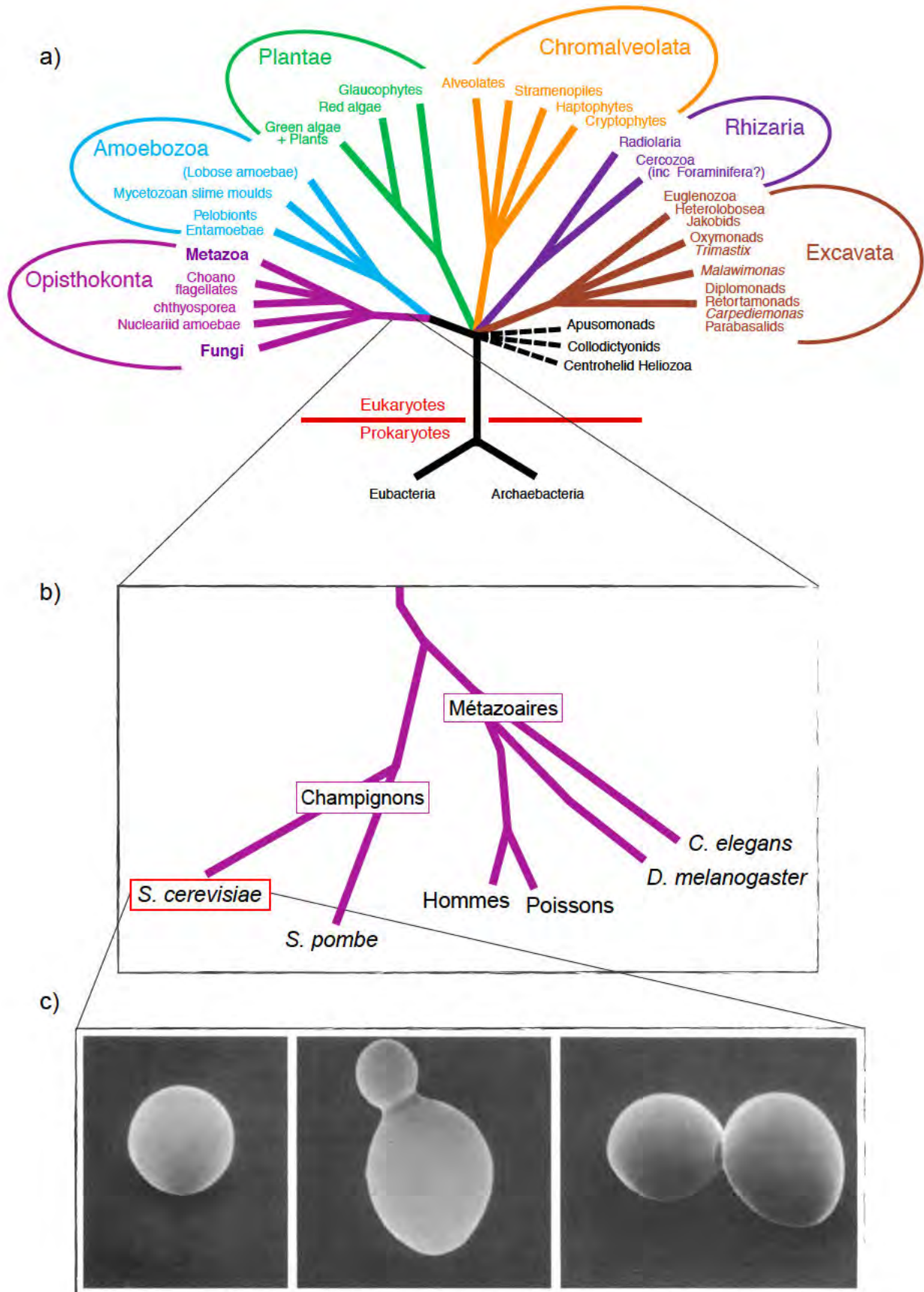


Figure 1 : La levure *S. cerevisiae* comme organisme modèle. a) Arbre évolutif des eucaryotes. Adapté de (Simpson and Roger, 2004). b) Arbre évolutif simplifié des Opisthocontes. La levure utilisée dans l'étude, *S. cerevisiae*, est encadrée en rouge. c) Images de la levure à bourgeon *S. cerevisiae* à différentes phases du cycle cellulaire. (Herskowitz, 1988)

Avant-propos

Depuis la mise en évidence par Flemming en 1882 de la réorganisation massive des chromosomes au cours du cycle cellulaire, élucider l'organisation spatiale du génome dans le noyau des cellules eucaryotes et son importance pour la régulation de processus biologiques essentiels tels que la réparation des lésions à l'ADN, la transcription ou la ségrégation du génome lors de la division cellulaire, est devenu un enjeu majeur des recherches de biologies cellulaire et moléculaire. Pour ce faire, différents modèles d'études sont utilisés tels que des organismes unicellulaires et pluricellulaires appartenant aux sous-domaines des Opisthocontes et des Plantes (Figure 1a). Le sous-domaine des Opisthocontes (du grec « *opisthō* » = derrière et « *kontós* » = flagelle) regroupe les êtres vivants dérivant d'un ancêtre capable de se mouvoir dans un milieu aquatique à l'aide d'un flagelle. Il se divise en plusieurs sous-domaines comprenant les métazoaires et les champignons (Figure 1a). Les métazoaires regroupent l'ensemble des animaux, parmi lesquels les plus utilisés en tant qu'organismes modèles en biologie sont : les cellules humaines en culture, la souris *Mus musculus*, la drosophile *Drosophila melanogaster* ou le nématode *Caenorhabditis elegans*. Parmi les champignons, les deux espèces les plus communément utilisées en laboratoire sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. En référence à leur mode de division, elles sont également appelées respectivement levures à bourgeon et à fission. La dénomination « levure » regroupe l'ensemble des champignons unicellulaires mais n'indique pas une proximité évolutive. Bien que *S. cerevisiae* et *S. pombe* appartiennent toutes deux au règne des champignons, elles ont divergé il y a environ 350 millions d'années, ce qui fait d'elles de lointaines cousines (Figure 1b). D'un point de vue phénotypique, certains processus cellulaires présents chez *S. pombe* apparaissent plus proches de ceux des métazoaires que de *S. cerevisiae*. La levure *S. pombe* a conservé la machinerie d'interférence à l'ARN et la structure des centromères et de l'hétérochromatine est comparable à celle des métazoaires. C'est également un bon modèle pour l'étude de la formation et de la régulation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire. Par ailleurs, la levure *S. cerevisiae* est largement utilisée pour des applications industrielles. C'est un modèle génétique puissant dont les principaux processus biologiques sont conservés dans l'évolution. L'étude de *S. cerevisiae* a notamment permis de grandes avancées en biologie dans des domaines aussi vastes que la transcription, la réplication ou la biogénèse des ribosomes. Ainsi l'étude de ces deux organismes modèles est pertinente à la fois pour comprendre leurs caractéristiques propres mais également pour analyser des processus conservés dans l'évolution. A

titre d'exemple, les mécanismes de régulation du cycle cellulaire ont pu être dévoilés grâce à l'analyse simultanée de *S. cerevisiae* et de *S. pombe*.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai utilisé la levure *S. cerevisiae* (Figure 1c) afin d'approfondir le rôle du complexe cohésine dans l'organisation tridimensionnelle du génome. Le complexe cohésine est un complexe conservé évolutivement, essentiel à la viabilité cellulaire, en forme d'anneau et capable de lier deux brins d'ADN. Bien que son implication dans l'organisation du génome soit aujourd'hui établie, son mécanisme d'action n'est pas élucidé. Dans ce manuscrit sont exposées les données que nous avons pu apporter, à la fois sur la régulation des cohésines et sur l'organisation du génome de la levure à bourgeon. Dans une première partie introductive, nous décrirons les principaux niveaux de repliement de la fibre d'ADN dans le noyau et détaillerons le complexe cohésine ainsi que ces fonctions. L'aspect temporel de la réorganisation des chromosomes, lié à la progression du cycle cellulaire, y est également abordé. Ces notions seront mises en perspectives dans différents organismes modèles tels que la levure évidemment mais aussi les cellules de mammifères ou la drosophile. Cette introduction ne se veut pas exhaustive mais a pour but d'introduire les notions nécessaires à une meilleure compréhension des résultats. Les travaux réalisés au cours de la thèse sont présentés dans une seconde partie. Ils s'articulent autour de deux articles scientifiques. Le premier décrit la régulation des cohésines dans leur fonction d'organisation du génome, le second est axé sur l'étude de l'organisation spatiale d'une région spécifique du génome, l'ADN ribosomique. Des résultats supplémentaires sont également présentés en marge de ces deux articles. Enfin une partie discussion permettra de replacer ces travaux dans une plus large perspective.

INTRODUCTION

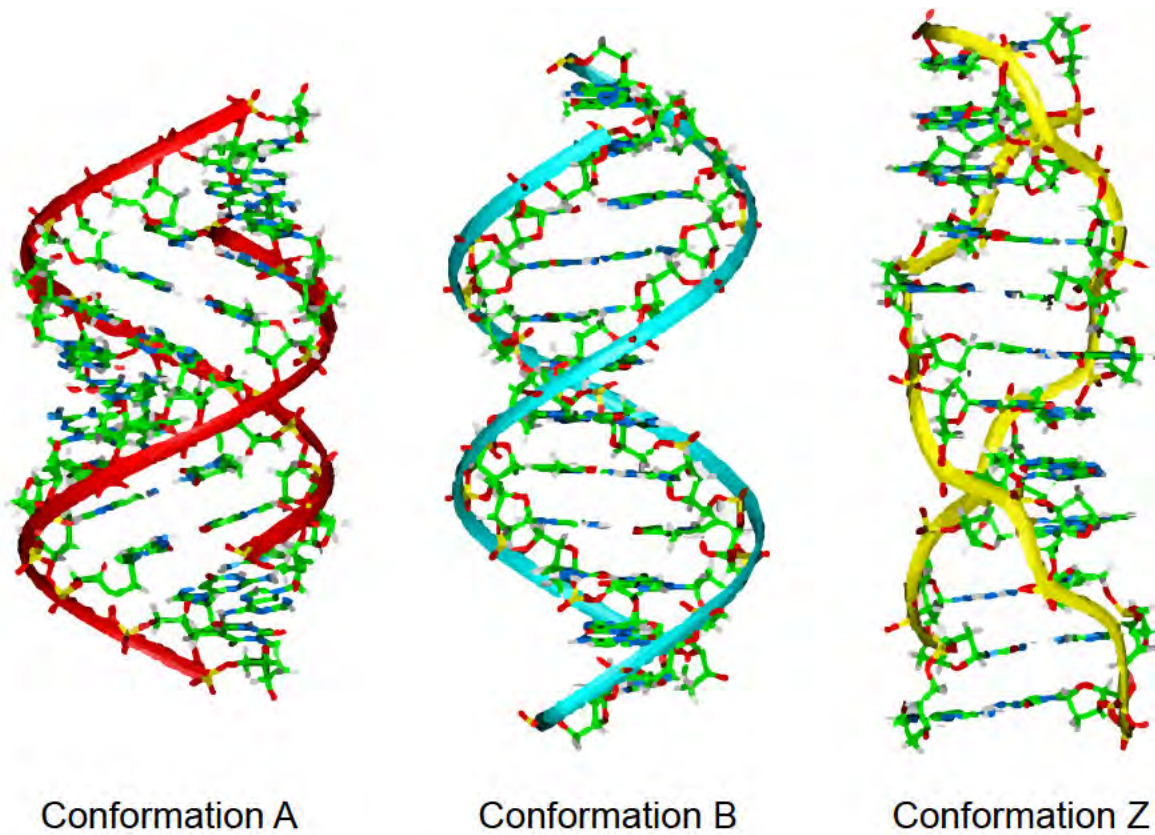


Figure 2 : Différentes conformations de la double hélice d'ADN. Exemples de conformations d'ADN retrouvées *in vivo* : la B est la plus répandue, la A est sa forme déshydratée et la Z, favorisée dans les séquences riches en GC, est dite en zig-zag. Adapté de https://fr.wikipedia.org/wiki/ADN_Z.

Chapitre I : Architecture du chromosome

A. La double hélice d'ADN

C'est en 1952 que Hershey et Chase identifient la molécule d'ADN comme support héréditaire de l'information génétique. En marquant radioactivement soit l'ADN soit les protéines de phages T2, les auteurs ont montré que le transfert d'ADN, et non de protéines, était requis pour la croissance des phages dans des bactéries infectées (Hershey and Chase, 1952). Dix ans plus tard, dans les années 60, Khorana, Nirenberg et Holley « interprétèrent le code génétique et sa fonction dans la synthèse protéique », en établissant le lien entre ADN, ARN et protéines. Cette découverte majeure leur valut l'obtention du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1968 (Raju, 1999).

L'histoire de la découverte de l'ADN commence bien plus tôt, en 1869, lorsque Meischer étudie la composition biochimique des leucocytes. En testant de nombreuses conditions d'extraction des constituants de ces cellules, il constate la formation d'un précipité blanc en condition acide. N'ayant pas les mêmes propriétés que les protéines ou les lipides connus jusque-là, Meischer conclut à l'identification d'une nouvelle molécule organique. Il montre ensuite que cette molécule est riche en phosphates, localisée dans le noyau des cellules et la nomme « *nuclein* » ((Miescher-Rüsch, 1871), pour revue (Dahm, 2008)). Puis Levene décrit en 1919 le nucléotide comme unité de base de l'ADN. Un nucléotide est constitué d'un groupement phosphate, d'un sucre (désoxyribose dans l'ADN) et d'une base azotée (parmi quatre : adénosine (A), thyrosine (T), guanine (G) et cytosine (C) (Levene, 1919)). Enfin Chargaff montre que les bases A et G sont présentes dans les tissus en mêmes quantités que les T et C respectivement (Chargaff, 1950). Toutes ces études, en n'oubliant évidemment pas les clichés révélateurs acquis par Rosalind Franklin and Maurice Wilkins, ont mené Watson et Crick à la découverte de la structure en double hélice de la molécule d'ADN par diffractions aux rayons X en 1953 ((Watson and Crick, 1953), pour revue (Pray, 2008)).

Dans cette étude, les auteurs décrivent une conformation d'ADN dite de type B (Figure 2, centre) : les bases A s'appariant avec les bases T et les bases G avec les bases C forment des plateaux au centre de l'hélice, perpendiculairement à son axe. Les groupements phosphate sont disposés vers l'extérieur et constituent l'ossature de l'hélice, d'orientation droite. De plus, les deux brins d'ADN ont une orientation antiparallèle (on distingue les extrémités 5'-phosphate et 3'-OH).

Chaque tour comprend 10 nucléotides (Watson and Crick, 1953). Toutefois, la molécule d'ADN est dynamique et de nombreuses autres conformations peuvent être générées en modifiant la géométrie et les liaisons hydrogènes entre les deux bases (Ghosh and Bansal, 2003). Même si une vingtaine de conformations différentes ont pu être décrites, seules trois sont majoritairement observées *in vivo* : les conformations A, B et Z (Ha et al., 2005; Rich and Zhang, 2003; Richmond and Davey, 2003; Wood, 2016). La conformation A correspondrait à la forme déshydratée de la conformation B. Les bases sont inclinées, déplacées de l'axe de l'hélice et sa structure est légèrement plus lâche, avec 11 nucléotides par tour (Figure 2, gauche (Ghosh and Bansal, 2003; Wood, 2016)). La conformation Z est retrouvée au niveau des répétitions G-C-G-C et est stabilisée par les super-enroulements négatifs. Elle est orientée vers la gauche et son ossature forme un zig-zag (Figure 2, droite (Ghosh and Bansal, 2003; Ha et al., 2005; Rich and Zhang, 2003)).

La conformation B est la plus répandue dans le monde vivant (Wood, 2016). Dans cette conformation, deux nucléotides adjacents sont séparés de 0,34 nm (Watson and Crick, 1953). Sachant que le génome humain comprend six milliards de paires de bases (pb), chaque cellule de notre corps contient près de 2 mètres d'ADN linéaire répartis sur 23 paires de chromosomes. Afin d'être « rangées » dans un noyau de 10 μm de longueur, ces longues molécules d'ADN doivent être compactées par un facteur 1 000. Le niveau de compaction de l'ADN peut même atteindre un facteur 10 000 au moment de la division cellulaire. Malgré son fort niveau de compaction, la séquence d'ADN doit rester accessible aux machineries de transcription, de réplication et de réparation. Ainsi, la compaction de l'ADN n'est pas aléatoire dans le noyau des cellules mais requiert un haut degré de régulation. Nous précisons que le terme de *compaction* employé ici et dans le reste du manuscrit fait référence à la restriction du *volume* occupé par l'ADN, sans modification des interactions chimiques. Le terme de *condensation* fait lui référence à la modification des interactions chimiques au sein d'une molécule, conduisant à sa séparation du solvant (par exemple, formation d'un précipité).

B. Les histones

De par sa forte teneur en groupements phosphate, la molécule d'ADN est couverte de charges négatives. Ce fort chargement polarisé provoque des répulsions électrostatiques et empêche le repliement de la molécule sur elle-même (Bloomfield, 1996). Néanmoins, l'ADN se condense *in vitro* lors de son incubation avec des cations (ions chargés positivement) (Wilson and

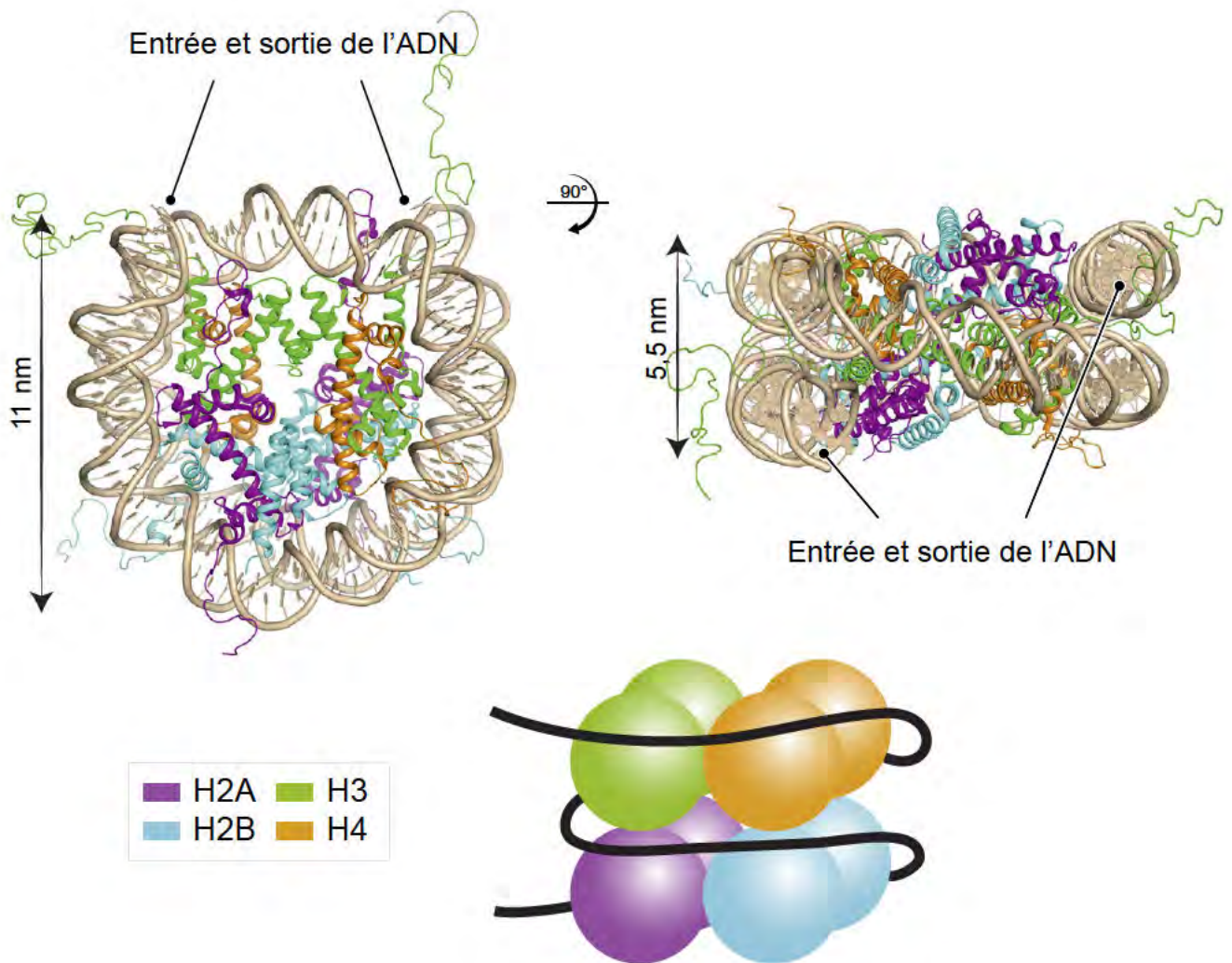


Figure 3 : Structure du nucléosome. Structure cristallographique d'un nucléosome, composé de 147 pb d'ADN enroulés autour d'un octamère d'histones. Gauche: vue de dessus, droite: vue de côté (Speranzini et al., 2016), bas: schéma d'un nucléosome. Les sphères représentent les histones canoniques selon le code couleur indiqué à gauche et la ligne noire représente l'ADN.

Bloomfield, 1979). Ceci suggère que la neutralisation des charges négatives est nécessaire pour la condensation de l'ADN. *In vivo*, cette neutralisation de charges est induite par la liaison à l'ADN de nombreuses protéines chargées positivement : les histones. L'association de l'ADN avec des protéines est appelée *chromatine*.

a. Le nucléosome

Les histones sont de petites protéines basiques d'environ 15 kDa très conservées chez les eucaryotes. Leur partie C-terminale est repliée en trois hélices α qui forment un motif spécifique (« *histone fold motif* ») leur permettant d'interagir entre elles et avec l'ADN (Luger et al., 1997). Il existe quatre histones dites canoniques : H2A, H2B, H3 et H4 (DeLange and Smith, 1971). Deux hétéro-dimères H2A/H2B s'associent avec un tétramère H3/H4 pour former un octamère d'histones (Figure 3, (Kornberg and Thomas, 1974)). La structure formée par l'enroulement de 146/147 pb d'ADN autour de cet octamère (en 1,7 tour) est appelée nucléosome et est considérée comme le premier niveau de condensation de l'ADN (Kornberg, 1974; Olins and Olins, 1974; Oudet et al., 1975). Un nucléosome forme un cylindre de 5,5 nm de hauteur et 11 nm de diamètre (Olins and Olins, 2003). Sa structure cristallographique a été révélée en 1997 à 2,8 Å de résolution (Luger et al., 1997), avant d'être affinée à 1,9 Å (Davey et al., 2002). Alors que le repliement de l'ADN autour de l'octamère d'histones paraît relativement uniforme entre les nucléosomes, l'angle avec lequel l'ADN sort du nucléosome peut, lui, varier. Comme nous allons le voir plus loin, ce paramètre peut jouer un rôle important dans l'organisation de la fibre nucléosomale.

b. Les modifications post-traductionnelles d'histones

L'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones modifie la courbure de l'hélice et bloque l'accès à la séquence nucléotidique, pourtant nécessaire au recrutement des facteurs de transcription ou de réparation (Richmond and Davey, 2003). En effet, le grand sillon de l'ADN donnant accès aux bases de l'ADN n'est pas accessible depuis le solvant. L'association entre les histones et l'ADN doit donc être remodelée pour permettre l'accessibilité aux séquences nucléotidiques. Pour cela, la partie N-terminale des histones, riche en résidus chargés positivement (lysines et arginines), subit des modifications post-traductionnelles (MPT) (Davey et al., 2002; Luger et al., 1997). Ces modifications (méthylation, acétylation, phosphorylation...) influent sur l'état de charge, la structure tridimensionnelle ou l'association des nucléosomes à d'autres facteurs

protéiques (Hansen et al., 1998). Par exemple, l'acétylation des histones réduit leur association avec l'ADN et favorise l'accès des facteurs protéiques à la séquence nucléotidique lors de certains processus tels que la transcription ou la réplication. Cependant, une même MPT peut également conduire à des effets contraires selon le résidu ciblé. A titre d'exemple, la marque H3K4me est associée à des régions chromatiniennes actives en transcription alors que H3K27me est généralement enrichie au niveau de régions réprimées (pour revue (Kouzarides, 2007)). La régulation des MPT des histones est donc un processus très complexe. Le lien entre les modifications des histones, leur effet sur la chromatine et la régulation de processus biologiques a été nommé « codes des histones » (Strahl and Allis, 2000).

L'accessibilité à la séquence d'ADN est également favorisée par l'action de « remodeleurs » de la chromatine qui déplacent ou dissocient les nucléosomes, permettant le recrutement de facteurs spécifiques tels que les polymérases. Les nucléosomes sont ensuite réassemblés à la fin du processus (e.g. la transcription d'un gène) (pour revue (Kouzarides, 2007)).

c. Les variants d'histones

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont dites « canoniques » car elles composent la grande majorité des nucléosomes. Il existe également des formes non canoniques, appelées « variants » d'histones. A ce jour, des variants d'H2A, H2B et H3 ont été reportés chez les mammifères mais aucun pour H4. Ces variants peuvent être enrichis sur des séquences spécifiques comme les centromères (CENP-A), l'ADN ribosomique (macroH2A.1) ou peuvent réguler des processus tels que la réparation des cassures d'ADN double brins (H2A.X) et la transcription (H2A.Z). D'autres jouent un rôle lors du développement (H3.3) ou ne sont exprimés que dans des tissus spécifiques (H2B.W). A noter que ces variants d'histones peuvent également subir des MPT, la reconnaissance de la forme phosphorylée de H2A.X (γ H2A.X) étant une des premières étapes de la réponse aux cassures d'ADN double brins (pour revue (Buschbeck and Hake, 2017)). La levure à bourgeon ne possède que deux variants d'histones : Cse4 et Htz1. Cse4 (l'orthologue de CENP-A) est incorporé dans les nucléosomes centromériques et joue un rôle primordial dans l'assemblage des kinétochores (Meluh et al., 1998) alors que Htz1 (l'orthologue de H2A.Z) est impliqué dans l'activation de la transcription et le remodelage de la chromatine (Santisteban et al., 2000).

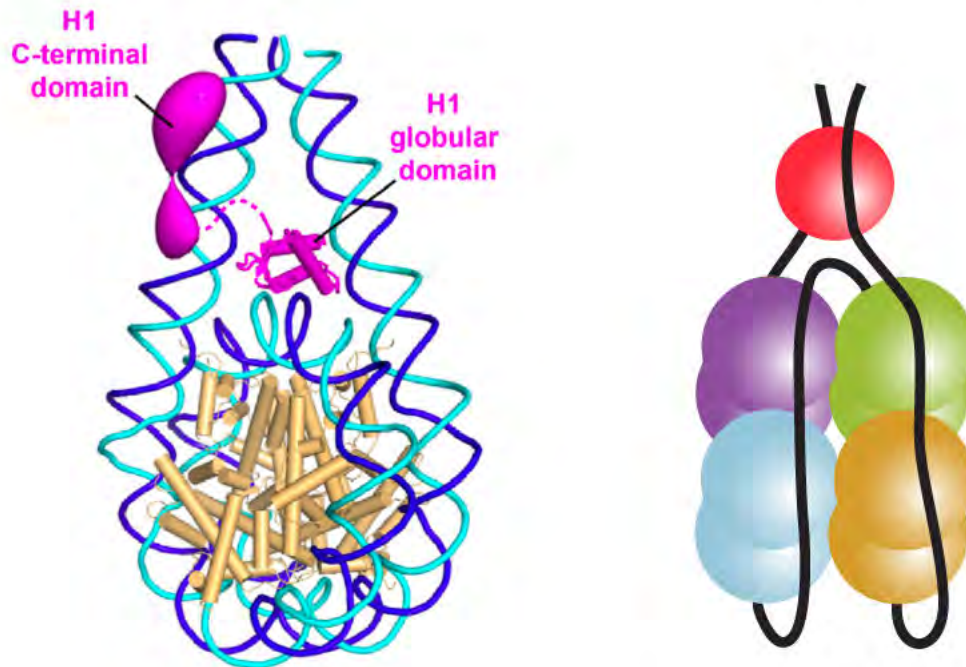


Figure 4 : Structure d'un nucléosome lié à l'histone linker H1. Gauche: structure cristallographique adaptée de (Bednar et al., 2017). Droite: schéma. Le nucléosome est représenté comme Figure 3 et l'histone linker H1 par la sphère rouge.

d. L'histone H1

Il existe une cinquième histone, H1, dite histone de liaison ou « *linker* ». Elle est beaucoup moins conservée que ses homologues canoniques et se structure en trois domaines : un domaine globulaire central et deux extensions N- et C-terminales (Allan et al., 1980). Chez les mammifères on compte onze sous-types de l'histone H1, exprimés dans différents tissus ou impliqués dans divers processus tels que la réparation de l'ADN, la compaction des chromosomes en mitose ou l'expression génique (pour revue (Schneider et al., 2015)). La levure *S. cerevisiae* ne compte qu'une histone linker, Hho1 (Landsman, 1996; Patterton et al., 1998) et *S. pombe* en semble dépourvue (Godde and Widom, 1992). Le domaine globulaire de H1 fixe les deux régions d'ADN libres à l'entrée et à la sortie du nucléosome (extrémités 5' et 3' d'un nucléosome), sur environ 10 pb chacune. Cela permet l'enroulement en deux tours complets d'environ 165-168 pb d'ADN autour de l'octamère d'histones (Figure 4, (Allan et al., 1980; Bednar et al., 2017; Simpson, 1978)). La liaison d'H1 induit une stabilisation du nucléosome et est généralement associée à une fibre d'ADN compactée et réprimée transcriptionnellement (Schlissel and Brown, 1984). Chez l'homme le ratio histones canoniques/H1 est proche de 1, indiquant que la plupart des nucléosomes est associée à une molécule H1 (Bates and Thomas, 1981). Ce ratio peut néanmoins varier en fonction de l'état transcriptionnel d'une séquence, dans différents types cellulaires ou selon les conditions de croissance (Woodcock et al., 2006). Chez la levure *S. cerevisiae* ce ratio est réduit, avec la liaison d'une molécule Hho1 tous les 4 ou 37 nucléosomes selon les études (Downs et al., 2003; Freidkin and Katcoff, 2001). Les histones linkers peuvent également subir des MPT qui influencent leur liaison à l'ADN ou leur association avec d'autres facteurs (pour revues, (Hergeth and Schneider, 2015; Woodcock et al., 2006)).

Il existe une autre famille de protéines capables de lier l'ADN laissé libre entre les nucléosomes, les HMG (« *High Mobility Group* »). Ces protéines ont été définies sur la base de leur forte migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Goodwin et al., 1973). Les membres de cette famille sont composés d'au moins une boîte HMG qui leur confère une capacité de liaison à l'ADN (Read et al., 1993). Les boîtes HMG lient le petit sillon de l'ADN, indépendamment de sa séquence et préférentiellement au niveau de structures particulières de l'ADN telles que les jonctions à quatre voies, l'ADN modifié par du cis-platine ou les points d'entrée et de sortie du nucléosome ((Nightingale et al., 1996), pour revues (Bustin, 1999; Thomas

and Travers, 2001)). La liaison des protéines HMG dans le petit sillon de l'ADN peut provoquer l'ouverture locale de l'hélice d'ADN et la courbure de la fibre. Les régions liées par les protéines HMG sont généralement considérées comme décondensées, notamment car ces protéines entrent en compétition avec l'histone H1 pour leur liaison à l'ADN ((Jackson et al., 1979), pour revue (Travers, 2003)). Toute comme l'histone H1, les protéines HMG sont donc des protéines architecturales jouant un rôle important dans l'organisation de la fibre nucléosomale. Toutefois, les protéines HMG sont très dynamiques, avec un temps de résidence sur l'ADN d'environ 30 secondes contre 8 minutes pour H1 et jusqu'à plusieurs heures pour H2A (Misteli et al., 2000; Phair and Misteli, 2000).

La formation du nucléosome et son association avec les protéines H1 ou HMG ne représentent que le premier degré de compaction de l'ADN dans le noyau. Dans les sections suivantes, nous allons aborder les niveaux supérieurs de compaction de la fibre requis pour établir des structures ordonnées et compactes telles que les chromosomes mitotiques.

C. La fibre de 10 nm

La fibre composée d'une succession de nucléosomes et d'ADN libre a été décrite comme un « collier de perle » en microscopie électronique à transmission (MET) (Olins and Olins, 1974). De nos jours, on la nomme « fibre de 10 nm », en faisant référence à son diamètre, de la taille des nucléosomes.

Le positionnement des nucléosomes le long de la fibre est variable. En effet, les histones peuvent s'associer à une grande variété de séquences nucléotidiques. Cependant, elles ne lient pas toutes les séquences avec la même affinité et ont donc un positionnement préférentiel sur l'ADN. Ainsi une séquence d'ADN présentant une courbure naturelle de la double hélice (par exemple une séquence riche en A et T) est incorporée plus facilement dans le nucléosome et l'interaction histones-ADN qui en résulte est stabilisée (Segal et al., 2006; Widom, 2001). Par conséquent les nucléosomes ne sont pas formés de manière régulière le long de la fibre, leur positionnement est irrégulier.

L'agencement des nucléosomes entre eux est également modulable. L'angle entre les séquences entrante et sortante d'un nucléosome, la longueur d'ADN séparant deux nucléosomes ou l'angle de rotation entre deux nucléosomes adjacents déterminent l'organisation

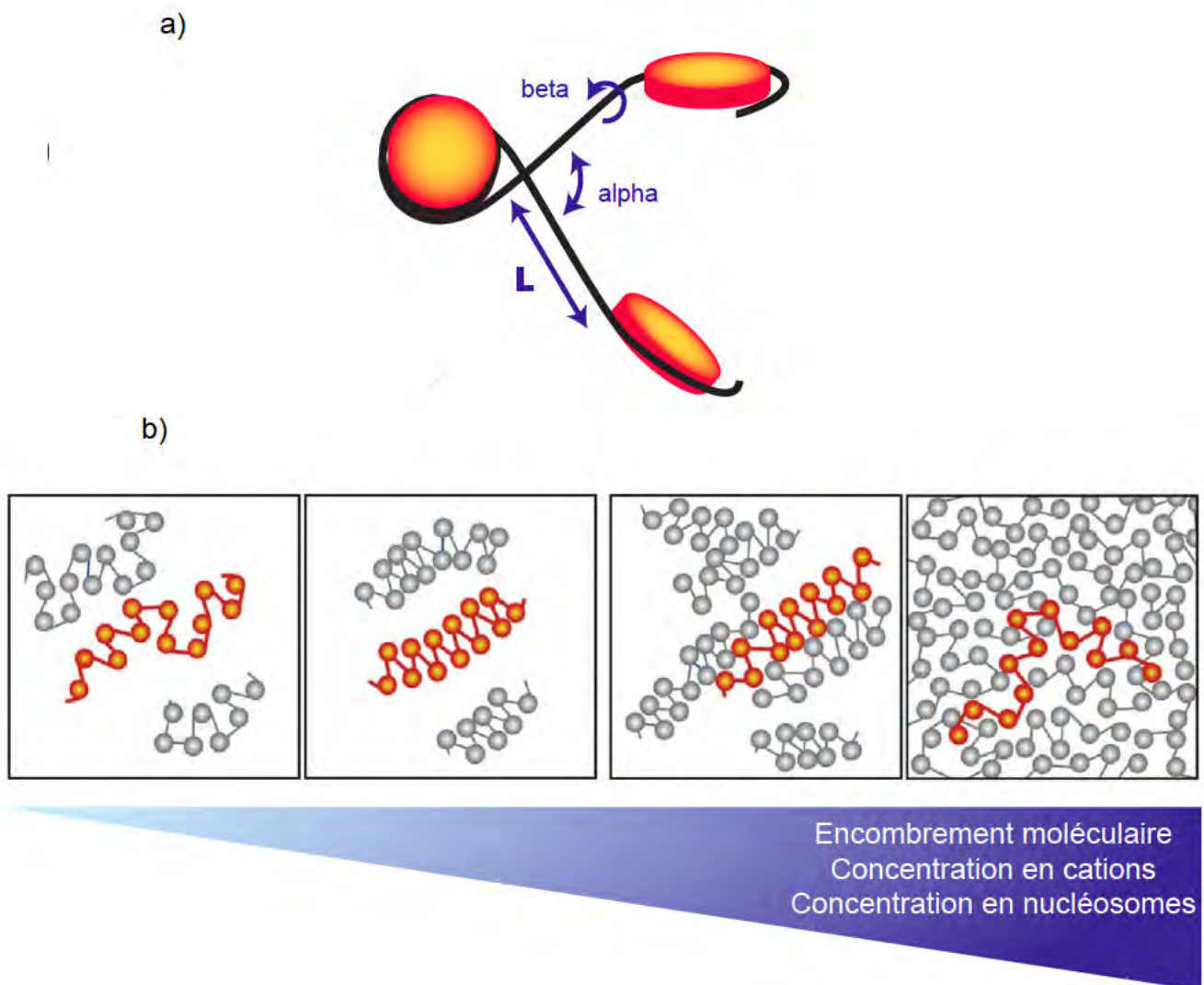


Figure 5 : Flexibilité de la fibre de 10 nm. a) La longueur entre deux nucléosomes (L), l'angle entre trois nucléosomes (α) et l'angle de rotation entre deux nucléosomes (β) sont dynamiques. Adapté de (Woodcock et al., 1993). b) En conditions diluées en nucléosomes et en cations les répulsions électrostatiques entre nucléosomes empêchent les repliements intra-fibres. Lors de l'augmentation de la concentration en cations les charges électrostatiques sont neutralisées, les nucléosomes établissent des contacts intra-fibres qui conduisent à la formation de fibres de 30 nm. Dans le cas où la concentration en fibres d'ADN est élevée (par accroissement de la concentration en cations ou de l'agglomération des fibres nucléosomales), les nucléosomes établissent des interactions inter-fibres qui interfèrent avec les repliements intra-fibres. Les nucléosomes des fibres adjacentes s'inter-mêlent et les fibres d'ADN forment alors des polymères flexibles. Adapté de (Nishino et al., 2012).

tridimensionnelle de la fibre (Figure 5a, (Barbi et al., 2012; Woodcock et al., 1993)). Enfin, le ratio nucléosomes/H1 influence également l'organisation des nucléosomes sur la fibre (Hansen, 2002; Woodcock et al., 2006).

La fibre de 10 nm est dynamique et son étude *ex vivo* peut conduire à la formation de conformations irrégulières n'existant pas, ou peu, *in vivo*. Ceci a notamment été le cas en 1976 lorsque Finch et Klug décrivent, par étalement de chromatine et visualisation en MET, un état de compaction supérieur de la fibre de 10 nm : une fibre de 30 nm (Finch and Klug, 1976). Selon leur modèle, elle serait établie par des nucléosomes ordonnés, formant un solénoïde de 33 nm de diamètre. Au sein de ce solénoïde, les nucléosomes pourraient soit former une hélice (deux nucléosomes consécutifs sont alors proches dans l'espace) soit s'arranger en zig-zag (deux nucléosomes consécutifs sont alors disposés de part et d'autre de l'axe du solénoïde) (Robinson et al., 2006; Schalch et al., 2005). Après des décennies de recherche, le repliement de l'ADN en fibres de 30 nm n'a pu être détecté que dans quelques types cellulaires (Horowitz et al., 1994; Kizilyaprak et al., 2010) et l'hypothèse selon laquelle il représenterait le mode de compaction prépondérant de la chromatine *in vivo* est peu probable. En effet, différentes études de cryo-MET sur cellules de mammifères ont rapporté la présence *in situ* de fibres de 10 nm et non pas de 30 nm (Eltsov et al., 2008; McDowall et al., 1986). Les mêmes conclusions ont pu être avancées après analyse de chromosomes mitotiques par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, « *Small Angle X-rays Scattering* ») ((Nishino et al., 2012), pour revue (Joti et al., 2012)). En réalité, la fibre de 30 nm représenterait un état métastable, favorisé par la préparation de la chromatine *in vitro*. Plusieurs arguments peuvent être avancés pour expliquer cela. Premièrement, lorsque la concentration en sels est basse, elle favorise l'interaction entre les nucléosomes et la formation de structures compactes comme la fibre de 30 nm. Au contraire, lorsqu'elle est élevée, elle favorise la formation d'amas de nucléosomes non ordonnés (Figure 5b (Hansen, 2002; Maeshima et al., 2016)). Deuxièmement, le positionnement régulier des nucléosomes permettrait la formation d'une fibre ordonnée *in vitro*. En revanche, un tel positionnement n'est pas observé *in vivo* (voir plus haut, (Hansen, 2002)). Enfin, les MPT (Shogren-Knaak et al., 2006) des histones et la présence *in vivo* de protéines courbant l'ADN (Bajpai et al., 2017) compromettraient l'établissement d'une structure comme la fibre de 30 nm (pour revue (Maeshima et al., 2019)). Ainsi, même si la possibilité n'est pas exclue qu'elle se forme *in vivo* dans certaines conditions spécifiques, la fibre de 30 nm ne

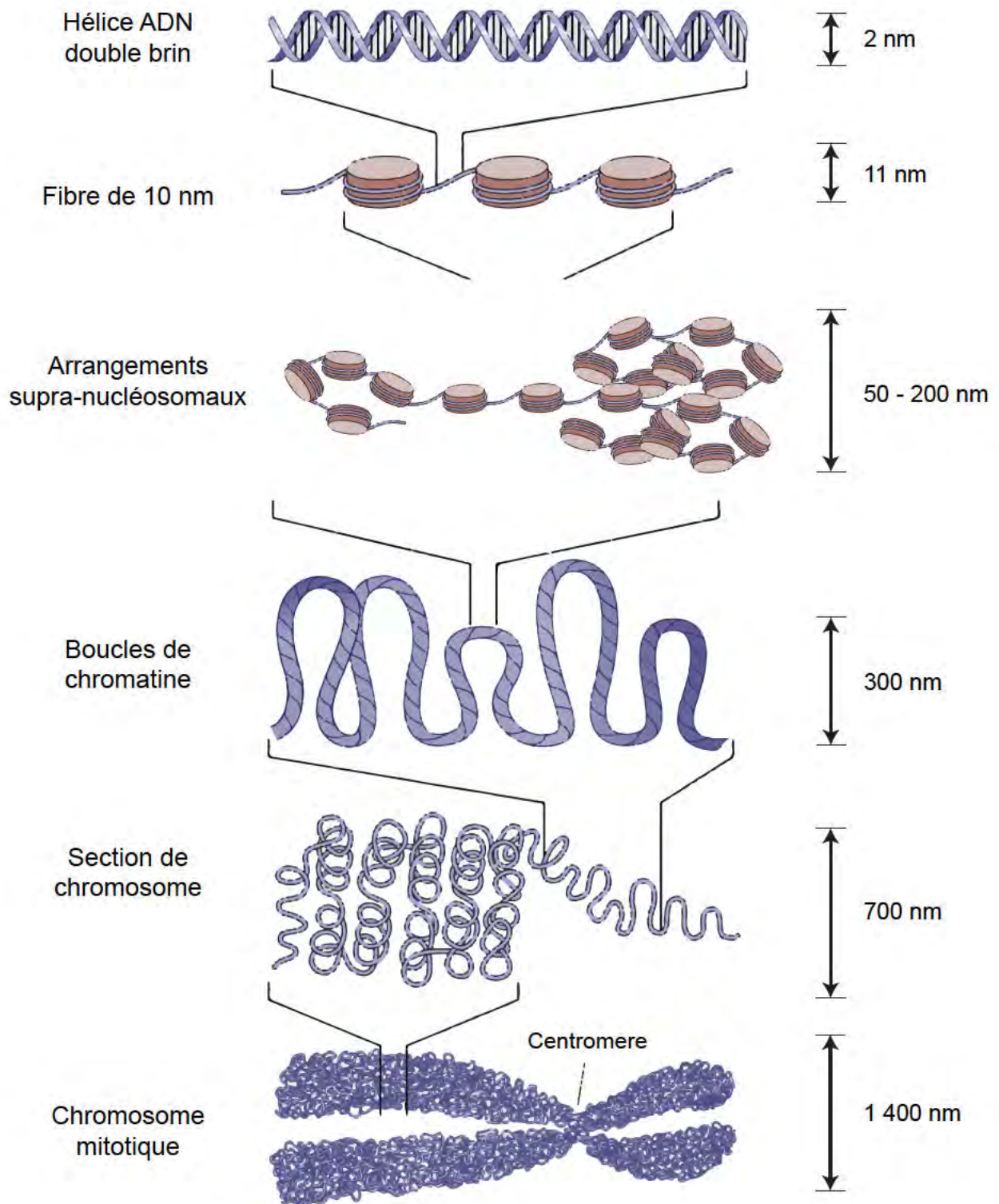


Figure 6 : Les différents niveaux de compaction, de la double hélice d'ADN au chromosome mitotique. La double hélice d'ADN se replie en une fibre de 10 nm *via* son association avec les histones. La formation de clusters de nucléosomes, leur coalescence et l'établissement de boucles de chromatine représentent les niveaux supérieurs de la compaction de la chromatine. Adapté de (Jansen and Verstrepen, 2011).

semble pas être l'état prédominant de compaction de la fibre de 10 nm. Cependant, cette dernière doit subir d'autres types de compaction pour s'adapter à l'espace nucléaire.

D. De la fibre de 10 nm et vers au-delà

a. Arrangement supra-nucléosomaux

Un nombre croissant d'études semble favoriser un modèle alternatif pour l'organisation de la chromatine *in vivo*, dans lequel elle ne serait pas compactée uniformément dans le noyau mais adopterait différents degrés de compaction. Dans ce modèle, les nucléosomes s'assembleraient en clusters qui, en interagissant entre eux, pourraient former des globules de plus grande taille. Une étude réalisée par MET sur des cellules humaines a révélé que la chromatine pouvait adopter différents niveaux de compaction au sein d'un même noyau (Ou et al., 2017). Les auteurs ont pu observer des fibres de chromatine de densités et de diamètres variables (de 5 à 24 nm), dans lesquelles les nucléosomes adoptaient différentes conformations. Plusieurs niveaux d'organisation de la chromatine ont pu également être révélés en microscopie à fluorescence à haute résolution (Fang et al., 2018; Ricci et al., 2015). Dans ces deux études, les auteurs ont utilisé la technologie de STORM (« *STochastic Optical Reconstruction Microscopy* »), basée sur l'illumination aléatoire de fluorophores et leur détection pointilliste. Ils ont mis en évidence l'existence de clusters de quelques nucléosomes et de globules de plus grande taille, formés par l'agglomération de ces clusters. Les différents niveaux d'association des nucléosomes ont pu être reconstitués *in vitro* avec des fibres d'ADN extraites d'érythrocytes de poulet et composées de 12 nucléosomes (Maeshima et al., 2016). En fonction de la concentration en sels, ces fibres d'ADN s'associent et forment des « oligomères » de tailles pouvant varier entre 50 et 1000 nm de diamètre.

La compaction hétérogène de la chromatine semble être un mécanisme conservé dans l'évolution. Elle a également été observée par cryo-MET chez la levure à fission *S. pombe* (Cai et al., 2018) et chez la levure à bourgeon *S. cerevisiae* (Chen et al., 2016). Enfin, des techniques de Capture de chromosomes (C-techniques, détaillées dans le Chapitre IV de cette Introduction) ont également conforté ce modèle avec notamment l'étude de Hsieh *et al.* qui, après traitement des cellules à la nucléase micrococcale (MNase), a pu montrer que le génome de *S. cerevisiae* n'était pas compacté de manière homogène mais s'organisait en des domaines d'interaction de taille variable, dont l'unité de base semble être des clusters de 3-4 nucléosomes (Dekker, 2008; Hsieh et al., 2015).

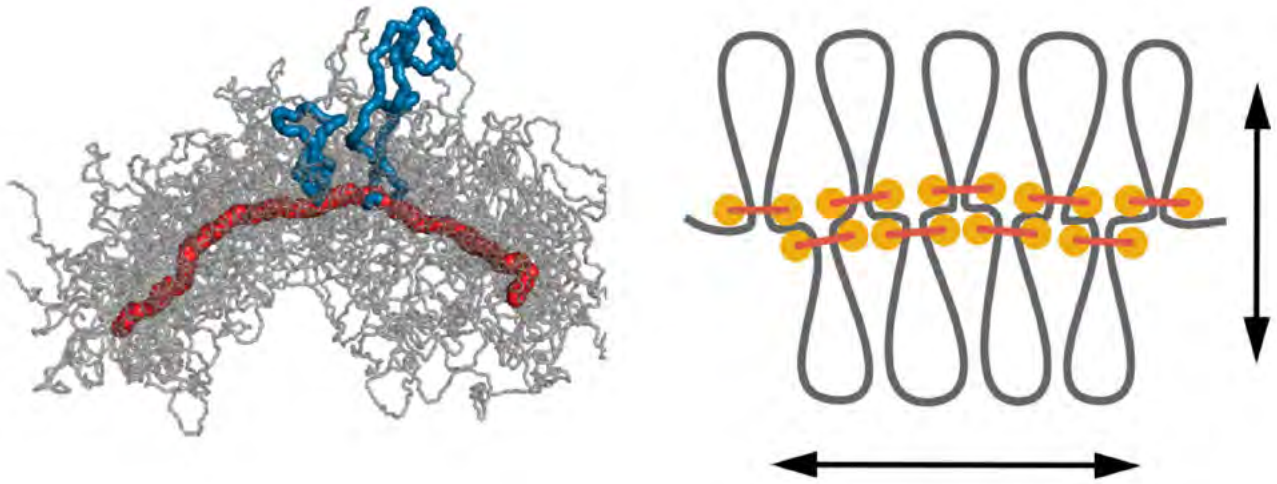


Figure 7 : Les boucles de chromatine compactent le génome. La compaction des chromosomes mitotiques est assurée par l'établissement de boucles de chromatine ordonnées (Goloborodko et al., 2016a).

Toutes ces études pointent vers un modèle selon lequel la fibre de 10 nm serait l'état de compaction de base de la chromatine. Une compaction d'ordre supérieur serait opérée par des interactions inter-nucléosomales irrégulières (à opposer aux arrangements périodiques de la fibre de 30 nm), menant à la formation de clusters puis de globules de grandes tailles (Figure 6, arrangements supra-nucléosomaux). De nombreux facteurs peuvent réguler l'association entre les nucléosomes, tels que les MPT des histones, la liaison de l'histone H1 ou l'état transcriptionnel des gènes (Nozaki et al., 2017).

b. Boucles de chromatine

Au-delà de la formation de clusters de nucléosomes, la fibre de 10 nm peut être compactée par la formation de boucles de chromatine (Figure 6). En effet, l'accumulation de multiples boucles de chromatine le long des bras des chromosomes permet une compaction de ce dernier. Le haut degré de compaction des chromosomes mitotiques est notamment assuré par la compaction de la fibre de 10 nm en une multitude de boucles organisées le long de l'axe du chromosome (Figure 7, (Earnshaw and Laemmli, 1983; Gibcus et al., 2018)). Les mécanismes de formation et de régulation des boucles de chromosomes ainsi que leur impact sur l'organisation du génome sont détaillés en Chapitre IV de cette partie.

c. Euchromatine et hétérochromatine

i. Chez les mammifères

Au-delà de la description structurale des fibres d'ADN et de chromatine, l'organisation du génome peut également être appréhendée par l'observation cytologique des chromosomes dans le noyau. Cela a permis d'identifier deux conformations chromatiniennes au sein des noyaux : l'euchromatine et l'hétérochromatine (Heitz, 1928). L'hétérochromatine fait référence à un état compacté. Elle apparaît dense aux électrons après contraste aux métaux lourds et visualisation en MET et forme des masses sombres à la périphérie du noyau et des nucléoles dans les cellules de mammifères. Au contraire l'euchromatine est décompactée, elle apparaît peu contrastée en MET et est généralement située au centre du noyau (Figure 8a, (Porter et al., 1945)). Dans les cellules de mammifères on emploie également le terme de « compartiment » pour distinguer ces deux états chromatiniens. Le compartiment A fait référence à l'euchromatine et le B à l'hétérochromatine ((Lieberman-Aiden et al., 2009), explicités dans le Chapitre IV de cette Introduction).

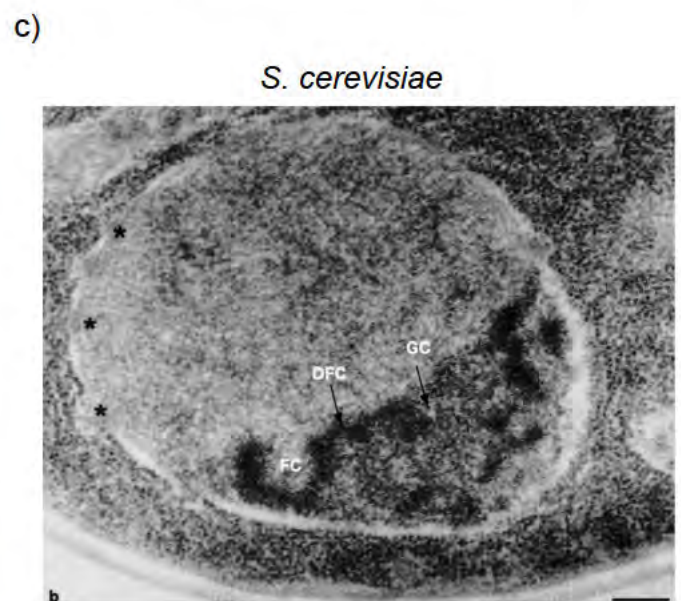
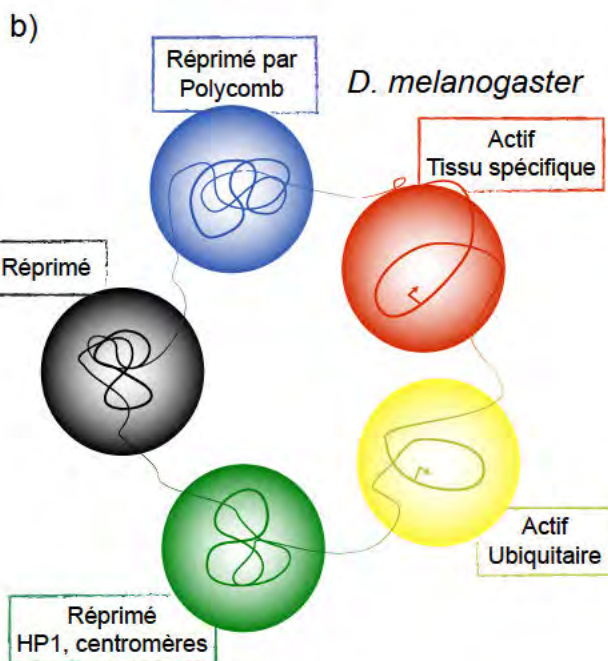
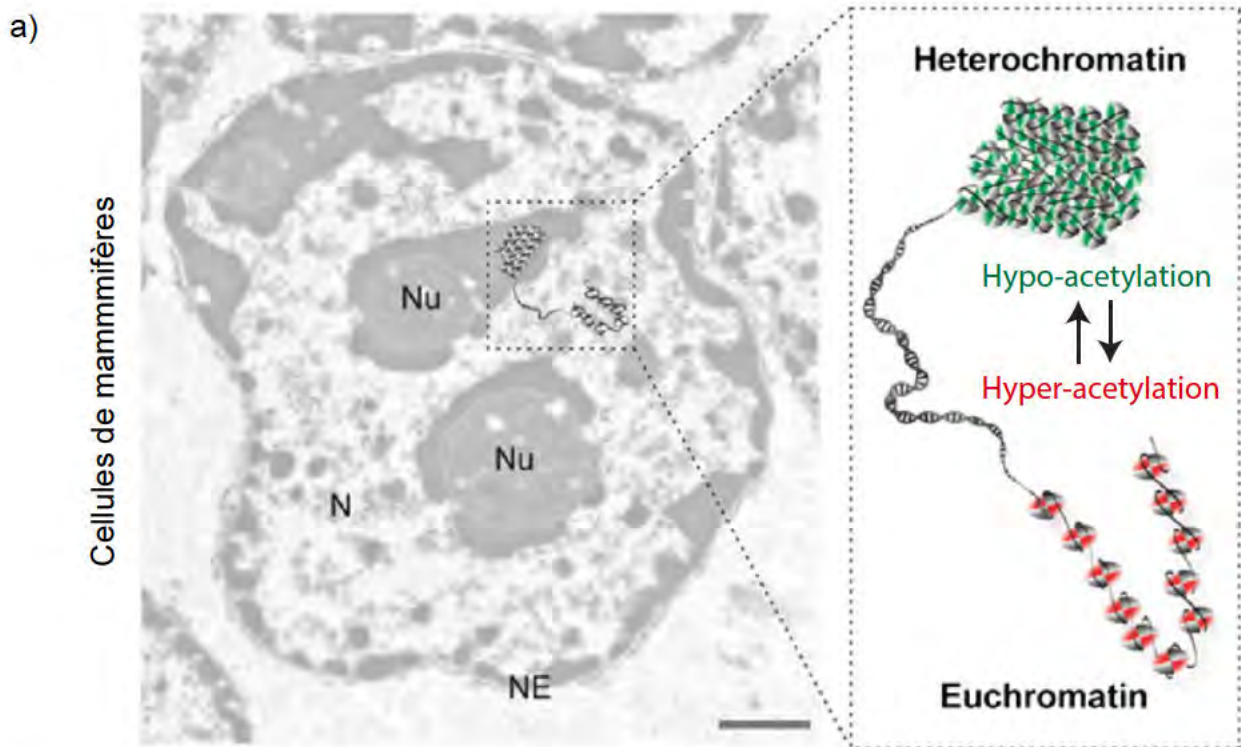


Figure 8 : Hétérochromatine et euchromatine. a) Gauche: image en MET d'une coupe d'un noyau de cellule de mammifère. Nu: nucléole, N: noyau, NE: enveloppe nucléaire. Droite: schéma représentant l'hétérochromatine compactée et l'euchromatine décompactée. Adapté de (Jost et al., 2012). Echelle: 500 nm. b) Le code de couleur de la chromatine chez *D. melanogaster* comme défini par (Filion et al., 2010). c) Image en MET d'une coupe d'un noyau de levure *S. cerevisiae*, le nucléole apparaît dense aux électrons, mais aucune région hétérochromatique n'est révélée. Echelle: 200 nm (Léger-Silvestre et al., 1999).

La majeure partie de l'hétérochromatine détectée en MET est dite constitutive car elle est maintenue dans un état compacté tout au long du cycle cellulaire (Heitz, 1928). Elle se compose majoritairement de séquences répétées telles que les microsattellites, les transposons, les régions centromériques, télomériques et les copies inactives d'ADN ribosomique (ADNr). Les gènes y sont réprimés et associés avec des marques d'histones spécifiques comme la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3). La méthylation de l'ADN dans ces régions renforce la répression génique (pour revue (Jost et al., 2012)). Ces régions chromatinienne sont répliquées tardivement et enrichies en histone H1. De plus, la protéine HP1 (pour « *Heterochromatin Protein 1* ») se concentre dans les régions hétérochromatiniennes et contribue au maintien d'un état fermé de la chromatine (pour revue (Maison and Almouzni, 2004)). L'hétérochromatine peut être également facultative : les gènes associés sont alors réprimés transcriptionnellement mais peuvent être convertis en gènes actifs. Ce sont généralement des gènes dont l'expression est régulée dans le temps (e.g. à certains stades du développement), dans l'espace (e.g. à l'intérieur vs. à la périphérie du noyau) ou en réponse à des stimuli (e.g. choc thermique). La tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) semble être une marque spécifique de l'hétérochromatine facultative (pour revue (Trojer and Reinberg, 2007)).

Une des caractéristiques de l'hétérochromatine est sa capacité à se propager et à provoquer la répression de gènes adjacents, indépendamment de leur séquence. Ce phénomène est connu sous le nom de « *Position Effect Variegation* » ou effet de positionnement d'un gène. Il a été découvert pour la première fois chez la drosophile *D. melanogaster* (Muller, 1930). Dans cette étude, Muller utilisait une lignée dans laquelle le gène codant pour un pigment rouge accumulé dans les yeux de drosophile avait été déplacé à proximité d'une région hétérochromatinienne. La propagation de l'hétérochromatine variant de cellule à cellule, les drosophiles exhibaient des yeux bigarrés, contenant des cellules rouges (dans lesquelles le gène n'avait pas été réprimé) et des cellules blanches (dans lesquelles le gène avait été réprimé).

L'euchromatine, contrairement à l'hétérochromatine, est décondensée et pauvre en histone H1. Elle est riche en gènes transcriptionnellement actifs. Les nucléosomes y sont globalement hyper-acétylés et di-méthylés sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2) (Jost et al., 2012).

L'hétérochromatine et l'euchromatine représentant deux niveaux distincts de compaction de la chromatine, le repliement de la fibre de 10 nm pourrait être différent. Afin de vérifier cette

hypothèse, plusieurs études ont imagé l'histone H2B par microscopie à fluorescence à haute résolution (Nozaki et al., 2017; Ricci et al., 2015). Ces études mettent en avant une augmentation de la taille des clusters de nucléosomes dans les régions réprimées transcriptionnellement (Nozaki et al., 2017; Ricci et al., 2015). Cependant, une autre étude révèle des clusters de tailles et de densités comparables dans les régions chromatiniennes actives ou réprimées (Fang et al., 2018). Il faut noter que dans cette dernière étude les auteurs ont utilisé un marquage de l'ADN et non des histones. De plus, l'analyse en cryo-MET de l'euchromatine et de l'hétérochromatine péricentromérique de souris révèle une organisation similaire de ces deux régions, sous la forme de fibres de 10 nm (Fussner et al., 2012). En résumé, il semblerait que l'hétérochromatine et l'euchromatine soient toutes deux formées par des clusters de nucléosomes de tailles et de conformations similaires, mais que dans le cas de l'hétérochromatine, ces clusters auraient tendance à s'associer.

ii. Chez la drosophile *D. melanogaster*

Alors que le génome de mammifère peut être divisé en deux états chromatiniens (ou compartiments) distincts, celui de la drosophile *D. melanogaster* a été divisé en cinq. On parle dans cet organisme de « couleurs » de chromatine : Noire, Bleue, Verte, Rouge et Jaune ((Filion et al., 2010), Figure 8b). La plus grande proportion du génome a été définie comme de couleur Noire. Cet état chromatiniens est associé à des séquences pauvres en gènes qui sont réprimées transcriptionnellement et qui ne présentent pas d'enrichissement en marques d'histones spécifiques. Les chromatines Bleue et Verte sont hétérochromatiniennes. Alors que la chromatine Verte est associée à des séquences fortement réprimées (telles que les régions centromériques), riches en protéines HP1 et en marque d'histone H3K9me3, la chromatine Bleue correspond à de l'hétérochromatine facultative, enrichie en marque d'histone H3K27me3 et dont les gènes sont réprimés transcriptionnellement par le complexe répresseur de la transcription Polycomb. Les chromatines Rouge et Jaune correspondent à l'euchromatine. Les séquences dites Rouges sont les premières à être répliquées et elles sont composées de gènes impliqués dans des processus spécifiques. Par exemple, ces gènes ne sont exprimés que dans un nombre restreint de tissus lors du développement embryonnaire. Enfin, les séquences associées à de la chromatine Jaune sont enrichies en marque d'histone H3K36me3 et les gènes en présence sont impliqués dans des

processus ubiquitaires tels que la biogénèse des ribosomes ou la réponse aux dommages à l'ADN (Filion et al., 2010).

iii. Chez la levure *S. cerevisiae*

Alors que l'hétérochromatine et l'euchromatine sont visuellement distinguables dans les cellules de mammifères, ces deux états chromatiniens le sont beaucoup moins chez *S. cerevisiae* (Figure 8c). En effet l'observation du noyau de levure par MET ne révèle pas de structures denses aux électrons comparables aux régions hétérochromatiniennes des cellules de mammifère (à l'exception du nucléole) (Grunstein and Gasser, 2013; Léger-Silvestre et al., 1999). Le niveau élevé d'acétylation des histones (Waterborg, 2000) et le sous-enrichissement de l'histone linker Hho1 par rapport aux histones canoniques ((Downs et al., 2003; Freidkin and Katcoff, 2001), voir plus haut) favorisent un état décondensé du génome de levure (Dekker, 2008). De plus, l'absence de machinerie de méthylation de l'ADN, ainsi que d'orthologues de HP1 ou des marques d'histones H3K9me3 et H3K27me3 ne permettent pas l'établissement de régions d'hétérochromatine constitutive semblables à celles des cellules de mammifères. Cependant, certaines régions peuvent être assimilées à de l'hétérochromatine facultative : les régions sub-téломériques, les loci HM (« *Homothallic Mating* ») impliqués dans le changement de type sexuel et l'ADN ribosomique (pour revue (Taddei and Gasser, 2012)). Ces régions sont réprimées transcriptionnellement et enrichies en nucléosomes hypo-acétylés (Braunstein et al., 1996; Rine and Herskowitz, 1987; Rine et al., 1979; Shore and Nasmyth, 1987). La mise en silence des régions sub-téломériques peut également se propager sur les séquences adjacentes, on parle alors chez la levure de « *Telomere Position Effect* » (Gottschling et al., 1990; Hecht et al., 1995). On peut noter que les centromères de *S. cerevisiae*, contrairement à ceux de l'autre levure modèle *S. pombe*, sont de courtes régions (environ 250 pb) qui ne présentent pas les caractéristiques de l'hétérochromatine (Bloom and Carbon, 1982; Furuyama and Biggins, 2007).

Pour conclure ce chapitre, nous avons évoqué qu'un nucléosome résultait de l'enroulement de l'ADN autour d'un octamère d'histones. L'enchainement de nucléosomes constitue la fibre de 10 nm, qui peut être compactée en clusters ainsi qu'en boucles de chromatine. En parallèle, cette fibre peut se trouver dans deux états chromatiniens différents (*i.e.* hétérochromatique et euchromatique) pouvant également influencer son niveau de compaction et

sa position dans l'espace. Nous détaillerons dans le Chapitre IV de cette partie que ces deux processus (boucles de chromatine *vs.* états chromatiniens) entrent en compétition pour réguler le repliement de la fibre de 10 nm dans l'espace nucléaire (Nuebler et al., 2018).

Chapitre II : Le cycle cellulaire

A. Préambule

Afin d'assurer sa descendance, chaque cellule mère doit croître, dupliquer son contenu (génétique bien sûr, mais aussi en lipides, protéines et sucres) puis le diviser de manière équitable. La succession de ces étapes est qualifiée de cycle cellulaire. Après compaction, les deux chromatides qui forment le chromosome mitotique sont séparés et transmis par la cellule mère aux deux cellules filles. Ce transfert vertical du matériel génétique est un processus essentiel pour la vie cellulaire.

En 1855, Rudolf Virchow met en évidence que la prolifération cellulaire résulte de la division d'une cellule mère en deux cellules filles et déclare « toute cellule provient d'une autre cellule » (Virchow, 1859). Cette notion est ensuite renforcée par Pasteur, réfutant la théorie de « génération spontanée » (Pasteur, 1860). Vingt ans plus tard, lors de ces études sur les cellules de salamandre, Flemming découvre que le matériel présent dans le noyau ces cellules (et qu'il nomme alors « chromatine ») subit des réorganisations importantes juste avant la division cellulaire (Flemming, 1879). Il qualifie l'ensemble de ces réorganisations comme la phase de « mitose » ((Flemming, 1882), pour revue (Paweletz, 2001)). Les travaux de Flemming ont ouvert la voie vers l'étude du cycle cellulaire et de sa régulation. Plus d'un siècle plus tard, Hartwell, Hunt et Nurse sont récompensés par le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leur découverte des protéines kinases CDK, régulateurs clefs du cycle cellulaire (pour revue (Nasmyth, 2001a)).

Dans cette section, nous décrivons d'abord les différentes étapes du cycle cellulaire chez les mammifères puis nous aborderons les particularités associées au cycle de la levure *S. cerevisiae*. Enfin nous détaillerons les différents modes de synchronisation des cellules utilisés dans la partie Résultats.

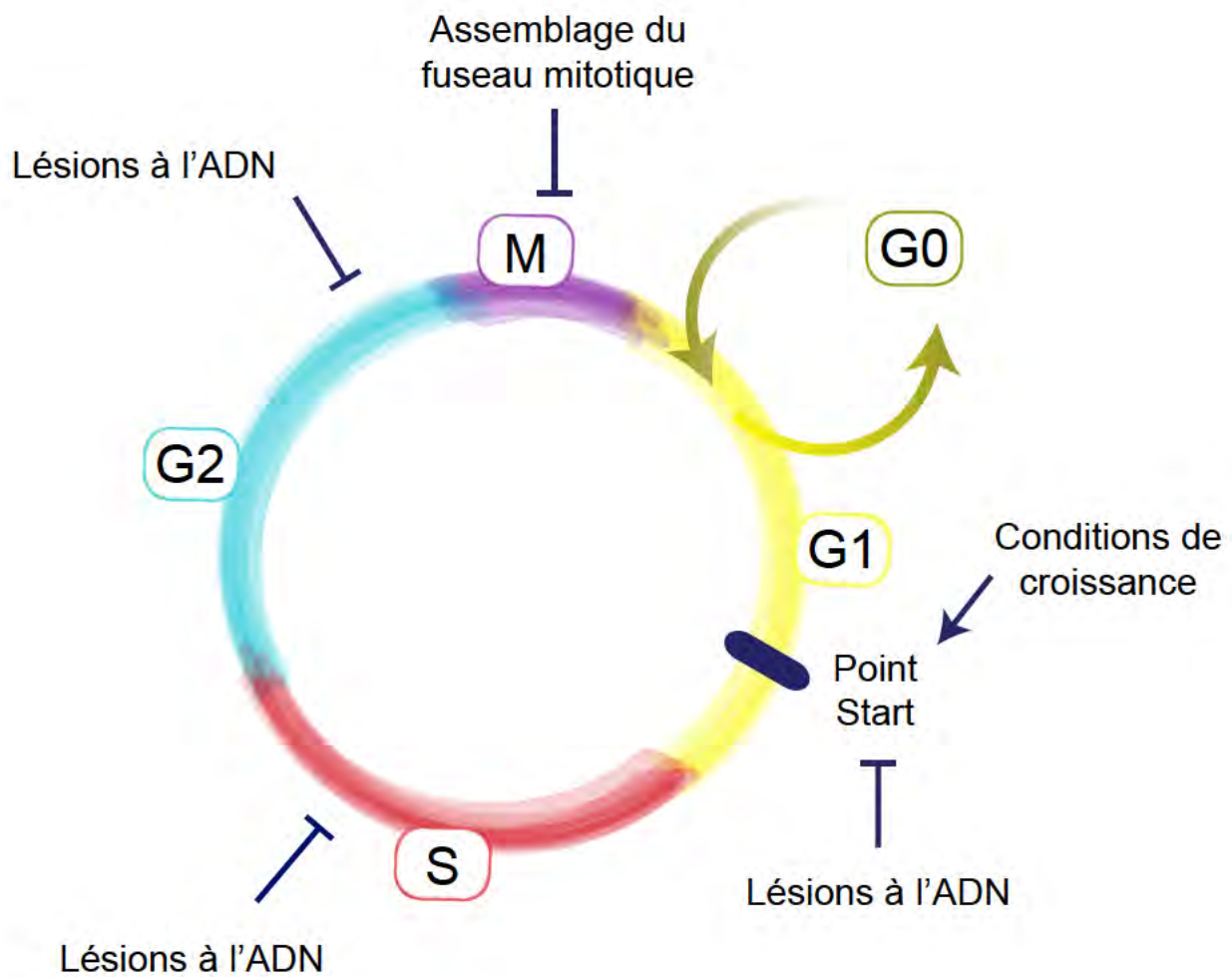


Figure 9 : Les différentes étapes du cycle cellulaire. Lors de la phase G1, si les conditions de croissance sont favorables et l'ADN non endommagé, la cellule franchit le point Start et initie le cycle cellulaire. Dans le cas où les conditions sont défavorables, la cellule entre dans un état de quiescence, réversible, G0. Lors de la phase S, l'ADN est répliqué et la cellule se divise en mitose (M). La progression dans le cycle est régulée par des points de contrôle en G1, S, G2 et mitose.

B. Généralités chez les métazoaires

Le cycle cellulaire est divisé en deux grandes étapes : l'interphase et la mitose. Lors de l'interphase, la cellule croît et duplique son matériel génétique. Elle peut être sous divisée en trois phases distinctes : les phases G1, S et G2. L'ADN est répliqué lors de la phase S (pour Synthèse) alors que les phases G1 et G2 (pour Gap) sont des phases intermédiaires dans lesquelles la cellule augmente en masse et se prépare à la phase suivante. La mitose, ou phase M, est l'étape du cycle cellulaire au cours de laquelle l'ADN est ségrégué dans les deux cellules filles (Howard, A., Pelc, S. R., 1953). Le bon déroulement de chacune de ses étapes est assuré tout au long du cycle par différents points de contrôle (Hartwell and Weinert, 1989) (Figure 9, pour revues sur le cycle cellulaire, (Lodish et al., 2000; Morgan, 2007)).

a. L'interphase

La phase G1 est déterminante : à l'issue de cette phase, la cellule décide d'entrer dans le cycle cellulaire ou non. Si les conditions de croissance sont favorables, la cellule franchit un point de restriction appelé point Start. Une fois ce point franchi, l'entrée dans le cycle est irréversible, la cellule devra se diviser même si les conditions de croissance ne permettent plus la ségrégation fidèle de ses chromosomes et peuvent entraîner sa mort. C'est donc un risque pour la cellule. Si lors de la phase G1 les conditions de croissance ne sont pas favorables, la cellule reste dans cette phase du cycle en attendant des conditions plus propices à sa croissance. Dans le cas où l'attente est prolongée, la cellule sort du cycle cellulaire et entre dans un état de quiescence, non prolifératif, appelé G0. L'entrée d'une cellule dans le cycle est régulée par de nombreux facteurs tels que le programme génétique du tissu dont elle fait partie ou les signaux extracellulaires envoyés par les cellules environnantes. Ainsi, lors de sa progression en phase G1, la cellule croît et intègre un ensemble de signaux internes et externes. Si les conditions sont favorables, elle passe le point Start et progresse inéluctablement vers la phase S (Pour revue (Pardee, 1989)).

L'évènement déterminant de la phase S est la réplication de l'ADN où une molécule d'ADN est dupliquée en deux molécules identiques (Swift, 1950). En 1958, Meselson et Stahl ont montré par marquage radioactif de cultures de bactéries *Escherichia coli* que la réplication de l'ADN était semi-conservative (Meselson and Stahl, 1958). En d'autres termes, lors de la division cellulaire, chaque cellule fille reçoit une chromatide composée d'un brin d'ADN parental et d'un brin d'ADN

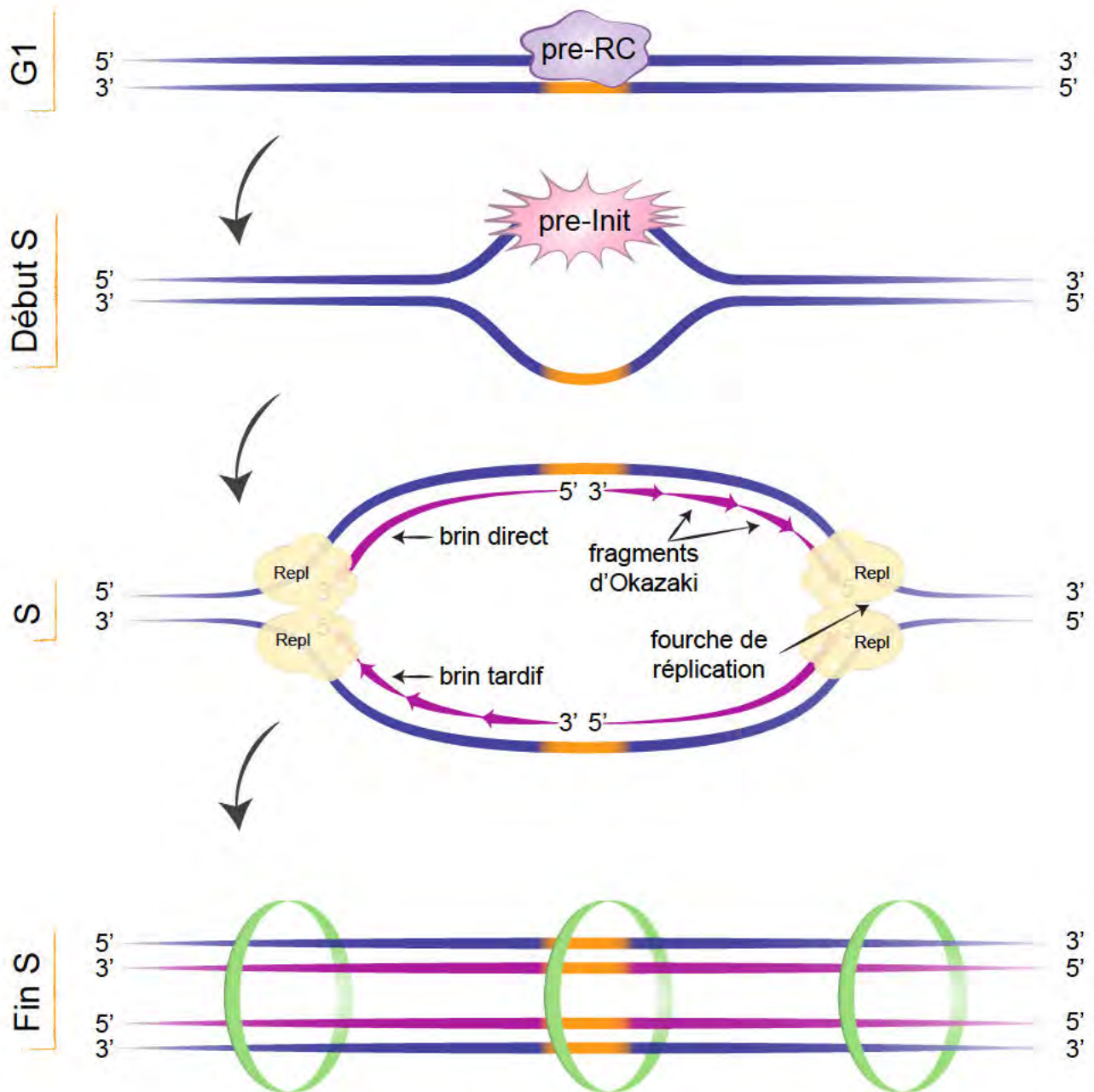


Figure 10 : Schéma décrivant les étapes de la réplication de l'ADN lors de la phase S. Le complexe de pré-réplication (pré-RC) est recruté aux origines de réplication (segments oranges) dès la phase G1. Le recrutement des sous-unités GINS et Cdc45 en début de phase S induit la formation du complexe de pré-initiation (pré-Init) qui permet l'ouverture de la double hélice d'ADN. La machinerie de réplication (Repl) est alors recrutée et synthétise les nouveaux brins d'ADN aux fourches de réplication. En fin de phase S, deux molécules d'ADN sont générées, maintenues à proximité par le complexe cohésine (anneau vert).

néo-synthétisé. Pour permettre la synthèse d'une molécule d'ADN hybride (contenant un brin « vieux » et un brin « jeune »), la double hélice d'ADN est ouverte et chaque brin est lu par la machinerie de réplication qui synthétise le brin complémentaire. La mise en place de la réplication de l'ADN commence dès la fin de mitose/début de G1 par la fixation d'un complexe pré-répliatif sur l'ADN, au niveau de séquences appelées « origines de réplication ». On peut noter que chez les métazoaires, le complexe pré-répliatif ne semble pas reconnaître une séquence primaire d'ADN mais s'associerait plutôt à des séquences appauvries en nucléosomes et présentant un motif largement dégénéré riche en îlots CpG (Cayrou et al., 2011, 2012; Vashee et al., 2003). Ces motifs nommés OGRE pour « *Origin G-rich Repeated Element* » pourraient favoriser la formation de structures secondaires telles que les G-quadruplex ((Cayrou et al., 2012), pour revue (Parker et al., 2017)). Au contraire, chez la levure *S. cerevisiae* les origines de réplication sont définies par leur séquence primaire et contiennent une séquence consensus riche en bases A/T (Marahrens and Stillman, 1992). En début de phase S, le recrutement de facteurs d'initiation de la réplication conduit à la formation d'un complexe de pré-initiation permettant l'ouverture de la double hélice d'ADN et le recrutement de la machinerie de réplication. Une fois la réplication initiée, les facteurs pré-répliatifs sont dissociés de l'ADN et n'y seront re-recrutés qu'à la fin de la mitose. La régulation de l'association des facteurs pré-répliatifs à l'ADN est essentielle pour garantir une vague unique de réplication des chromosomes. La machinerie de réplication composée entre autres des ADN polymérase synthétisant le brin d'ADN *de novo*, d'hélicases ouvrant l'hélice d'ADN et de nombreux autres facteurs régulateurs, progresse le long de la fibre d'ADN ; c'est une étape productive dite d'élongation. On parle alors de progression de la fourche de réplication composée à l'avant de la double hélice d'ADN et à l'arrière des deux molécules d'ADN répliquées. Les ADN polymérase ne synthétisent l'ADN que dans un seul sens, définit comme le sens 5' → 3'. Les brins d'ADN étant orientés en sens inverse, leur synthèse ne peut donc pas se faire par les mêmes mécanismes. Le brin néo-synthétisé orienté 5' → 3' est appelé brin direct ou « *leading strand* ». Sa synthèse est continue, au fur et à mesure de l'ouverture de l'hélice. Le second brin néo-synthétisé est orienté 3' → 5'. Il est dit tardif ou « *lagging strand* » et sa synthèse ne peut se faire qu'une fois la double hélice ouverte. La synthèse de ce brin est donc discontinue, elle se fait par fragments (appelés fragments d'Okazaki) qui sont ensuite ligaturés entre eux (Figure 10). Afin que le génome entier puisse être répliqué en un temps relativement court, de nombreuses origines de réplication sont dispersées le long des chromosomes et initient la progression bidirectionnelle de

deux fourches de réplication. Cependant toutes les origines de réplication ne sont pas activées simultanément lors de la phase S. On peut alors différencier les régions chromatinienne répliquées de manière précoce (en début de phase S) de celles répliquées tardivement (en fin de phase S) ((Raghuraman et al., 2001), pour revue (Bell and Dutta, 2002)).

Nous avons décrit au chapitre I que l'ADN n'était pas nu mais qu'il était enroulé autour d'octamères d'histones. Avant le passage de la fourche de réplication, les nucléosomes doivent être désassemblés puis après le passage de la fourche, ils sont réassemblés sur les deux molécules d'ADN répliquées. Ces étapes sont assurées par des facteurs dits « remodeleurs de la chromatine ». Cependant la quantité d'ADN étant doublée lors de la phase S, la synthèse d'histones doit également être amplifiée. Afin de subvenir à une demande forte et soudaine en histones, leur expression est stimulée à cette étape du cycle. De plus, les MPT (modifications post-traductionnelles) des histones semblent conservées après le passage de la fourche de réplication ; elles sont donc copiées et incorporées dans les nucléosomes formés *de novo*. Cependant les processus régulant cette transmission ne sont pas encore élucidés (pour revues, (Lai and Pugh, 2017; Marzluff and Duronio, 2002)).

Une fois la réplication terminée, chaque chromosome est constitué de deux chromatides maintenues à proximité l'une de l'autre par un anneau protéique, la cohésine (Figure 10). La cohésion des chromatides sœurs est un processus essentiel pour organiser les chromosomes jusqu'en mitose, où elle sera abolie pour permettre la ségrégation des deux chromatides dans les cellules filles (Guacci et al., 1994; Strunnikov et al., 1993; Tóth et al., 1999; Uhlmann et al., 1999). La cohésine et son rôle dans l'organisation du génome sont détaillés dans le chapitre suivant.

En phase G2, la cellule s'assure d'une part que la réplication des chromosomes est complète et n'a pas entraîné de dommages à l'ADN, d'autre part elle se prépare à la division cellulaire. C'est une phase de croissance impliquant une importante synthèse protéique.

b. La mitose

La mitose est la phase la plus courte du cycle cellulaire. Elle regroupe la compaction des chromosomes, leur ségrégation et la formation des deux cellules filles (pour revue (Mazia, 1961)). Dès 1882, les différentes phases de la mitose ont été décrites par Flemming sur la base des changements morphologiques des chromosomes observés en cytologie (Flemming, 1882).

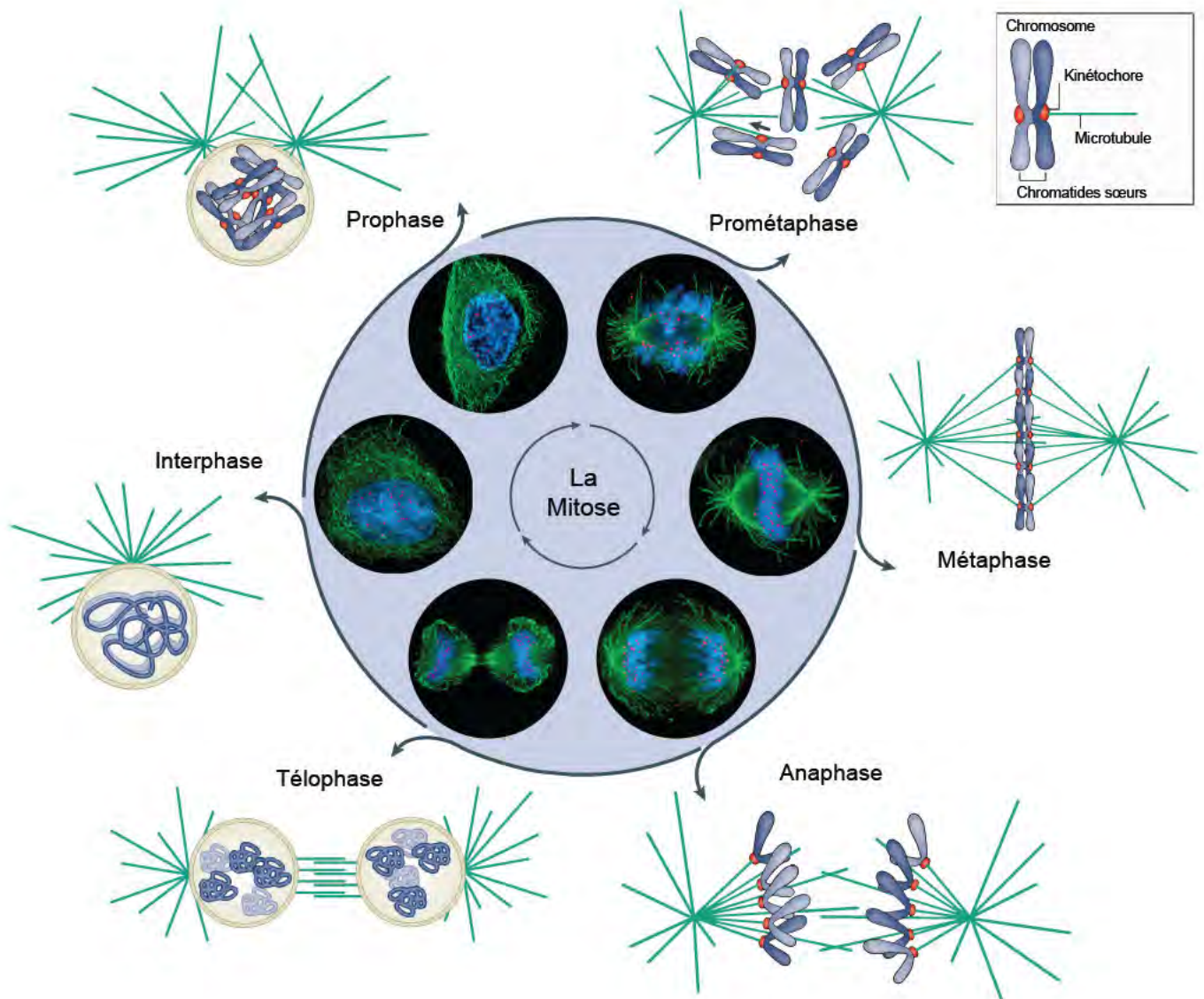


Figure 11 : Les étapes de la mitose lors de la division des cellules de mammifères. Images acquises par immunofluorescence de l'ADN (bleu), des microtubules (vert) et des kinétochores (rouge) au cours des différentes étapes de la mitose accompagnées de leur schéma explicatif. En interphase les chromosomes sont décompactés. Ils se compactent en mitose lors de la prophase. En prométaphase les kinétochores des chromatides s'associent avec les microtubules et l'enveloppe nucléaire est désassemblée. En métaphase les chromosomes s'alignent le long de la plaque métaphasique. La ségrégation des chromatides vers les pôles de la cellule indique l'anaphase. Enfin, en téléphase, l'enveloppe nucléaire se reforme et les chromosomes se décompactent. Adapté de (Cheeseman and Desai, 2008).

La mitose débute par la **prophase** associée à la compaction des chromosomes par les condensines notamment. C'est un complexe structurellement proche de celui des cohésines qui sera également détaillé dans les prochains chapitres. Lors de cette étape, les cohésines sont également dissociées des bras des chromosomes mais leur association est maintenue au niveau des régions centromériques (Losada et al., 1998; Michaelis et al., 1997). Les chromosomes adoptent alors leur structure caractéristique en forme de X. Les centres organisateurs des microtubules (MTOC ou centrosomes chez les mammifères) se séparent et débutent leur migration vers les deux pôles de la cellule. L'assemblage du fuseau mitotique est également initié.

Vient ensuite la **prométaphase** au cours de laquelle l'enveloppe nucléaire se fragmente en un grand nombre de vésicules. Cette phase se poursuit jusqu'à ce que les deux kinétochores, larges complexes protéiques associés aux centromères des chromosomes, soient chacun associés avec les microtubules émanant d'un pôle de la cellule (Ault and Nicklas, 1989; Brinkley et al., 1988; Nicklas, 1989). On parle alors de « bi-orientation » des chromosomes.

Lors de la **métaphase**, la traction des microtubules sur les chromosomes provoque leur alignement le long de la plaque métaphasique, perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique. Les centromères sont alors soumis à des forces contraires provenant des microtubules d'une part et des cohésines d'autre part maintenant les deux chromatides sœurs à proximité.

L'entrée en **anaphase** est marquée par le clivage des cohésines centromériques, libérant les chromatides sœurs qui ségrégent alors chacune vers un pôle de la cellule (Uhlmann et al., 1999). C'est l'anaphase A. Lors de l'anaphase B, les centrosomes migrent un peu plus vers les pôles afin de parfaire la ségrégation des chromatides.

Enfin, en **télophase**, la ségrégation des chromosomes touche à sa fin. Le fuseau mitotique est désassemblé, l'enveloppe nucléaire se reforme autour des chromosomes qui se décompactent progressivement (Figure 11).

Le cycle cellulaire s'achève par la **cytokinèse**. Un anneau contractile d'actine se forme au niveau de l'ancienne plaque métaphasique et au terme de sa contraction, scinde la cellule mère en deux cellules filles.

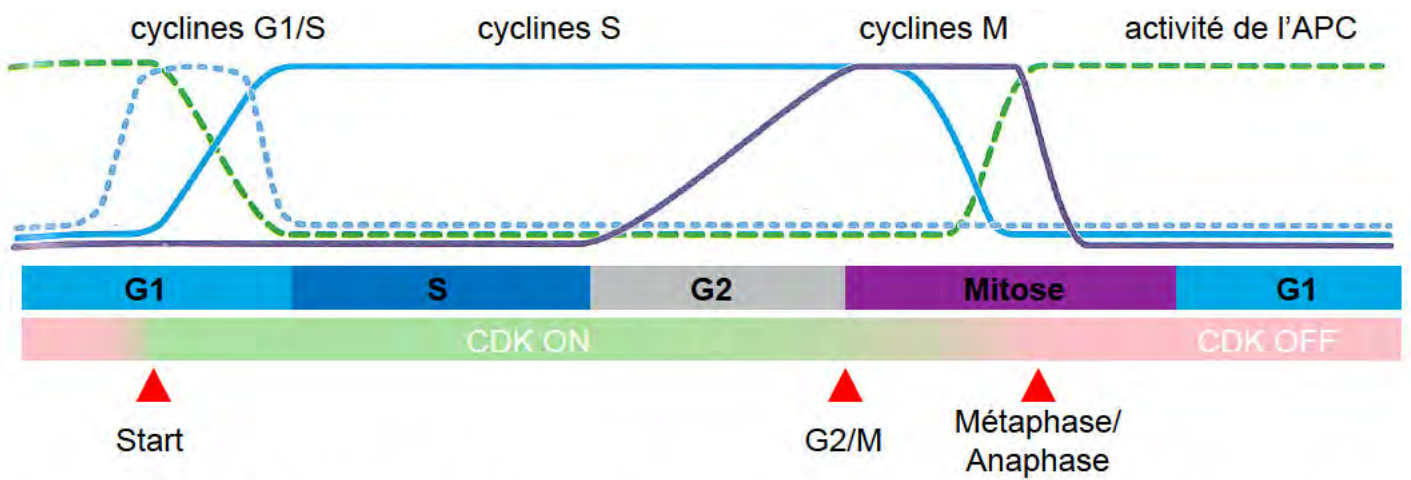


Figure 12 : Activité des cyclines au cours du cycle cellulaire. Les cyclines G1/S initient l'entrée dans le cycle et l'accumulation des cyclines S. A la transition G2/M les cyclines M sont accumulées. Les cyclines S et M sont dégradées par le complexe APC activé à la transition métaphase-anaphase. Ainsi, l'activité CDK est au plus fort dans la cellule entre le point Start et l'anaphase. Adapté de (Morgan, 2007).

c. La régulation du cycle cellulaire

i. Les cyclines

Les complexes CDK-cycline sont des régulateurs essentiels de la progression du cycle cellulaire, composés d'une sous-unité catalytique CDK (« *Cyclin-Dependent Kinase* ») et d'une sous-unité régulatrice, la cycline. Ces complexes assurent la phosphorylation de nombreuses protéines cibles contrôlant les différents événements survenant au cours du cycle cellulaire. Alors que la concentration en CDKs est constante tout au long du cycle, celle des cyclines ne l'est pas. L'activité du complexe évolue donc en fonction de l'association CDK-cycline. On distingue les cyclines selon la phase du cycle régulée : G1, G1/S, S ou M. L'activation des complexes CDK-cycline est basée sur un fonctionnement de type interrupteur. Les complexes s'accumulent progressivement jusqu'à atteindre un seuil maximum où la phosphorylation des protéines cibles est déclenchée. De plus, les cyclines sont activées dans un ordre précis où chaque cycline est responsable notamment de l'activation de la suivante. Par conséquent l'activation des cyclines G1/S, après le passage du point Start, provoque une séquence d'événements autonomes dédiés à être menés à leur terme, ne nécessitant plus l'apport de signaux externes. En d'autres termes, le cycle cellulaire suit un mécanisme de tout ou rien (pour revue (Harashima et al., 2013)).

Brièvement, l'activité des CDKs, faible en début de cycle, est stimulée par l'accumulation progressive des cyclines G1. Les cyclines G1/S sont activées et permettent le passage du point Start. Puis les cyclines S permettent d'initier la réplication de l'ADN. Après la phase S, les cyclines M déclenchent l'assemblage du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. Lors de l'anaphase, la dégradation des cyclines S et M par le complexe APC (« *Anaphase Promoting Complex* ») permet la sortie de mitose. L'activité des CDKs est également réduite par des protéines inhibitrices, les CKI (« *CDK Inhibitor* ») qui favorisent le retour à un niveau bas de CDKs en G1 (Figure 12).

ii. Les points de contrôle (« *checkpoints* »)

Des points de contrôle sont répartis tout au long du cycle cellulaire. La cellule vérifie que des dommages qui pourraient être délétères au moment de la division ne sont pas accumulés. Le premier point de contrôle, le point Start, se situe à la transition G1/S. La cellule prend en compte un ensemble de signaux externes (conditions de croissance favorables) et internes (taille de la cellule, absence de dommages à l'ADN) pour initier la phase S. Puis, un mécanisme de surveillance

actif lors de la phase S prévient de l'accumulation de dommages à l'ADN dépendant de la réplication. La transition G2/M n'est franchie que lorsque la réplication de l'ADN est achevée et qu'elle n'a pas engendrée de dommages à l'ADN. Enfin, lors du dernier point de contrôle à la transition métaphase-anaphase, la cellule s'assure que le fuseau mitotique est bien assemblé et que chaque chromatide sœur est attachée à un pôle différent de la cellule (Figure 9). L'APC est alors activé, permettant la complétion du cycle cellulaire.

Ainsi, à chaque point de contrôle la cellule vérifie que les conditions sont favorables pour poursuivre sa progression dans le cycle. Si elles ne le sont pas (lésions à l'ADN ou attachements défectueux des chromatides sœurs par exemple), les points de contrôle sont activés et déclenchent l'arrêt temporel du cycle. La cellule met alors en place des mécanismes de réparation des dommages. Une fois la situation rétablie, le point de contrôle est inactivé, permettant la reprise et l'achèvement du cycle cellulaire. Si toutefois les dommages sont trop importants et la cellule ne parvient pas à les endiguer, un programme apoptotique est déclenché et la cellule est éliminée ((Hartwell and Weinert, 1989), pour revue (Nakanishi et al., 2006)).

C. Le cycle cellulaire chez la levure *S. cerevisiae*

Grace à sa génétique puissante, la levure *S. cerevisiae* est devenue un modèle pour l'étude de processus tel que la régulation du cycle cellulaire. En effet, des cribles génétiques menés entre 1970 et 1974 ont conduit à l'identification de nombreux gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, nommés *cdc* (pour *Cell Division Cycle*) (Culotti and Hartwell, 1971; Hartwell, 1971a, 1971b, Hartwell et al., 1970, 1973, 1974). En analysant la morphologie des cellules, Hartwell a pu identifier la phase du cycle pour laquelle l'expression de chacun de ces gènes était requise. Puis, quelques années plus tard, les travaux de Nurse ont permis l'identification des orthologues de ces gènes chez la levure *S. pombe* (Nurse et al., 1976). D'autres découvertes ont conduit à des avancées majeures dans la communauté telle que la mise en évidence que l'entrée dans le cycle cellulaire était en partie contrôlée par la taille de la cellule (Nurse, 1975) et qu'une unique CDK régula le cycle cellulaire de levure : Cdc28 chez *S. cerevisiae* et Cdc2 chez *S. pombe* (Hartwell et al., 1974; Nurse and Thuriaux, 1980; Wittenberg et al., 1990).

La synchronisation des cellules à une étape spécifique du cycle cellulaire peut être engendrée par différents procédés comme l'inactivation conditionnelle de certains gènes *cdc* ou l'ajout de composés chimiques dans le milieu de culture. Dans cette section nous explicitons les

différents modes de synchronisation de la levure *S. cerevisiae* utilisés dans la partie Résultats. Mais nous allons dans un premier temps aborder les différences notables entre le cycle cellulaire de la levure *S. cerevisiae* et celui des métazoaires décrit dans la section précédente. En effet, bien que les étapes du cycle cellulaire décrites au préalable soient communes à la plupart des cellules eucaryotes, la durée de chaque étape et leur régulation peuvent varier d'un organisme à l'autre ou entre différents types cellulaires d'un même organisme.

a. Les différences avec le cycle cellulaire des métazoaires

Tout d'abord, la levure *S. cerevisiae* est un organisme à croissance rapide. Sa division cellulaire s'effectue en approximativement 90 min contre 24 heures en moyenne pour les cellules de mammifères (de même, ce chiffre est extrêmement variable entre les types cellulaires). Les processus mis en place tout au long du cycle et la durée de chaque étape sont donc largement réduits (Lodish et al., 2000; Morgan, 2007).

Deuxièmement, *S. cerevisiae* est un organisme unicellulaire. L'entrée dans le cycle d'une cellule n'est donc pas régulée par les signaux provenant des cellules avec lesquelles elle est en contact physique. Pour les organismes unicellulaires, et contrairement aux cellules présentes dans les organismes multicellulaires, c'est majoritairement la quantité de nutriments présents dans le milieu de croissance qui régule leur entrée dans le cycle (Alberghina et al., 1998).

Une autre particularité provient du fait que la mitose est dite « fermée » chez la levure *S. cerevisiae*. En d'autres termes, il n'y a pas de rupture de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose (Boettcher and Barral, 2013). Les processus associés à la fragmentation en pro-métaphase et à la reconstitution de l'enveloppe en télophase n'ont donc pas lieu dans cet organisme. Par conséquent, la pro-métaphase ne peut être décrite chez *S. cerevisiae*.

Enfin, une autre différence non négligeable entre le cycle cellulaire de la levure à bourgeon et celui de la plupart des cellules de mammifère est la temporalité du début de la mitose. En effet, comme vu précédemment, la mitose est initiée chez les mammifères par la prophase, caractérisée par la compaction des chromosomes par les condensines, la séparation des MTOC et la dissociation des cohésines des bras des chromosomes. Chez *S. cerevisiae*, les cohésines ne sont pas dissociées des bras de chromosomes mais restent associées jusqu'en anaphase où elles seront alors toutes clivées (Michaelis et al., 1997; Uhlmann et al., 1999). De plus la compaction des chromosomes par les condensines et la séparation des MTOC sont concomitantes avec la fin de la phase S.





Organisme	Levure <i>S. cerevisiae</i>	Levure <i>S. pombe</i>	Drosophile <i>D. melanogaster</i>	Cellules de mammifères	
Phase					
G1	α -facteur	Cdc10	Privation en sérum		
G1/S	Sic1	Homologue	Rum1	dSkp2	p27 ^{kip1}
		Condition comparable	Cdc25 ¹	Double bloc thymidine ¹	
Mitose sans replication	Cdc45	Homologue	Cdc45	Cdc45	Cdc45
		Condition comparable	Hydroxy urée + caféine		
Métaphase	Cdc20	Homologue	Slp1	Fzy	Cdc20
		Condition comparable	Nuc2		
Prophase	Nocodazole	Nda3	Nocodazole		

Table I : Méthodes de synchronisation classiquement utilisées chez *S. cerevisiae* et dans différents organismes modèles de laboratoire. Méthodes de synchronisation pour *S. pombe* : Cdc10, Cdc25, Nuc2, Nda3 (Giga-Hama and Kumagai, 1997) ; hydroxy urée et caféine (Wang et al., 1999). Méthodes pour *D. melanogaster* et les cellules de mammifères : hydroxy urée et caféine (Wise, 1999) ; double bloc thymidine et Nocodazole (Jackman and O'Connor, 2001) ; privation en sérum (Langan and Chou, 2011).

1: Ces méthodes de synchronisation sont utilisées pour synchroniser les cellules en début de phase S et ne sont donc pas strictement équivalentes à la synchronisation G1/S de *S. cerevisiae* par surexpression de Sic1.

Ceci est expliqué par l'expression précoce des cyclines M chez *S. cerevisiae*, lors de la phase S (Richardson et al., 1992). Ainsi, les phases G2 et mitose sont concomitantes, on parle alors de phase G2/M.

On peut résumer le cycle de la levure à bourgeon *S. cerevisiae* ainsi : lors de la phase G1, la cellule sonde son environnement à la recherche de nutriments. S'ils sont présents en quantité suffisante pour permettre la croissance cellulaire, le couple CDK-Cycline spécifique de la phase G1 (Cdc28-Cln3) promeut l'expression des cyclines G1/S Cln1 et Cln2 *via* la phosphorylation de leur répresseur transcriptionnel Whi5. Le point Start est alors franchi. A leur tour, Cln1 et Cln2 stimulent l'expression des cyclines S Clb5 et Clb6 qui déclenchent la réplication de l'ADN. Les cyclines M Clb1, Clb2, Clb3 et Clb4 sont accumulées et provoquent l'entrée en mitose caractérisée par la compaction des chromosomes par les condensines, la séparation des MTOC et l'assemblage du fuseau mitotique. Lors de la métaphase, les chromosomes sont tous bi-orientés (*i.e.* les deux kinétochores de chaque chromosome sont chacun attachés à un pôle différent de la cellule). Toutefois, on peut noter qu'il n'y a pas de plaque métaphasique bien définie chez la levure *S. cerevisiae* car les chromosomes sont dispersés le long du fuseau mitotique. Les cohésines sont clivées en anaphase par la séparase, déclenchant la ségrégation des chromatides sœurs. Enfin lors de la télophase, les chromatides ségrégent dans chaque pôle de la cellule et se décompactent. L'enveloppe nucléaire se referme autour de chaque masse chromosomique et la cellule se divise lors de la cytokinèse.

b. Détail des méthodes de synchronisation utilisées dans l'étude

Différentes techniques peuvent être utilisées pour synchroniser une culture de levure à une étape précise du cycle cellulaire. Par soucis de brièveté, ne seront présentées dans cette section que les techniques de synchronisation utilisées dans la partie Résultats (Figure 13). Les équivalences de ces synchronisations dans différents organismes modèles sont reportées dans la Table I.

i. Synchronisation en G1

Dans les conditions standards utilisées en laboratoire, la levure *S. cerevisiae* se propage à l'état haploïde. En d'autres termes, chaque chromosome n'est présent qu'en une seule copie dans les cellules. L'état diploïde, généré par la fécondation entre deux cellules haploïdes, ne peut

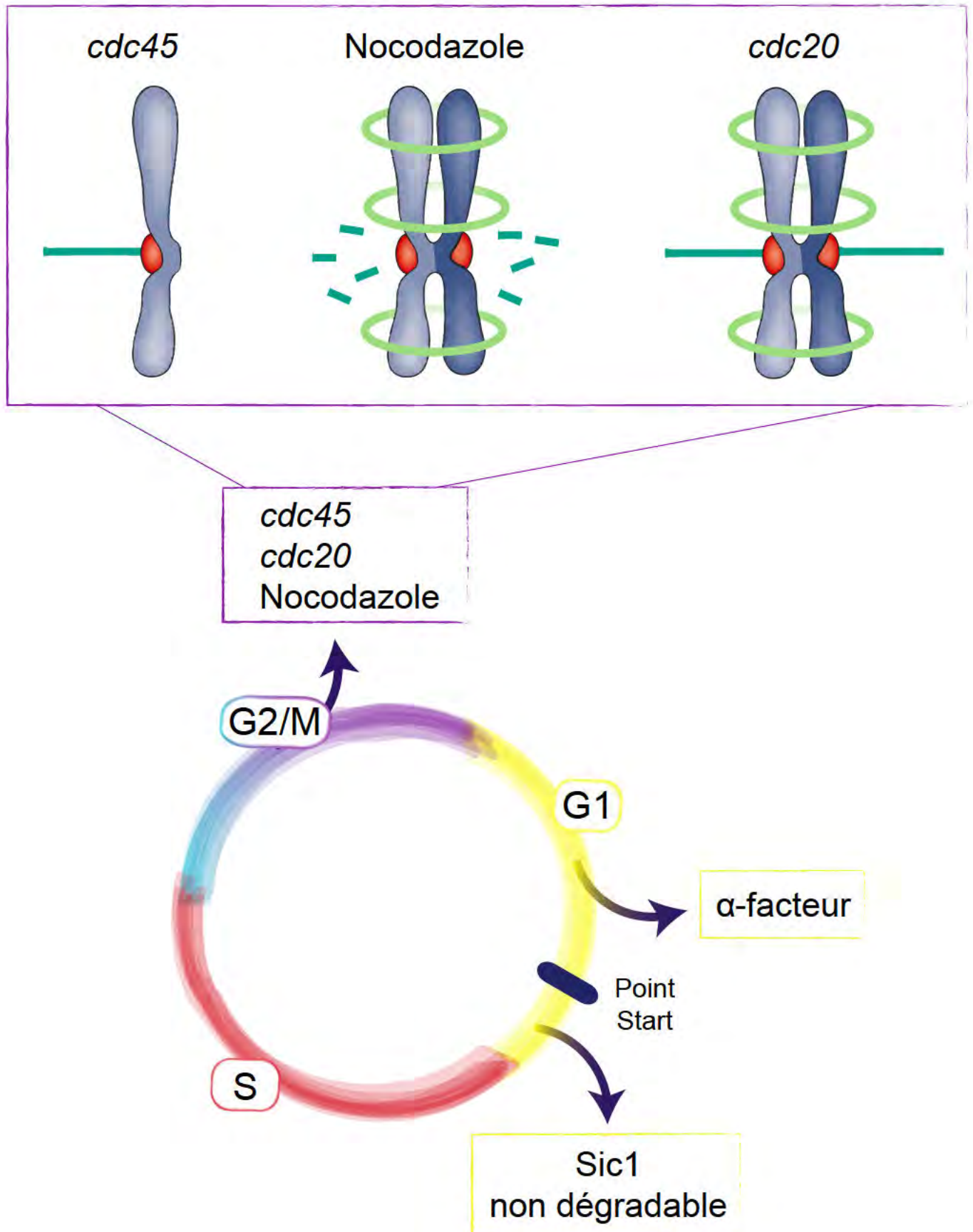


Figure 13 : Récapitulatif des synchronisations de levure utilisées dans l'étude. Lors de l'arrêt en α -facteur les cellules sont synchronisées en G1. L'expression d'une version non dégradable de Sic1 induit un arrêt des cellules en G1, après le point Start. Pour les synchronisations *cdc45*, Nocodazole et *cdc20* les cellules sont arrêtées en mitose. En absence de Cdc45 l'ADN n'est pas répliqué, en présence de Nocodazole les microtubules ne sont pas fonctionnels et en absence de Cdc20 les chromosomes sont bi-orientés et les chromatides sœurs sont cohésives. Adapté de (Cheeseman and Desai, 2008).

s'opérer qu'entre cellules de types sexuels opposés. Les cellules de levure *S. cerevisiae* sont définies par deux types sexuels, ou haplotypes : *MAT-a* et *MAT-alpha*. Seule la fusion entre une cellule Mat-a et une cellule Mat-alpha est possible lors de la fécondation. Les cellules de ses deux haplotypes ne présentent pas de différences morphologiques mais se distinguent par la production de phéromones peptidiques spécifiques : le facteur-a pour les cellules Mat-a et le facteur-alpha (ci-après appelé α -facteur) pour les cellules Mat-alpha. Lorsque des cellules Mat-a sont en présence de cellules Mat-alpha, la liaison de l' α -facteur sur les cellules Mat-a provoque une inhibition des cyclines G1 et G1/S, Cln1, Cln2 et Cln3 (de même pour la liaison du facteur-a sur les cellules Mat-alpha) (Bardwell et al., 1994). En absence de ces cyclines, le point Start ne peut être franchi, les cellules se synchronisent en G1 et mettent en place les processus de fécondation (pour revue (Herskowitz, 1988), Figure 13). Elles initient une croissance polarisée dans la direction du gradient de phéromones en augmentant leur synthèse protéique et adoptent alors une morphologie caractéristique de « *shmoo* ». Néanmoins, la réponse des cellules aux facteurs a et α est inhibée par la protéine Bar1. Cette protéase sécrétée dans le milieu extracellulaire clive les phéromones et diminue leur concentration locale. De ce fait, la réponse aux phéromones ne peut être initiée qu'en présence d'un excès de facteurs-a ou α , outrepassant l'action de Bar1.

La communauté scientifique utilisant *S. cerevisiae* comme modèle d'étude a su, depuis de nombreuses années, mettre à profit ce processus physiologique. En effet, l'ajout répété d' α -facteur (permettant un excédent de phéromone et la saturation de Bar1) dans des cultures de cellules Mat-a induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1, sans inhibition du métabolisme cellulaire. Ce mode de synchronisation est particulièrement avantageux : il est issu d'un processus naturel ne nécessitant pas de manipulation génétique des souches de levure. De plus, l'élimination de l' α -facteur du milieu de culture permet le relargage rapide des cellules qui franchissent le point Start en quelques minutes et initient, de manière synchrone, un nouveau cycle cellulaire (Breden, 1997).

ii. Synchronisation en G1/S

La synchronisation des cellules en G1/S s'effectue par surexpression d'une version non dégradable de la protéine CKI, Sic1 (Verma et al., 1997). Cette protéine s'accumule dans les cellules en G1 et inhibe le fonctionnement des cyclines S et M. Elle ne régule cependant pas l'activité des cyclines G1 et G1/S. Ainsi Sic1 prévient l'entrée précoce des cellules en phase S

(Lengronne and Schwob, 2002) mais n'impacte pas sur la progression en G1/S. Afin d'initier la phase S, les cyclines G1/S Cln1 et Cln2 phosphorylent Sic1, provoquant ainsi sa dégradation par le protéasome et la levée de l'inhibition des cyclines S et M.

Dans le cas où une version non dégradable de Sic1 est accumulée en G1, les cellules franchissent le point Start et expriment les cyclines G1/S. Cependant le niveau de Sic1 reste élevé dans ces cellules et ne permet pas l'entrée en phase S et l'initiation de la réplication. Les cellules sont alors synchronisées en G1/S c'est-à-dire après le point Start mais avant la phase S (Figure 13).

iii. Synchronisation en mitose, sans réplication

Les cellules peuvent également être synchronisées en phase S, avant la réplication de l'ADN. Dans ce cas, les cellules n'expriment plus les cyclines G1/S comme lors de la synchronisation avec Sic1 mais les cyclines S et M. La synchronisation à cette étape du cycle est provoquée par l'inactivation de la protéine Cdc45, une sous unité régulatrice du complexe hélicase CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS) (Zou et al., 1997). Les sous-unités catalytiques du complexe Mcm2-7 sont recrutées sur l'ADN en fin de mitose, comme composants du complexe de pré-réplication. Elles sont cependant inactives. Leur activation nécessite le recrutement, en début de phase S, des sous-unités régulatrices Cdc45 et GINS. Le complexe actif initie alors l'ouverture de la double hélice d'ADN aux origines de réplifications et recrute les ADN polymérases nécessaires à la réplication de l'ADN (pour revue (Bell and Dutta, 2002)). Lorsque Cdc45 est inactivé, le complexe CMG reste inactif et les ADN polymérases ne sont pas recrutées sur l'ADN. Par conséquent, l'ADN ne peut être répliqué dans cette condition. Cependant, comme mentionné précédemment, les cyclines M sont accumulées lors de la phase S chez *S. cerevisiae*. Dans la condition où Cdc45 est inactivé, les cyclines M sont exprimées et l'état physiologique des cellules est comparable à celui de cellules en mitose. Toutefois l'ADN n'a pas été répliqué (Figure 13).

iv. Synchronisations en mitose

La synchronisation des cellules en métaphase peut être provoquée par plusieurs mécanismes, physiologiquement non équivalents. Une première approche consiste à tirer parti de la génétique de la levure et à inactiver conditionnellement un activateur majeur du complexe APC, la protéine Cdc20. En plus de dégrader les cyclines S et M, l'APC stimule le clivage des cohésines au début de l'anaphase (pour revue (Yu, 2007)). Ainsi lorsque Cdc20 est invalidé, l'APC est inactif

et les cohésines maintenues sur les chromosomes permettent de résister aux forces de traction exercées par les microtubules. Les cellules sont donc synchronisées en métaphase (Figure 13).

Une seconde approche consiste à ajouter dans le milieu de culture une drogue qui déstabilise des microtubules : le Nocodazole. Lorsque les cellules sont en présence de Nocodazole le fuseau mitotique ne peut être correctement assemblé, les chromosomes ne sont pas bi-orientés (Figure 13) et les cellules déclenchent le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (Figure 9). De plus les MTOC ne sont pas séparés (Jacobs et al., 1988). Ainsi l'ajout de Nocodazole dans le milieu de culture synchronise les cellules dans un état proche de celui de la prophase. Par ailleurs, il faut noter que le Nocodazole semble induire la compaction des chromosomes, à la fois chez la levure *S. cerevisiae* et dans les cellules de mammifères (Choi et al., 2011; Lazar-Stefanita et al., 2017).

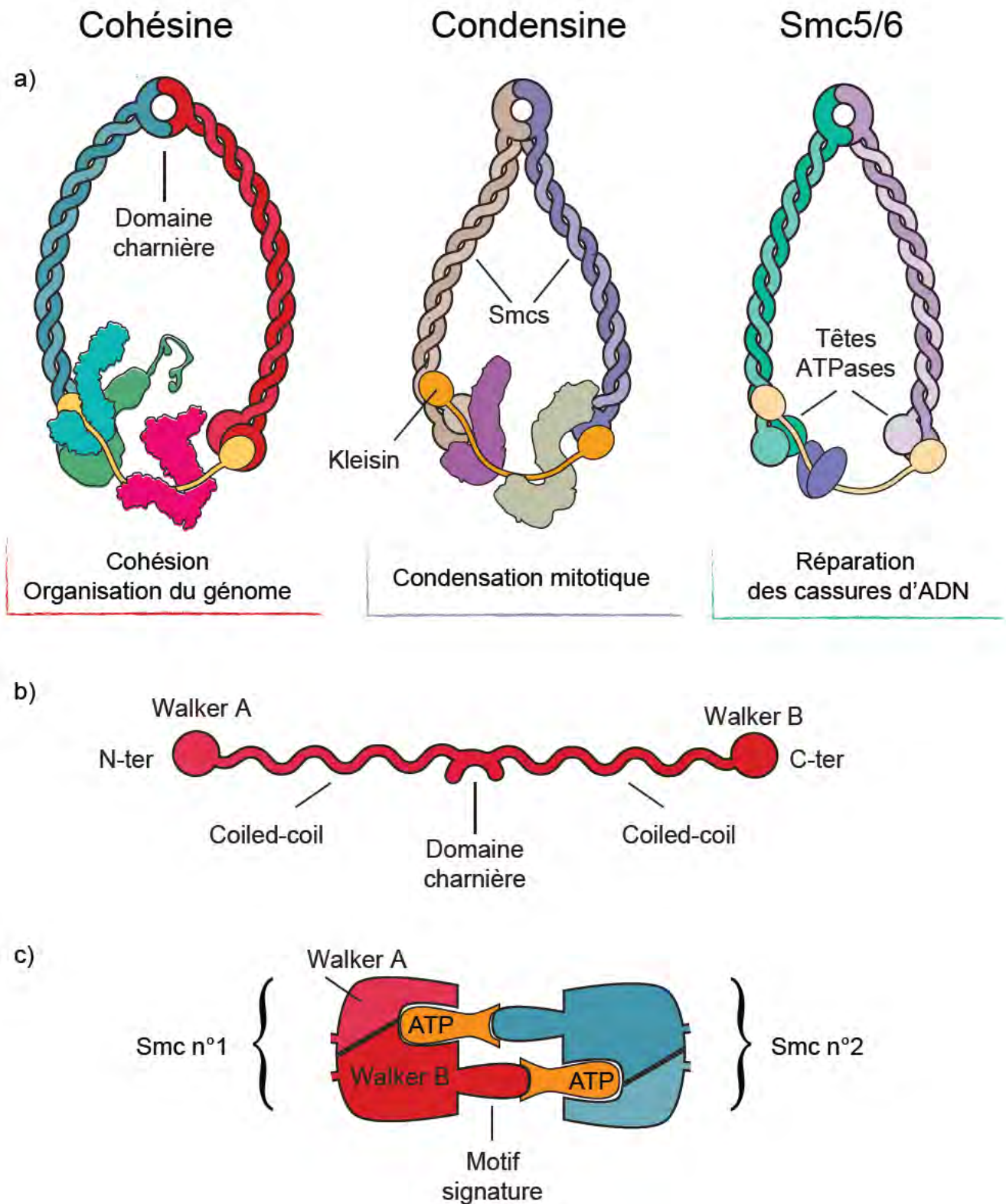


Figure 14 : La famille des complexes SMCs. a) La cohésine, la condensine et Smc5/6 forment la famille des SMCs. Elles partagent une architecture commune en forme d'anneau composé de deux sous-unités Smc et d'une sous-unité kleisin. Cette dernière agit comme une plateforme pour le recrutement de facteurs régulateurs. Les sous-unités Smc interagissent *via* un domaine charnière. b) Détail d'une sous-unité Smc composée de domaines Walker A et Walker B à ses extrémités N- et C-terminales respectivement. Le repliement intramolécule de la protéine provoque le rapprochement de ces deux domaines. c) Schéma de la liaison de deux molécules d'ATP aux deux têtes ATPases. Adapté de (Wells et al., 2017).

Chapitre III : Un complexe de la famille des SMCs : la cohésine

A. Préambule

Lors du précédent chapitre nous avons pu identifier un rôle crucial des complexes cohésine et condensine dans la réorganisation des chromosomes au cours du cycle cellulaire. Ces deux complexes, ainsi que le complexe Smc5/6, forment à eux trois la famille des SMCs (pour « *Structural Maintenance of Chromosomes* ») (Figure 14a). Les membres de cette famille sont caractérisés par une architecture commune, en forme d'anneau tripartite, composé d'un hétérodimère de protéines Smc et d'une sous-unité appelée « kleisin ». Les protéines Smc ont une conformation spécifique : elles sont composées d'un domaine charnière central (aussi appelé « *hinge* »), séparé des deux domaines globulaires N- et C-terminaux par de longues répétitions coiled-coil (Figure 14b). Ces dernières interagissent entre elles de manière antiparallèle, ce qui donne naissance à une protéine repliée dans l'espace composée du domaine charnière et d'une « tête » générée par l'interaction des domaines N- et C-terminaux, de part et d'autre des coiled-coil. L'association de deux protéines Smc par leur domaine charnière aboutit à la formation d'une structure en V. La sous-unité kleisin se lie aux deux têtes Smc, ce qui permet la fermeture du V et la formation d'un anneau. Elle joue également un rôle de plateforme de recrutement pour différentes protéines régulatrices.

Les complexes SMCs possèdent une activité catalytique d'hydrolyse d'ATP. Elle est conférée par les deux têtes Smc composées chacune d'un motif Walker A de liaison de l'ATP (situé dans la partie N-terminale de la protéine), d'un motif Walker B d'hydrolyse d'ATP et d'un motif signature (tous deux situés dans la partie C-terminale de la protéine). Le repliement intramoléculaire des protéines Smc provoque le rapprochement des motifs Walker A et B. Lors de sa liaison à l'hétérodimère de Smc, une molécule d'ATP se lie d'une part aux domaines Walker d'une protéine et d'autre part au domaine signature de l'autre protéine. Ainsi chaque complexe SMC peut lier deux molécules d'ATP, toutes deux associées aux deux têtes (Figure 14c). En plus de leur association via le domaine charnière, les protéines Smc interagissent donc également au niveau de leur tête ATPase.

Bien qu'ils partagent une architecture similaire, les trois complexes qui composent la famille des SMCs ont chacun des activités spécifiques (Figure 14a). Les cohésines sont impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs de la phase S à l'anaphase et dans l'organisation du génome par la formation de boucles de chromatine. Les condensines compactent les chromosomes lors de la mitose, également par l'établissement de boucles de chromatine. Le complexe Smc5/6 joue un rôle dans la réparation des cassures d'ADN. Il est important de noter que l'activité de ces complexes est fondamentale puisqu'ils sont tous essentiels pour la survie cellulaire (pour revue (Nasmyth and Haering, 2005)).

Dans ce chapitre, après avoir évoqué les principales découvertes ayant mené à l'identification de cette famille protéique, nous allons décrire plus en détail la mécanistique des cohésines chez la levure à bourgeon.

B. La découverte des SMCs

Le terme SMC fut employé pour la première fois en 1985 par Larionov *et al.* lors de l'identification chez la levure *S. cerevisiae* d'un gène impliqué dans la stabilité des mini-chromosomes centromériques. Ils le nomment alors *SMC1* pour « *Stability of Mini-Chromosomes* » (Larionov et al., 1985). Quelques années plus tard, Niki et ses collaborateurs recherchent par crible génétique des gènes impliqués dans la partition des chromosomes chez la bactérie *E. coli*. Ils mettent en évidence le gène *mukB* (du japonais « *mukaku* » pour « sans noyau », (Hiraga et al., 1989)), codant pour une protéine composée de longues répétitions coiled-coil séparées par un domaine central, et de domaines terminaux capables de lier l'ATP (Niki et al., 1991). L'année suivante cette protéine est visualisée par MET (Niki et al., 1992). Les auteurs décrivent deux conformations pour la protéine : une étirée en forme de bâtonnet (ou de I) ou une repliée en forme de V. Ils concluent que la protéine MukB est capable d'homodimérisation, avec un alignement parallèle des coiled-coil (*i.e.* les extrémités N-terminales et C-terminales des deux protéines seraient situées de part et d'autre du domaine charnière, voir Figure 15a). Sur la base de sa séquence primaire, il apparaît que la protéine Smc1 de levure possède la même architecture que MukB, composée de répétitions coiled-coils et de domaines terminaux liant l'ATP (Strunnikov et al., 1993). Cette protéine est essentielle pour la ségrégation des chromosomes et son absence provoque un arrêt des cellules en mitose (Strunnikov et al., 1993). En 1994, Hirano *et al.* identifient sur les chromosomes mitotiques de xénope des protéines homologues à Smc1/MukB (Hirano and Mitchison, 1994). Leur déplétion

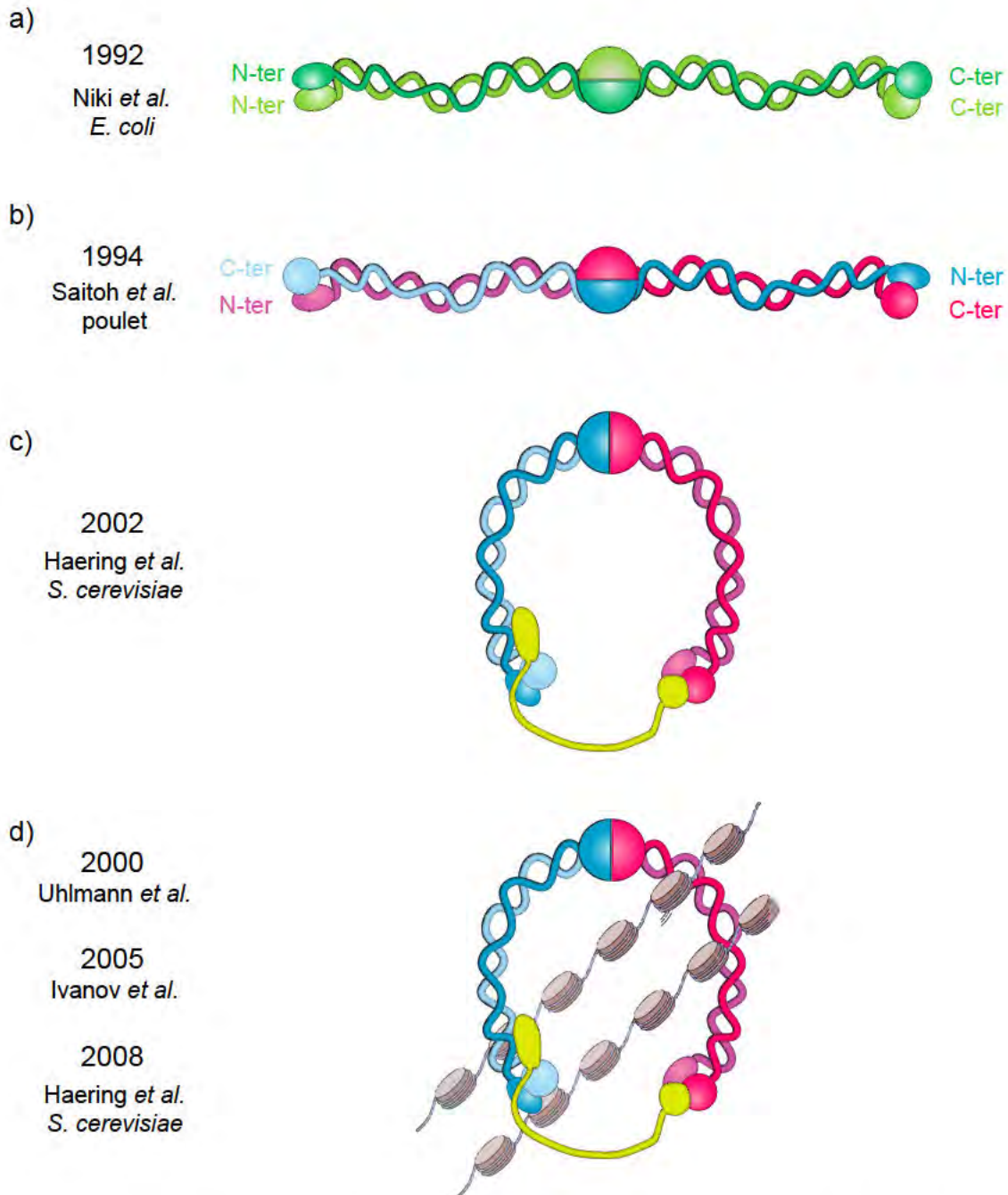


Figure 15 : Etapes clés de la découverte de l'architecture des SMCs. a) Niki *et al.* proposent que le repliement des coiled-coils soit parallèle. b) Le repliement anti-parallèle des coiled-coils est suggéré par Saitoh *et al.* en 1994 puis démontré par Melby *et al.* en 1998. c) Haering *et al.* démontrent en 2002 que les complexes SMCs forment un anneau par repliement intra-moléculaire des coiled-coils et liaison avec une sous-unité kleisin. d) Uhlmann *et al.*, Ivanov *et al.* et Haering *et al.* démontrent que la cohésine embrasse l'ADN de manière topologique.

engendre la désorganisation massive des chromosomes qui n'apparaissent plus en microscopie à fluorescence comme des fibres distinctes mais forment des amas diffus appelés « *puffs* ». Les auteurs décrivent alors ces protéines comme impliquées dans la « condensation » des chromosomes. La même année, des protéines homologues aux Smc sont également identifiées chez la levure à fission *S. pombe* (Saka et al., 1994) et chez le poulet (Saitoh et al., 1994). Dans cette dernière étude, les auteurs mettent en évidence que les sites de liaison et d'hydrolyse d'ATP sont chacun situés dans les deux domaines terminaux des protéines Smc. Afin de permettre la reconstitution d'un site fonctionnel, ils proposent que les coiled-coils s'associent de manière antiparallèle (*i.e.* qu'un domaine C-terminal soit juxtaposé à un domaine N-terminal, (Saitoh et al., 1994), Figure 15b). Puis sur la base d'alignements de séquences entre le gène *SMC1* et les séquences annotées du génome alors disponibles, un second gène codant pour une protéine Smc est identifié chez la levure *S. cerevisiae*, *SMC2* (Strunnikov et al., 1995). Cette protéine, également requise pour la ségrégation des chromosomes, est décrite pour son rôle dans la condensation des chromosomes. Alors que la déplétion de *Smc1* n'a que peu d'effets sur la condensation des chromosomes, les auteurs ont proposé l'existence, au sein des protéines Smc, de « sous familles aux fonctions biologiques différentes, même si leur similarité structurale suggère des activités biochimiques primaires communes » (Strunnikov et al., 1995). L'acronyme SMC est alors redéfini « *Structural Maintenance of Chromosomes* » (Strunnikov et al., 1995). Les années suivantes, de plus amples investigations permettent une meilleure caractérisation des deux complexes cohésines et condensines. Les condensines sont décrites chez le xénope par Hirano et ses collaborateurs comme un complexe multi protéique composé de deux protéines Smc et de trois protéines auxiliaires. Les auteurs confirment leur rôle par des expériences *ex vivo* de condensation des chromosomes incubés avec des condensines purifiées (Hirano et al., 1997). Les sous-unités des cohésines sont identifiées dans des cribles génétiques recherchant des facteurs impliqués dans la séparation précoce des chromatides sœurs (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997). Cependant, ce n'est qu'en 1998 que Losada *et al.* caractérisent chez le xénope deux complexes Smc aux propriétés distinctes : les condensines qui condensent le génome lors de la mitose et les cohésines qui sont requises dans des étapes plus précoces du cycle cellulaire afin de maintenir la cohésion des chromatides sœurs (Losada et al., 1998). De manière concomitante, des études de MET confirment l'association antiparallèle des coiled-coils dans les hétérodimères de protéines Smc (Melby et al., 1998). Cependant, il est suggéré que les deux sous-unités interagissent entre elles sur

















Organisme / Fonction	Levure <i>S. cerevisiae</i> 	Levure <i>S. pombe</i> 	Drosophile <i>D. melanogaster</i> 	Cellules de mammifères 
Sous-unités coeurs 	 Smc1	Psm1	Smc1	SMC1
	 Smc3	Psm3	Cap	SMC3
	 Scc1/Mcd1	Rad21	Rad21	RAD21
	 Scc3	Psc3	SA	SA1 et SA2
Dissociation des cohésines de l'ADN 	 Wpl1/Rad61	Wpl1	Wapl	WAPL
	 Pds5	Pds5	Pds5	PDS5A et PDS5B
Acétylation de Smc3/ Etablissement de la cohésion 	Eco1	Eso1	Deco et Sans	ESCO1 et ESCO2
Recrutement des cohésines à l'ADN 	 Scc2	Mis4	Nipped-B	NIPBL
	 Scc4	Ssl3	Mau-2	MAU2

Table II : Équivalence des noms des sous-unités des cohésines dans différents organismes modèles. Smc1, Smc3, Scc1 et Scc3 forment les sous-unités coeurs des cohésines. Pds5 et Wpl1 sont impliquées dans la dissociation des cohésines de l'ADN alors que Scc2 et Scc4 régulent leur recrutement. Eco1 est impliquée dans l'établissement de la cohésion via l'acétylation de Smc3. Deux orthologues d'Eco1 sont présents chez la drosophile et deux orthologues de Scc3, Pds5 et Eco1 sont exprimés dans les cellules de mammifères.

toute leur longueur (Figure 15b). Il faut attendre 2002 et les études cristallographiques de Haering *et al.* sur les cohésines pour prouver que le repliement des Smc est intramoléculaire et que les deux sous-unités interagissent seulement *via* leur domaine charnière ((Haering et al., 2002), Figure 15c). Cette étude en association avec celle de Gruber *et al.* menée *in vivo* permet une découverte majeure dans le domaine des SMC : la cohésine forme un anneau composé d'un hétérodimère de Smc et d'une troisième sous-unité associée aux deux têtes ATPasiques ((Gruber et al., 2003; Haering et al., 2002), Figure 15c). Un nom générique est alors attribué à la troisième sous-unité des complexes SMC, celui de « *kleisin* » (du grec « fermé ») (Schleiffer et al., 2003). Une protéine kleisin est définie comme composée de deux domaines N et C terminaux globulaires qui interagissent avec les protéines Smc et séparés entre eux par un « *linker* » moins structuré (Gruber et al., 2003; Schleiffer et al., 2003). Dès 1999, Uhlmann *et al.* ont montré que la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase nécessitait le clivage de la sous-unité kleisin des cohésines (Uhlmann et al., 1999). Puis, dans une seconde étude Uhlmann *et al.* ont induit le clivage artificiel de la kleisin par la protéase du virus du tabac (TEV) (Uhlmann et al., 2000). Le fait que cela induise la perte de cohésion des chromatides sœurs suggérait que cette dernière était établie par l'embrasement topologique de l'ADN à l'intérieur de l'anneau (Uhlmann et al., 2000). Cette hypothèse d'embrasement topologique a été confirmée par Ivanov *et al.* en 2005 puis par Haering *et al.* en 2008 ((Haering et al., 2008; Ivanov and Nasmyth, 2005), Figure 15d). Enfin, en 2014 Gligoris *et al.* mettent en évidence que la dissociation de l'interface entre la kleisin et Smc3 est nécessaire pour la sortie de l'ADN hors de l'anneau (Gligoris et al., 2014). Le mécanisme de maintenance de la cohésion par les cohésines est alors dévoilé.

C. Les cohésines

La majorité des protéines composant ou régulant les cohésines sont conservées dans l'évolution. Afin d'aider le lecteur, la Table II récapitule le nom des différents homologues de ces protéines dans les principaux organismes modèles. Sauf si explicitement mentionné, les noms des protéines utilisés dans ce manuscrit sont ceux d'usage chez la levure *S. cerevisiae*.

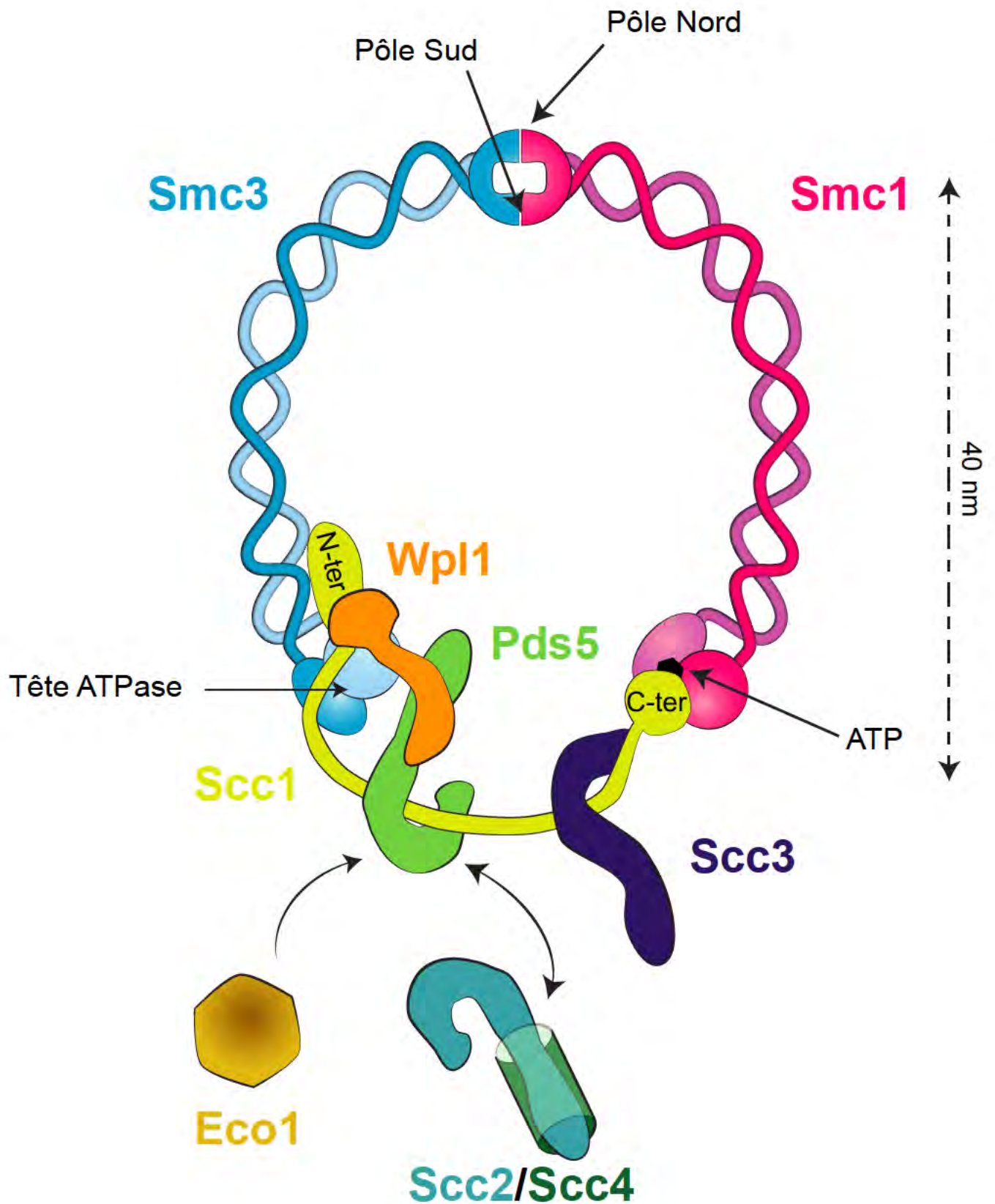


Figure 16 : Schéma de la cohésine associée à ses partenaires. L'anneau de cohésine est composé de deux sous-unités Smc: Smc1 et Smc3 et d'une sous-unité kleisin, Scc1. Les protéines Wpl1, Pds5, Scc3, Eco1, Scc2 et Scc4 sont des protéines qui s'associent à l'anneau et régulent son association avec l'ADN.

a. Un complexe multiprotéique

i. L'anneau tripartite

L'anneau de cohésine est formé par l'association des protéines Smc1, Smc3 et Scc1. Smc1 et Smc3 interagissent *via* leur domaine charnière (Haering et al., 2002). Un domaine charnière est structuré en demi-cercle et l'association de deux de ces domaines provoque la formation d'un anneau de petite taille, environ 0,5 nm de diamètre, dont l'intérieur est principalement composé d'acides aminés chargés positivement (Haering et al., 2002; Kurze et al., 2011). Il y a donc deux points de contact entre Smc3 et Smc1 au domaine charnière : au pôle Nord et au pôle Sud de cet anneau (Figure 16). Une telle structure semble conservée des bactéries aux métazoaires et pour tous les complexes SMC (Kurze et al., 2011). La kleisin Scc1 s'associe aux têtes ATPases de Smc1 et Smc3 (Haering et al., 2002) mais ne contacte pas les mêmes domaines sur les deux protéines. Alors que le domaine N-terminal de Scc1 s'associe aux coiled-coils situés à la base de la tête ATPase de Smc3 (Gligoris et al., 2014), son domaine C-terminal s'associe directement à la tête de Smc1, sans contacter les coiled-coils ((Haering et al., 2004) Figure 16). De plus, il semblerait que Scc1 ne puisse contacter Smc3 qu'après s'être associée avec la tête de Smc1 liée à de l'ATP (Arumugam et al., 2003). Ainsi, la cohésine forme un anneau asymétrique, d'environ 40 nm de diamètre, composé de deux têtes ATPases (Haering et al., 2002).

ii. Les protéines auxiliaires

Scc1 agit comme une plateforme et permet le recrutement des protéines auxiliaires appelées HAWKS pour « *HEAT proteins Associated With Kleisins* » que sont Scc3, Pds5, Wpl1 et Scc2/Scc4 ((Wells et al., 2017), Figure 16). La présence de nombreuses répétitions HEAT dans ces protéines leur confère une architecture commune composée d'une région étirée et hautement structurée formée par les répétitions HEAT et d'une région plus flexible formant un crochet (Chao et al., 2015; Chatterjee et al., 2013; Hinshaw et al., 2015; Lee et al., 2016; Ouyang et al., 2013; Roig et al., 2014). Ces protéines régulent l'association/ la dissociation de l'anneau de cohésine de l'ADN ainsi que son activité ATPase. Nous allons brièvement décrire leur fonction.

Le complexe Scc2/Scc4 régule le chargement des cohésines à l'ADN (Ciosk et al., 2000) alors que le complexe Pds5/Wpl1 lui, stimule leur dissociation (Kueng et al., 2006; Rowland et al., 2009; Sutani et al., 2009). L'association des cohésines à l'ADN est donc dynamique et dépendante de l'activité de ces deux complexes. Wpl1 est considéré comme le facteur de dissociation des

cohésines (Kueng et al., 2006). Chez les mammifères, son invalidation stabilise les cohésines sur l'ADN et provoque la compaction massive de la chromatine qui adopte, lors de l'arrêt prolongé des cellules en G1 ou G0, une structure caractéristique dite de « *vermicelli* » (Tedeschi et al., 2013). Pds5, lui, permet le recrutement de Wpl1 aux cohésines, en s'associant avec la partie N-terminale de Scc1 (Lee et al., 2016). Cependant, au-delà de son rôle dans le recrutement de Wpl1, Pds5 est également impliqué dans l'établissement et le maintien de la cohésion (Hartman et al., 2000; Panizza et al., 2000). Il exerce par conséquent un rôle à la fois stabilisateur (établissement, maintien de la cohésion) et déstabilisateur (recrutement de Wpl1) sur les cohésines. Les différents mécanismes d'action de Pds5 restent à ce jour mal compris. Cependant, il a récemment été rapporté que Pds5 entrait en compétition avec Scc2 pour sa liaison aux cohésines (Murayama and Uhlmann, 2015; Petela et al., 2018). De manière intéressante, alors que Pds5 semble inhiber l'activité ATPasique de l'anneau, Scc2, elle, la stimulerait (Petela et al., 2018).

Scc3 est associée à la partie C-terminale de Scc1 (Haering et al., 2002). Cette protéine est essentielle pour le chargement des cohésines sur l'ADN, pour l'établissement et pour maintien de la cohésion (Hu et al., 2011; Roig et al., 2014; Tóth et al., 1999). Scc3 joue également un rôle dans l'activité dépendante de Wpl1 de dissociation des cohésines de l'ADN, mais son mécanisme d'action reste inconnu (Rowland et al., 2009).

Enfin, l'association des cohésines à l'ADN est également régulée par l'acetyl-transférase Eco1 (Ivanov et al., 2002; Skibbens et al., 1999; Tóth et al., 1999). Cette dernière est recrutée à l'anneau par Pds5, elle ne fait pas partie de la famille des HAWKs (Noble et al., 2006). Elle est responsable de l'acétylation, pendant la réplication, des lysines K112 et K113 situées dans la tête ATPase de Smc3 (Moldovan et al., 2006; Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Unal et al., 2008). Une fois ces lysines acétylées, Wpl1 n'est plus en mesure de dissocier les cohésines de l'ADN, qui y deviennent alors stablement associées (Beckouët et al., 2016; Chan et al., 2012; Elbatsh et al., 2016; Lopez-Serra et al., 2013). On peut noter que Pds5 est requis à la fois pour l'acétylation de Smc3 en phase S mais également pour le maintien de cette modification post-traductionnelle (MPT) tout au long de la phase G2/M (Chan et al., 2013).

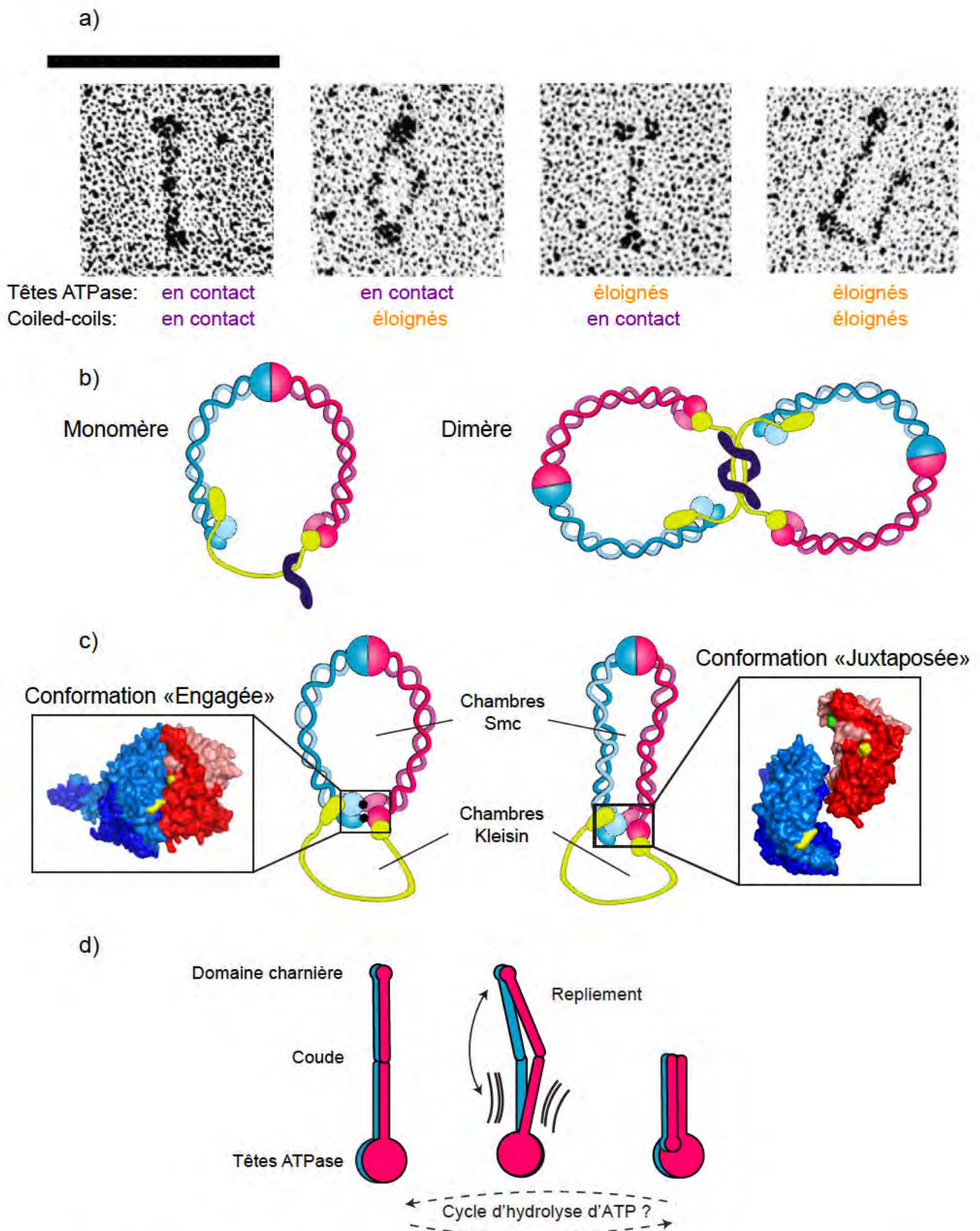


Figure 17 : Différents modèles de conformation de l'anneau de SMCs. a) Images de MET montrant différentes conformations du complexe SMC de *B. subtilis*, échelle 100 nm (Melby et al., 1998). b) La cohésine pourrait former des monomères ou des dimères (Zhang et al., 2008b). c) Selon leur liaison ou non à l'ATP, les têtes ATPases adoptent une conformation «engagée» ou «juxtaposée», respectivement (Chapard et al., 2019). d) Un coude dans les coiled-coils peut provoquer le repliement des protéines Smc (Bürmann et al., 2019).

iii. Différents modèles de conformation de l'anneau

La cohésine ne se résume pas à un simple anneau tripartite. Cet anneau adopte différentes conformations en fonction de son interaction avec ses différents partenaires, de ses MPT ou de sa liaison à l'ATP. Un haut degré de variabilité est d'ailleurs visible par MET pour le seul dimère de Smc bactériennes ((Melby et al., 1998), Figure 17a). En effet, les coiled-coils peuvent ou non interagir sur toute leur longueur et les têtes ATPases peuvent ou non se contacter. On trouve ainsi dans la littérature plusieurs modèles décrivant la conformation de l'anneau de cohésine.

Tout d'abord, de nombreuses études suggèrent que des monomères de cohésines (*i.e.* l'anneau est composé d'une molécule de chaque sous-unité) lient l'ADN ((Gruber et al., 2003; Haering et al., 2002, 2008; Ivanov and Nasmyth, 2005; Mc Intyre et al., 2007) Figure 17b gauche). En revanche, une autre étude propose que la cohésine formerait des dimères, *via* la dimérisation de Rad21 ((Zhang et al., 2008b), Figure 17b droite). La contradiction majeure entre ces études repose sur le fait que Zhang *et al.* montrent par surexpression de Rad21 dans des cellules humaines en culture, que deux versions de la protéine fusionnées à différents épitopes sont capables d'interagir entre elles. Cette surexpression pourrait engendrer des interactions forcées entre deux molécules de Rad21 et par conséquent être à l'origine d'artéfacts.

L'engagement ou non des têtes ATPases avec des molécules d'ATP semble également être déterminant pour la conformation de l'anneau. Une étude récente suggère que la liaison à l'ATP induit une association étroite entre les têtes ATPases qui adoptent une conformation « engagée ». *A contrario*, en absence d'ATP, les têtes restent proches spatialement mais légèrement décalées, elles sont alors dites « juxtaposées » ((Chapard et al., 2019; Diebold-Durand et al., 2017), Figure 17c). En adéquation avec les clichés obtenus en MET sur les complexes SMCs bactériens (Figure 17a), l'hydrolyse d'ATP semble induire une réorganisation des coiled-coils (Melby et al., 1998). Alors qu'ils semblent éloignés en présence d'ATP, l'hydrolyse de ce dernier provoque le rapprochement spatial des deux coiled-coils ((Chapard et al., 2019; Diebold-Durand et al., 2017) Figure 17c). De telles conformations de l'anneau existent *in vivo*, quelle que soit l'étape du cycle cellulaire considérée (Chapard et al., 2019). Les têtes ATPases semblent donc constamment associées l'une à l'autre. Cela implique 1) que l'anneau de cohésine serait en fait composé de deux chambres, l'une formée par les sous-unités SMC et l'autre par la kleisin et 2) que ces chambres peuvent adopter deux conformations : engagée ou juxtaposée (Figure 17c).

Enfin, des études notamment de MET ont révélé l'existence d'un coude dans les répétitions coiled-coils des protéines Smc qui permettrait le repliement du domaine charnière vers les têtes ATPases ((Bürmann et al., 2019; Melby et al., 1998), Figure 17d). Cette structure semble conservée dans tous les complexes SMC et dans l'évolution (Bürmann et al., 2019). La fonction d'un tel repliement n'a pas été mise en évidence à ce jour, mais il semblerait que l'association entre les têtes ATPases et le domaine charnière puisse avoir lieu *in vivo* (Mc Intyre et al., 2007).

b. L'association des cohésines à l'ADN

Comme mentionné précédemment, le complexe Scc2/Scc4 recrute les cohésines à l'ADN. Il s'accumule majoritairement aux centromères ainsi qu'aux séquences fortement transcrites sur les bras des chromosomes (Hu et al., 2015; Lengronne et al., 2004). De manière surprenante, les sous-unités des cohésines ne présentent pas la même distribution le long du génome mais sont associées préférentiellement aux péri-centromères (50 kb autour du centromère) et aux séquences situées entre les gènes dont la transcription est convergente (ci-après désignés comme gènes convergents) (Busslinger et al., 2017; Glynn et al., 2004; Hu et al., 2015; Lengronne et al., 2004; Paldi et al., 2019; Tanaka et al., 1999; Weber et al., 2004). Ainsi, après leur recrutement par Scc2/Scc4, les cohésines sont déplacées sur l'ADN et accumulées à distance de leur point de chargement. Le mode de translocation des cohésines sur l'ADN reste mystérieux. Différents modèles ont été proposés, ils sont présentés dans la section suivante.

A ce jour on ne possède que peu d'informations sur les étapes qui conduisent au chargement des cohésines sur l'ADN. Ce processus serait initié par la liaison de Scc2/Scc4 à l'ADN et le recrutement subséquent des cohésines (Chao et al., 2015; Murayama and Uhlmann, 2014). Des protéines du kinétochore semblent également impliquées dans le recrutement des cohésines aux centromères (Eckert et al., 2007; Hinshaw et al., 2015). De plus, l'hydrolyse d'ATP apparaît essentielle pour l'association stable des cohésines à l'ADN (Arumugam et al., 2003). En effet, des versions de Smc1 ou Smc3 capables de lier l'ATP mais incapables de l'hydrolyser sont dynamiques sur l'ADN, s'accumulent aux mêmes sites que Scc2/Scc4 et ne permettent pas l'établissement de la cohésion (Hu et al., 2011, 2015). L'hydrolyse d'ATP stimulée par Scc2 serait donc essentielle pour l'association stable des cohésines sur l'ADN (Petela et al., 2018).

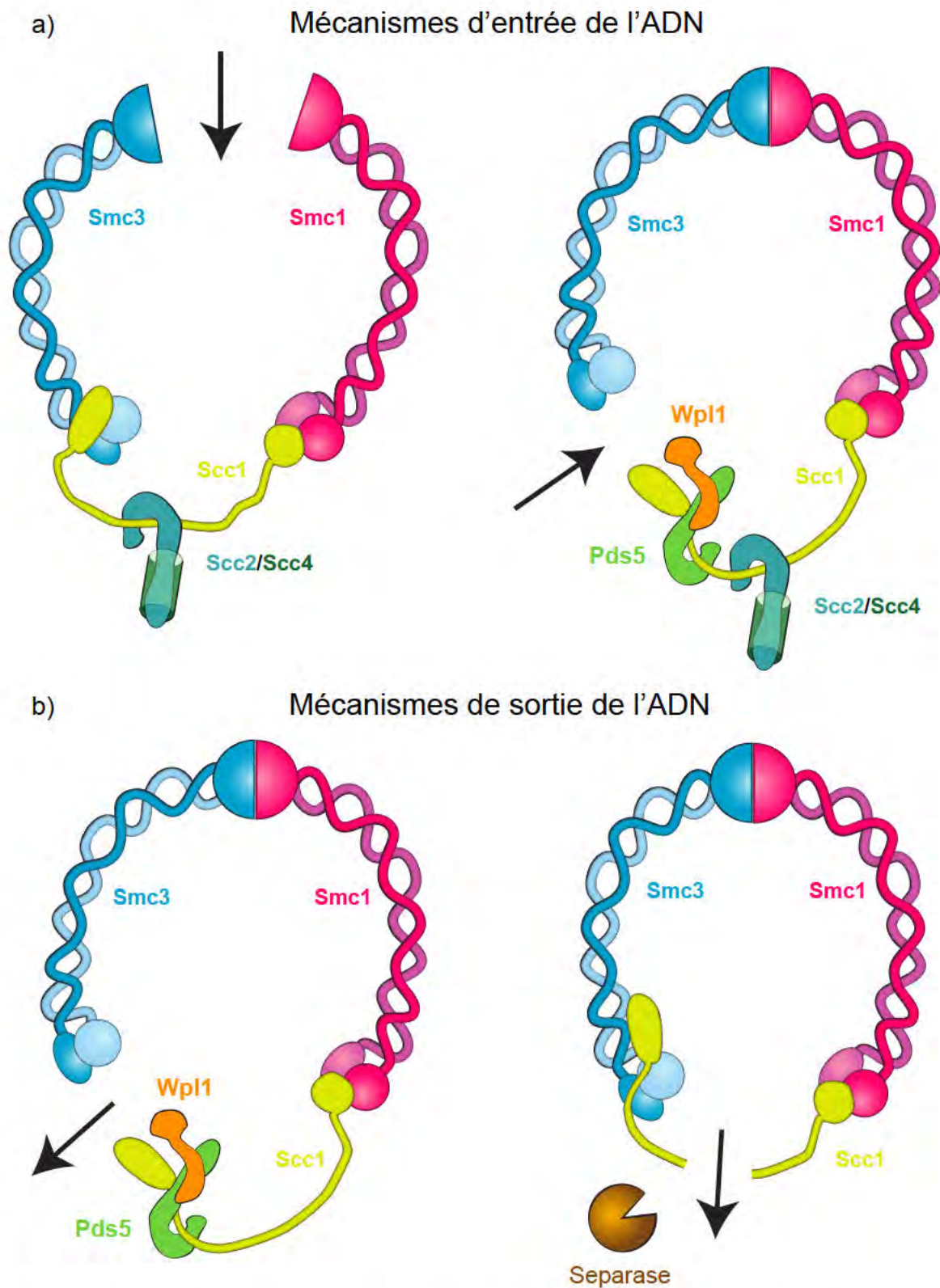


Figure 18 : Les mécanismes d'entrée et de sortie de l'ADN de l'anneau de cohésine. a) L'entrée de l'ADN pourrait s'effectuer par ouverture du domaine charnière et/ou de l'interface Smc3/Scc1 par Wpl1/Pds5. Dans les deux cas, la liaison à l'ADN requiert les protéines Scc2/Sc4. b) La sortie de l'ADN s'effectue par l'ouverture de l'interface Smc3/Scc1 par Wpl1/Pds5 et suite au clivage de Scc1 par la Séparase.

c. Un anneau avec une porte d'entrée

Afin d'établir la cohésion, il est nécessaire que la cohésine s'ouvre et permette l'entrée de l'ADN dans son anneau. Il existe trois portes d'entrée potentielles, aux trois interfaces entre Smc1, Smc3 et Scc1. Une étude réalisée dans le laboratoire de Nasmyth a visé à fusionner chaque interface et analyser le recrutement des cohésines sur l'ADN. Alors que les fusions Smc3-Scc1 et Smc1-Scc1 ne compromettaient pas le chargement des cohésines, ce dernier était aboli lors de la fusion entre les domaines charnières de Smc1 et Smc3 (Gruber et al., 2006). Les auteurs ont donc conclu que le chargement des cohésines s'effectuait *via* le domaine charnière (Figure 18a gauche). Cependant la fusion entre deux protéines pouvant induire des réarrangements importants et mener à la formation d'artefacts, d'autres études ont cherché à affiner ce résultat. L'introduction de mutations ponctuelles dans le pôle Sud du domaine charnière semble altérer le recrutement des cohésines sur les chromosomes, alors que le complexe est convenablement assemblé (Mishra et al., 2010). De plus, lors de la mutation des charges positives du domaine charnière vers une charge globalement neutre, les cohésines sont accumulées sur les chromosomes mais ne sont pas capables d'embrasser topologiquement l'ADN ni de former de la cohésion (Kurze et al., 2011; Srinivasan et al., 2018). Ces données suggèrent que l'ouverture du domaine charnière entre Smc1 et Smc3 est essentielle pour la capture topologique de l'ADN par les cohésines mais pas nécessairement pour une association non topologique comme par exemple pour l'établissement des boucles de chromatine (Figure 19, voir ci-après).

Une autre étude réalisée dans le laboratoire d'Uhlmann propose que l'entrée de l'ADN à l'intérieur de l'anneau soit effectuée par la dissociation de l'interface entre Smc3 et Scc1 par Wpl1/Pds5 ((Murayama and Uhlmann, 2015), Figure 18a droite). Dans cette étude, l'incubation *in vitro* de l'anneau de cohésine en présence de Wpl1 et de Pds5 semble stimuler la formation de dimères de mini-chromosomes et donc l'association topologique du complexe avec l'ADN. Ce modèle est compatible avec les données montrant une réduction de l'accumulation des cohésines et un défaut de cohésion dans des souches invalidées pour Wpl1 (Rowland et al., 2009; Sutani et al., 2009). La contradiction apparente entre le fait que Wpl1 soit à la fois requis pour dissocier les cohésines de l'ADN et pour établir la cohésion suggère que l'enfermement des deux brins d'ADN nécessite un certain niveau de dynamisme de l'anneau de cohésine.

Alors que ces deux modèles paraissent à première vue contradictoires, le repliement du domaine charnière vers les têtes Smc (par l'intermédiaire du coude dans les coiled-coils)

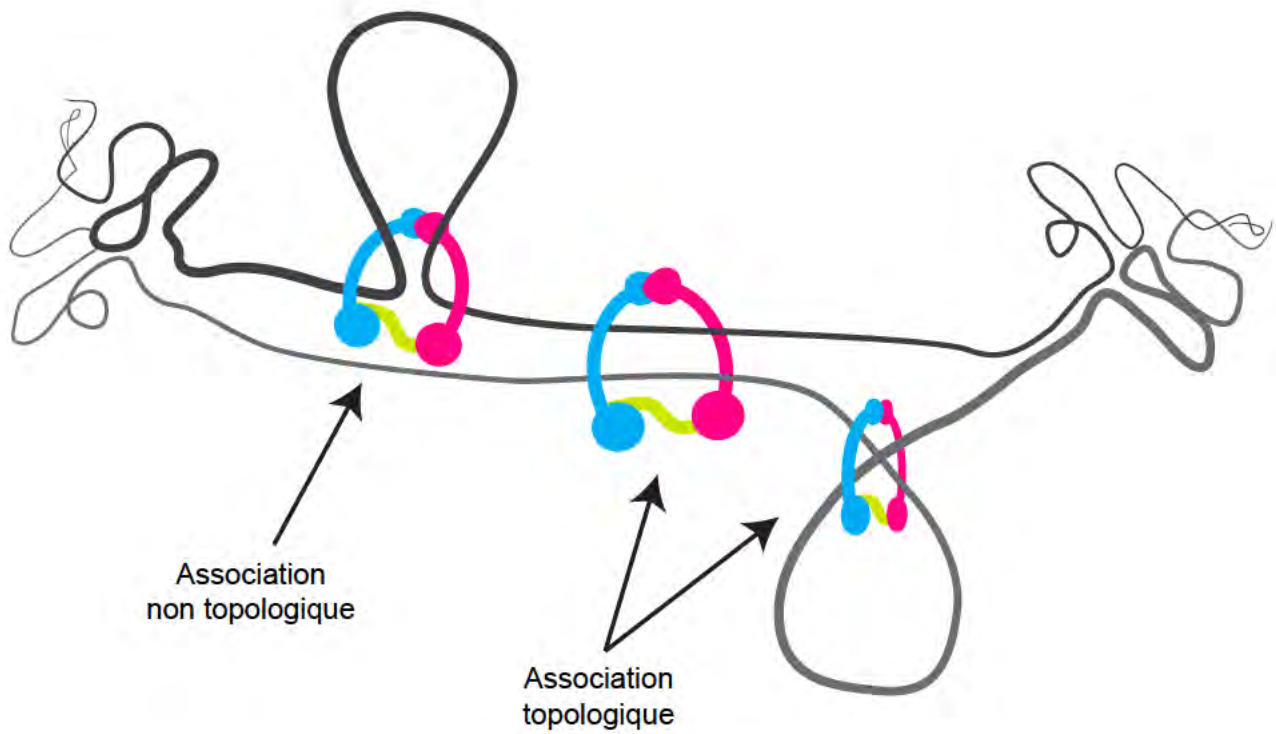


Figure 19 : Associations topologique et non topologique des cohésines à l'ADN. Contrairement à l'association topologique, l'association non topologique des cohésines à l'ADN ne requiert pas nécessairement l'ouverture de l'anneau.

permettrait de concilier un rôle à la fois du domaine charnière et de l'interface Smc3-Scc1 dans le chargement des cohésines sur l'ADN (Bürmann et al., 2019). De plus une étude très récente suggère que les résidus de Smc3 et de Scc1 situés à proximité de l'interface Smc3-Scc1 sont impliqués dans l'ouverture d'une deuxième interface de l'anneau (vraisemblablement Smc1-Smc3) et donc dans le recrutement des cohésines à l'ADN (Guacci et al., 2019). Ainsi le chargement des cohésines sur l'ADN semble être un processus complexe impliquant Wpl1, Pds5, Scc2, Scc3 et l'ouverture de plusieurs interfaces de l'anneau.

d. Un anneau avec deux portes de sortie

Afin que la ségrégation des chromatides sœurs puisse être effective, les cohésines doivent également être dissociées de l'ADN. Pour cela, deux mécanismes entrent en jeu. Un premier, actif en interphase, implique la dissociation de l'interaction Smc3-Scc1 par Wpl1/Pds5 ((Beckouët et al., 2016; Chan et al., 2012; Elbatsh et al., 2016; Lopez-Serra et al., 2013), Figure 18b gauche). L'ouverture de cette interface nécessite la liaison de l'ATP et vraisemblablement l'hydrolyse de l'ATP présent dans la tête Smc3 (Beckouët et al., 2016; Elbatsh et al., 2016). Comme mentionné précédemment, chez la levure *S. cerevisiae* ce mécanisme est contrecarré par l'acétylation de Smc3-K112 et K113 (Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Unal et al., 2008). Chez les métazoaires, la seule acétylation de ces mêmes résidus de Smc3 (K105 et K106 chez l'homme) ne suffit pas à inhiber l'action de Wpl1/Pds5 (Zhang et al., 2008a). Cela nécessite le recrutement d'une protéine supplémentaire aux cohésines, la Sororin (Nishiyama et al., 2010; Rankin et al., 2005).

Le deuxième mécanisme de dissociation des cohésines de l'ADN a lieu à la transition métaphase-anaphase où la sous-unité kleisin Scc1 est clivée par une thiol-protéase, la séparase ((Ciosk et al., 1998; Uhlmann et al., 1999, 2000), Figure 18b droite). Ce clivage protéolytique, stimulé par la phosphorylation préalable de Scc1 par la kinase Polo Cdc5 (Alexandru et al., 2001) provoque l'ouverture de l'anneau, sa dissociation de l'ADN et permet la ségrégation des chromatides sœurs.

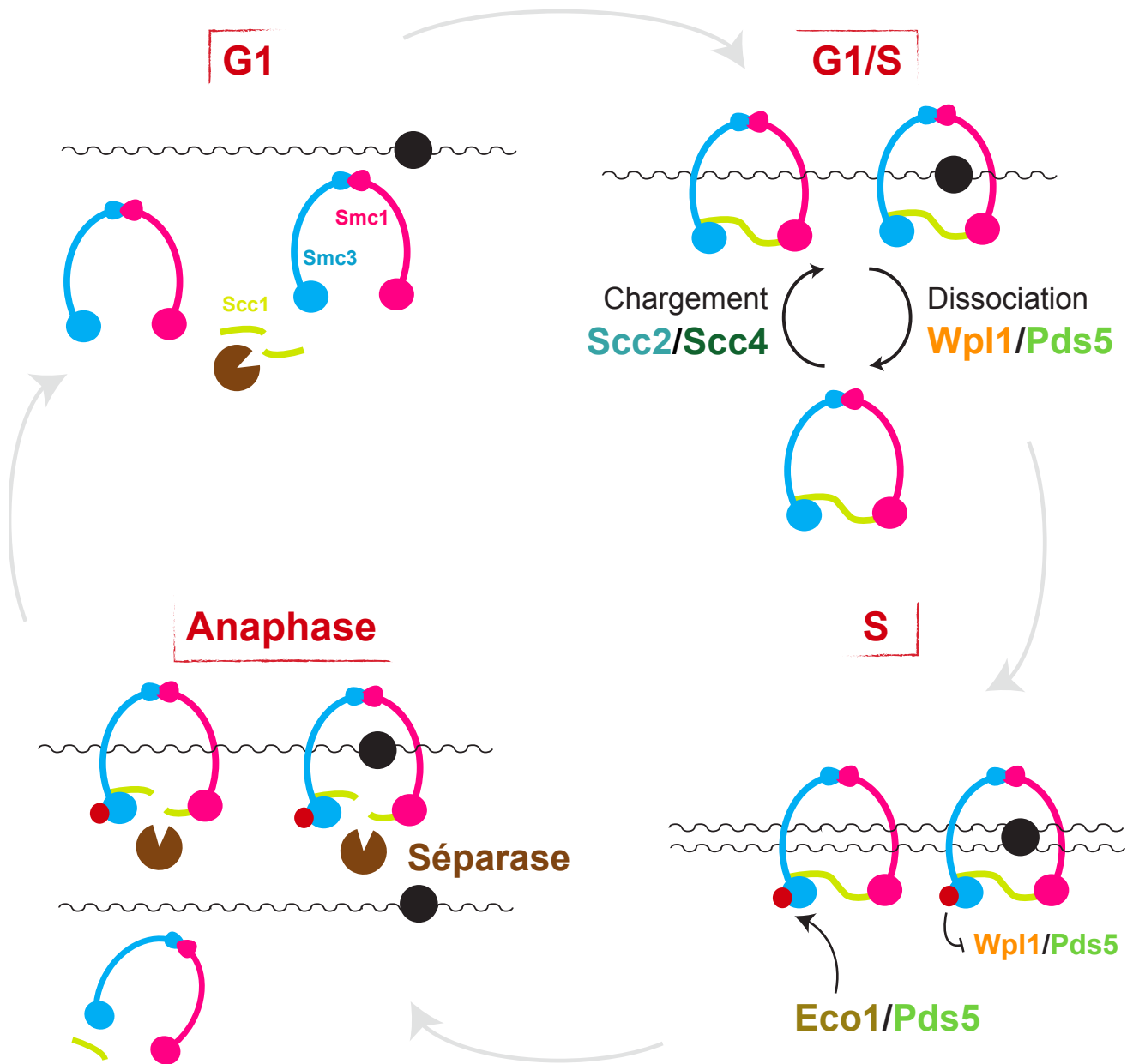


Figure 20 : Etablissement et abolition de la cohésion chez *S. cerevisiae*. Les cohésines sont absentes des chromosomes en G1, elles ne sont chargées qu'à la transition G1/S par le complexe Scc2/Scc4. En parallèle, le complexe Wpl1/Pds5 les dissocie de l'ADN. Les cohésines sont alors dynamiques sur l'ADN. Lors de la réplication, Pds5 recrute Eco1 qui acétyle Smc3 (cercle rouge) et stabilise les cohésines sur l'ADN. La séparase (cercle ouvert marron) clive Scc1 à la transition méta-phase-anaphase pour permettre la ségrégation des chromatides sœurs. Smc3 est déacétylé et les fragments de Scc1 sont dégradés.

D. Les rôles des cohésines

a. La cohésion

La cohésine tire son nom de son rôle décrit à l'origine dans la cohésion des chromatides sœurs. Cette dernière est établie en phase S, maintenue jusqu'en anaphase, essentielle pour la bi-orientation des kinétochores et par conséquent pour la ségrégation fidèle des chromosomes et la stabilité du génome (Dewar et al., 2004; Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997). Alors que la cohésion n'est établie que quelques heures lors de la division mitotique, elle doit être maintenue plusieurs mois voire plusieurs années lors de la méiose, dans les ovocytes (Burkhardt et al., 2016). L'établissement et le maintien de la cohésion sont donc essentiels pour la survie cellulaire et doivent être hautement régulés. Les principales étapes menant à l'établissement et au maintien de la cohésion chez la levure *S. cerevisiae* ainsi que chez les mammifères sont abordées dans la section suivante.

i. Chez la levure *S. cerevisiae*

Les principales étapes de l'établissement et de l'abolition de la cohésion sont résumées en Figure 20.

Les cohésines sont absentes des chromosomes en G1. Cela est provoqué d'une part par la faible expression de Scc1 et d'autre part par le clivage des protéines résiduelles par la séparase active à cette étape du cycle (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997).

Le passage du point Start voit la stimulation de l'expression de Scc1 et la séquestration de la séparase par son inhibiteur, la sécurine (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997). L'anneau de cohésine est alors assemblé et recruté sur l'ADN par Scc2/Scc4 (Ciosk et al., 2000; Lengronne et al., 2004; Uhlmann and Nasmyth, 1998). Cependant, cette association n'est que transitoire car les cohésines sont également dissociées de l'ADN par Wpl1/Pds5 (Gerlich et al., 2006a; Rowland et al., 2009; Sutani et al., 2009). A ce stade, les cohésines sont donc dynamiques sur l'ADN et engagées dans des cycles constants d'association/dissociation (Chan et al., 2012; Gerlich et al., 2006a).

La cohésion est établie lors de la phase S, par piégeage du brin d'ADN répliqué dans l'anneau de cohésine (Ivanov and Nasmyth, 2005; Uhlmann and Nasmyth, 1998). Afin de prévenir le relargage de l'ADN, l'acétyl-transférase Eco1 acétyle les lysines K112 et K113 de Smc3 (Ivanov et al., 2002; Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Skibbens et al., 1999; Tóth et al., 1999; Unal et al., 2008). Cette acétylation inhibe l'action de Wpl1/Pds5, stabilise des cohésines sur l'ADN et maintient la cohésion entre les chromatides sœurs (Beckouët et al., 2016; Elbatsh et al., 2016; Rowland et al., 2009; Sutani et al., 2009). L'établissement de la cohésion ne semble pas nécessiter un chargement *de novo* de cohésines à l'ADN, mais serait initié par des cohésines préalablement chargées sur l'ADN (Lengronne et al., 2006; Rhodes et al., 2017; Srinivasan et al., 2019). La machinerie de réplication semble également jouer un rôle primordial dans ce processus. En effet, Eco1 interagit directement avec PCNA, un facteur présent à la fourche de réplication (Moldovan et al., 2006). De plus, l'invalidation de plusieurs facteurs de réplication provoque des défauts de cohésion (Hanna et al., 2001; Skibbens, 2004; Skibbens et al., 1999).

Par ailleurs, Eco1 peut établir la cohésion après induction de cassures doubles brins en G2/M, soit après la réplication (Heidinger-Pauli et al., 2009; Unal et al., 2007). Cette observation suggère un rôle additionnel d'Eco1 dans l'établissement de la cohésion, indépendant de la machinerie de réplication. Deux modèles peuvent être avancés pour l'établissement de la cohésion : 1) un modèle passif où la fourche de réplication passe directement à travers l'anneau et 2) un modèle actif selon lequel l'anneau de cohésine s'ouvre transitoirement pour faciliter le passage de la fourche puis se referme après capture du second brin d'ADN. Le mécanisme précis d'établissement de la cohésion reste mal compris et constitue un vaste domaine d'études qui promet des découvertes majeures dans les prochaines années.

Lors de la phase G2/M, l'activité du complexe Scc2/Scc4 provoque le chargement ininterrompu des cohésines sur l'ADN (Uhlmann and Nasmyth, 1998). Cependant cette fraction de cohésines non acétylées est sensible à l'action de Wpl1/Pds5 (Rowland et al., 2009; Sutani et al., 2009). Il existe donc deux fractions de cohésines liées à l'ADN en G2/M : une fraction stable et acétylée et une fraction dynamique, non acétylée (Chan et al., 2012; Gerlich et al., 2006a). On peut noter que cette fraction dynamique, recrutée après la phase S, n'est pas capable d'établir la cohésion (Uhlmann and Nasmyth, 1998).

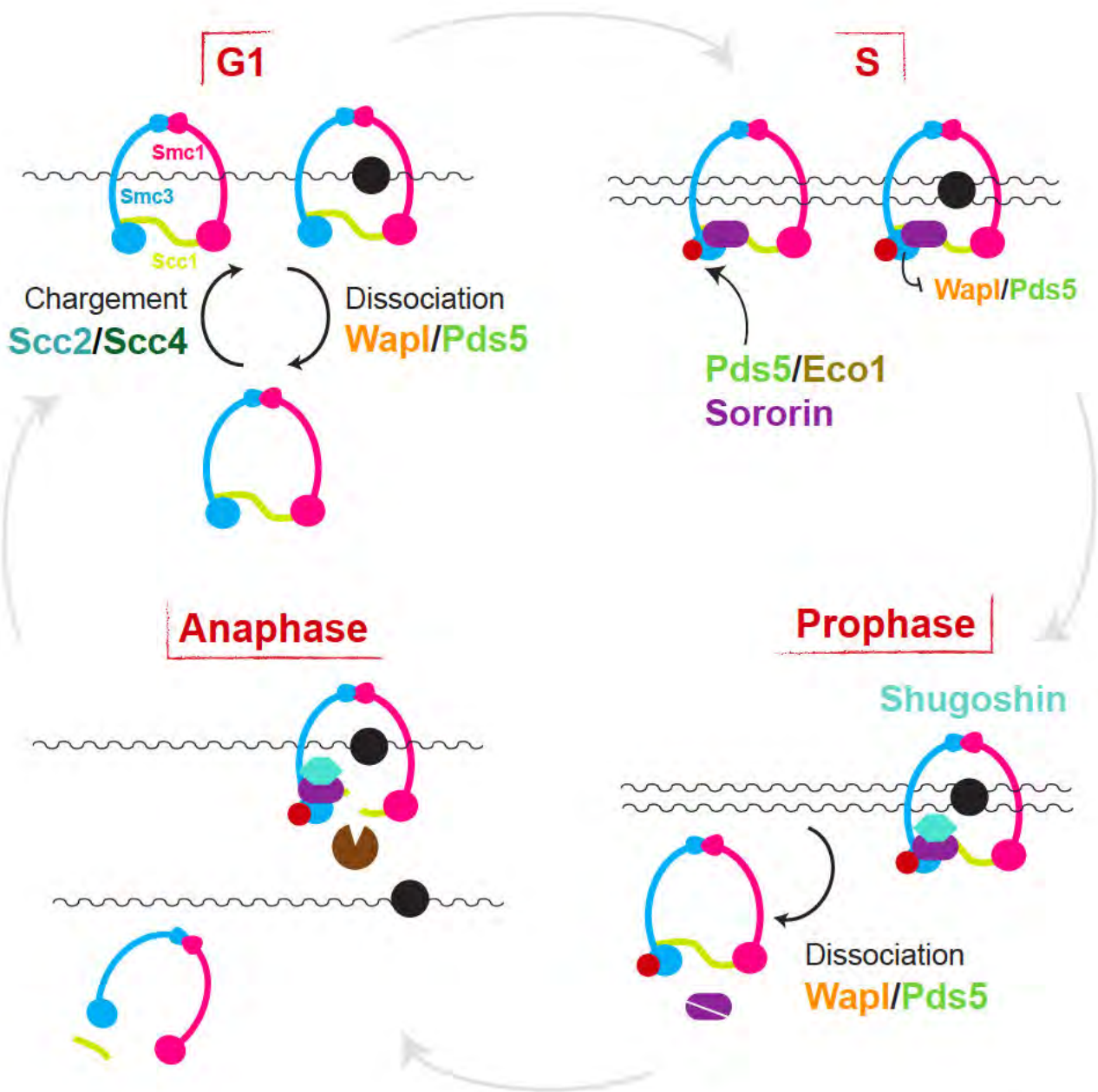


Figure 21 : Etablissement et abolition de la cohésion chez les mammifères. En G1, la cohésine est chargée sur les chromosomes. L'établissement de la cohésion requiert l'acétylation de Smc3 ainsi que le recrutement de la protéine Sororin. Lors de la prophase, la phosphorylation de Sororin provoque le recrutement de Wapl et la dissociation des cohésines des bras des chromosomes. Aux centromères, Shugoshin inhibe la phosphorylation de Sororin. Les cohésines présentes sur les séquences centromériques sont clivées par la Séparase en anaphase.

L'entrée en mitose s'accompagne notamment de l'activation de la kinase Cdc5 et du complexe APC (Irniger et al., 1995; King et al., 1995; Sudakin et al., 1995). Alors que la première provoque la phosphorylation de Scc1, le second induit la dégradation de la sécurine (Alexandru et al., 2001; Cohen-Fix et al., 1996; Funabiki et al., 1996). La séparase, alors libérée de son inhibiteur, clive la forme phosphorylée de Scc1 (Ciosk et al., 1998; Uhlmann et al., 1999, 2000). Après clivage, l'anneau est dissocié de l'ADN. Smc3 est dé-acétylé par la protéine Hos1, afin de permettre le recyclage de la protéine (Beckouët et al., 2010; Borges et al., 2010; Xiong et al., 2010). En effet l'acétylation persistante de Smc3 ou l'expression de versions constitutivement acétylées de la protéine ne sont pas recrutées sur l'ADN et ne peuvent pas établir la cohésion (Borges et al., 2010; Guacci and Koshland, 2012; Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Unal et al., 2008). Le fragment C-terminal de Scc1 est dégradé par le « *N-end rule* » (voie de dégradation ciblant des protéines en fonction de leur séquence N-terminale, pour revue (Varshavsky, 2011)) afin qu'il ne puisse pas entrer en compétition avec la forme pleine longueur de la protéine dans le cycle suivant (Rao et al., 2001). Le fragment N-terminal est lui dissocié de Smc3 par Wpl1 (Beckouët et al., 2016). Le complexe APC reste actif durant la phase G1, expliquant l'activité persistante de la séparase à cette phase du cycle (Michaelis et al., 1997).

ii. Chez les mammifères

Le cycle des cohésines dans les organismes multicellulaires fait intervenir des acteurs et des régulations supplémentaires à ceux de levure détaillés plus haut. Nous allons décrire les principales différences entre ces deux cycles (Figure 21).

Tout d'abord, les protéines de levure Pds5, Eco1 ou Scc3 sont présentes en deux exemplaires chez l'homme, à savoir PDS5A et PDS5B, ESCO1 et ESCO2 et SA1 et SA2 (Table II). Bien qu'il existe des différences fonctionnelles entre ces paralogues, leurs rôles spécifiques (ou non) sur la régulation de l'anneau de cohésines ne sont pas encore clairement établis (pour ESCO1 et ESCO2 voir plus bas).

Le chargement des cohésines sur l'ADN s'effectue dès la fin de mitose, en télophase. Elles sont alors dynamiques sur l'ADN et leur stabilisation lors de la phase S implique l'acétylation des lysines K105 et K106 de Smc3 par ESCO1 et ESCO2 ainsi que le recrutement de la protéine Sororin (Nishiyama et al., 2010; Rankin et al., 2005; Zhang et al., 2008a). Cette dernière entre en

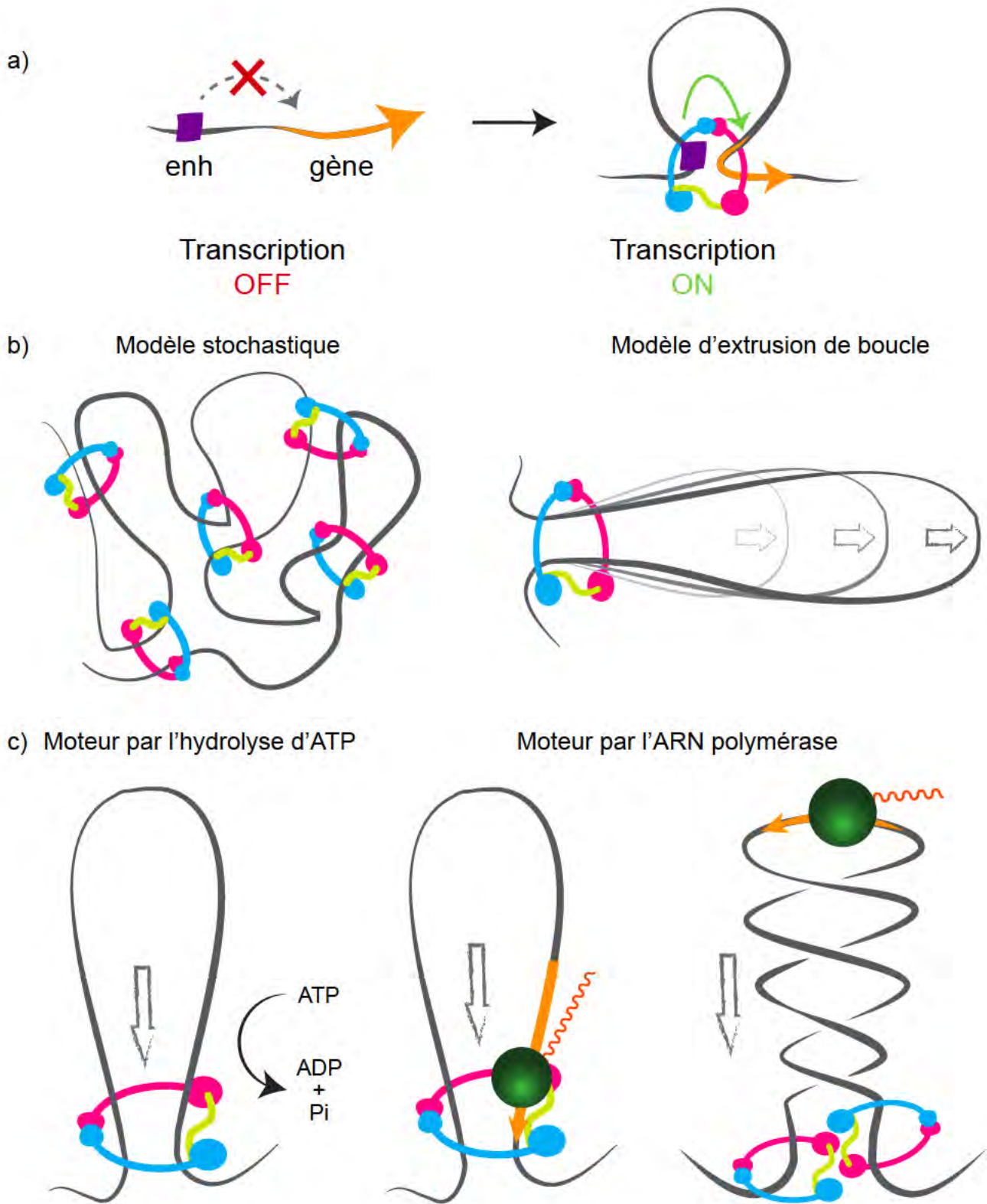


Figure 22 : Modèles de formation des boucles de chromatine par les cohésines. a) Schéma représentant l'activation d'un gène suite au rapprochement entre un enhanceur et le promoteur de ce gène grâce à la formation d'une boucle de chromatine par les cohésines. b) Modèles de formation de boucles par les cohésines : stochastique (gauche) ou par extrusion de boucle (droite). c) Trois modèles de moteur permettant l'agrandissement de la taille des boucles de chromatine dépendantes des cohésines : les cohésines sont poussées par l'énergie apportée par l'hydrolyse d'ATP (gauche) ; par l'ARN polymérase (cercle vert) transcrivant un gène (flèche orange, milieu) et/ou par les stress topologiques induits par la transcription (droite).

compétition avec Wpl1 pour sa liaison à Scc1 (Nishiyama et al., 2010). Une fois Sororin recrutée aux cohésines, Wpl1 ne peut donc plus se lier à Scc1, ce qui stabilise les cohésines sur l'ADN.

Lors de la prophase, la phosphorylation de Sororin provoque sa dissociation de l'anneau (Nishiyama et al., 2010). Wapl est alors de nouveau recruté aux cohésines et les dissocie de l'ADN. Ce phénomène est responsable de la dissociation de la grande majorité des cohésines des bras des chromosomes en prophase et nécessite également la phosphorylation de Scc3 (Hauf et al., 2005; Losada et al., 1998; Tedeschi et al., 2013). La phosphorylation de Sororin est inhibée spécifiquement aux centromères, par l'action de la protéine Shugoshin, elle-même recrutée par les kinétochores (McGuinness et al., 2005). Les cohésines présentes à proximité des séquences centromériques sont donc protégées de l'action de Wpl1 en prophase et seront clivées par la Séparase à la transition métaphase-anaphase (Waizenegger et al., 2000).

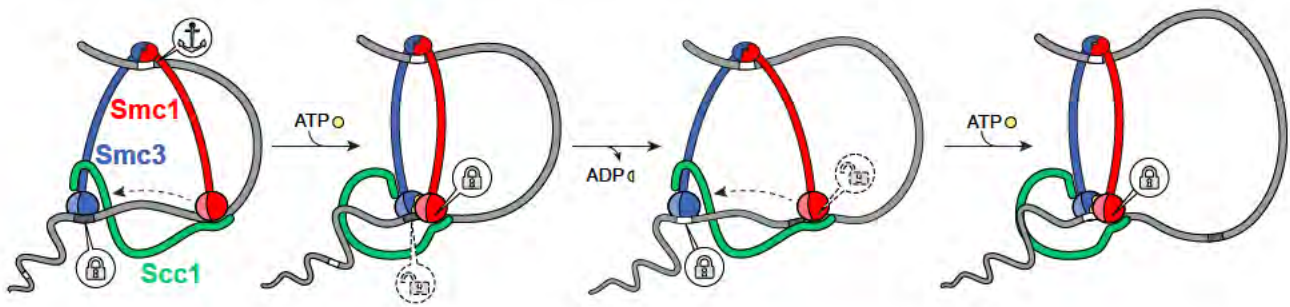
b. L'organisation du génome

Il est aujourd'hui admis qu'en plus d'établir la cohésion, les cohésines jouent un rôle majeur dans l'organisation 3D du génome en interphase (Gassler et al., 2017; Haarhuis et al., 2017; Lazar-Stefanita et al., 2017; Rao et al., 2017; Schalbetter et al., 2017; Wutz et al., 2017). Elles permettent la formation de boucles de chromatine en capturant deux fragments d'ADN appartenant à une même molécule. Deux éléments distants sur la séquence primaire (tels que des enhanceurs et des promoteurs) peuvent ainsi entrer en contact et induire la transcription d'un gène (Figure 22a). Les conséquences de la formation de boucles de chromatine sur l'organisation du génome sont plus amplement détaillées dans le Chapitre IV de cette introduction. Le mécanisme par lequel les cohésines établissent de telles boucles de chromatine reste obscur mais différents modèles ont été proposés pour l'expliquer. Nous allons aborder ici les plus pertinents.

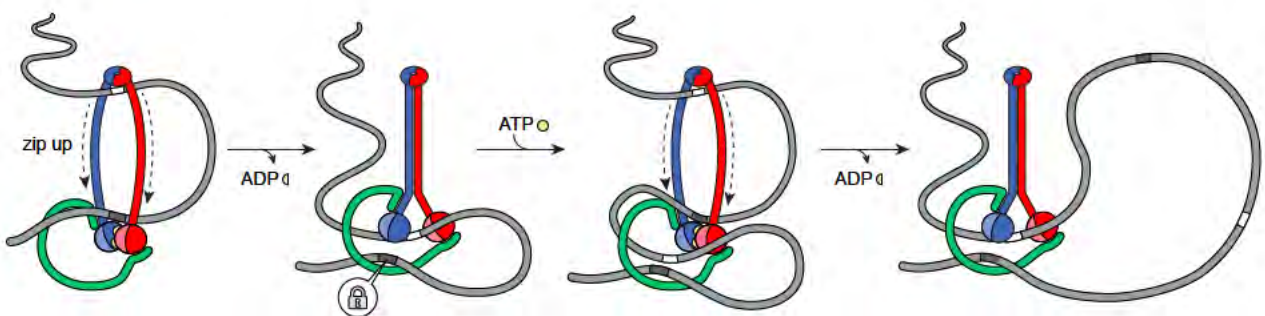
Tout d'abord, un modèle dit stochastique postule que l'anneau présent sur une séquence d'ADN capture de manière aléatoire toute fibre d'ADN présente à proximité ((Cheng et al., 2015), Figure 22b gauche). Cependant ce modèle n'explique pas comment les cohésines pourraient d'une part stimuler l'interaction entre un enhanceur et un de ses promoteurs cibles et d'autre part défavoriser l'interaction de ce même enhanceur avec un autre promoteur dont l'activation serait délétère pour la cellule.

Alternativement, les cohésines se fixeraient sur l'ADN et induiraient la formation de grandes boucles par l'extrusion progressive de la chromatine à travers l'anneau ((Alipour and Marko, 2012;

a) Modèle de marche sur le chromosome



b) Modèle de pompe



c) Modèle de flexion-extension

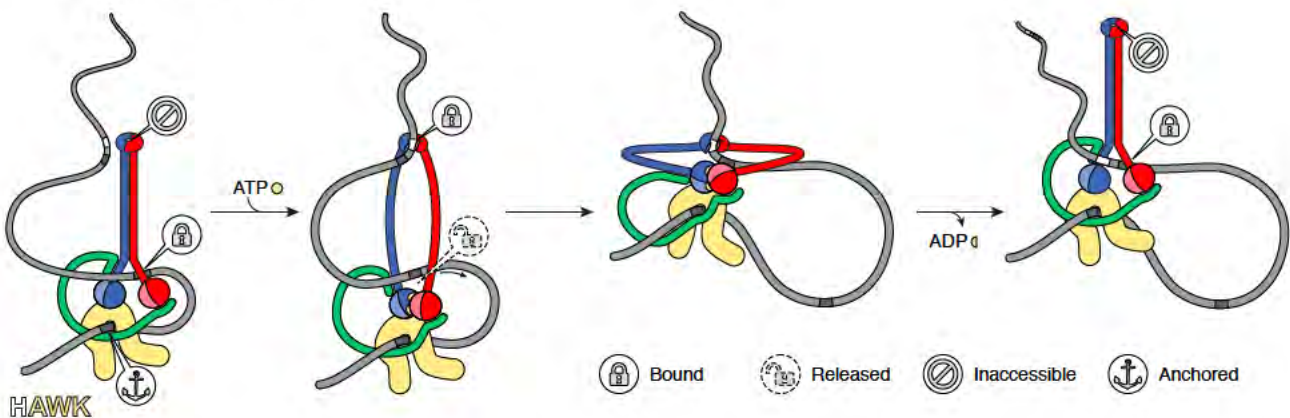


Figure 23 : Différents modèles de translocation des cohésines sur l'ADN. a) Modèle de marche sur le chromosome: les têtes ATPases des complexes SMCs lient successivement l'ADN lors de la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. b) Modèle de pompe: l'ADN lié au domaine charnière est relocalisé dans la chambre kleisin lors de l'hydrolyse d'ATP. c) Modèle de flexion-extension: l'ADN lié au domaine charnière est amené à proximité des têtes ATPases par le repliement des protéines SMC via le coude présent dans le coiled-coil lors de l'hydrolyse de l'ATP (Hassler et al., 2018).

Nasmyth, 2001b), Figure 22b droite). Ce modèle, connu sous le nom d'extrusion de boucles ou « *loop extrusion* » implique un apport d'énergie nécessaire au déplacement des cohésines sur l'ADN et/ou au « pompage » de l'ADN à travers l'anneau. Plusieurs modèles sont envisagés quant à la nature de ce moteur (pour revue (Hassler et al., 2018)).

1) Il pourrait être intrinsèque aux cohésines. L'énergie nécessaire à l'extrusion de boucles serait alors apportée par l'hydrolyse d'ATP ((Alipour and Marko, 2012) Figure 22c gauche). Il a été montré *in vitro* que le complexe condensine de *S. cerevisiae* était capable d'extruder de l'ADN à travers son anneau par un mécanisme nécessitant l'hydrolyse d'ATP (Ganji et al., 2018; Terakawa et al., 2017). Une même conclusion a pu être tirée suite à l'étude *in vivo* du complexe SMC de *Bacillus subtilis* (Wang et al., 2018). La conservation structurale et fonctionnelle entre les condensines et les cohésines laisse à penser que ces dernières sont également capables d'initier un processus d'extrusion de boucles. Une telle activité reste cependant à être démontrée. Sur la base des données disponibles à la fois sur la biochimie des cohésines et sur les moteurs moléculaires cytoplasmiques, différents modèles explicitant le mécanisme d'agrandissement des boucles de chromatine par les cohésines ont été proposés. Nous allons en présenter trois brièvement (pour revue (Hassler et al., 2018)) :

- le modèle de marche sur le chromosome ((Terakawa et al., 2017), Figure 23a). Il est basé sur l'ancrage d'une fibre d'ADN au domaine charnière et sur le déplacement successif des têtes ATPases sur une seconde fibre. En présence d'ATP, les têtes des protéines Smc sont ancrées à l'ADN. L'hydrolyse d'ATP provoque le désengagement d'une des deux têtes qui se déplace et s'ancre à distance de la seconde. Lors de la liaison d'une nouvelle molécule d'ATP, cette seconde tête se rapproche de la première et provoque l'agrandissement de la boucle d'ADN liée à la fois aux têtes ATPases et au domaine charnière. Ce modèle présente plusieurs défauts majeurs : il semble incompatible avec l'observation que les têtes ATPases restent à proximité après hydrolyse de l'ATP et aucune preuve n'a été apportée à ce jour que les têtes ATPases puissent lier alternativement l'ADN. De plus, il n'explique pas ce qui empêcherait la cohésine de capturer une autre molécule d'ADN à proximité dans l'espace nucléaire, alors que cela entraverait la formation d'une boucle de chromatine.

- le modèle de pompe ((Minnen et al., 2016), Figure 23b). Selon ce modèle, en présence d'ATP, deux boucles d'ADN sont formées dans les deux chambres SMC et kleisin. Lors de l'hydrolyse d'ATP, les deux coiled-coils se rapprochent physiquement et les têtes ATPases se

désengagent. La boucle d'ADN de la chambre SMC est alors poussée vers la chambre kleisin, ce qui agrandit la boucle déjà présente dans cette dernière. Ce modèle est en adéquation avec les changements structuraux des coiled-coils et des têtes ATPases lors de l'hydrolyse d'ATP. Cependant, il n'explique ni la formation de la boucle de chromatine dans la chambre SMC ni le mécanisme d'ancrage de l'ADN dans la chambre kleisin. Alors que la sous-unité Brn1 des condensines pourrait agir comme une ancre et permettre l'association stable du complexe à l'ADN, aucune activité de ce type n'a été rapportée pour les HAWKs des cohésines.

- le modèle de flexion-extension ((Terakawa et al., 2017), Figure 23c). D'après ce modèle, en absence d'ATP deux fibres d'ADN sont ancrées aux cohésines : une dans la chambre kleisin et une dans la chambre SMC, à proximité des têtes ATPases. La liaison de l'ATP provoque l'éloignement des coiled-coils, la libération de la fibre d'ADN ancrée aux têtes SMC et la capture d'une troisième fibre d'ADN par le domaine charnière. Puis, le complexe se replie *via* le coude présent dans les coiled-coils (Figure 17d), ce qui induit le rapprochement spatial entre le domaine charnière et les têtes ATPases. La fibre d'ADN initialement liée au domaine charnière est transférée vers les têtes ATPases où elle s'ancre après hydrolyse de l'ATP et provoque l'agrandissement de la boucle de chromatine. Ce modèle est attrayant car il implique un rôle central du domaine charnière dans la capture de l'ADN et le repliement des cohésines *via* leur coude. Cependant il n'apporte aucune explication quant à l'interaction entre le domaine charnière et les têtes ATPases.

On peut noter que ces trois modèles ne prennent pas en compte un aspect important de la formation des boucles : la directionnalité de l'extrusion. En effet, afin que les boucles puissent augmenter en taille, il est nécessaire que les cohésines soient processives, qu'elles aillent toujours dans la même direction sur l'ADN et qu'elles ne reculent pas. Les mécanismes permettant une telle directionnalité du mouvement des SMCs sur l'ADN ne sont pas élucidés.

2) Selon un second modèle, le moteur moléculaire pourrait être externe aux cohésines et généré par les ARN polymérases en cours de transcription. Les polymérases pourraient pousser physiquement les cohésines et ainsi induire leur translocation sur l'ADN (Figure 22c, milieu). Il a été montré *in vitro* sur des fibres d'ADN liées à leurs deux extrémités sur une plaque de verre et incubées avec des cohésines et avec l'ARN polymérase du bactériophage T7 qu'un tel type d'interaction cohésine-polymérase était possible (Davidson et al., 2016). Alternativement, la

translocation des cohésines pourrait être induite par les stress topologiques accumulés lors de la transcription d'un gène (Figure 22c droite). En effet, une étude *in silico* suggère que l'accumulation des super-enroulements de l'ADN pourrait déplacer les cohésines à distance du site de transcription (Racko et al., 2018). Le modèle favorisant un moteur externe aux cohésines est basé sur l'observable que le taux d'hydrolyse d'ATP par les condensines *in vitro* est très faible (environ 0,2 molécule hydrolysée par seconde) et ne semble pas compatible avec la formation de boucles de chromatine pouvant atteindre plusieurs centaines de kilobases chez les mammifères (Dixon et al., 2012; Murayama and Uhlmann, 2014). Ce modèle est en adéquation avec la relocalisation des cohésines en 3' d'un gène lors de sa transcription (Bausch et al., 2007; Busslinger et al., 2017; Lengronne et al., 2004; Ocampo-Hafalla et al., 2016) et l'accumulation de l'anneau entre les gènes convergents (Busslinger et al., 2017; Lengronne et al., 2004). Cependant d'après ce modèle l'altération de la transcription des gènes devrait modifier le profil d'accumulation des cohésines le long du génome : les cohésines nouvellement recrutées à l'ADN ne pourraient pas être relocalisées à distance de leur point de chargement en absence de transcription. Ainsi ce modèle ne permet donc pas d'expliquer l'absence de relocalisation des cohésines après inhibition de la transcription (Vian et al., 2018).

Bien que le mécanisme d'extrusion de boucles soit favorisé pour expliquer le rôle des cohésines dans l'organisation du génome, il n'est, à ce jour, que théorique. En effet, il est envisageable que les cohésines et les condensines emploient des mécanismes distincts pour extruder la chromatine.

c. Cohésion vs. organisation du génome

La cohésine capture dans son anneau deux brins d'ADN. Ces derniers peuvent être intermoléculaires, lors de l'établissement de la cohésion ou intramoléculaires lors de la formation de boucles de chromatine. Par quels mécanismes ces deux activités sont-elles régulées ? Quelles sont les différences entre un anneau de cohésine engagé dans l'une ou l'autre de ces deux fonctions ? Alors que la réponse à ces questions est toujours manquante, certaines données générées dans les cellules de mammifères suggèrent un rôle des acétyl-transférases ESCO1 et ESCO2 dans cette régulation. Même si ces deux protéines sont impliquées dans l'acétylation des lysines 105 et 106 de SMC3, les mécanismes en jeu sont différents (Zhang et al., 2008a).

ESCO2 est recrutée sur la chromatine lors de la phase S par le complexe hélicase MCM (Ivanov et al., 2018). Elle voyagerait avec la fourche de réplication pour permettre l'acétylation de Smc3 et l'établissement de la cohésion sur les bras des chromosomes et aux régions centromériques (Alomer et al., 2017; Ivanov et al., 2018; Kawasumi et al., 2017; Zhang et al., 2008a). Lors de la mitose, ESCO2 est dégradée par le complexe APC (Hou and Zou, 2005; van der Lelij et al., 2009).

ESCO1 est présente dans le noyau des cellules tout au long du cycle cellulaire (Hou and Zou, 2005) et s'associe avec les cohésines par l'intermédiaire de PDS5A et B. Elle est responsable de la majorité de l'acétylation de SMC3 et ce au cours des phases G1, S et G2 (Alomer et al., 2017).

La déplétion d'ESCO1 ne conduit pas à un défaut de cohésion aussi prononcé que celui induit par la perte d'ESCO2. De plus, contrairement à *ESCO2*, l'inactivation du gène codant pour ESCO1 est viable dans les cellules HeLa (Alomer et al., 2017). Ces résultats suggèrent un rôle mineur de ESCO1 dans l'établissement de la cohésion des chromatides sœurs (Alomer et al., 2017; Kawasumi et al., 2017; Zhang et al., 2008a). De plus, la perte de cohésion des régions centromériques semble être spécifique qu'à la déplétion d'ESCO2 et non de celle d'ESCO1 (Ivanov et al., 2018; Kawasumi et al., 2017). Ainsi il apparaît qu'ESCO2 régule principalement l'établissement de la cohésion des chromatides sœurs alors qu'ESCO1 a un rôle tout au long du cycle cellulaire, possiblement dans l'établissement et/ou la régulation des boucles de chromatine. De manière intéressante ESCO1 est enrichie aux sites de cohésines engagés dans des boucles de chromatine alors que ce n'est pas le cas pour ESCO2 (Rahman et al., 2015). De plus, des données *in vitro* montrent que les cohésines acétylées par ESCO1 sont plus mobiles sur l'ADN que les cohésines non acétylées (Kanke et al., 2016). L'acétylation de Smc3 par ESCO1 pourrait donc stimuler la translocation des cohésines sur l'ADN et par conséquent réguler l'organisation 3D des chromosomes.

En conclusion, les enjeux majeurs de ces prochaines années seront 1) de comprendre comment sont régulées les cohésines pour établir à la fois la cohésion des chromatides sœurs et l'organisation du génome, 2) d'élucider si les boucles d'ADN dépendantes des cohésines sont formées par extrusion de chromatine et si oui 3) de découvrir par quel(s) mécanisme(s).

Chapitre IV : L'architecture nucléaire

A. Préambule

Les complexes SMCs (cohésines et condensines) sont capables d'embrasser deux régions d'ADN appartenant à la même molécule, formant ainsi une boucle de chromatine (Figure 22a). Il est aujourd'hui établi que la formation de multiples boucles de chromatine et leur arrangement dans l'espace permettent le repliement de la fibre de 10 nm en niveaux d'organisation supérieurs, assurant la compaction de l'ADN dans l'espace nucléaire. Dans ce chapitre, nous allons aborder les différents niveaux de repliements de la chromatine chez les mammifères en précisant le rôle des boucles de chromatine générées par les complexes SMCs dans cette organisation. Dans un second temps, nous allons détailler l'architecture du noyau de la levure *S. cerevisiae* et nous concentrer sur un locus dont l'organisation est dépendante des cohésines et des condensines : l'ADN ribosomique. Au préalable, nous aborderons les différentes techniques permettant l'étude de l'organisation 3D de la chromatine dans le noyau des cellules.

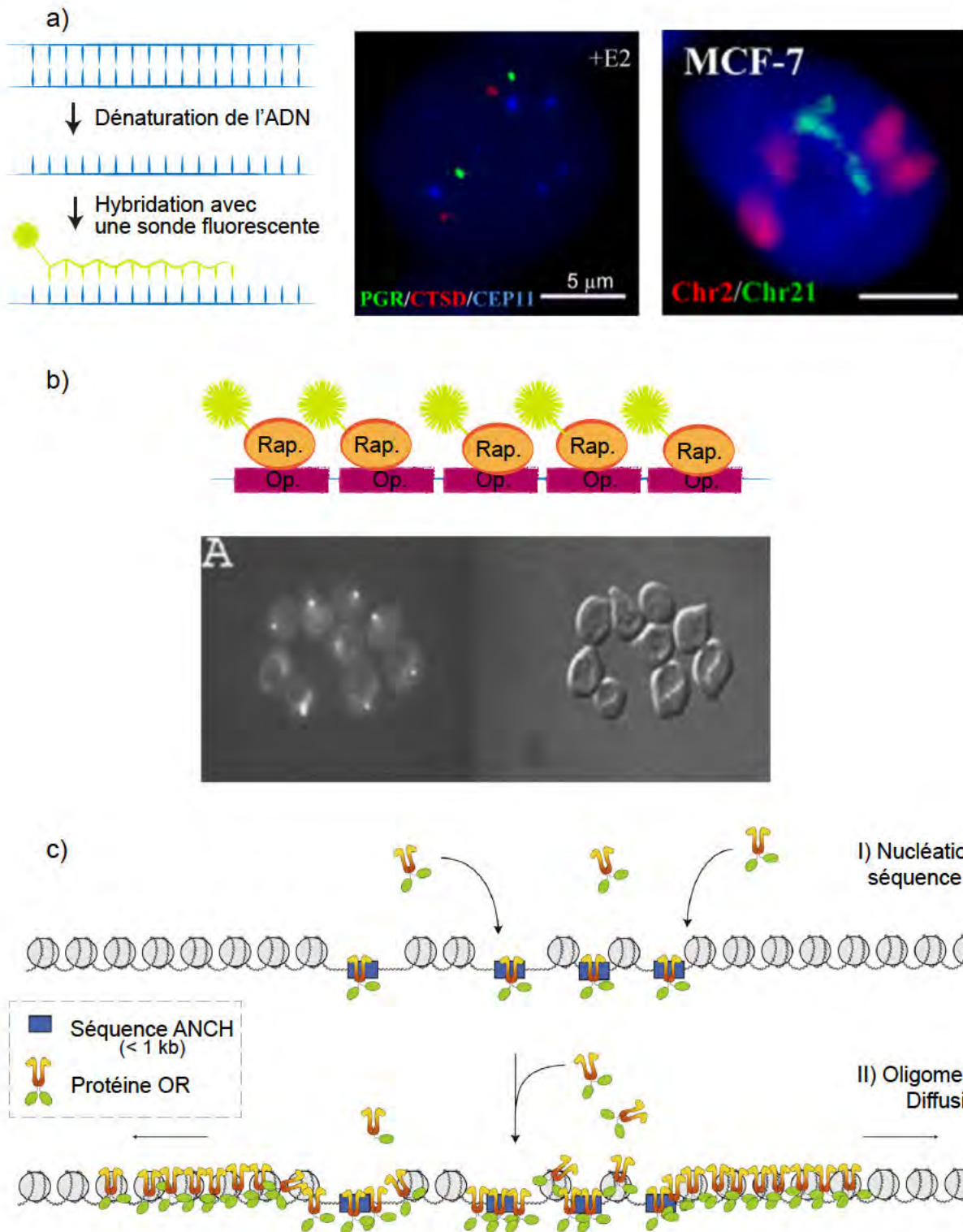


Figure 24 : Différentes techniques pour l'étude de l'organisation du génome par microscopie à fluorescence. a) Technique de FISH. Les cellules sont fixées, l'ADN est dénaturé puis les séquences d'intérêt sont visualisées grâce à une sonde fluorescente. Images: gauche, marquage de loci spécifiques; droite, marquage de chromosomes entiers, (Kocanova et al., 2010). b) Technique de FROS. Des séquences Operateur (Op.) reconnues par des protéines Rapporteur fluorescentes (Rap.) sont insérées dans le génome de manière répétée. Image (Robinett et al., 1996). c) Technique ANCH-OR. Une séquence ANCH insérée dans le génome sert de point de nucléation pour les protéines OR fluorescentes qui ensuite s'oligomèrent et diffusent sur les séquences adjacentes. Adapté de (Germier et al., 2018).

B. Les méthodes d'analyse des repliements de la chromatine

a. FISH, FROS et ANCH-OR

Depuis le développement de la technique de DNA-FISH (hybridation *in situ* de l'ADN en fluorescence), la microscopie à fluorescence a été une technique de choix pour analyser l'organisation de la chromatine dans le noyau des cellules (Manuelidis, 1985; Schardin et al., 1985). Brièvement, le matériel biologique est fixé par un agent pontant (de type formaldéhyde) créant des liens covalents entre les acides aminés lysine et arginine des protéines et les acides nucléiques. L'échantillon est porté à haute température (entre 65°C et 75°C en fonction de la concentration utilisée en agent dénaturant tel que le formamide) afin de permettre la dénaturation de la double hélice d'ADN. Il est ensuite incubé en présence de sondes fluorescentes dont les séquences sont complémentaires à la séquence d'intérêt. Après lavage des sondes en excès, les séquences ciblées sont détectées par microscopie à fluorescence. Selon les sondes utilisées, cette technique permet la visualisation de chromosomes entiers ou de séquences spécifiques (pour revue (Huber et al., 2018), Figure 24a). La technique de FISH a notamment permis de mettre en évidence que les chromosomes étaient organisés en territoires lors de l'interphase (voir plus bas, (Bolzer et al., 2005)). Cependant, les étapes de fixation du matériel biologique et de dénaturation de l'ADN à haute température peuvent conduire à l'extraction de matériel biologique ou à la formation d'artefacts. Afin de pallier ce problème, des approches d'imagerie en temps réel, ne nécessitant pas de fixation de l'échantillon ont été développées. Nommées FROS pour « *Fluorescent Reporter Operator System* », elles sont basées sur l'insertion de larges répétitions (plusieurs kilobases) de séquences bactériennes dans le génome d'intérêt et sur leur reconnaissance par des protéines fluorescentes ((Robinett et al., 1996), Figure 24b). Néanmoins, la présence de répétitions et leur liaison par de nombreuses protéines peut perturber le bon déroulement de processus biologiques tels que la transcription ou la réplication (Beuzer et al., 2014). Ainsi a été développé un système alternatif dérivant du système ParB/ParS de partition des plasmides bactériens : le système ANCH-OR. La taille de la séquence bactérienne (ANCH) intégrée au génome est réduite (environ 0,5 kb) et elle n'est reconnue que par un nombre limité de protéines OR. Ce sont les interactions entre les protéines OR qui permettent la visualisation du locus d'intérêt par microscopie à fluorescence en temps réel ((Germier et al., 2018; Saad et al., 2014), Figure 24c). Ces techniques (FROS et ANCH-OR) ont permis l'analyse de la dynamique et de relocalisation d'un locus suite à différents stimuli tels que l'activation ou l'inhibition de la transcription (Cabal et al., 2006; Germier et al., 2017;

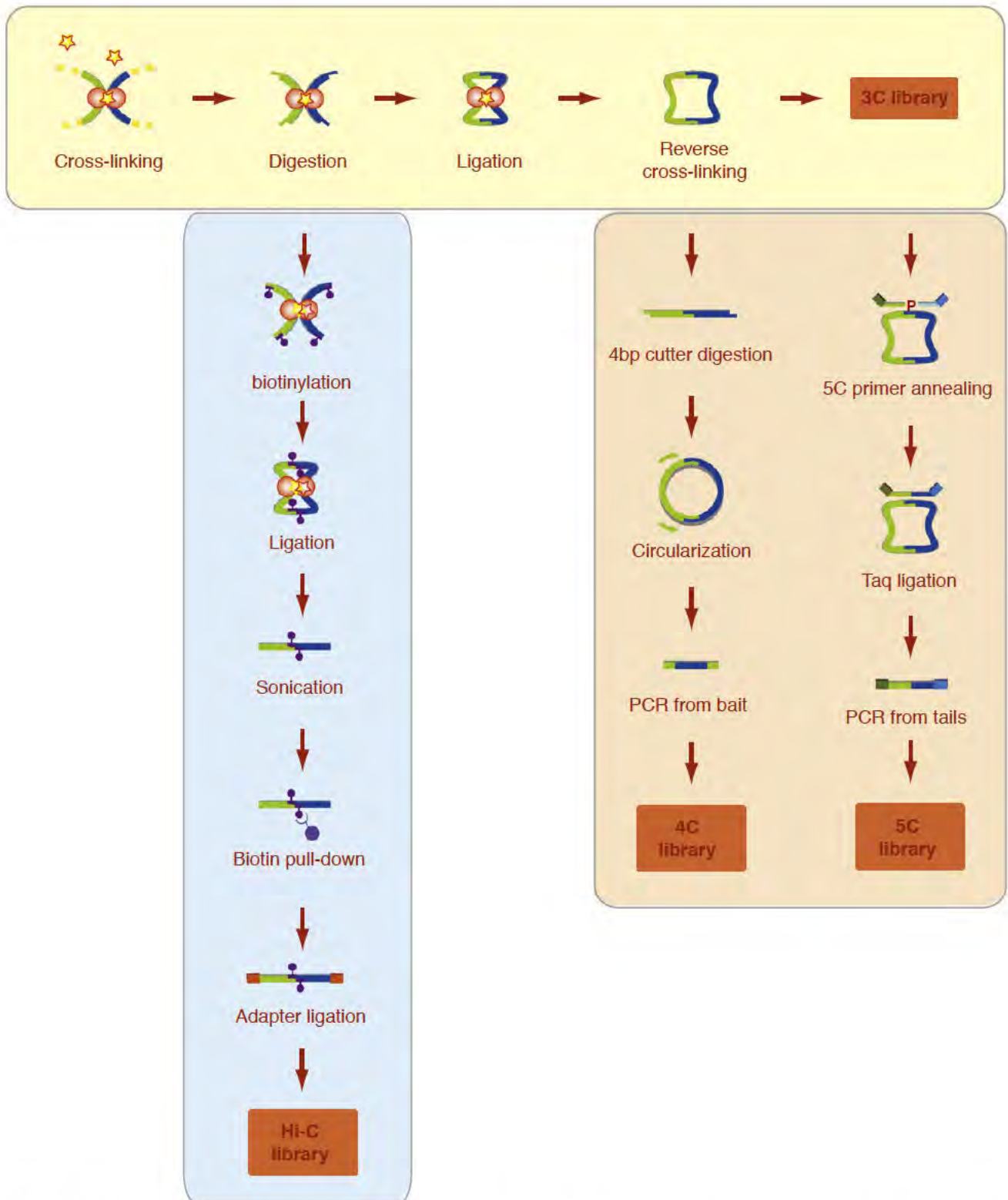


Figure 25 : Schéma des principales étapes des C-techniques. Les techniques de Hi-C, 4C et 5C sont des dérivées de la technique 3C. La 4C repose sur la ligation des hybrides d'ADN et l'amplification de ceux contenant une séquence d'intérêt. Pour la 5C, ce sont des hybrides entre différentes amorces d'intérêt qui sont séquencés. Dans le Hi-C, les fragments hybrides sont sélectionnés grâce à une étape de biotinylation. Adapté de (Ethier et al., 2012).

Therizols et al., 2010). Cependant seul un nombre limité de loci peuvent être étudiés et l'organisation d'un chromosome entier ne peut être ainsi sondée. Cette limite peut être dépassée grâce aux techniques d'édition du génome telles que les TALENs (« *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* ») ou les CRISPRs (« *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* »). Ces techniques ont été détournées afin non pas d'induire une cassure d'ADN à un ou plusieurs loci spécifiques dans le génome mais afin de marquer ces loci avec des protéines fluorescentes (pour revue (Bancaud et al., 2017)). Cependant, toutes ces techniques sont limitées par des contraintes intrinsèques à la microscopie à fluorescence dont la faible résolution des images (200 nm de résolution latérale et 500 nm de résolution axiale), due à la limite de diffraction de la lumière.

Pour pallier ce problème, des techniques d'imageries à haute résolution, capables de s'affranchir de la limite de la diffraction de la lumière ont été récemment développées (voir ci-après). Par ailleurs, l'étude de l'organisation 3D des chromosomes a également bénéficié du développement de techniques complémentaires, distinctes de la microscopie à fluorescence.

b. Les C-techniques

En 2002 le laboratoire de Job Dekker a mis au point la technique de **3C** pour « *Chromosome Conformation Capture* » qui vise à capturer et analyser la conformation tridimensionnelle des chromosomes dans le noyau (Dekker et al., 2002). Tout d'abord, des cultures cellulaires sont fixées par du formaldéhyde et leur chromatine est fragmentée par des enzymes de restrictions. Les produits de digestion sont ensuite ligaturés par la T4 ADN ligase. Lors de cette étape, les produits de digestion sont dilués afin de favoriser la ligature des fragments d'ADN présents dans les mêmes complexes protéiques. Les pontages entre les protéines et les acides nucléiques sont éliminés en chauffant les échantillons à 65°C, les protéines sont dégradées par traitement à la protéinase K, les ARN sont également dégradés par traitement à la RNase A et l'ADN est purifié par extraction au phénol-chloroforme. Ainsi, sont obtenus des produits hybrides, composés de fragments d'ADN potentiellement distants sur la séquence primaire génomique mais proches spatialement et « capturés » par la ligature. Cette technique étant basée sur la fragmentation de la chromatine d'une population cellulaire, les fragments d'ADN ainsi générés sont nombreux, on parle alors de « librairie » de produits de ligature (Figure 25). Enfin la librairie est analysée afin de déterminer quels fragments d'ADN se trouvaient à proximité dans le noyau des cellules. A l'origine de la

technique de 3C, l'analyse se faisait par PCR (« *Polymerase Chain Reaction* ») ou PCR quantitative. N'étaient alors analysés que des hybrides contenant des séquences d'ADN connues, c'est-à-dire celles des amorces utilisées pour l'amplification. Ainsi la technique de 3C est une technique dite de 1→1, elle ne permet d'analyser l'interaction qu'entre des fragments d'ADN connus. Cette technique a permis d'analyser pour la première la conformation 3D d'un chromosome de levure (Dekker et al., 2002) et de mettre en évidence que des loci distants de plusieurs dizaines de kb pouvait entrer en contact et former des boucles de chromatine (Tolhuis et al., 2002). Avec le séquençage du génome et l'essor des techniques de séquençage massif, la technique de 3C a par la suite connu de nombreuses améliorations (pour revue (Sati and Cavalli, 2017)).

Tout d'abord la technique de 4C (pour « *Circular 3C* » ou « *3C-Chip* ») a été développée (Simonis et al., 2006; Zhao et al., 2006). Elle repose sur la circularisation des produits de ligature et l'amplification de la librairie par PCR inverse en utilisant des amorces hybridant sur une région d'intérêt. Ainsi ne sont amplifiés que les fragments contenant la région d'intérêt, ligaturés avec n'importe quelle autre région du génome (Figure 25). Ces hybrides sont analysés par hybridation sur puce (ou « *chip* » en anglais) ou par séquençage massif. Dans le cas de la technique de 4C, sont analysés toutes les séquences interagissant avec une séquence d'intérêt. On parle de technique 1→tous. Cette technique a notamment pu mettre en lumière que les chromosomes étaient divisés en régions transcriptionnellement actives et inactives et que les gènes actifs et inactifs établissaient préférentiellement des contacts avec d'autres gènes actifs et inactifs respectivement situés soit à distance sur le même chromosome soit sur un autre chromosome (Simonis et al., 2006). Les techniques de **Capture-C** (Hughes et al., 2014) et de **T2C** (« *Targeted Chromatin Capture* », (Kolovos et al., 2014)) sont également des techniques de 1→tous basées sur l'utilisation d'amorces hybridant sur la séquence d'intérêt. Cependant cette amorce n'est pas utilisée pour l'amplification des hybrides en PCR mais pour les purifier. La librairie enrichie en hybrides contenant la séquence d'intérêt est ensuite analysée en séquençage massif.

Le développement de la technique de 5C (pour « *Carbon Copy 3C* ») a permis d'aller un cran plus loin dans l'analyse de l'organisation 3D du génome (Dostie et al., 2006). Cette méthode est basée sur la copie d'une partie de la librairie 3C, son amplification et sa détection. Pour ce faire, des amorces spécifiques à une région d'intérêt sont hybridées sur la librairie de 3C. Lorsque deux amorces hybridées sont en contact immédiat elles sont ligaturées. Ce sont alors les hybrides entre

ces amorces qui sont amplifiés par PCR et analysés par puce ou séquençage massif (Figure 25). Cette technique permet à partir d'une librairie de 3C d'analyser toutes les interactions couvrant une région donnée. Elle a notamment permis d'identifier que le chromosome X de souris était partitionné en domaines topologiques caractérisés par une fréquence élevée d'interactions intra-chromosomiques, que les auteurs ont nommé TADs pour « *Topologically Associating Domains* » (Nora et al., 2012).

Enfin, l'expansion du séquençage massif et la réduction de son coût ont mené au séquençage de la totalité de la librairie 3C. Ce type d'analyse permet d'étudier l'interaction de chaque séquence d'ADN avec le reste du génome ; on parle alors de techniques tous→tous. Dans une première technique appelée **GCC** (« *Genome Conformation Capture* ») la librairie de 3C est séquencée directement (Rodley et al., 2009). Cependant des produits présents dans la librairie mais qui ne sont pas issus d'évènements de ligature (ils ne sont donc pas informatifs quant à l'organisation 3D du génome) sont également séquencés et engendrent une perte d'information. La seconde technique est le **Hi-C** (« *High throughput 3C* »). Devenue aujourd'hui la technique de référence pour l'étude de l'organisation des génomes en 3D, elle requiert une modification du protocole de 3C permettant l'ajout de biotine aux fragments d'ADN (Lieberman-Aiden et al., 2009). Après digestion de la chromatine, le fragment de Klenow synthétise le brin complémentaire aux séquences flanquantes générées par les enzymes de restriction, en présence de nucléotides biotinylés. Les hybrides d'ADN sont ensuite générés par ligature avec la T4 ADN ligase. On peut noter qu'afin d'éliminer des biais dus à la dilution des produits de digestion (voir plus haut), selon certains protocoles la ligature est réalisée *in situ*, à l'intérieur du noyau, (Nagano et al., 2015). Par la suite et conformément au protocole de 3C, le pontage est éliminé, les protéines et les ARN dégradés et l'ADN purifié. Puis la biotine présente sur les fragments d'ADN qui n'ont pas été ligaturés est retirée par activité exonucléolytique de la T4 ADN polymérase. Enfin l'ADN est fragmenté par sonication et les fragments hybrides sont purifiés par « *pull down* » avec des billes liées à la streptavidine. La librairie ainsi générée est enrichie en hybrides issus de la ligature entre deux fragments d'ADN (Figure 25). Elle est analysée par séquençage massif. Le Hi-C a permis de valider que les chromosomes étaient formés par une succession de TADs et qu'à plus grande échelle, les régions euchromatiniennes et hétérochromatiniennes n'interagissaient que très peu entre elles mais formaient des compartiments distincts nommés arbitrairement compartiments A et B respectivement ((Lieberman-Aiden et al., 2009), voir plus bas).

Une fois les librairies analysées (de nos jours communément par séquençage massif), les résultats sont présentés sous forme de cartes de contacts lisibles tel un tableau à double entrée dans lequel sont représentées toutes les interactions entre deux fragments détectées par séquençage. Cette carte reflète la probabilité de contact entre différentes paires de régions génomiques. En effet, si deux fragments sont souvent associés dans le noyau des cellules, à l'échelle de la population les hybrides contenant ces deux séquences seront fréquents et cela se traduira par une forte probabilité de contact sur la carte. Il est important de noter que les C-techniques permettent de sonder l'organisation du génome sur une population cellulaire. Ainsi la carte de contacts générée représente une agrégation de tous les contacts présents dans chaque cellule à l'instant t et ne reflète pas l'état de chaque cellule à cet instant.

Un autre aspect important de ces techniques est la résolution de la carte de contacts obtenue. Ce paramètre dépend 1) de la taille des fragments d'ADN générés : plus les fragments analysés sont grands et plus la résolution diminue et 2) de la profondeur de séquençage : plus grand est le nombre d'hybrides séquencés et plus haute sera la résolution. La profondeur de séquençage dépend, elle-même, de la taille du génome de référence. En effet, pour atteindre la même résolution, un génome de petite taille nécessite le séquençage d'un nombre réduit de fragments par rapport à un génome de plus grande taille. De nos jours, des cartes de contacts d'une résolution de l'ordre du kilobase peuvent être obtenues chez la levure comme chez les mammifères ((Lazar-Stefanita et al., 2017; Rao et al., 2014), voir aussi Article I). La résolution d'une carte peut être améliorée par l'utilisation d'endonucléases non spécifiques telles que la Micrococcal Nucléase (MNase) dégradant l'ADN non protégé par les nucléosomes ou par d'autres facteurs protéiques protégeant la double hélice d'ADN. La résolution atteinte peut alors être de l'ordre du nucléosome, soit d'environ 150 pb (technique de **Micro-C**, (Hsieh et al., 2015, 2016)). Cependant l'assemblage de cartes à haute résolution nécessitant un fort degré de séquençage et représentant donc un fort coût, la résolution des cartes de contacts générées sur les génomes de mammifères est généralement de l'ordre de la dizaine de kilobases (Belaghzal et al., 2017).

Par ailleurs, après séquençage les séquences d'ADN obtenues sont identifiées par alignement avec un génome de référence. La technique de Hi-C s'applique donc seulement aux organismes dont le génome est séquencé et assemblé. De plus, ne sont analysables que les séquences dont le positionnement sur le génome est non-ambigu. Cependant, il existe dans le génome des séquences répétées générées par l'insertion d'une séquence unique à de multiples loci

génomiques (transposons, SINEs (« *Short Interspersed Nuclear Element* »), LINEs, (« *Long Interspersed Nuclear Element* »), microsatellites, répétitions Alu, etc). Les fragments de ligature contenant de telles séquences ne pouvant pas être annotés sur un seul locus, ils sont généralement éliminés des cartes de contacts. Les gènes codant les ARN ribosomiques étant répétés environ 200 fois dans les cellules, leur séquence est également éliminée des cartes de contacts (pour revue (Bersaglieri and Santoro, 2019)). De ce fait le Hi-C est largement limité dans sa capacité à sonder l'organisation 3D des séquences répétées. Cela conduit à une perte importante d'information sachant que les séquences répétées peuvent représenter jusqu'à deux tiers du génome humain (de Koning et al., 2011). Cependant les méthodes de normalisation des cartes de Hi-C peuvent être modifiées afin d'analyser les hybrides contenant une portion de séquences répétées. Il a ainsi été montré que les éléments rétro-transposables de la famille des SINEs établissaient entre eux des contacts à longue distance et qu'ils pourraient de ce fait jouer un rôle important dans l'organisation 3D des génomes (Cournac et al., 2016).

Bien que les C-techniques aient permis une avancée majeure dans la compréhension de l'organisation 3D du génome, elles présentent certaines faiblesses. En effet, elles ne permettent de sonder que les contacts entre deux fragments d'ADN proches dans le noyau. Or des regroupements de gènes peuvent être formés lors de la transcription de gènes co-régulés (Jackson et al., 1993) et l'organisation spatiale de la chromatine est influencée par la présence de corps nucléaires. En effet, des séquences pauvres en gènes et peu transcrites sont généralement retrouvées à proximité du nucléole (Pederson, 2011) et à la périphérie du noyau (Guelen et al., 2008 ;) alors que les séquences transcriptionnellement actives sont recrutées à proximité des granules nucléaires (« *speckles* ») composés d'ARN messagers et des facteurs d'épissage (Spector and Lamond, 2011). Il est impossible par Hi-C d'évaluer si un fragment d'ADN donné est dans un complexe impliquant plus de deux fibres d'ADN ou de déterminer s'il est associé à différents corps nucléaires.

c. Le SPRITE

Afin de pallier ces limitations, le laboratoire de Guttman a développé une technique alternative au Hi-C, le SPRITE (« *Split-Pool Recognition of Interactions by Tag Extension* », Figure 26) (Quinodoz et al., 2018). Cette technique ne repose pas sur la ligature de fragments d'ADN à proximité et permet de capturer et d'analyser tous les fragments (ADN, ARN et

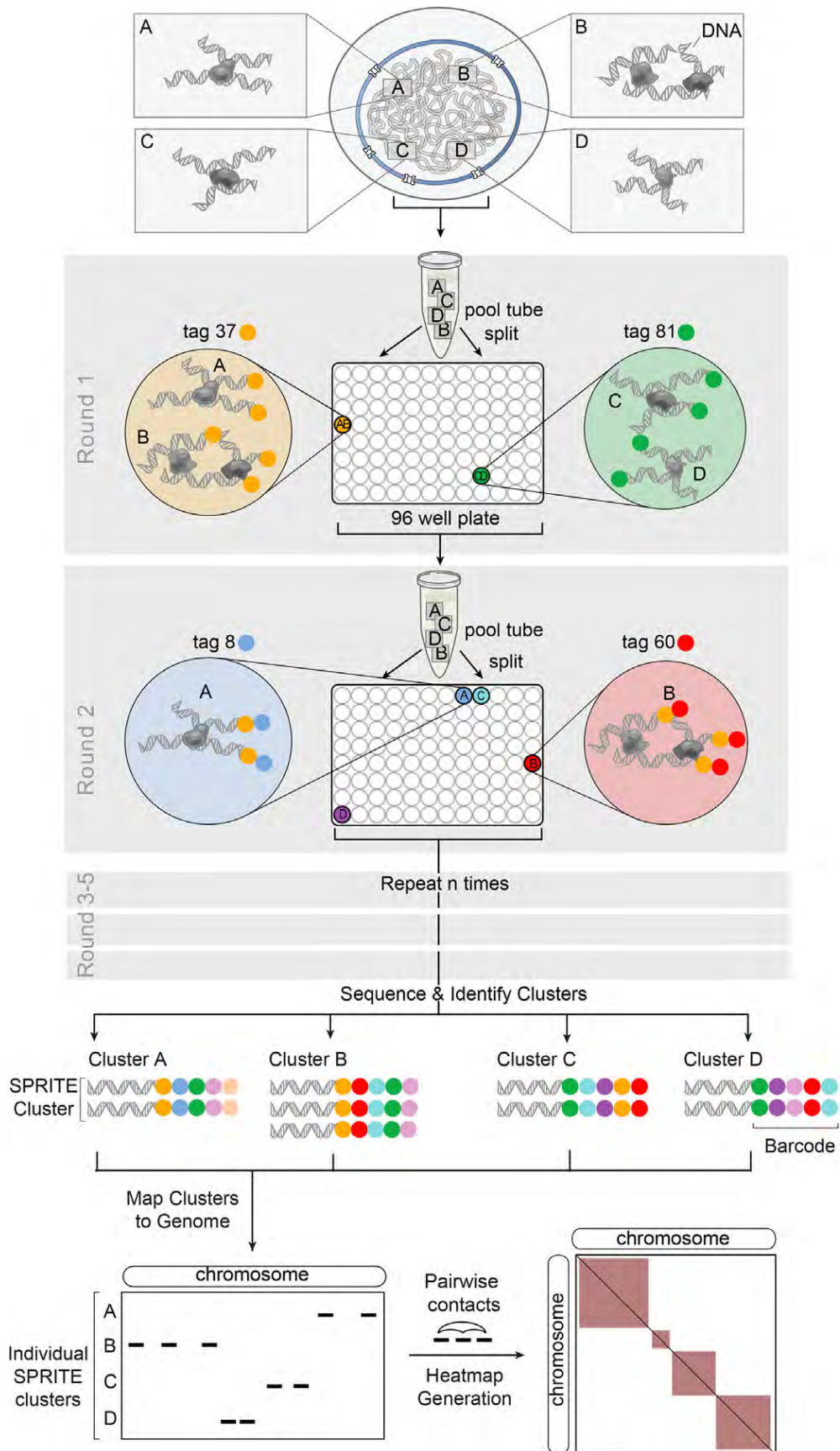


Figure 26 : Technique de SPRITE. Les séquences d'ADN provenant d'un même complexe ADN-ARN-protéines sont étiquetées grâce à une combinaison unique d'amorces. Les fragments sont ensuite séquencés et analysés. L'ADN est représenté par une double hélice, les protéines par des sphères grises et les amorces ligaturées par des disques de différentes couleurs (Quinodoz et al., 2018).

potentiellement protéique), appartenant à un même complexe. La chromatine est pontée au formaldéhyde puis fragmentée par sonication et traitement à la DNase. Des fragments d'ADN de 150 à 1000 pb sont ainsi générés. Les complexes protéine-ADN-ARN sont liés à des billes magnétiques de sorte à ce que chaque bille ne soit associée qu'à un seul complexe. Les billes sont ensuite réparties dans une plaque de 96 puits (étape de *split* n°1). A cette étape chaque puits contient plusieurs billes et donc plusieurs complexes. Pour chaque puits, une amorce spécifique est ajoutée et ligaturée aux fragments d'ADN présents dans le puits. Toutes les billes sont récupérées, mélangées (étape de *pool*) et re-réparties dans une autre plaque de 96 puits (étape de *split* n°2). Chaque puits contient alors plusieurs billes mais différentes de celles du premier *split*. De nouveau, de nouvelles amorces spécifiques à chaque puits sont ligaturées, à la suite des premières. Après 5 répétitions de ce cycle *split-pool*, chaque complexe protéine-ADN-ARN est associé à une combinaison d'amorces différentes, appelée code-barres. Le pontage est éliminé, les protéines sont digérées, l'ADN est purifié et analysé par séquençage massif. Grâce au code-barres spécifique de chaque complexe, on peut ainsi déterminer quelles séquences d'ADN interagissaient dans le noyau (Figure 26). Dans un premier temps, les auteurs ont pu grâce à cette approche, confirmer la présence des TADs, des compartiments A et B et des boucles de chromatine dans des cellules humaines et embryonnaires de souris (Quinodoz et al., 2018). Puis l'analyse des fragments d'ARN présents au sein des complexes a permis de dépasser les données collectées en Hi-C. Dans cette méthode, les fragments d'ARN ne sont pas dégradés par traitement à la RNase, ils restent donc associés aux complexes ADN-protéines. Les fragments d'ADN et d'ARN associés dans un même complexe ont donc le même code-barres après les cycles de *split-pool*. Les auteurs ont ainsi pu montrer que les fragments d'ADN appartenant au compartiment B et donc inactifs, interagissaient avec des fragments d'ARN correspondant aux ARN ribosomiques. Ces séquences génomiques étaient donc vraisemblablement proches du nucléole dans le noyau des cellules. De la même manière les séquences actives étaient en complexe avec le long ARN non codant MALAT1, un composant des granules nucléaires.

En conclusion la technique de SPRITE est une technique prometteuse permettant d'explorer l'organisation du génome au-delà de simples interactions entre deux fragments d'ADN et donc de fournir un niveau d'information supérieur à celui généré par Hi-C.

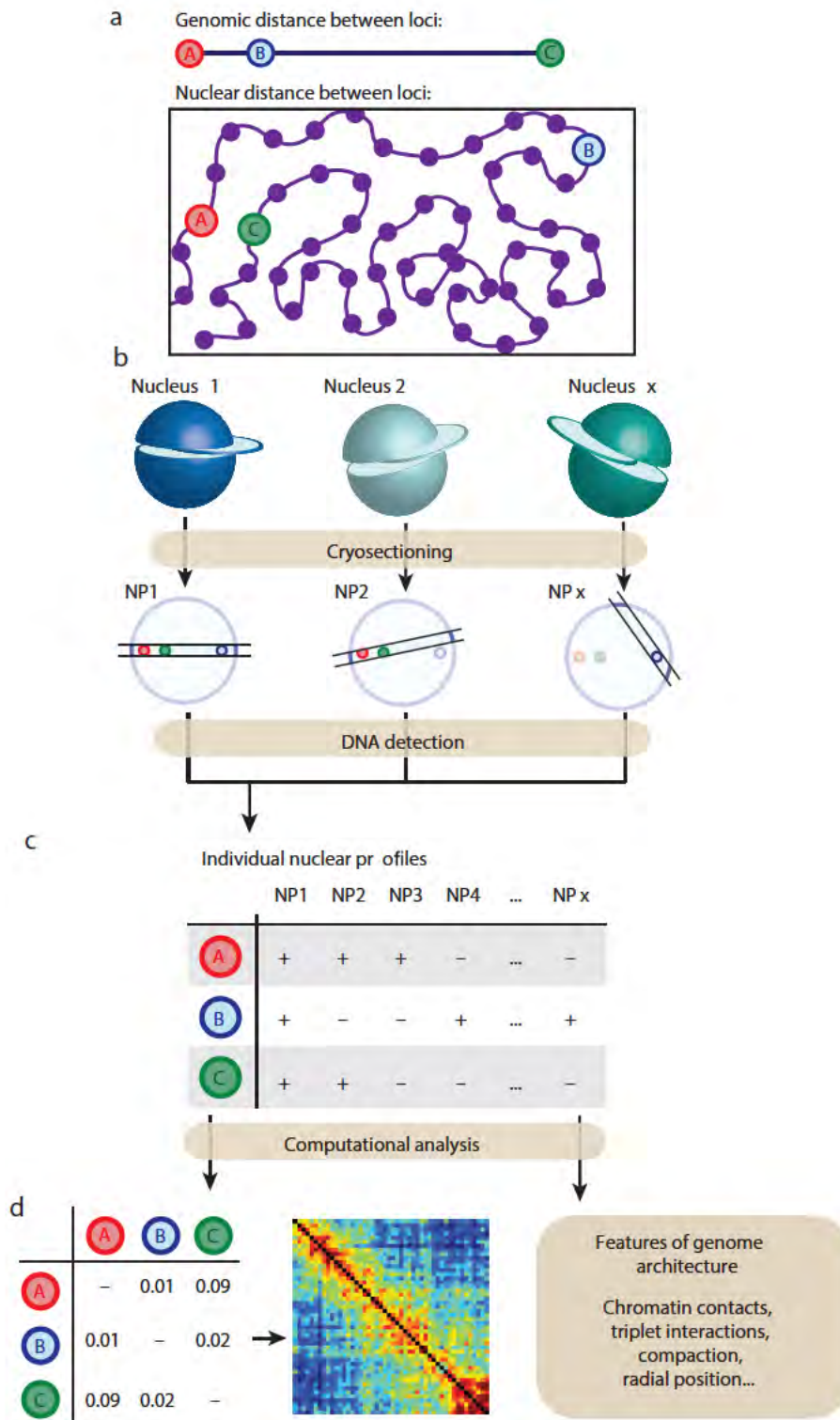


Figure 27 : Technique de GAM. a) Les interactions physiques entre les différents loci ne reflètent pas leur position sur la séquence génomique primaire. b) Les loci proches spatialement sont plus fréquemment regroupés dans une même coupe de noyau (NP, *nuclear profile*) que des loci éloignés. c) Les loci présents dans chaque coupe sont identifiés. d) La co-ségrégation des loci calculée sur une grande collection de coupes permet de déduire la position et la compaction d'un loci ainsi que la proximité spatiale entre différents loci. Adapté de (Beagrie et al., 2017).

Il est toutefois important de préciser que le SPRITE ainsi que les C-techniques, nécessitent le pontage de la chromatine par traitement au formaldéhyde. Or il est possible qu'une telle fixation puisse engendrer des artefacts. Une technique basée sur la MET a donc émergé afin d'analyser l'organisation du génome sans pontage préalable au formaldéhyde.

d. Le GAM

La technique de GAM (« *Genome Architecture Mapping* ») a été mise au point dans le laboratoire de Pombo et vise à étudier l'organisation 3D du génome par une approche relativement différente de celles présentées jusqu'ici (Beagrie et al., 2017). Les cellules ne sont pas fixées au formaldéhyde mais elles sont cryofixées dans de l'azote liquide. Ceci permet la congélation rapide des échantillons biologiques et la préservation de leur structure interne (Adrian et al., 1984). Les cellules sont ensuite sectionnées à l'ultra-cryomicrotome en coupes d'environ 220 nm d'épaisseur. Les coupes contenant une portion de noyau sont identifiées et ce dernier est alors extrait par microdissection au laser et isolé dans un des puits d'une plaque 96 ou 384 puits. Les protéines contenues dans la coupe de noyau sont dégradées par traitement à la protéinase K, l'ADN est amplifié puis séquencé par séquençage massif. La détection de deux fragments d'ADN dans un seul puits reflète leur colocalisation dans une même section nucléaire. La cooccurrence répétée entre fragments d'ADN révèle que ces fragments étaient à proximité dans le noyau des cellules. Dans cette méthode, un contact physique entre les fragments n'est pas requis pour qu'ils soient identifiés comme initialement proches dans l'espace nucléaire. Une carte de proximité, et non de contacts, peut ainsi être générée suite au séquençage des fragments d'ADN (Figure 27). Les auteurs concluent que l'analyse de 408 sections de noyaux permet de générer une carte de proximité de 30 kb de résolution (Beagrie et al., 2017).

L'analyse de l'organisation des chromosomes par GAM révèle la présence des mêmes TADs que ceux détectés par Hi-C ou par SPRITE. Il en est de même pour les compartiments A et B. De plus, comme le SPRITE, cette technique n'est pas limitée à l'analyse de l'interaction entre deux fragments d'ADN. En effet, les auteurs ont pu montrer que trois super-enhancers pouvaient se regrouper spatialement et former des triplets d'interactions. Il est également intéressant de noter que l'analyse des données de GAM peut apporter de l'information qui n'est pas limitée au contact entre deux fragments d'ADN mais qui se rapporte à l'état de compaction ou à la position d'un locus dans le noyau (Beagrie et al., 2017).

Le développement du 3C et de tous ses dérivés a révolutionné l'étude de l'organisation du génome. Le Hi-C reste la technique la plus utilisée même si elle a ces limites. L'émergence de nouvelles techniques telles que le SPRITE, le GAM ou la Hi-M (« *High-throughput microscopy* », voir plus bas) permettra une compréhension plus globale et complète de l'organisation 3D du génome dans de nombreuses espèces.

C. Les repliements de la chromatine chez les métazoaires

L'analyse des premières données obtenues par les C-techniques a révélé que la fréquence de contact entre deux loci décroît avec leur distance génomique (Dekker et al., 2002; Lieberman-Aiden et al., 2009). Cela traduit un arrangement linéaire de la chromatine où une séquence donnée interagit préférentiellement avec ses proches voisins plutôt qu'avec des séquences éloignées sur la fibre d'ADN. Deux loci distants sur le génome linéaire peuvent cependant présenter une forte probabilité d'interaction, indiquant la présence *in vivo* d'une boucle de chromatine. De telles boucles peuvent notamment réguler l'association entre enhanceurs et promoteurs (Tolhuis et al., 2002). De plus, les contacts intra-chromosomiques sont plus fréquents que les contacts inter-chromosomiques. Les chromosomes ont ainsi tendance à « se replier » sur eux-mêmes plutôt qu'à interagir avec les autres chromosomes. Cela a confirmé l'organisation des chromosomes en territoires chromosomiques dans le noyau des cellules en interphase ((Bolzer et al., 2005), voir plus bas). Enfin, et sans doute de manière la plus intéressante, les cartes de contacts de 5C et de Hi-C ont dévoilé que les chromosomes n'étaient pas organisés linéairement dans l'espace mais qu'ils se divisaient en domaines d'association topologiques appelés TADs (« *Topologically Associated Domains* ») (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012). De nombreuses études ont alors cherché à comprendre leur nature, les mécanismes menant à leur formation et évidemment leur fonction. Dans les prochaines sections, nous décrirons de manière non exhaustive la biologie de ces TADs (pour revues (Hansen et al., 2018; Szabo et al., 2019)) et les repliements de la chromatine.

a. Les TADs

i. Un TAD, qu'est-ce que c'est ?

Avec le développement et l'amélioration de la résolution des C-techniques, des triangles ont pu être visualisés le long de la diagonale des cartes de contacts générées dans des cellules de mammifères. Ces triangles correspondent à un enrichissement local en contacts intra-

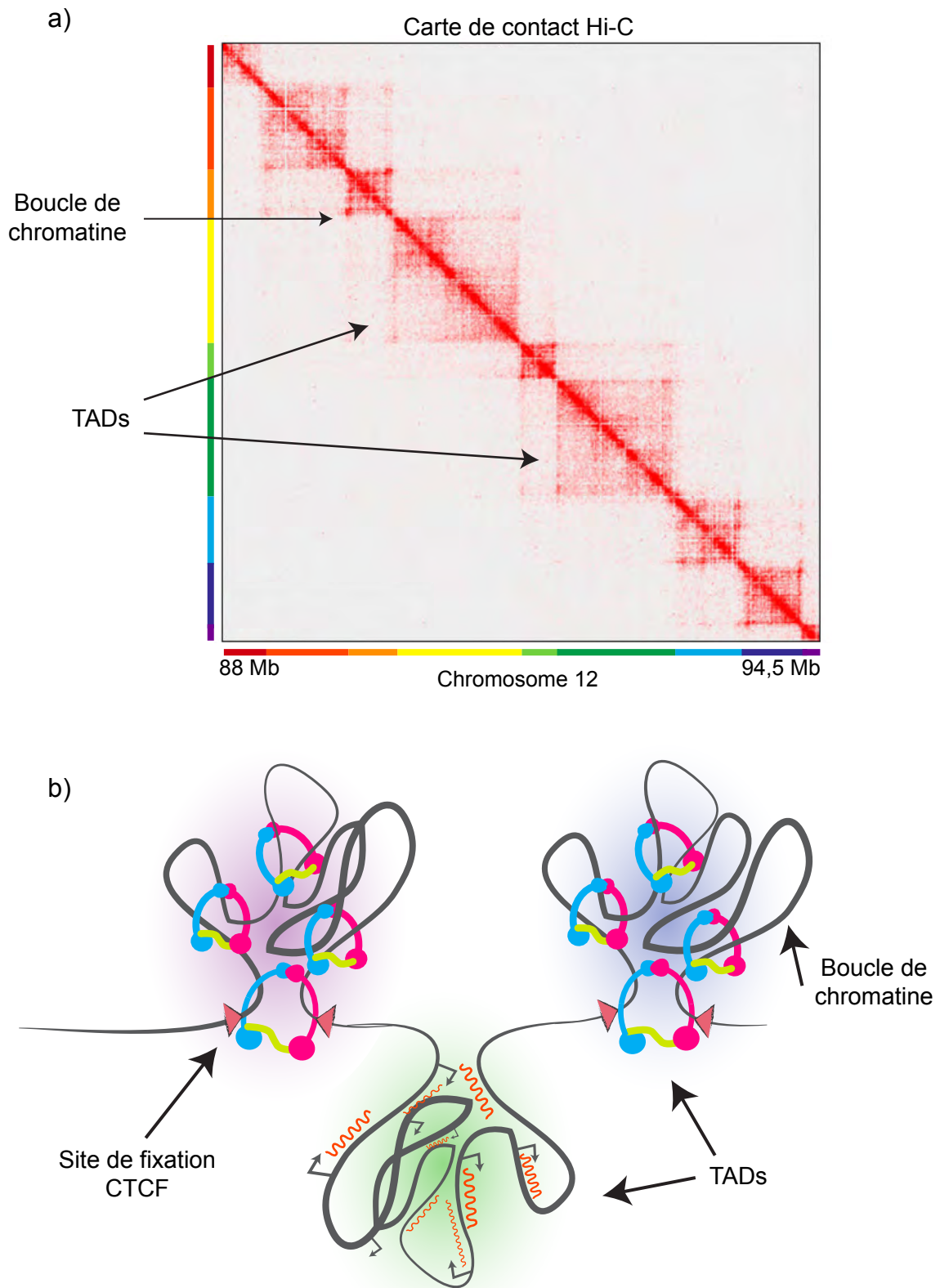


Figure 28 : Les chromosomes sont organisés en TADs. a) Carte de contact d'un fragment du chromosome 12 de cellules humaines. Chaque triangle identifiable le long de la diagonale sur une moitié de carte représente un TAD. Adapté de (Wutz et al., 2017). b) Schéma de la formation des TADs. Ils peuvent être formés par des boucles de chromatine établies par les cohésines (anneaux bleus, roses et jaunes) et bloquées aux sites de liaison de CTCF (triangles) (haut) ou par l'état chromatinien et la transcription (produisant des ARN, zig-zags oranges) des gènes (flèches grises) (bas).

chromosomiques et reflètent la formation de domaines d'association où les séquences présentes à l'intérieur d'un domaine interagissent plus fréquemment entre elles qu'avec les séquences des domaines adjacents. Ils sont nommés TADs et sont donc définis sur la base de l'inspection visuelle des cartes de contacts ((Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012), Figure 28a). Dans les cellules de mammifères les TADs peuvent comprendre de quelques dizaines de kilobases jusqu'à plusieurs mégabases d'ADN ; ils ont une taille médiane d'environ 900 kb (Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014). Avec l'amélioration de la résolution des cartes de contacts, des structures intra-TADs ont ensuite pu être détectées. Deux TADs sont séparés par des séquences dites « insulatrices » qui agissent comme des barrières et restreignent l'interaction des séquences d'un TAD avec les séquences du TAD adjacent. Elles permettent ainsi la formation de domaines adjacents mais distincts (Figure 28b). L'interaction entre les deux séquences insulatrices d'un TAD induit la formation d'une boucle de chromatine qui est visualisable sur la carte de contact comme un point de forte intensité au sommet du triangle correspondant (Figure 28a). Les séquences présentes à l'intérieur d'un TAD sont dans un état chromatinien comparable. Certains TADs peuvent ainsi être enrichis en marques d'histones associées à l'euchromatine, telle que H3K36me3, alors que d'autres sont associés à des marques d'histones de chromatine plus fermée comme H3K27me3 (Rao et al., 2014; Sexton et al., 2012). De plus, la propagation de la marque d'histone gamma-H2AX (phosphorylation du variant d'histone H2AX) formée autour d'une cassure d'ADN double brin semble stoppée à la frontière du TAD dans lequel la cassure est survenue (pour revue (Marnef and Legube, 2017)). Les TADs seraient également corrélés à la temporalité de la réplication (Dixon et al., 2012; Pope et al., 2014). En effet, les séquences à l'intérieur d'un TAD semblent être répliquées dans une même fenêtre temporelle et des séquences répliquées à différents moments de la phase S (en début vs. en fin de phase) sont associées à différents TADs. Ainsi les TADs sont des domaines d'association préférentielle, qui semblent avoir une signification biologique (voir plus bas) et qui permettent de segmenter le génome 1D en domaines 3D (Figure 28b).

ii. Les séquences insulatrices

Afin de comprendre la biologie des TADs, un point clef a été d'analyser la nature des séquences insulatrices. Différentes études pointent que la chromatine de ces séquences aurait une conformation plutôt ouverte. Elles sont enrichies en sites d'initiation de la transcription, en gènes fortement transcrits tels que les gènes de ménage et les modifications post-traductionnelles (MPT)

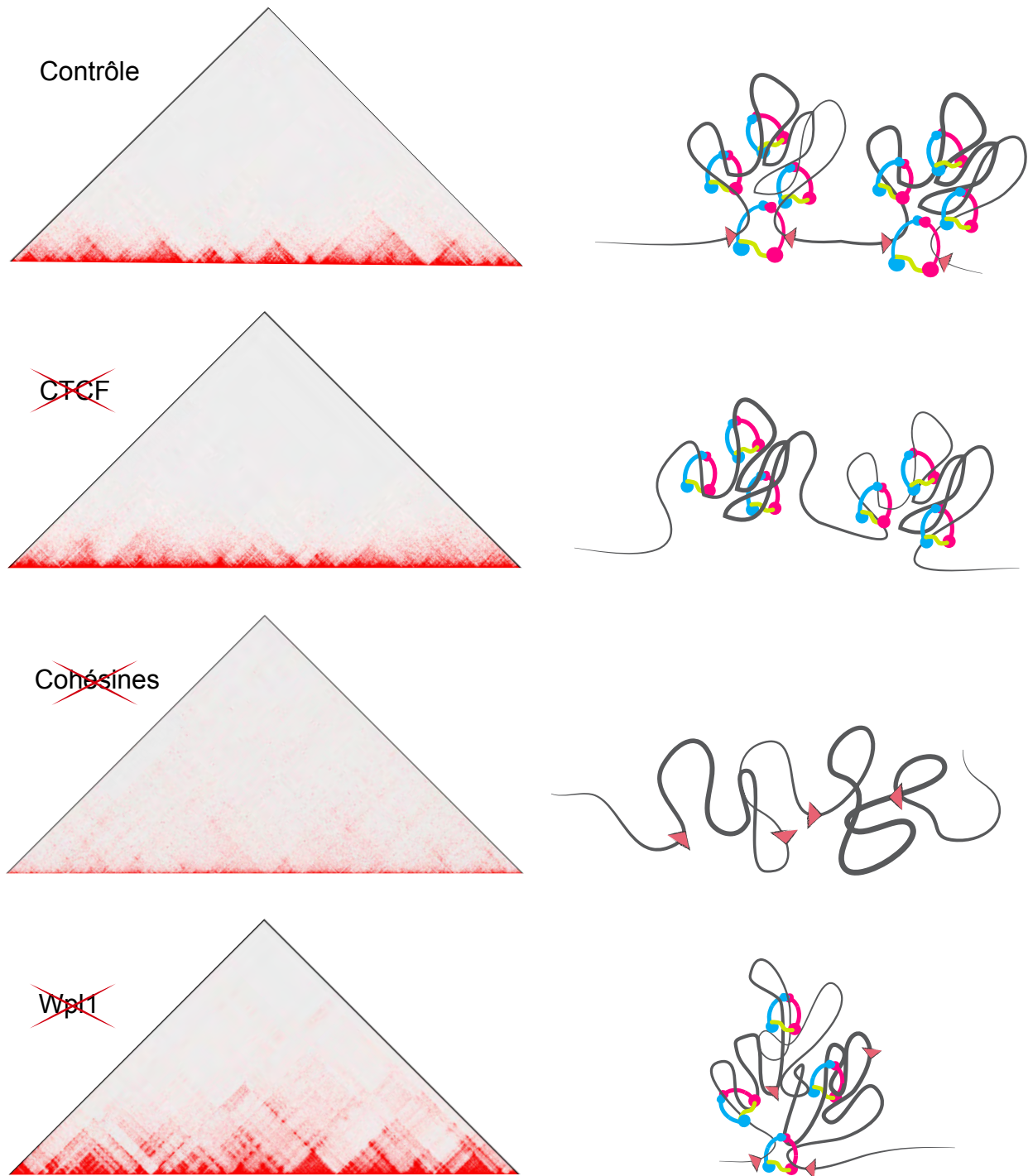


Figure 29 : Conséquences de l'inactivation de CTCF, des cohésines ou de Wpl1 sur la formation des TADs. En absence de CTCF les TADs sont formés mais ne sont pas insulés. La perte des cohésines conduit à la perte des TADs. L'inactivation de Wpl1 induit l'augmentation de la taille des TADs. Gauche, cartes de contacts de Hi-C adaptées de (Wutz et al., 2017) ; droite, schémas représentant l'organisation des chromosomes dans les différentes conditions.

des histones sont spécifiques de la chromatine ouverte (H3K4me3, H3K36me3) (Bonev et al., 2017; Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014). Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage massif (ChIP-seq) ont permis de mettre en évidence que ces séquences insultrices présentaient un fort taux d'enrichissement en cohésines et en facteur de transcription CTCF (pour « *CCCTC binding Factor* ») (Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014). Pour plus de détails sur les cohésines, se référer au chapitre III de cette introduction. La protéine CTCF est composée de onze domaines Zinc Finger lui permettant de lier une séquence spécifique et non palindromique d'ADN (Ohlsson et al., 2001). La liaison de CTCF à l'ADN est donc orientée, la séquence reconnue pouvant être dans un sens « *forward* » ou dans un sens « *reverse* ».

Après avoir identifié que les cohésines et CTCF étaient accumulées aux séquences insultrices, la question a été de savoir si elles étaient impliquées dans la formation et/ou la maintenance des TADs. Pour cela différents groupes ont analysé par Hi-C les conséquences de la perte de CTCF ou des cohésines sur la formation des TADs. De manière intéressante, les TADs sont différemment impactés par la dégradation de l'une ou de l'autre.

La déplétion de CTCF provoque la perte des boucles de chromatine détectables sur les cartes de contacts comme des points de forte intensité et la diminution de l'insulation des TADs ((Nora et al., 2017; Wutz et al., 2017), Figure 29). En d'autres termes, les TADs sont toujours formés mais la fréquence des contacts inter-TADs augmente. Ceci suggère la perte du rôle de barrière des séquences insultrices. Cet effet est visualisable sur les cartes de contacts où la délimitation entre les TADs est beaucoup moins distincte qu'en présence de CTCF (Figure 29). Ainsi, CTCF ne semble pas requis pour la formation des TADs mais l'est pour leur positionnement et leur insulation. Il s'est avéré que l'orientation des sites reconnus par CTCF était également primordiale pour la genèse des TADs. En effet, la grande majorité des TADs (allant de 65% à 90% en fonction des études) est délimitée par des sites convergents de CTCF, c'est-à-dire orientés de manière *forward-reverse* (au détriment des orientations *forward-forward*, *reverse-reverse* ou *reverse-forward*, (Guo et al., 2015; Rao et al., 2014; de Wit et al., 2015), Figure 28b). La délétion ou l'inversion d'un site de reconnaissance de CTCF situé entre deux TADs adjacents peut conduire à la formation d'un nouveau TAD résultant de la fusion des deux précédents. Dans certains cas, cette réorganisation provoque la dérégulation de gènes présents à l'intérieur du nouveau TAD ((Guo et al., 2015; Lupiáñez et al., 2015; Sanborn et al., 2015; de Wit et al., 2015), voir plus bas).

La perte des cohésines a un effet beaucoup plus drastique sur la formation des TADs. En effet, lorsque la kleisin est dégradée ou que les cohésines ne sont pas recrutées sur l'ADN (par l'invalidation du complexe de chargement), les TADs ne sont plus visualisables sur les cartes de Hi-C ((Rao et al., 2017; Schwarzer et al., 2017; Wutz et al., 2017), Figure 29). Les cohésines semblent donc requises pour la formation des TADs. De manière intéressante, la déplétion des cohésines conduit également au renforcement des compartiments A et B (Schwarzer et al., 2017; Wutz et al., 2017) (voir ci-après). Alors que la dégradation des cohésines conduit à la perte des TADs, quelles est la conséquence de leur stabilisation sur l'ADN : conduit-elle à l'agrandissement de la taille des TADs ? Pour répondre à cette question, les cohésines ont été stabilisées sur l'ADN par invalidation du facteur de dissociation Wpl1 ((Kueng et al., 2006; Tedeschi et al., 2013; Wutz et al., 2017), voir chapitre III). Dans cette condition, les interactions à longues distances sont favorisées et conduisent à l'augmentation significative de la taille des TADs et des boucles de chromatine ((Haarhuis et al., 2017; Wutz et al., 2017), Figure 29). Le temps de résidence des cohésines sur l'ADN semble donc être un paramètre déterminant pour réguler la taille des TADs dans les cellules mammifères.

En conclusion, ces études suggèrent un rôle distinct des cohésines et de CTCF sur les TADs : les cohésines sont responsables de la formation des TADs et CTCF définit leur positionnement précis (Wutz et al., 2017). On peut noter que la ré-expression de CTCF ou des cohésines après leur dégradation conduit à la reformation de TADs comparables à ceux formés avant la dégradation des protéines. Ce résultat suggère que les TADs sont des structures dynamiques capables d'être dissociées puis reformées en fonction de la présence ou non des cohésines et de CTCF (Nora et al., 2017; Rao et al., 2017). Cette hypothèse est renforcée par l'observation que les temps de résidence des cohésines et de CTCF sur l'ADN ne sont pas équivalents : environ 20 minutes pour les cohésines et entre 1 et 4 minutes pour CTCF (Hansen et al., 2017). Ainsi au cours d'un même cycle cellulaire les cohésines et CTCF sont engagés dans de nombreux cycles d'association et de dissociation de l'ADN, présumant un caractère dynamique à la formation des TADs.

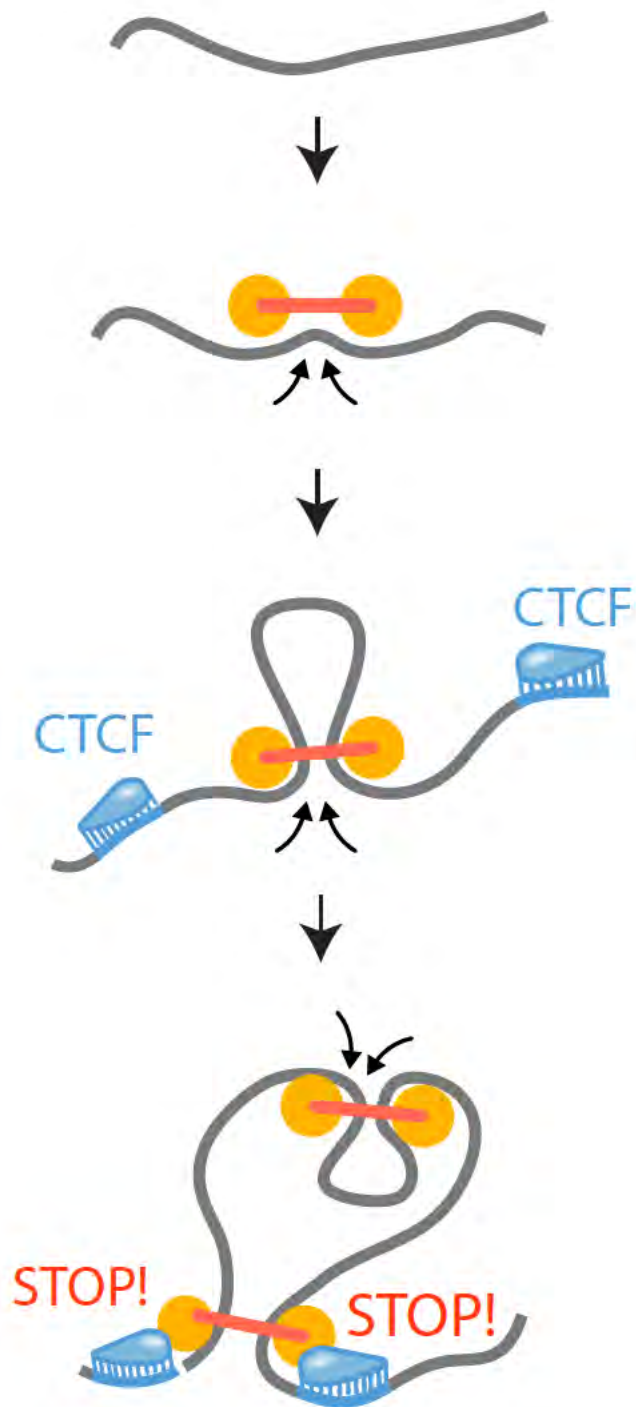


Figure 30 : Modèle de l'extrusion de boucles par les cohésines. La cohésie est recrutée sur la fibre de chromatine et extrude de l'ADN à travers son anneau jusqu'à rencontrer des sites CTCF qui bloquent sa progression lorsqu'il sont (Nora et al., 2017).

iii. Les modèles de formation des TADs

Bien que les chromosomes soient divisés en TADs, ils ne semblent pas tous être formés par les mêmes mécanismes. Sont présentés ici deux modèles aujourd'hui envisagés pour la formation des TADs.

Par extrusion de boucles par les cohésines

Le fait que la probabilité de contact entre les deux séquences insultrices d'un TAD soit élevée, suggère que les TAD sont formés par des boucles de chromatine (Rao et al., 2014). Dans le domaine, le modèle phare de formation des boucles par CTCF et par les cohésines est le modèle de l'extrusion de boucles (Alipour and Marko, 2012; Nasmyth, 2001b). Comme mentionné plus haut et illustré en Figure 30, selon ce modèle, la cohésine se fixerait sur l'ADN puis extruderait l'ADN à travers son anneau jusqu'à rencontrer CTCF qui pourrait alors agir comme une barrière, en fonction de son orientation. L'extrusion de multiples boucles bloquées de part et d'autre des sites convergents de CTCF conduirait à la formation de domaines d'associations topologiques. En adéquation avec ce modèle, il a été montré *in silico* que les cartes de contacts obtenues en Hi-C pouvaient être reconstituées lors de la simulation de la compaction d'un polymère par un facteur extrudant la chromatine et dont la progression peut être stoppée par un élément barrière (Fudenberg et al., 2016; Sanborn et al., 2015). De plus, un tel modèle permet d'expliquer différents observables qui ne sont pas compatibles avec un modèle de formation de boucles stochastique (Figure 22b gauche) : 1) les sites CTCF formant les TADs sont convergents (Guo et al., 2015; Rao et al., 2014; de Wit et al., 2015). 2) Les boucles de chromatine impliquant des sites consécutifs de CTCF sont défavorisées *in vivo* (Rao et al., 2017). 3) La stabilisation des cohésines sur l'ADN (par invalidation de WAPL) conduit à l'agrandissement des boucles de chromatine et des TADs déjà existants (Haarhuis et al., 2017; Wutz et al., 2017). Par ailleurs on peut noter que la cohésine est accumulée 20 pb en aval des sites CTCF, ce qui correspondrait à l'intérieur des TADs dans un modèle d'extrusion de boucles ((Fudenberg et al., 2016; Uusküla-Reimand et al., 2016), Figure 28b).

Par la transcription

Tous les TADs identifiés sur une carte de Hi-C ne peuvent pas être formés par des boucles de chromatine impliquant CTCF. En effet, les boucles de chromatine formées entre deux séquences insultrices ne sont détectées que dans 40% des TADs (Rao et al., 2014). De plus, CTCF est absent

des séquences insultrices de 25% des TADs (Dixon et al., 2012). Comme évoqué plus haut, les séquences insultrices sont également définies comme des régions ouvertes, riches en gènes actifs en transcription (Bonev et al., 2017; Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014). L'état chromatinien associé à la transcription par l'ARN polymérase II pourrait donc jouer un rôle dans la formation des TADs (Figure 28b). C'est notamment le cas chez la drosophile où l'organisation du génome est majoritairement régulée par l'état transcriptionnel des gènes (voir plus loin). De plus, la topoisomérase II, enzyme permettant de réduire les stress topologiques liés à la transcription, est également enrichie aux séquences insultrices des TADs (Uusküla-Reimand et al., 2016). Cependant, il semblerait que l'induction de la transcription dans un TAD ne suffise pas à créer une barrière *de novo* et à le diviser en deux TADs de tailles réduites (Bonev et al., 2017). De plus, l'analyse de l'organisation des chromosomes dans les zygotes de souris a révélé la présence de TADs avant la première vague de transcription zygotique (Du et al., 2017; Flyamer et al., 2017; Ke et al., 2017). En revanche, les TADs ne sont pas identifiables sur les cartes de Hi-C lorsque la réplication est inhibée dans ces mêmes cellules par traitement à l'aphidicoline (Ke et al., 2017).

Ainsi, la formation des TADs semble être un processus complexe impliquant à la fois plusieurs processus biologiques tels que la réplication et la transcription et différents acteurs protéiques comme CTCF ou les cohésines.

iv. Quelle fonction pour les TADs établis par les cohésines et CTCF ?

Bien que les chromosomes soient divisés en TADs, on peut se demander s'ils ont une fonction biologique. Afin de répondre à cette question, plusieurs études ont altéré les séquences insultrices entre deux TADs et analysé les conséquences sur la transcription des gènes à proximité. Dans une première étude, de Wit *et al.* ont supprimé ou inversé indépendamment trois sites CTCF associés aux loci *Malt1*, *Sox2* et *Fbn2* dans des cellules embryonnaires de souris. Alors que la formation des trois TADs était affectée, seul le gène *Fbn2* était différentiellement exprimé (surexpression d'un facteur 2) après invalidation du site CTCF (de Wit et al., 2015). Dans une seconde étude, Guo *et al.* ont inversé les sites CTCF présents dans les clusters du gène codant pour la protocadhérine. Cette inversion a provoqué la chute de la transcription des exons présents dans ces clusters (Guo et al., 2015). Par ailleurs, l'abolition d'une barrière entre deux TADs peut également conduire au développement de pathologies (Franke et al., 2016) ou de processus cancéreux (Flavahan et al., 2016). A titre d'exemple, la polydactylie est provoquée par l'altération

du TAD au locus *Epha4* qui dérégule des interactions entre enhanceurs et promoteurs dans ces régions et induit l'expression ectopique des gènes *Pax3* et *Wnt* dans les membres (Lupiáñez et al., 2015). Au vu de ces études, les séquences insultrices séparant les TADs semblent avoir une fonction biologique : permettre la co-régulation des gènes présents dans un même TAD et atténuer les interactions enhanceurs-promoteurs entre TADs adjacents. Cependant, d'autres études ont analysé les conséquences sur la transcription de la perte globale des TADs après dégradation des cohésines. Étonnement, environ 90% des gènes ne sont pas différentiellement exprimés en absence de TADs (Rao et al., 2017; Schwarzer et al., 2017). Ces résultats vont donc à l'encontre des modèles suggérant un rôle prépondérant des TADs dans la régulation génique des cellules. Les TADs pourraient avoir un rôle localisé et réguler l'expression d'une fraction de gènes clefs pour le développement mais ce rôle ne semble pas extrapolable à l'ensemble des gènes transcrits.

Afin d'élucider une fonction potentielle des TADs, une autre approche a consisté à analyser leur conservation : ils apparaissent conservés, d'une part au cours du développement d'un organisme et d'autre part au cours de l'évolution (Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014; Zhan et al., 2017). Ainsi, des TADs (appelés également CID pour « *Chromosomal Interacting Regions* ») ont été identifiés dans de nombreux organismes modèles tels que la bactérie *B. subtilis*, les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*, la drosophile *D. melanogaster* ou le nématode *Caenorhabditis elegans* (Crane et al., 2015; Hsieh et al., 2015; Marbouty et al., 2015; Mizuguchi et al., 2014; Sexton et al., 2012). Le repliement 3D des chromosomes en TADs semble donc être un processus conservé, laissant supposer une fonction biologique des TADs. Néanmoins, bien que la présence de TADs soit conservée dans différentes espèces, il est important de préciser que leur nature moléculaire peut varier. C'est notamment le cas chez la drosophile.

v. Les TADs chez *D. melanogaster*

Sur la base des cartes de contacts générées par C-technique, des TADs ont été identifiés chez la drosophile (Sexton et al., 2012). Ils sont cependant beaucoup plus petits que leurs équivalents chez les mammifères avec une taille médiane de 100kb (Hou et al., 2012).

Chez la drosophile, les séquences des TADs sont fortement corrélées avec leur état chromatinien (Figure 31). Quatre catégories de TADs ont ainsi été définies sur la base des couleurs de chromatine définies par Filion *et al.* (Filion et al., 2010), Figure 8) : 1) transcriptionnellement

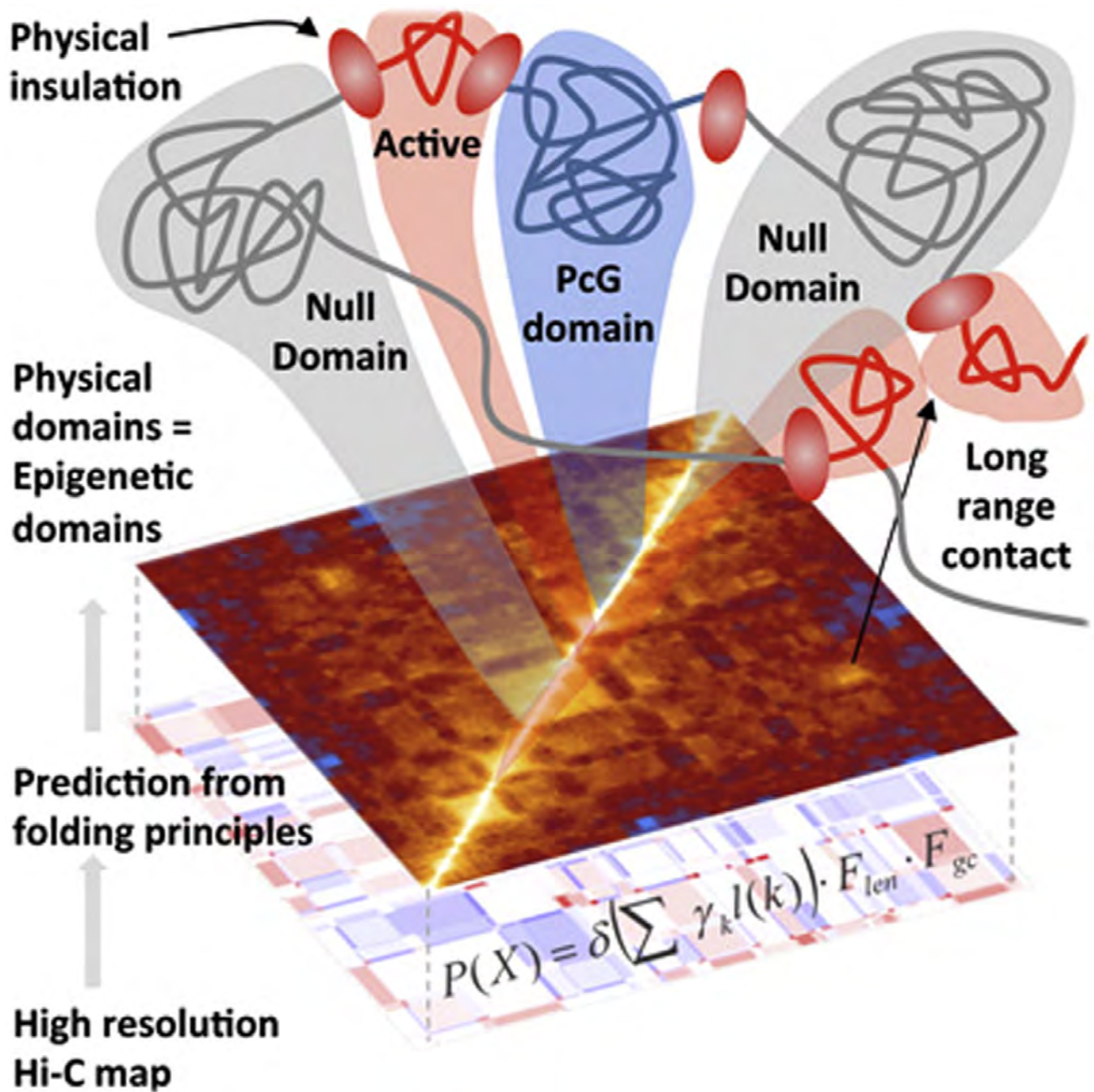


Figure 31 : Nature des TADs chez la drosophile *D. melanogaster*. Chez la drosophile les TADs sont corrélés avec l'état chromatinien de la fibre d'ADN. Ils peuvent être actifs (chromatine rouge), réprimés par Polycomb (chromatine bleue) ou réprimés et pauvres en gènes (chromatine noire apparaissant grise sur le schéma) (Sexton et al., 2012).

actifs, associés avec les marques d'histones H3K4me3 and H3K36me3 (chromatine Rouge et Jaune); 2) réprimés par le complexe Polycomb et enrichis en marques d'histones H3K27me3 (chromatine Bleue) ; 3) ne présentant pas de marque d'histones connues (chromatine Noire) ; 4) hétérochromatiniens, enrichis en histone linker HP1 et en modification d'histone H3K9me2 (chromatine Verte) (Sexton et al., 2012). Les TADs associés à la chromatine Noire sont de grande taille (entre 100 et 600 kb) et représentent la plus grande fraction du génome. Au contraire les chromatines Rouge et Jaune sont enrichies dans des TADs de taille réduite, inférieure à 100 kb (Hou et al., 2012; Sexton et al., 2012).

Les séquences insultrices sont des régions transcrites, riches en gènes et associées à de la chromatine ouverte (Rouge et Jaune) (Hou et al., 2012; Sexton et al., 2012). Les protéines insultrices CTCF, BEAF-32 et CP190 y sont enrichies ainsi que la protéine du fuseau mitotique Chromator (Hou et al., 2012; Sexton et al., 2012). Des protéines architecturales telles que les cohésines ou les condensines y sont également accumulées (Van Bortle et al., 2014). Cependant, il faut noter que chez *D. melanogaster*, et contrairement aux mammifères, CTCF et les cohésines ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans la formation des TADs (Luzhin et al., 2019; Ramírez et al., 2018; Schaaf et al., 2013; Ulianov et al., 2016). Dans cet organisme, la cohésine semble impliquée dans la régulation génique par son association avec le complexe Polycomb et par la formation des boucles de chromatine entre enhancers et promoteurs (pour revue (Dorsett, 2019)).

Le mécanisme de formation des TADs diverge également entre la drosophile et les mammifères. En effet, l'absence d'interaction entre les séquences insultrices chez *D. melanogaster* suggère que les TADs ne sont pas formés par des boucles de chromatine dans cette espèce (Cattoni et al., 2017). De plus, l'établissement des TADs dans le zygote est dépendant de la première vague de transcription (Cardozo Gizzi et al., 2019).

En résumé, l'organisation du génome de drosophile est dictée par l'état épigénétique de la chromatine et l'accessibilité transcriptionnelle des gènes. Ce génome peut être défini comme une succession de TADs de grandes tailles, réprimés transcriptionnellement et séparés entre eux par des TADs de plus petites tailles, riches en chromatine ouverte et active en transcription.

La drosophile n'est pas le seul organisme où CTCF n'est pas impliqué dans la formation des TADs. En effet, les génomes de *B. subtilis*, *C. elegans*, *S. pombe* et *S. cerevisiae* ne semblent pas coder pour des protéines homologues à CTCF et pourtant des TADs ont bien été identifiés dans

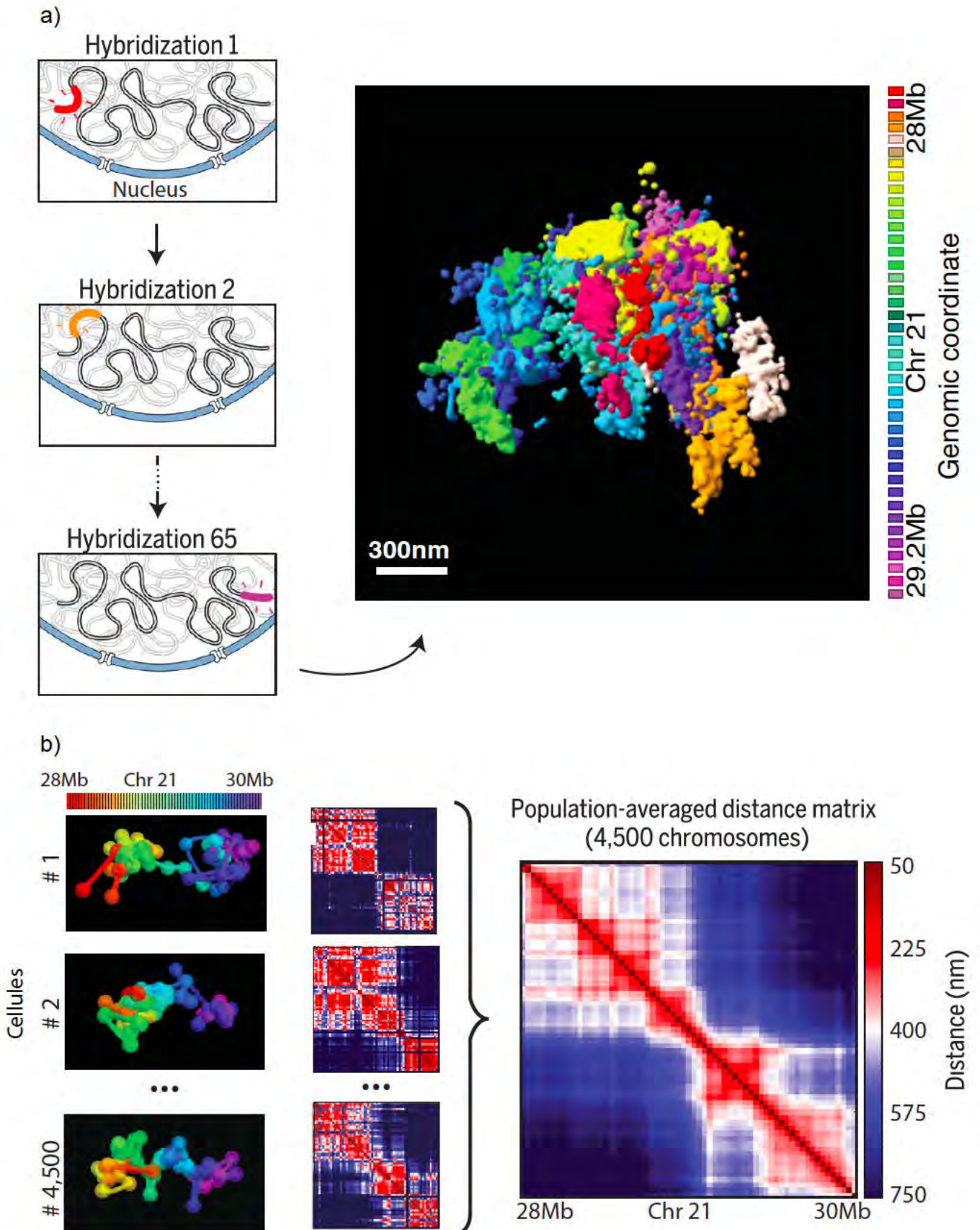


Figure 32 : Analyse des TADs en cellules uniques par technique de Hi-M. a) Principe de la technique de Hi-M : des séquences adjacentes sont successivement hybridées avec des sondes fluorescentes puis détectées en microscopie (gauche). L'organisation de la région génomique sondée est ensuite reconstituée en 3D (droite). b) Une même région génomique pouvant adopter différentes conformations dans chaque cellule, la carte de contact obtenue à partir d'une population cellulaire ne reflète pas l'organisation du génome en cellules uniques. Adapté de (Bintu et al., 2018).

ces organismes (Acemel et al., 2017; Crane et al., 2015; Hsieh et al., 2015; Marbouty et al., 2015; Mizuguchi et al., 2014; Sexton et al., 2012).

En conclusion les TADs sont présents dans une grande variété d'espèces et pourraient représenter l'unité fonctionnelle du génome (Zhan et al., 2017). Cependant, leur nature diffère et rend l'étude de leur fonction biologique difficile.

Rappelons ici que les TADs ont été définis comme des triangles visualisables le long de la diagonale des cartes de contacts générées sur des populations cellulaires par C-techniques. Comme mentionné précédemment, les cartes de contacts sont la résultante de la somme des contacts présents dans toutes les cellules de la population. Bien que ces dernières puissent être synchronisées dans différentes phases du cycle cellulaire afin d'homogénéiser la population étudiée (voir Chapitre II), la fibre de chromatine reste dynamique (voir Chapitre I) et adopte donc des conformations différentes à l'intérieur de chaque cellule. Un des enjeux majeurs suite à l'explosion du nombre de données générées par Hi-C a donc été de comprendre si les TADs étaient générés par l'agglomération de données issues de cellules individuelles ou s'ils reflétaient réellement une organisation de la fibre de chromatine à l'intérieur de chaque cellule.

vi. Visualisation des TADs en cellules uniques

Afin d'analyser l'organisation du génome en cellules uniques, différents laboratoires ont combiné des approches de FISH, permettant de visualiser une large région génomique en microscopie à fluorescence, avec des techniques d'imagerie telles que le 3D-SIM (« *Structured Illuminated Microscopy* ») ou le STORM permettant la détection de la région d'intérêt à haute résolution (100 nm et 20 nm respectivement). De cette manière, des régions génomiques adjacentes peuvent être marquées successivement par des sondes couplées à différents fluorophores et détectées à haute résolution. Des cartes de contacts peuvent ensuite être reconstituées, pour chaque cellule, sur la base de l'interaction entre les différentes régions imagées. Par analogie au Hi-C, on parle alors de techniques Hi-M (« *High throughput Microscopy* », (Bintu et al., 2018; Cardozo Gizzi et al., 2019), Figure 32a). Les premières études de Hi-M révèlent que l'agglomération des cartes de contacts obtenues sur cellules uniques reproduit la carte de contacts obtenue par Hi-C dans les mêmes conditions (Bintu et al., 2018; Cardozo Gizzi et al., 2019).

Ces techniques basées sur la microscopie à fluorescence ont permis de mettre en évidence chez la drosophile que les séquences définissant un TADs décrit en Hi-C colocalisaient dans le noyau de cellules uniques et formaient des domaines d'association (Boettiger et al., 2016; Cardozo Gizzi et al., 2019; Cattoni et al., 2017; Szabo et al., 2018). Cependant, Cardozo-Gizzi et ses collaborateurs ont rapporté que l'organisation de ces domaines était hétérogène de cellule à cellule. De plus, en analysant simultanément la transcription d'un gène et l'organisation du TAD dans lequel il se situe, les auteurs de la même étude ont pu établir que lors de la transcription du gène, le TAD n'est plus discernable sur les cartes de contacts Hi-M (Cardozo Gizzi et al., 2019). Ainsi des domaines d'association tels que les TADs définis en Hi-C semblent se former *in vivo* mais ils sont hétérogènes de cellules à cellules. Les mêmes conclusions ont pu être établies sur cellules de mammifères : les cartes de contacts générées en cellules uniques sont fortement hétérogènes mais leur agglomération produit une carte de contact similaire à celle obtenue en Hi-C ((Bintu et al., 2018), Figure 32b).

L'organisation des chromosomes d'une cellule unique peut également être étudiée par Hi-C. En effet, le laboratoire de Fraser a mis au point la technique de Hi-C sur cellules uniques (Nagano et al., 2015). Brièvement, les noyaux des cellules sont triés, isolés et une librairie Hi-C est générée pour chacun d'entre eux. Cette technique ne permet pas d'obtenir des matrices de contact avec une haute couverture du génome mais est clef pour explorer l'hétérogénéité de cellules à cellules. Il est apparu que dans une population de cellule, chacune arborait une conformation des chromosomes différente de celle de sa voisine (Flyamer et al., 2017; Stevens et al., 2017). Cette hétérogénéité de conformation des chromosomes semble provenir en partie du cycle cellulaire. En effet, les cartes de contacts réalisées sur une population asynchrone sont plus hétérogènes que celles réalisées sur des populations synchronisées (Nagano et al., 2017). Une certaine variabilité intrinsèque à chaque cellule est cependant toujours présente dans les cellules synchronisées.

Enfin, d'après les modélisations réalisées *in silico*, les TADs identifiés sur les cartes de contacts Hi-C ne peuvent être reproduits qu'à la condition où les boucles de chromatine sont dynamiques (Fudenberg et al., 2016). Dans ce modèle, les facteurs d'extrusion sont en constant mouvement sur la chromatine et sont impliqués dans des cycles d'association et de dissociation de la chromatine. Cela implique que la fibre de chromatine adopte de multiples conformations, même dans des cellules aux conditions physiologiques comparables.

En résumé, l'interaction préférentielle sur la fibre de chromatine entre certaines séquences adjacentes conduit à la formation *in vivo* de domaines d'associations. Ces interactions préférentielles conduisent à la formation de domaines qui ne sont pas formés aléatoirement mais sont guidés, chez les mammifères, par la réplication, la transcription et par des facteurs protéiques tels que les cohésines ou CTCF. Ils sont dynamiques, varient de cellule à cellule et en fonction de l'étape du cycle cellulaire. L'agglomération de tous les domaines formés à un instant *t* dans une population cellulaire permet de révéler l'ensemble des interactions préférentielles qu'un locus établit avec les séquences adjacentes. Ceci se traduit sur les cartes de contacts par une succession de domaines d'associations topologiques, appelés TADs. A l'avenir, il semble essentiel d'associer des données générées par Hi-C (en population ou sur cellule unique) à celles obtenues par Hi-M afin d'avancer dans notre compréhension de la fonction et de la formation des TADs. De tels projets ont déjà vu le jour et permettent par exemple la reconstitution de modèles 3D des chromosomes basés sur des données à la fois de FISH et de Hi-C (Abbas et al., 2019).

b. Les compartiments chromatiniens A et B

L'analyse des cartes de contacts générées par Hi-C révèle qu'en plus des interactions intra-chromosomiques aboutissant à la formation de TADs, les chromosomes établissent des interactions inter-chromosomiques. Ces interactions génèrent sur les cartes de contacts un motif semblable à un damier (« *checkerboard pattern* ») et reflètent la division du génome en deux compartiments nommés arbitrairement A et B ((Lieberman-Aiden et al., 2009), Figure 33a). Les séquences appartenant au compartiment A sont associées à l'euchromatine et les séquences associées au compartiment B à l'hétérochromatine. Il s'avère que les séquences du compartiment A n'interagissent pas avec celles du compartiment B. Les interactions A-A et B-B sont ainsi privilégiées et conduisent à la formation de ce motif caractéristique de damier. Ces interactions inter-chromosomiques s'effectuant à l'échelle de plusieurs mégabases, il a été proposé que le génome était organisé de manière hiérarchique, avec les compartiments formant un niveau d'organisation à plus grande échelle que les TADs. (Lieberman-Aiden et al., 2009; Rao et al., 2014; Sexton et al., 2012). On sait aujourd'hui qu'il existe une compétition entre ces deux modes de repliement de la chromatine (voir ci-après).

La formation des compartiments semble reposer avant tout sur l'état transcriptionnel de la cellule. En effet, les compartiments ne sont pas visibles dans les zygotes et ne deviennent apparents

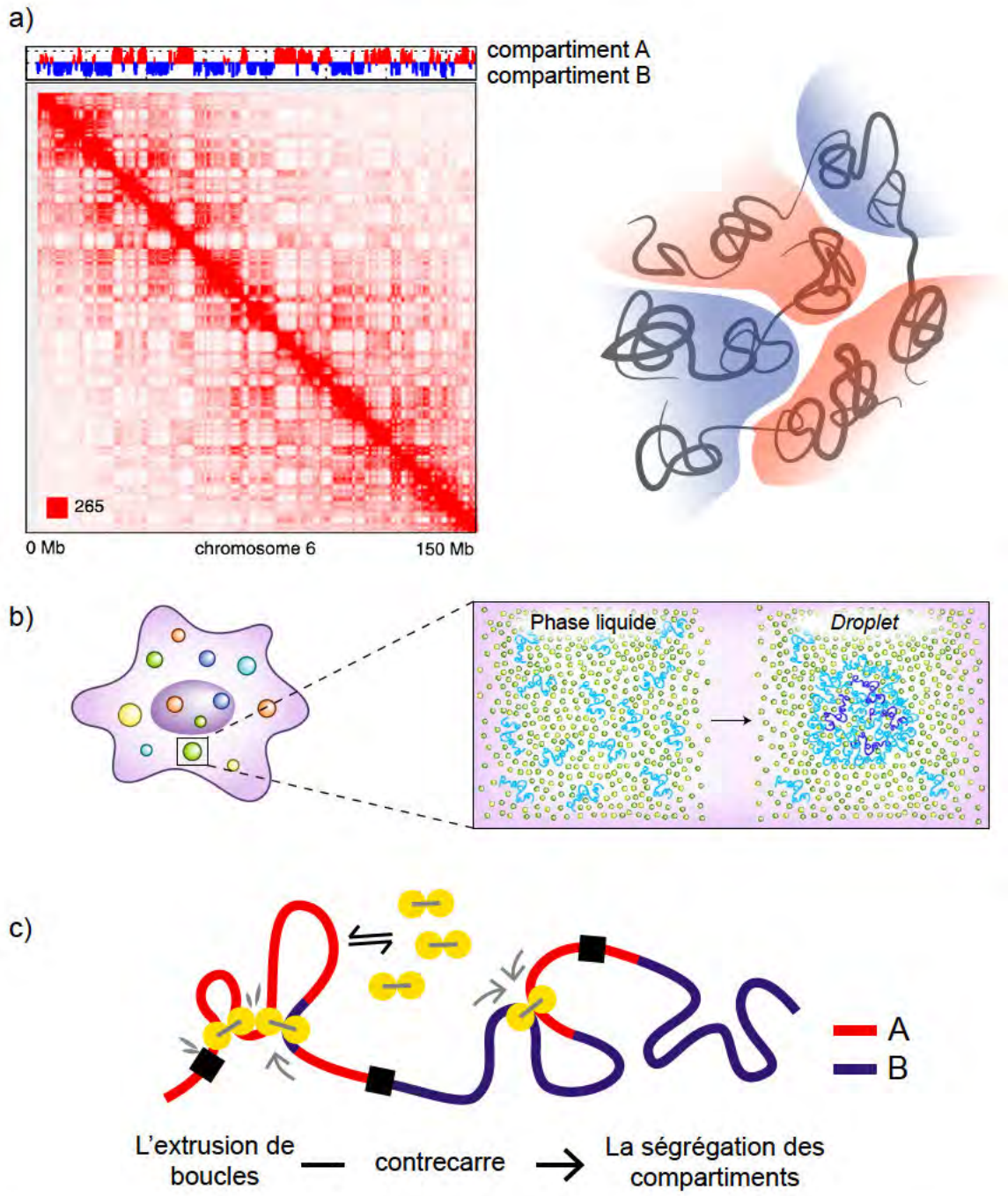


Figure 33 : Les compartiments A et B. a) Gauche : carte de Hi-C laissant apparaître un motif de damier qui révèle la segmentation du génome en deux compartiments nommés A et B (Wutz et al., 2017). b) Formation de « droplets » par un processus de transition de phase initié par la concentration locale en protéines telles que HP1. Adapté de (Tang, 2019). c) Schéma représentant la compétition entre l'extrusion de boucles et la formation des compartiments pour l'organisation de la chromatine. Adapté de (Nuebler et al., 2018).

qu'après les premières divisions de l'embryon (Du et al., 2017; Flyamer et al., 2017; Ke et al., 2017). De plus, la ségrégation spatiale entre les deux compartiments semble être établie par un mécanisme de séparation de phases. Selon ce principe, l'augmentation de la concentration locale en protéines liées à la chromatine provoque la formation de gouttes ou « *droplets* » aux propriétés physico-chimiques différentes de celles du milieu environnant (Figure 33b). Les protéines à l'intérieur des *droplets* sont dynamiques et le rapprochement spatial entre deux *droplets* de mêmes propriétés induit leur fusion. Si une séquence d'ADN se trouve dans un état chromatinien comparable à celui des séquences à l'intérieur de la *droplet*, alors elle peut être associée dans cette *droplet*. En revanche, une séquence dans un état chromatinien différent de celui des séquences à l'intérieur de la *droplet* ne peut y être recrutée. Au moins deux types de séparation de phases peuvent être proposés : le « *Polymer-Polymer Phase Separation* » (PPPS) et le « *Liquid-Liquid Phase Separation* » (LLPS). Dans le premier cas, des facteurs protéiques se lient à la chromatine, établissent des ponts entre différents fragments d'ADN et provoquent leur ségrégation du reste de la chromatine. Dans le second cas, la séparation de phase est établie par des facteurs liant la chromatine mais ayant des propriétés d'auto-assemblage. Il a été montré que les protéines HP1 humaines et de drosophiles enrichies aux séquences du compartiment B pouvaient s'agréger et former des gels *in vitro* (Larson et al., 2017; Strom et al., 2017). Les interactions chromatine-chromatine établies par ces protéines pourraient donc favoriser la ségrégation du compartiment B par un mécanisme de PPPS. De même, il a été montré que l'interaction entre plusieurs super-enhancers pouvait conduire à la formation de *droplets* favorisant les interactions A-A et donc la ségrégation de phase de ce compartiment (Sabari et al., 2018). Enfin, un récent modèle *in silico* conforte l'hypothèse de ségrégation des compartiments A et B par un mécanisme de séparation de phase. D'après ce modèle, les seules forces d'interactions B-B et B-lamines permettent de reconstituer la disposition des compartiments dans la plupart des cellules de mammifères (*i.e.* euchromatine au centre et hétérochromatine à la périphérie, Figure 8a) (Falk et al., 2019).

c. Compétition entre les TADs et les compartiments

Bien que les TADs et les compartiments représentent deux niveaux de compaction différents de la chromatine dans un noyau, il existe une compétition entre ces deux modes de repliement de la chromatine. En effet, il a été montré par des données de Hi-C générées *in vivo* et *in silico* que la perte de TADs induisait une meilleure démarcation des compartiments (Flyamer et

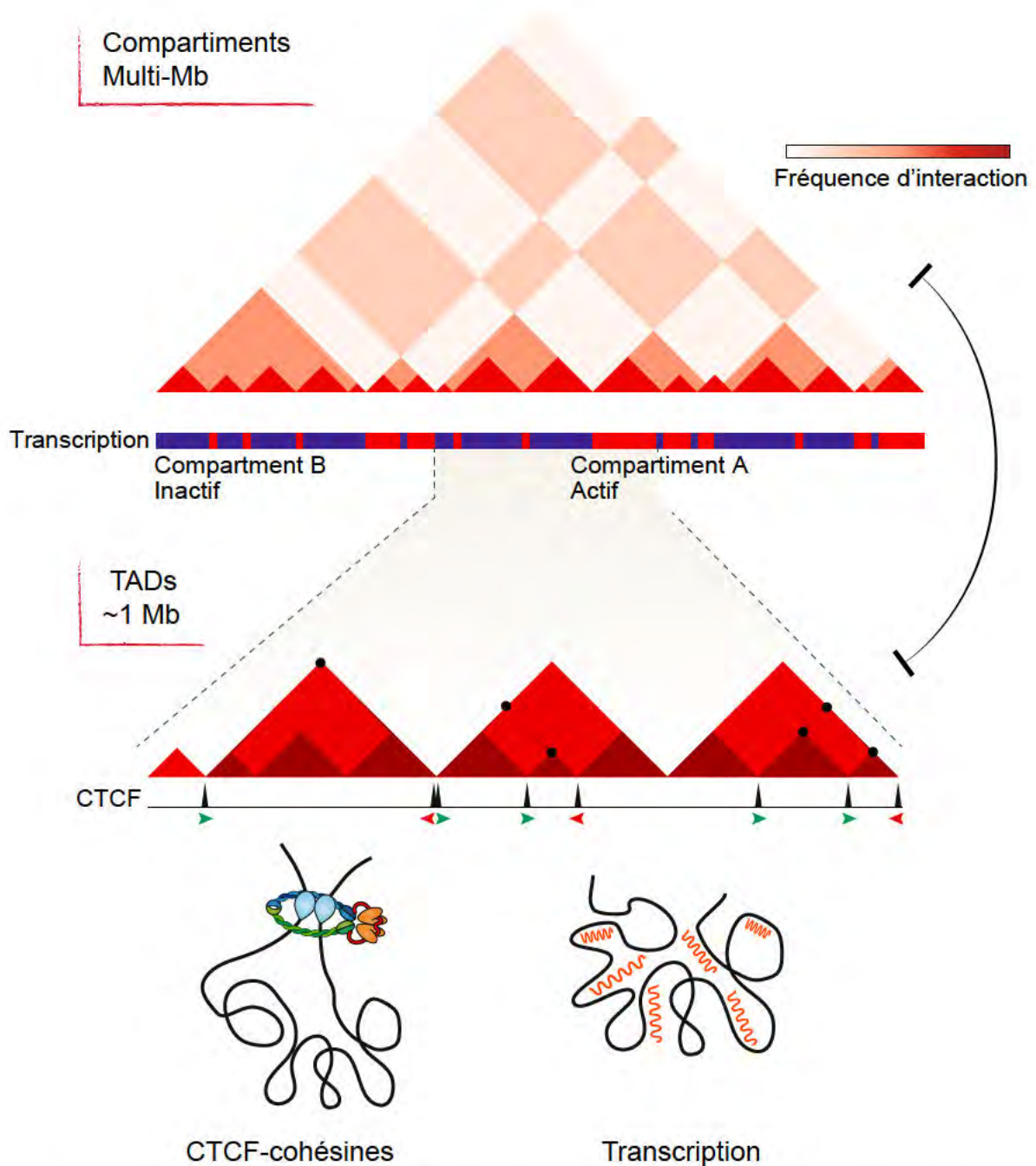


Figure 34 : Compétition entre les TADs et les compartiments pour l'organisation du génome. À grande échelle (Multi-Mb), les chromosomes interagissent entre eux en fonction de leur état chromatinien et forment ainsi deux compartiments : A (actif) et B (inactif). A plus petite échelle (de l'ordre du Mb), les chromosomes s'organisent intra-moléculairement en TADs. Ces derniers peuvent être formés par les cohésines et CTCF générant des boucles de chromatine ou par la transcription. Adapté de (Rowley and Corces, 2018).

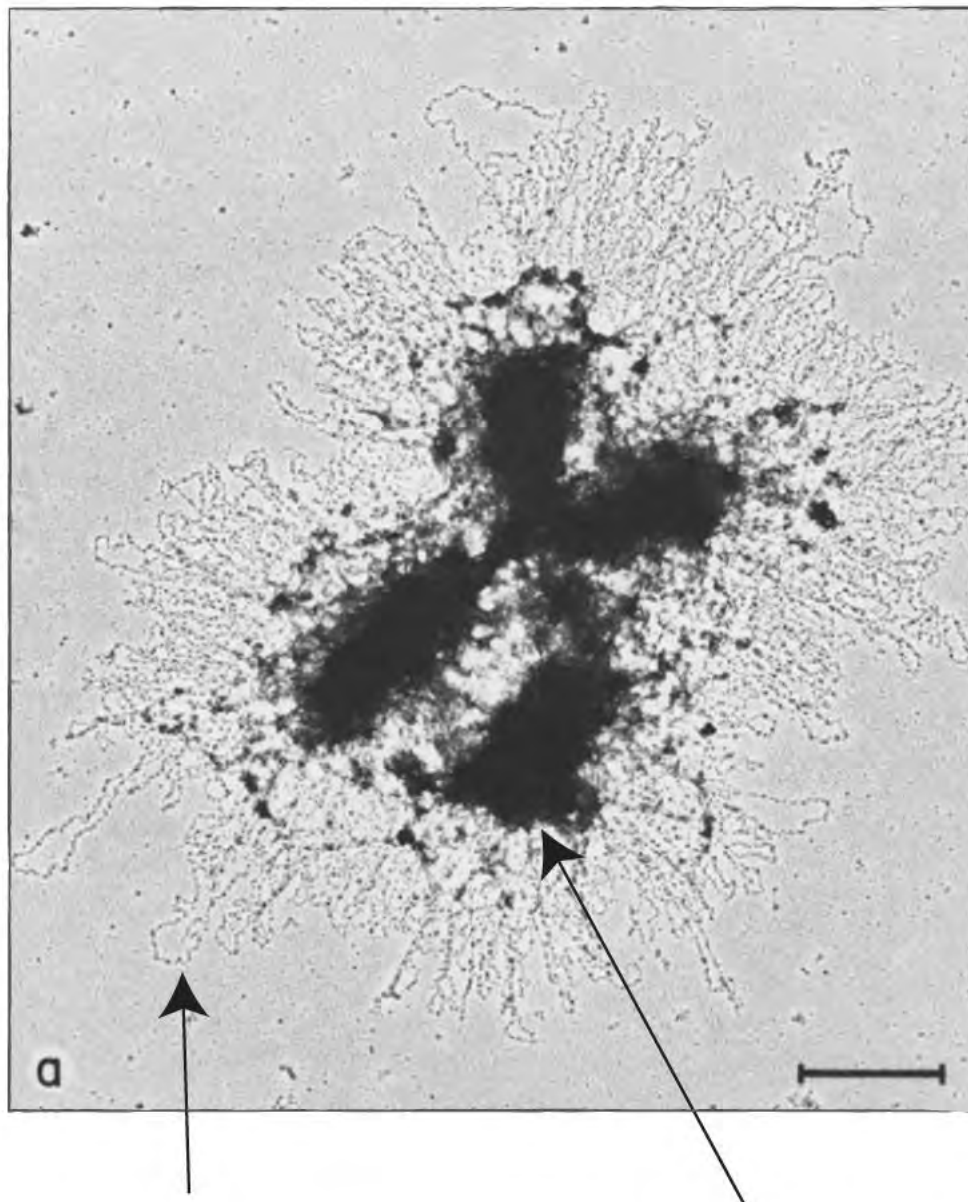
al., 2017; Nagano et al., 2017; Nuebler et al., 2018; Schwarzer et al., 2017; Wutz et al., 2017). Alternativement, lorsque la taille des TADs est amplifiée, la délimitation entre les compartiments est atténuée (Haarhuis et al., 2017; Nuebler et al., 2018; Wutz et al., 2017). Ces données suggèrent qu'en condition normale de croissance, l'extrusion de boucles induirait un certain degré d'association entre les séquences spécifiques des compartiments A et B (Figure 33a).

Ainsi l'organisation 3D du génome des cellules en interphase résulte de l'action combinée de deux forces contraires, l'une favorisant la formation de boucles locales de chromatine et l'autre stimulant le repliement à plus grande échelle des séquences aux états chromatiniens comparables (Figure 34).

Toutefois, les TADs et les compartiments ne sont plus visibles sur les cartes de contacts de Hi-C générées sur des cellules arrêtées en mitose (Nagano et al., 2017; Naumova et al., 2013). Ces résultats suggèrent une réorganisation profonde des chromosomes à cette phase du cycle cellulaire.

d. Les chromosomes mitotiques

Depuis la visualisation de la réorganisation des chromosomes avant la mitose par Flemming en 1879, un enjeu majeur en biologie a été de comprendre les mécanismes permettant la réorganisation de la chromatine interphasique décompactée (peu dense aux électrons après coloration et visualisation en MET) en chromosomes en forme de X, hautement compactés (denses aux électrons dans les mêmes conditions) (Flemming, 1879). Cependant l'étude de l'architecture sous-jacente des chromosomes métaphasiques par MET fut entravée par leur haut degré de compaction et leur concentration importante en protéines histones et non histones. Dans une étude en 1977, Adolph et ses collaborateurs ont cherché à comprendre l'importance des protéines non histones dans l'architecture de ces chromosomes. Pour cela, ils ont incubé les chromosomes métaphasiques en présence d'anions (dextran sulfates et héparines), induisant l'éviction des histones des chromosomes (Adolph et al., 1977). Les auteurs ont ainsi généré des chromosomes métaphasiques décondensés, dénués d'histones mais toujours associés aux protéines non histones. Le marquage de ces chromosomes par un intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium et leur visualisation par microscopie à fluorescence a révélé que leur architecture globale était conservée : les chromosomes apparaissaient toujours sous forme de X et étaient composés d'une structure centrale dense entourée d'un halo. De plus, cette architecture était dépendante de facteurs protéiques, le traitement des chromosomes au SDS ou à l'urée induisant sa dissolution (Adolph et



Boucles de chromatine

Squelette protéique

Figure 35 : Image par MET d'un chromosome métaphasique en milieu hypotonique. Le chromosome semble composé d'un squelette central duquel émanent des boucles de chromatine (Earnshaw and Laemmli, 1983).

al., 1977). Les auteurs ont conclu que les chromosomes métaphasiques étaient formés d'un squelette central établi par des protéines non histones servant de support à la compaction de l'ADN. Les mêmes conclusions ont été formulées après analyse des chromosomes dépourvus en histones par MET (Marsden and Laemmli, 1979; Paulson and Laemmli, 1977). Cependant l'analyse des chromosomes à haute résolution par MET a permis de mettre en évidence que de multiples boucles d'ADN (de tailles comprises entre 30 et 90kb) émanaient du squelette central ((Earnshaw and Laemmli, 1983; Paulson and Laemmli, 1977), Figure 35). De là est né le modèle selon lequel les chromosomes métaphasiques seraient compactés en de multiples boucles de chromatine, organisées de manière radiale autour d'un squelette protéique central.

Différentes études ont alors cherché à caractériser la nature protéique de ce squelette. Il est apparu que les condensines (Hirano and Mitchison, 1994; Hirano et al., 1997) et la topoisomérase II (Earnshaw et al., 1985) étaient enrichies sur l'axe central des chromosomes métaphasiques ; elles entraînent donc probablement dans la composition du squelette. La topoisomérase II résout les enchevêtrements générés entre les deux chromatides sœurs lors de la réplication (Farcas et al., 2011; Liu et al., 1980). En absence de cette protéine, les chromosomes métaphasiques ne sont pas réorganisés en forme de X mais persistent sous forme d'amas, dans un état proche de celui observé en interphase (Hirano and Mitchison, 1993; Wood and Earnshaw, 1990). Un même phénotype est observé après déplétion des condensines (Hirano and Mitchison, 1994; Hirano et al., 1997). La topoisomérase II et les condensines sont donc requises pour la réorganisation des chromosomes interphasiques en chromosomes métaphasiques en forme de X. De manière surprenante, ni la topoisomérase II ni les condensines ne semblent impliquées dans la **compaction** des chromosomes en mitose (pour rappel, définie comme le volume occupé par la chromatine). En effet, en absence de topoisomérase II ou de condensines, des chromosomes métaphasiques en forme de X ne sont pas formés mais la chromatine est compactée (le volume occupé par la chromatine est réduit par rapport à celui en interphase, (Gibcus et al., 2018; Hirano and Mitchison, 1993; Samejima et al., 2018)). Les condensines et la topoisomérase II ont donc un rôle architectural : elles permettent la réorganisation d'une fibre de chromatine interphasique en chromosome métaphasique compacté, à la forme caractéristique en X. On peut alors se demander, par quel mécanisme ces protéines parviennent à une telle « prouesse » ?

C'est grâce à l'émergence des C-techniques et aux modélisations de polymères *in silico* que cette énigme a pu être résolue. Dans leur étude de 2013, Naumova *et al.* ont montré par Hi-C que

la compaction des chromosomes en prophase s'accompagnait de la dissolution des TADs et des compartiments. Ils ont ensuite suggéré grâce à des modélisations biophysiques basées sur des modèles de polymères que les chromosomes métaphasiques se réorganisaient en de multiples boucles de chromatine mesurant entre 80 à 120 kb. Les auteurs ont proposé un modèle de formation des chromosomes métaphasiques en deux étapes : 1) des boucles se forment le long des bras des chromosomes lors de la prophase (compaction linéaire) puis 2) en prométaphase les bras des chromosomes sont soumis à une compression axiale induisant le rapprochement de la base des boucles ((Naumova et al., 2013) Figure 36a). Intéressé par le mécanisme de formation des boucles, le laboratoire de Mirny a alors cherché à comprendre si l'extrusion de boucles suffisait à compacter la chromatine en chromosomes métaphasiques ((Nasmyth, 2001b), Figure 22b droite). Pour cela Goloborodko *et al.* ont modélisé la réorganisation d'une fibre de chromatine suite à l'action de facteurs d'extrusion. Différents paramètres ont été inclus dans le modèle : la distance séparant deux facteurs d'extrusion, la quantité d'ADN extrudée avant la dissociation des facteurs de l'ADN (la « processivité » des facteurs d'extrusion) et leur concentration. Après de nombreux tests *in silico*, les auteurs ont mis en évidence que le modèle d'extrusion de boucles permet d'expliquer la compaction de la chromatine à la condition que la distance entre deux facteurs d'extrusion soit égale à zéro (*i.e.* la fin d'une boucle coïncide avec le début de l'autre). Par conséquent, ces facteurs doivent être suffisamment « processifs » (c'est-à-dire extruder suffisamment d'ADN avant leur dissociation de la fibre) afin de pouvoir interagir entre eux. Leur concentration doit également être optimale : trop faible, un nombre limité de boucles est formé ne permettant pas la compaction de la chromatine ; trop haute, les boucles générées sont de petites tailles et provoquent la décompaction des chromosomes ((Goloborodko et al., 2016b), Figure 36b). Cette modélisation a ensuite été améliorée afin de prendre en compte un nombre additionnel de paramètres tels que l'architecture 3D d'un chromosome métaphasique, l'action de la topoisomérase II ou l'interaction entre les deux chromatides sœurs (Goloborodko et al., 2016a). Ainsi la compaction d'un chromosome par extrusion semble nécessiter l'action de la topoisomérase II et la répulsion stérique entre les boucles de chromatine (Goloborodko et al., 2016a). Alors que la première résout les enchevêtrements entre les deux chromatides sœurs et permet leur séparation, la seconde permet l'alignement des boucles les unes par rapport aux autres et empêche leur agglomération. La répulsion stérique des boucles de chromatine provoque la formation d'un squelette central formé par les facteurs d'extrusion, duquel s'étend une multitude de boucles de chromatine. Elle contribue

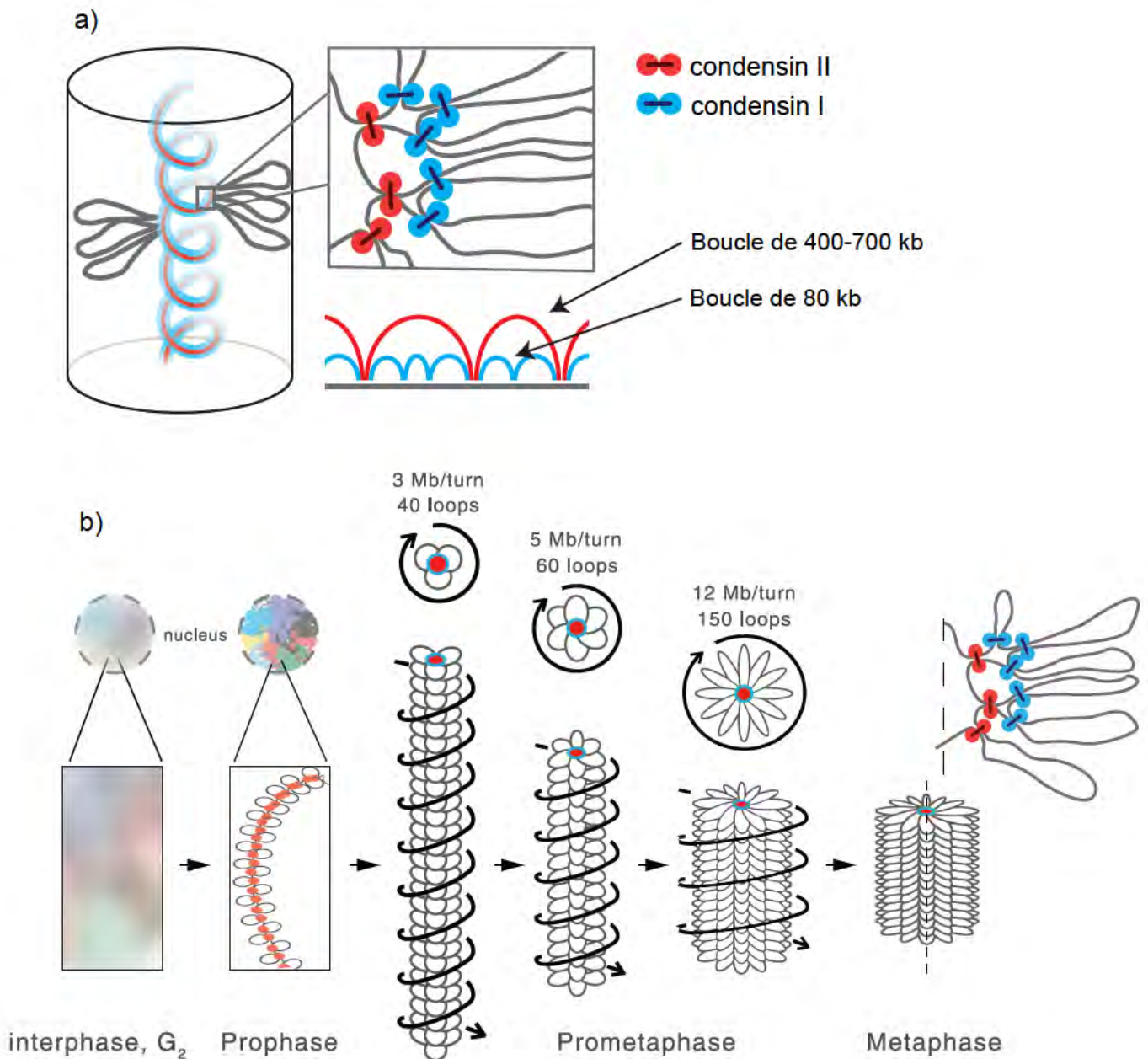


Figure 37 : Compaction des chromosomes métaphasiques par les condensines I et II. a) Les condensines forment un axe hélicoïdal central duquel émanent les boucles de chromatine. Les condensines II génèrent de grandes boucles de chromatine de 400-700 kb ; les condensines I forment des boucles de 80 kb à l'intérieur des précédentes. b) Lors de la prophase les boucles de chromatine sont formées par les condensines II. En prometaphase, ces boucles s'agrandissent et de nouvelles sont formées par les condensines I, induisant la compression des chromatides et la formation des chromosomes métaphasiques compactés. Adapté de (Gibcus et al., 2018).

également à la dissociation des deux chromatides sœurs (Figure 36c). Il est important de préciser que les condensines sont dynamiques sur l'ADN (Gerlich et al., 2006b). Dans ce modèle, le squelette protéique est donc également dynamique et non statique comme celui proposé dans les années 70 (Adolph et al., 1977). De plus, cette étude a permis de renforcer le modèle suggéré quelques années plus tôt de compaction des chromosomes en deux temps avec une phase de formation des boucles et une phase où elles sont consolidées puis agrandies (Goloborodko et al., 2016a; Naumova et al., 2013). Ces deux études (Goloborodko et al., 2016b, 2016a) stipulent que les chromosomes métaphasiques sont compactés par l'action d'un facteur d'extrusion. Même si tout laissait à penser que les condensines puissent correspondre à ce facteur, aucune preuve *in vivo* de l'extrusion de boucles par ce complexe n'était alors disponible.

Chez les mammifères, il existe deux complexes condensines (I et II) aux sous-unités Smc communes mais qui diffèrent par la sous-unité kleisin et les HAWKs qui lui sont associées (Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003). Les condensines II sont accumulées dans le noyau tout au long du cycle cellulaire. En revanche, les condensines I sont cytoplasmiques en interphase et ne sont recrutées sur les chromosomes qu'à la prométaphase, lors la dissolution de l'enveloppe nucléaire (Hirota et al., 2004; Yeong et al., 2003). Il a récemment été montré par Hi-C et modélisation *in silico* que ces deux complexes étaient impliqués dans la réorganisation des chromosomes métaphasiques par la formation de boucles de chromatine (Gibcus et al., 2018). Ils ont cependant des rôles distincts dans ce processus (Figure 37a). Lors de la prophase, les condensines II associées aux chromosomes établissent des boucles de chromatine de 60kb. Il est suggéré que la formation de ces boucles participe à l'éviction des cohésines et de CTCF des chromosomes et donc à la dissolution des TADs et des compartiments en mitose. En prométaphase, les boucles de chromatine s'agrandissent jusqu'à mesurer entre 400 kb et 700 kb. Les condensines I sont alors recrutées sur les chromosomes et initient également un processus d'extrusion sur les boucles générées préalablement par les condensines II. Cela conduit à la subdivision des boucles de 400-700kb en boucles d'environ de 80kb (Figure 37b). On peut noter que ces données sont en accord avec les tailles de boucles estimées dès les années 70 sur les chromosomes dépourvus d'histones (Paulson and Laemmli, 1977). Les condensines (I et II) sont redistribuées dans l'espace et forment un axe central hélicoïdal d'où émanent de nombreuses boucles de chromatine ((Gibcus et al., 2018), Figure 37a).

Grâce à la combinaison de multiples techniques telles de la microscopie à fluorescence, la MET, le Hi-C ou les modélisations *in silico*, nous avons aujourd'hui une vision beaucoup plus détaillée de la formation des chromosomes métaphasiques. A partir de la phase S, la topoisomérase II résout les enchevêtrements entre les chromatides sœurs. Puis, en prophase, les deux chromatides sont résolues, les condensines II initient l'extrusion des boucles de chromatine et les cohésines sont dissociées des bras des chromosomes. En prométaphase, la compaction des chromosomes se poursuit par l'action combinée des condensines I et II. Enfin, en métaphase, les chromosomes sont entièrement compactés, ils s'alignent sur la plaque métaphasique et le clivage des cohésines centromériques déclenche la ségrégation des chromatides sœurs.

e. Les territoires chromosomiques

Une fois la ségrégation des chromatides sœurs achevée, les chromosomes sont progressivement décondensés. Ils perdent alors leur structure caractéristique en X et apparaissent par microscopie à fluorescence dans le noyau interphasique comme des masses occupant des sous-domaines nucléaires appelés « territoire chromosomique ».

En parallèle des travaux de Flemming sur la mitose, Rabl étudiait en 1885 l'organisation des chromosomes en interphase dans des cellules de salamandre. Il postulait alors que les chromosomes décondensés n'étaient pas aléatoirement distribués dans le noyau des cellules mais qu'ils occupaient une sous-région distincte, héritée de la mitose précédente (Rabl, 1885). Ce concept fut repris quelques années plus tard par Boveri qui introduisit alors la notion de « territoire chromosomique » (Boveri, 1909). Une des premières preuves de l'existence des territoires chromosomiques fut apportée par des expériences sur des cellules de hamster réalisées dans le laboratoire de Cremer en 1984. Les auteurs ont irradié une zone de petite taille dans le noyau de cellules en interphase, en présence de nucléotides radio-marqués. L'irradiation provoquant des lésions de l'ADN, les nucléotides sont incorporés dans les chromosomes lors de la réparation des cassures de l'ADN. Les chromosomes métaphasiques ont ensuite été analysés par autoradiographie afin de déterminer les sites ayant été réparés. Dans le cas d'une répartition aléatoire des chromosomes dans l'espace nucléaire, on s'attend à ce qu'un grand nombre des chromosomes soit marqué (Figure 38a, gauche). Alternativement, dans le cas où chaque chromosome occupe un territoire qui lui est propre, l'irradiation ne devrait avoir touché qu'un nombre restreint de chromosomes (Figure 38a, droite). Après analyse des chromosomes métaphasiques, il s'est avéré

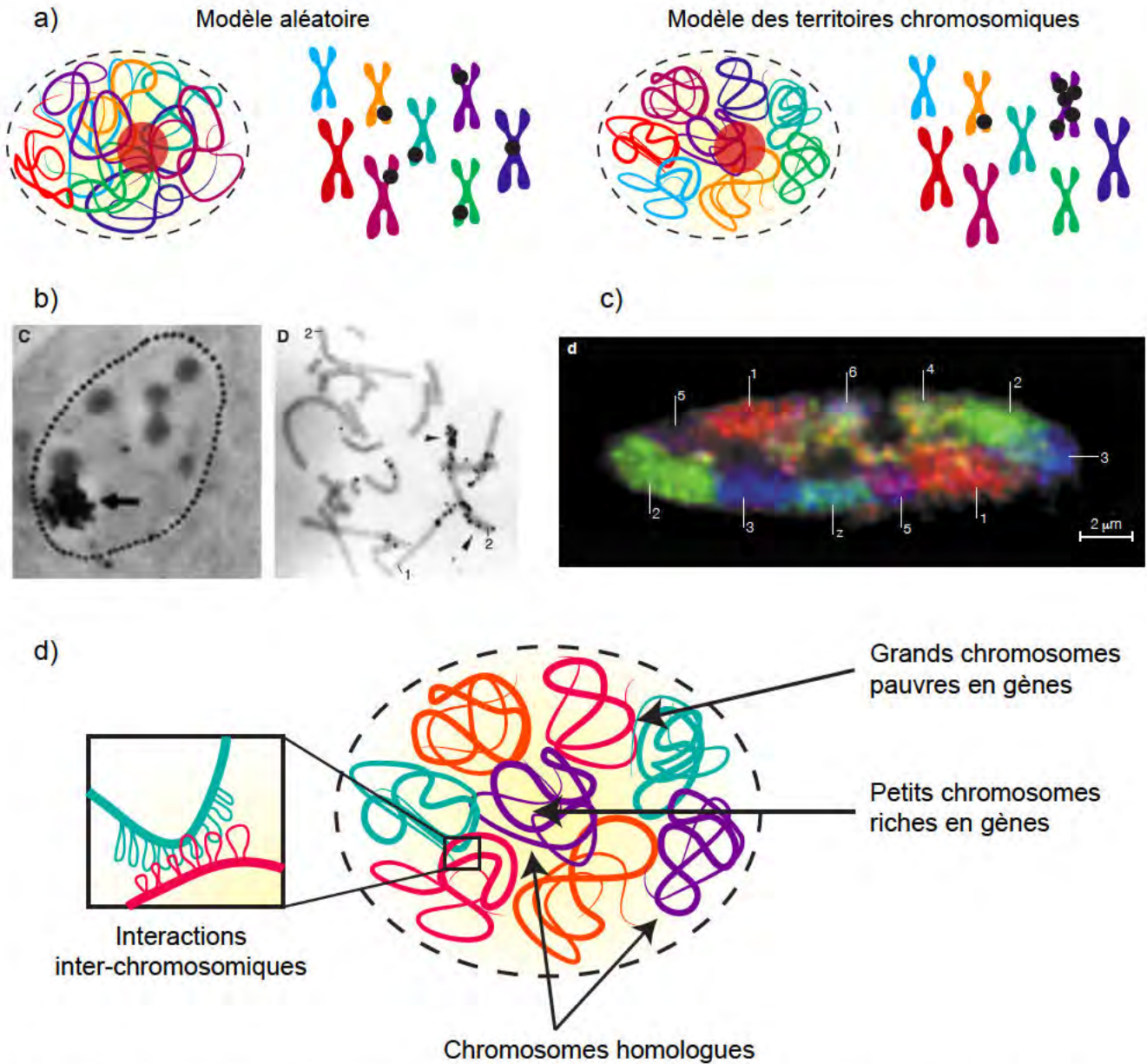


Figure 38 : Les territoires chromosomiques. a) Modèles de l'expérience réalisée par Cremer *et al.* en 1984. Les cercles rouges représentent les zones irradiées et les cercles noirs les sites d'incorporation des nucléotides radio-marqués. b) Résultats de l'expérience présentée en a) (Cremer and Cremer, 2010). c) Image de peinture chromosomique sur une cellule humaine (Bolzer *et al.*, 2005). d) Modèle d'organisation des chromosomes à l'intérieur d'une cellule humaine.

que seul un faible nombre de chromosomes avait incorporé des nucléotides radio-marqués ((Cremer et al., 1984), pour revue (Cremer and Cremer, 2010), Figure 38b). Même si ce résultat suggérait fortement l'existence de territoires chromosomiques, leur visualisation directe ne fut possible qu'avec l'émergence de la technique de DNA-FISH (Manuelidis, 1985; Schardin et al., 1985). Une telle technique a permis la visualisation dans des cellules hybrides (contenant des chromosomes de cellules humaines et de souris ou des chromosomes de cellules humaines et de hamsters) des chromosomes issus spécifiquement des cellules humaines. Conformément au postulat des territoires chromosomiques, les chromosomes occupaient alors des régions distinctes dans le noyau (Manuelidis, 1985; Schardin et al., 1985). Par la suite, des sondes spécifiques à chaque chromosome ont été générées, permettant le marquage simultané et distinct de plusieurs chromosomes. Cette technique, aussi connue sous le nom de « *chromosome painting* » ou « peinture chromosomique » a permis la visualisation des différents territoires chromosomiques dans un même noyau ((Bolzer et al., 2005), Figure 38c). Au-delà de la microscopie à fluorescence, les C-techniques ont également confirmé le modèle de territoires chromosomiques en révélant que la fréquence des interactions intra-chromosomiques était supérieure à celle des interactions inter-chromosomiques (Lieberman-Aiden et al., 2009).

A partir de la mise en évidence de l'existence des territoires chromosomiques, de nombreuses études ont visé à comprendre si le positionnement des chromosomes dans le noyau était aléatoire ou soumis à des contraintes. L'observation que chaque chromosome n'ait pas le même voisin d'une cellule à l'autre semble en faveur de l'hypothèse d'un arrangement aléatoire des chromosomes dans le noyau (Cornforth et al., 2002; Kozubek et al., 2002). Néanmoins, les chromosomes de petites tailles sont plus fréquemment localisés au centre du noyau et ceux de grandes tailles apparaissent préférentiellement situés à la périphérie (Bolzer et al., 2005; Cremer et al., 2008). De plus, la localisation périphérique d'un chromosome semble être anti-corrélée avec sa densité en gènes (Bolzer et al., 2005; Croft et al., 1999). Il a également été mis en évidence que les chromosomes homologues étaient situés à distance l'un de l'autre (Heride et al., 2010). Une telle séparation physique préviendrait 1) la recombinaison entre les deux chromosomes et la perte de l'hétérozygotie ainsi que 2) la lésion des deux copies d'un gène lors d'un stress localisé (e.g. induit par irradiations). Il est toutefois important de noter que cette séparation physique entre les chromosomes homologues n'est pas un processus conservé. En effet, on observe un appariement des chromosomes homologues dans les cellules somatiques de certaines espèces de l'ordre des

diptères telle que *D. melanogaster* (Joyce et al., 2012; Metz, 1916; Stevens, 1907), dans les cellules de *S. cerevisiae* à l'état diploïde (Burgess et al., 1999) ou au stade embryonnaire quatre cellules des cellules de mammifères (Fraser P., communication personnelle). Ainsi, le positionnement des chromosomes dans le noyau ne semble pas prédéterminé mais seulement influencé par certaines caractéristiques telles que sa taille ou sa densité en gènes (Figure 38d).

Malgré le fait qu'un chromosome interagisse majoritairement avec lui-même, il établit également des contacts avec ses voisins. Ces interactions conduisent notamment à la formation de domaines chromatiniens inter-chromosomiques co-régulés (tels que les compartiments A et B) et peuvent être analysées par Hi-C (Lieberman-Aiden et al., 2009) aussi bien qu'en microscopie à fluorescence (Branco and Pombo, 2006). En conclusion, même si un chromosome est préférentiellement confiné à l'intérieur d'un territoire, ce dernier n'agit pas comme une barrière physique mais confère une certaine porosité permettant une relocalisation de la chromatine dans les territoires adjacents.

D. Chez la levure

a. La conformation « *Rabl-like* » des chromosomes

Comme énoncé précédemment, Carl Rabl a postulé en 1885 que la disposition des chromosomes dans le noyau des cellules de salamandre était conservée entre la mitose et l'interphase. En d'autres termes, suite au désassemblage du fuseau mitotique les centromères des chromosomes restent regroupés à un pôle de la cellule alors que les bras des chromosomes s'étendent vers le pôle opposé ((Rabl, 1885), Figure 39). Une telle organisation des chromosomes (appelée organisation en Rabl) peut être observée dans une grande variété de cellules de plantes, de drosophile, de levures dont *S. cerevisiae* et *S. pombe* et dans certaines cellules de mammifères (Abranches et al., 1998; Cremer et al., 1982; Foe and Alberts, 1985; Funabiki et al., 1993; Hochstrasser et al., 1986; Jin et al., 2000; Sperling and Lüdtkke, 1981). L'organisation des chromosomes en Rabl n'est pas antinomique avec celle des territoires chromosomiques puisque comme nous allons le voir par la suite, les chromosomes chez la levure établissent préférentiellement des contacts intra-chromosomiques, suggérant que chaque chromosome occupe un territoire qui lui est propre (Dekker et al., 2002; Duan et al., 2010; Sexton et al., 2012). Chez les levures *S. cerevisiae* comme *S. pombe*, l'organisation des chromosomes dans le noyau dépend de trois éléments : les centromères, les télomères et le nucléole.

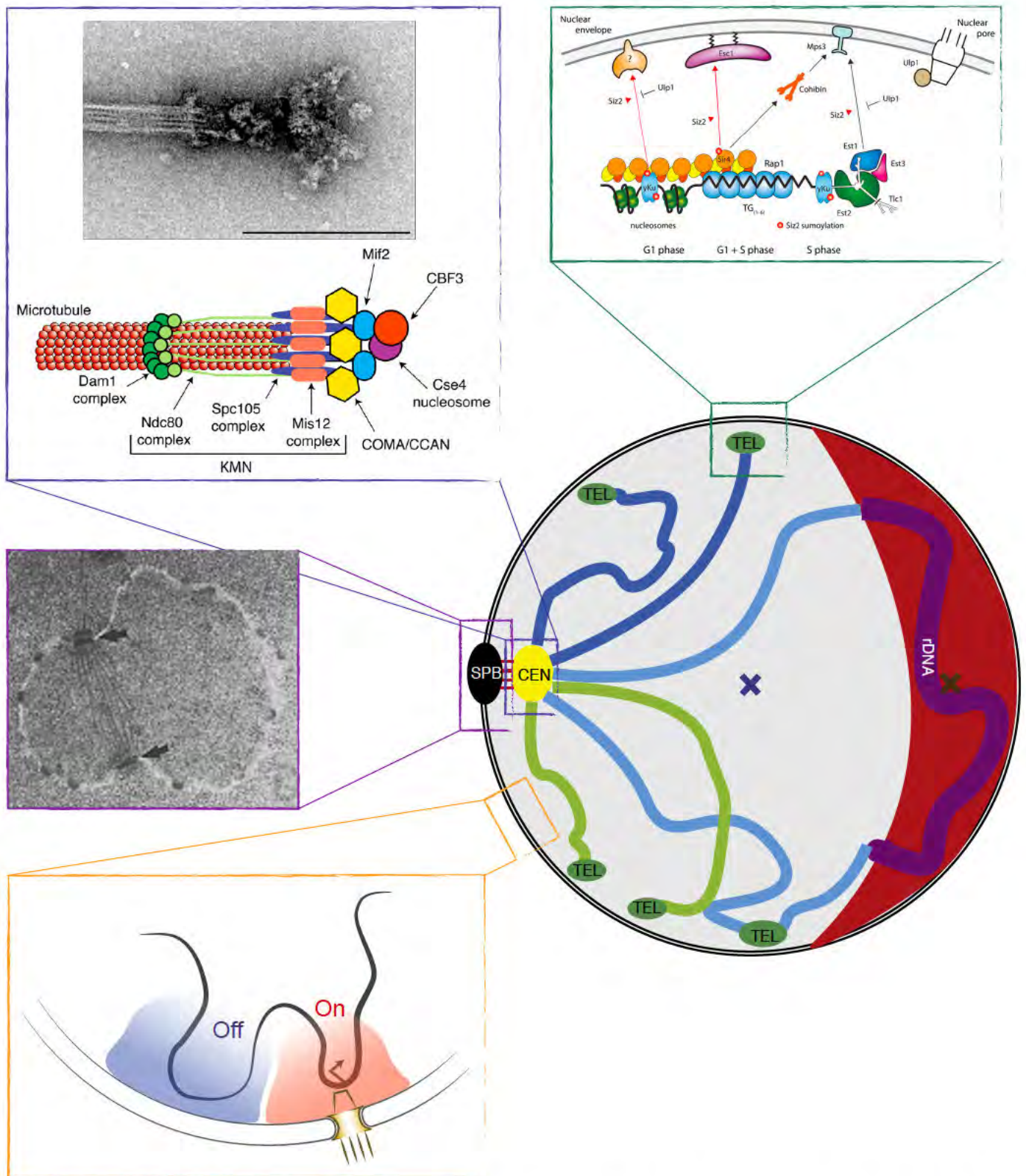


Figure 39 : La conformation « Rabl-like » des chromosomes. Les centromères sont regroupés à un pôle de la cellule, au niveau du SPB. Les télomères forment des foyers à l'enveloppe nucléaire. Le nucléole est situé à la périphérie du noyau, à l'opposé du SPB. Encart vert : schéma des mécanismes d'association des télomères à l'enveloppe nucléaire (Taddei and Gasser, 2012). Encart bleu : haut, image en MET d'un kinétochore lié par un microtubule, échelle 200 nm ; bas, schéma d'un kinétochore associé à un microtubule (Biggins, 2013). Encart violet : image en MET d'une coupe de noyau de levure, les flèches indiquent les deux SPBs (Jacobs et al., 1988). Encart orange : la chromatine associée aux NPCs est dans un état chromatien ouvert alors que celle associée au reste de l'enveloppe nucléaire est fermée.

i. Les centromères

Comme prédit par la conformation Rabl, les centromères sont regroupés à un pôle de la cellule de levure. Ils sont connectés à l'enveloppe nucléaire par l'intermédiaire de microtubules émanant du centre organisateur des microtubules et liés aux kinétochores (Bystricky et al., 2004; Guacci et al., 1994; Jin et al., 1998, 2000). Chez la levure *S. cerevisiae*, les kinétochores sont de larges complexes protéiques de plusieurs mégadalton, composés de plus de 45 protéines différentes et mesurant 120 nm de long (pour revue (Biggins, 2013), Figure 39 encart bleu). On distingue le kinétochore interne, qui comprend les sous-unités en contact avec le nucléosome centromérique caractérisé par la présence du variant d'histones Cse4, du kinétochore externe qui est, lui, composé des sous-unités en lien avec les microtubules. En plus d'ancrer les chromosomes à l'enveloppe nucléaire, les kinétochores jouent un rôle majeur lors de la mitose. En effet, ils agissent comme une plateforme permettant la détection des défauts d'attachement entre les centromères et les microtubules, le signalement de ces défauts et la mise en place du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (Biggins, 2013). On peut noter que chez la levure à bourgeon chaque kinétochore est lié par un unique microtubule (Winey et al., 1995). Le centre organisateur des microtubules, appelé « *Spindle Pole Body* » (SPB) chez la levure est ancré dans l'enveloppe nucléaire tout au long du cycle cellulaire ((Robinow and Marak, 1966), Figure 39 encart violet). C'est un complexe protéique de 500 MDa, mesurant en mitose 120 nm de long sur 150 nm de large (Byers and Goetsch, 1974). Il n'est cependant composé que de 18 protéines différentes qui sont donc présentes en grands nombres dans ce complexe (Rüthnick and Schiebel, 2018). De par son ancrage à l'enveloppe nucléaire, le SPB est en contact à la fois avec le cytosquelette cytoplasmique et avec les microtubules nucléaires ; il est donc un vecteur de la communication entre le cytoplasme et le noyau des cellules. Le SPB a un rôle essentiel dans l'organisation des chromosomes tout au long du cycle cellulaire : en interphase, il permet l'ancrage et le regroupement des centromères à un pôle de la cellule et en mitose, il initie la formation du fuseau mitotique (pour revue (Rüthnick and Schiebel, 2018)). Ainsi les chromosomes sont maintenus par le SPB dans une organisation de type Rabl. L'organisation des chromosomes dans le noyau interphasique ne résulte donc pas uniquement de l'organisation des chromosomes en mitose comme le suggérerait Rabl (Jin et al., 2000). Pour cette raison, on fait référence à une conformation « *Rabl-like* » dans les organismes où les centromères sont connectés au SPB.

ii. Les télomères

L'organisation des chromosomes chez la levure dépend également des télomères. Les télomères se situent à l'extrémité de chaque bras chromosomique et sont caractérisés chez la levure *S. cerevisiae* par la répétition de la courte séquence TG₁₋₃ sur 250-300 pb (Shampay et al., 1984). Les séquences sub-télomériques sont, elles, plus grandes (environ 7 kb) et sont composées de répétitions d'éléments génétiques tels que les éléments X et Y' (Horowitz et al., 1984; Walmsley et al., 1984). Comme abordé dans le Chapitre I de cette introduction, des protéines telles que Rap1 ou les histones déacétylases de la famille des Sirtuines Sir2, Sir3 et Sir4 se lient aux télomères et instaurent un état chromatinien fermé (pour revue (Taddei and Gasser, 2012)). De plus, et en accord avec leur état chromatinien réprimé, les télomères sont répliqués en fin de phase S (Raghuraman et al., 2001).

L'organisation des télomères dans le noyau des cellules a été initialement sondée par FISH (Gotta et al., 1996), puis en cellules vivantes par le système FROS ((Bystricky et al., 2005), voir plus haut, Figure 24). Ces études ont révélé que les télomères s'organisaient en foyers, à la périphérie du noyau. En effet, alors que chaque cellule contient 32 télomères répartis sur 16 chromosomes, seule une dizaine de foyers télomériques est visible par FISH (Gotta et al., 1996). Chaque foyer contiendrait donc en moyenne trois télomères. Le regroupement des télomères au sein d'un foyer n'est pas aléatoire : les télomères des bras courts (<300 kb) des chromosomes ont tendance à se regrouper entre eux, à proximité du SPB alors que les télomères des bras longs (>300 kb) sont plus fréquemment associés, à distance du SPB (Therizols et al., 2010). Ainsi le centromère et les télomères de chaque chromosome sont ancrés à l'enveloppe nucléaire. L'ancrage des télomères à l'enveloppe est un mécanisme complexe qui dépend du cycle cellulaire et qui fait intervenir de nombreux acteurs protéiques. Par exemple, la protéine Sir4 semble être associée à la protéine membranaire Esc1 au cours des phases G1 et S alors que les interactions entre la protéine membranaire Mps3 et Sir4 et entre Mps3 et la sous-unité de la télomérase Est1 semblent être spécifiques de la phase S (pour revue (Taddei and Gasser, 2012), Figure 39 encart vert).

iii. Le nucléole

Un dernier élément architectural du noyau de levure est le nucléole. Ce corps nucléaire, non délimité du nucléoplasme par une membrane, a une forme caractéristique de croissant. Il est situé à la périphérie du noyau, diamétralement opposé au SPB ((Bystricky et al., 2005; Yang et al., 1989),

Figure 39) et occupe un tiers du volume nucléaire (Uchida et al., 2011). Le nucléole est le site de la biogénèse des ribosomes (voir plus bas). De par sa forte concentration en acides nucléiques et en protéines le nucléole apparaît dense aux électrons après coloration aux métaux lourds et visualisation en microscopie électronique. Il a ainsi été montré que le nucléole était formé de trois sous-compartiments : le centre fibrillaire (FC), le composant fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (GC) ((Schwarzacher and Wachtler, 1991), Figure 8c). Chez les métazoaires, le FC serait un lieu de stockage pour des facteurs protéiques tels que la Pol I et pour les gènes d'ADN ribosomique (ADNr). La transcription de ces derniers aurait lieu à l'interface entre le FC et DFC. Les premières étapes de maturation des ARN ribosomiques (ARNr) se feraient dans le DFC alors que le GC contiendrait des particules plus matures. Alors que le DFC et le GC sont clairement visualisables dans des coupes de nucléole de *S. cerevisiae* observées en MET, la présence du FC dans cet organisme est matière à débat. Les FC ont pu être observés chez *S. cerevisiae* (Léger-Silvestre et al., 1999) cependant leur détection n'est pas aussi aisée que dans les cellules de mammifères et elle semble dépendre du fond génétique de la cellule observée. Cela a conduit à définir une structure bipartite du nucléole dans cet organisme, comprenant d'une part le GC et d'autre part le FC/DFC (Thiry and Lafontaine, 2005).

Depuis la découverte de ce corps nucléaire isolé du reste de la chromatine, de nombreux laboratoires ont cherché à comprendre quel était le mécanisme de formation du nucléole. Il est apparu que la morphologie du nucléole corrélait avec le niveau de transcription par la Pol I. En effet, lorsque cette dernière est inhibée le nucléole des cellules de levures apparaît compacté et son volume est réduit (Mostofa et al., 2018; Tsang et al., 2003). Au contraire, le nucléole semble occuper un volume plus important dans les cellules cancéreuses où la biogénèse des ribosomes est stimulée (Drygin et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que certaines protéines impliquées dans la maturation des ARNr montraient des propriétés de séparation de phase ((Feric et al., 2016), Figure 33b). Cela pourrait expliquer pourquoi le nucléole forme un corps nucléaire qui n'interagit que peu avec le reste de la chromatine.

Dans les cellules de mammifères, certaines séquences chromatiniennes interagissent avec la périphérie du nucléole. Ces séquences ont été nommées NADs pour « *Nucleolar-Associated Regions* » ; elles sont réprimées transcriptionnellement et pauvres en gènes (van Koningsbruggen et al., 2010; Németh et al., 2010; Quinodoz et al., 2018). Chez *S. cerevisiae*, le nucléole contribue également à l'organisation des chromosomes puisqu'il a été montré que certains gènes transcrits

par l'ARN polymérase III (Pol III) étaient préférentiellement recrutés à l'interface entre le nucléole et le nucléoplasme lors de leur transcription (Belagal et al., 2016).

iv. L'enveloppe et les pores nucléaires

En plus des trois éléments cités ci-dessus, l'enveloppe et les pores nucléaires influencent également le positionnement des chromosomes au sein du noyau. L'enveloppe nucléaire est constituée d'une double bicouche lipidique. Sa membrane externe, en continuité avec le réticulum endoplasmique, est en contact avec le cytoplasme alors que sa membrane interne fait face à l'intérieur du noyau. Les deux membranes sont séparées par un espace inter-membranaire mais fusionnent localement au niveau des pores nucléaires (pour revue (Taddei and Gasser, 2012)). Les pores nucléaires ou NPC (pour « *Nuclear Pore Complexes* ») sont des complexes protéiques de 50 MDa composés de 30 protéines différentes (les nucléoporines), toutes présentes dans le complexe selon un multiple de 8 (Kim et al., 2018; Rout et al., 2000). Chaque NPC est composé d'un anneau central et de deux anneaux, un externe et un interne d'où émanent des filaments protéiques flexibles, en direction du cytoplasme et du noyau respectivement (Alber et al., 2007). La fonction première des NPCs est de permettre le transport et l'échange entre le cytoplasme et le noyau des ARNs et des protéines. La face nucléaire des NPCs peut également s'associer avec la chromatine active en transcription ((Casolari et al., 2004), Figure 39 encart orange). Cette association stimulerait la transcription des gènes et permettrait de faciliter l'export des ARN messagers produits vers le cytoplasme ((Blobel, 1985) pour revue (Dieppois and Stutz, 2010)). Ce type d'interaction a notamment été observé lors de l'activation des gènes Gal : l'ajout de galactose dans le milieu a provoqué l'activation de la transcription de ces gènes et leur relocalisation à proximité des NPCs (Cabal et al., 2006; Taddei et al., 2006). Cependant la relocalisation des gènes aux NPCs n'est pas requise pour leur transcription et tous les gènes n'y sont pas recrutés lors de leur activation (Cabal et al., 2006).

En revanche, l'enveloppe nucléaire située à distance des NPCs représente un environnement répressif pour la transcription. En effet, la mise en silence d'un gène rapporteur induit sa relocalisation en périphérie du noyau et l'abolition de l'interaction entre les télomères et l'enveloppe nucléaire provoque l'activation de la transcription des gènes présents dans les séquences sub-télomériques ((Andrulis et al., 1998; Feuerbach et al., 2002), Figure 39 encart orange)

Les chromosomes de levure sont donc organisés autour d'éléments architecturaux que sont le SPB, le nucléole, les NPCs et l'enveloppe nucléaire. Mais qu'en est-il de l'organisation intramoléculaire de chaque chromosome ? Peut-on observer un repliement en TADs chez la levure ?

b. Les repliements intra-chromosomiques

i. Chez *S. cerevisiae*

Après l'étude de Dekker de l'organisation du chromosome III par technique de 3C (Dekker et al., 2002), l'organisation 3D de l'intégralité du génome de la levure *S. cerevisiae* a été sondée par une méthode dérivée du 4C par Duan et ses collaborateurs en 2010. Les cartes générées ont montré un enrichissement de contacts entre les centromères, entre les télomères et suggèrent le regroupement des gènes codant les ARN de transfert transcrits par la Pol III (Duan et al., 2010). Elles récapitulent donc les différentes caractéristiques attendues pour le génome de levure. De plus la fréquence accrue des contacts intra-chromosomiques par rapport aux contacts inter-chromosomiques a confirmé l'existence de territoires chromosomiques chez la levure (Lorenz et al., 2002). En revanche, l'inspection des contacts intra-chromosomiques le long de la diagonale n'a pas révélé la présence de domaines d'association comparables aux TADs visualisables sur les cartes des cellules de mammifères. Cette première étude a donc conclu que les chromosomes de *S. cerevisiae* n'adoptaient pas de conformation spécifique dans le noyau des cellules.

Quelques années plus tard, le laboratoire de Skotheim a ré-analysé les données générées par Duan *et al.* en calculant pour chaque séquence d'ADN son « score de couverture » défini comme le nombre d'interactions intra-chromosomiques contenant cette séquence. Une séquence à la frontière d'un TAD devrait avoir un score de couverture faible (cette séquence établie peu de contacts avec le reste du génome) alors qu'une séquence à l'intérieur d'un TADs devrait avoir un score de couverture plus important. Cette analyse a dévoilé la présence de domaines d'interactions le long des bras des chromosomes, que les auteurs comparent aux TADs présents chez les mammifères (Eser et al., 2017). Ces TADs mesurent environ 200 kb et sont donc du même ordre de grandeur que ceux analysés chez la drosophile (Sexton et al., 2012). Les séquences insultrices correspondent à des régions chromatiniennes ouvertes, enrichies en Pol II et en marques d'histones spécifiques de la chromatine active telle que H3K4me3. Elles ne sont cependant pas significativement corrélées avec les pics d'accumulation des cohésines. Les auteurs ont ensuite

recherché quelle pourrait être la fonction des TADs chez la levure. Aucun lien avec l'état transcriptionnel des gènes n'a été décelé ; cependant les gènes regroupés dans un même TAD semblent être répliqués dans la même fenêtre temporelle (Eser et al., 2017). Les auteurs ont donc conclu à l'existence de TADs de 200 kb chez la levure, en lien avec la réplication.

L'analyse de l'organisation du génome de levure par Micro-C a également dévoilé la présence de domaines d'associations chez *S. cerevisiae* (Hsieh et al., 2015). Comme mentionné plus haut, la technique de Micro-C consiste à fragmenter le génome par la nucléase micrococciale, clivant l'ADN non protégé. Les cartes de contacts ainsi obtenues ont une résolution de l'ordre du nucléosome, soit de 150 pb environ. Les domaines d'associations mis en évidence dans cette étude ont une taille variant entre 2 et 10 kb et comprennent entre 2 et 5 gènes. Les séquences insultrices correspondent à des séquences ouvertes telles que des séquences promotrices enrichies en marques d'histones H3K18ac. Les auteurs identifient également que les cohésines sont accumulées à ces séquences (Hsieh et al., 2015).

Enfin, les laboratoires de Koszul et Baxter ont utilisé la technique de Hi-C afin d'étudier l'organisation du génome de levure au cours du cycle cellulaire (Lazar-Stefanita et al., 2017). Aucune de ces deux études n'a rapporté la présence de TADs ou de domaines d'interactions dans cet organisme. Cependant, elles ont pu mettre en évidence une réorganisation des chromosomes entre la phase G1 et la mitose. Les contacts intra-chromosomiques et les contacts centromère-centromère semblent plus fréquents en mitose qu'en phase G1. Au contraire les contacts inter-chromosomiques semblent accrus en début de cycle. Ainsi les interactions entre les chromosomes sont réduites en mitose, suggérant leur individualisation à cette étape du cycle. De plus, la réorganisation des bras chromosomiques semble dépendre des cohésines. En effet, en absence de la sous-unité Scc1 les cartes de contacts ne traduisent pas d'individualisation des chromosomes en mitose mais suggèrent qu'ils conservent une organisation proche de celle observée en G1 (le ratio contacts intra-chromosomiques/contacts inter-chromosomiques n'est pas augmenté en mitose). Par ailleurs, les condensines ne semblent que très peu impliquées dans la compaction des chromosomes mitotiques de la levure *S. cerevisiae* contrairement à ceux des cellules de mammifères (voir plus haut). La déplétion de la sous-unité Smc2 des condensines ne conduit pas à la désorganisation des chromosomes mitotiques. En fait, les condensines semblent avoir un rôle lors de l'anaphase pour renforcer le regroupement des centromères et pour permettre le rapprochement de l'ADNr du

centromère du chromosome XII (Lazar-Stefanita et al., 2017). Même si on peut penser que ce rapprochement spatial permette de faciliter la ségrégation de l'ADNr, sa fonction n'est pas connue.

En conclusion, chez la levure *S. cerevisiae* la compaction des chromosomes mitotiques est assurée principalement par les cohésines. Les condensines semblent avoir un rôle limité aux centromères et à l'ADNr. De plus la présence de TAD/domaines d'associations est toujours controversée dans cet organisme et lorsqu'ils sont décrits leur taille est différente de celle des TADs observés chez les mammifères.

ii. Chez *S. pombe*

Comme nous avons pu l'évoquer en préambule, *S. cerevisiae* et *S. pombe* sont deux espèces de levures relativement divergentes. Il faut noter quelques différences, pertinentes pour notre étude, entre ces deux organismes. Tout d'abord, les cohésines sont recrutées sur les chromosomes dès le début de la phase G1 chez *S. pombe* (Bernard et al., 2008). De plus il a été décrit dans cet organisme, la présence d'hétérochromatine comparable à celle observée chez les mammifères. Ceci est notamment expliqué par la présence d'un homologue à la protéine HP1 de *D. melanogaster* et de la marque histone H3K9me3 (Cam et al., 2005). Enfin, concernant le cycle cellulaire, la phase G2 peut être dissociée de la mitose chez *S. pombe* et elle représente en temps plus de la moitié du cycle (Tanizawa et al., 2017).

L'organisation des chromosomes de *S. pombe*, comme celle de *S. cerevisiae*, s'articule autour des centromères regroupés à la périphérie du noyau par le SPB, des télomères ancrés à l'enveloppe nucléaire et le nucléole situé à l'opposé du SPB. Cependant, l'analyse des repliements intra-chromosomiques chez *S. pombe* a révélé la présence de domaines d'interactions, appelés globules dans une première étude, le long de la diagonale des cartes de contacts de Hi-C (Mizuguchi et al., 2014; Tanizawa et al., 2017). Ces globules ont une taille d'environ 50 kb et leur formation dépend des cohésines. Ils sont détectables tout au long de l'interphase, même en phase G1. L'étude de l'organisation des chromosomes de *S. pombe* au cours du cycle cellulaire a révélé un deuxième type de repliement des chromosomes lors de la mitose (Kakui et al., 2017; Tanizawa et al., 2017) : des domaines de taille supérieure, de l'ordre du mégabase, dépendants des condensines. Ces deux types de domaines d'interactions semblent mutuellement exclusifs, *i.e.* ceux dépendants des cohésines ne sont présents qu'en phases G1, S et début de mitose alors que ceux dépendants des

condensines ne sont détectables qu'en fin de G2 et mitose (Tanizawa et al., 2017). De plus, la déplétion des condensines n'affecte pas la formation des globules dépendants des cohésines et *vice versa* (Tanizawa et al., 2017). L'hétérochromatine semble également impacter l'organisation des chromosomes chez *S. pombe* (Mizuguchi et al., 2014). En effet, l'invalidation de la méthyltransférase établissant la marque répressive d'histones H3K9me3 conduit à la perte du regroupement des séquences centromériques et télomériques qui interagissent alors plus fréquemment avec les bras des chromosomes.

Ainsi l'organisation du génome de *S. pombe* semble partager plus de caractéristiques avec celle des cellules de mammifères que celle de *S. cerevisiae* (présence de domaines d'association en G1, compaction des chromosomes par les condensines en mitose). Cependant un dérivé de la technique de Micro-C a révélé la présence chez *S. pombe* de domaines d'associations comprenant de 1 à 5 gènes, comparables à ceux détectés par la même technique chez *S. cerevisiae* (Hsieh et al., 2016). De plus, la protéine CTCF n'est pas encodée par le génome de *S. pombe* (Acemel et al., 2017). Le mécanisme de formation des globules dépendant des cohésines doit donc être sensiblement différent dans les cellules de mammifères et dans cet organisme. En effet, d'après une étude *in silico*, en absence de barrières établies par CTCF, la seule action des cohésines ne suffit pas à établir des domaines d'association topologiques le long des bras des chromosomes (Benedetti et al., 2017). Cette étude propose que la formation des super-enroulements induits par la transcription des gènes soit à l'origine de la formation des globules (Benedetti et al., 2017).

c. L'ADN ribosomique

A ce point du manuscrit, nous avons abordé les repliements de la fibre de chromatine à différentes phases du cycle cellulaire et dans divers organismes modèles. La majorité des données présentées ont été obtenues par les C-techniques et par conséquent, par des approches basées sur le séquençage massif de l'ADN. Néanmoins, comme nous l'avons précisé lors de la description de ces techniques, elles ne permettent pas de sonder l'organisation des séquences répétées qui peuvent représenter jusqu'à deux tiers du génome humain (de Koning et al., 2011). Les C-techniques ne sont donc pas suffisantes pour explorer l'organisation de l'ensemble du génome. Une de ces séquences répétées, l'ADN ribosomique (ADNr), représente la région la plus transcrite du génome et son intégrité est essentielle à la survie cellulaire. Son organisation peut être aisément étudiée par microscopie à fluorescence (de par sa nature répétée) et elle est régulée à la fois par les cohésines

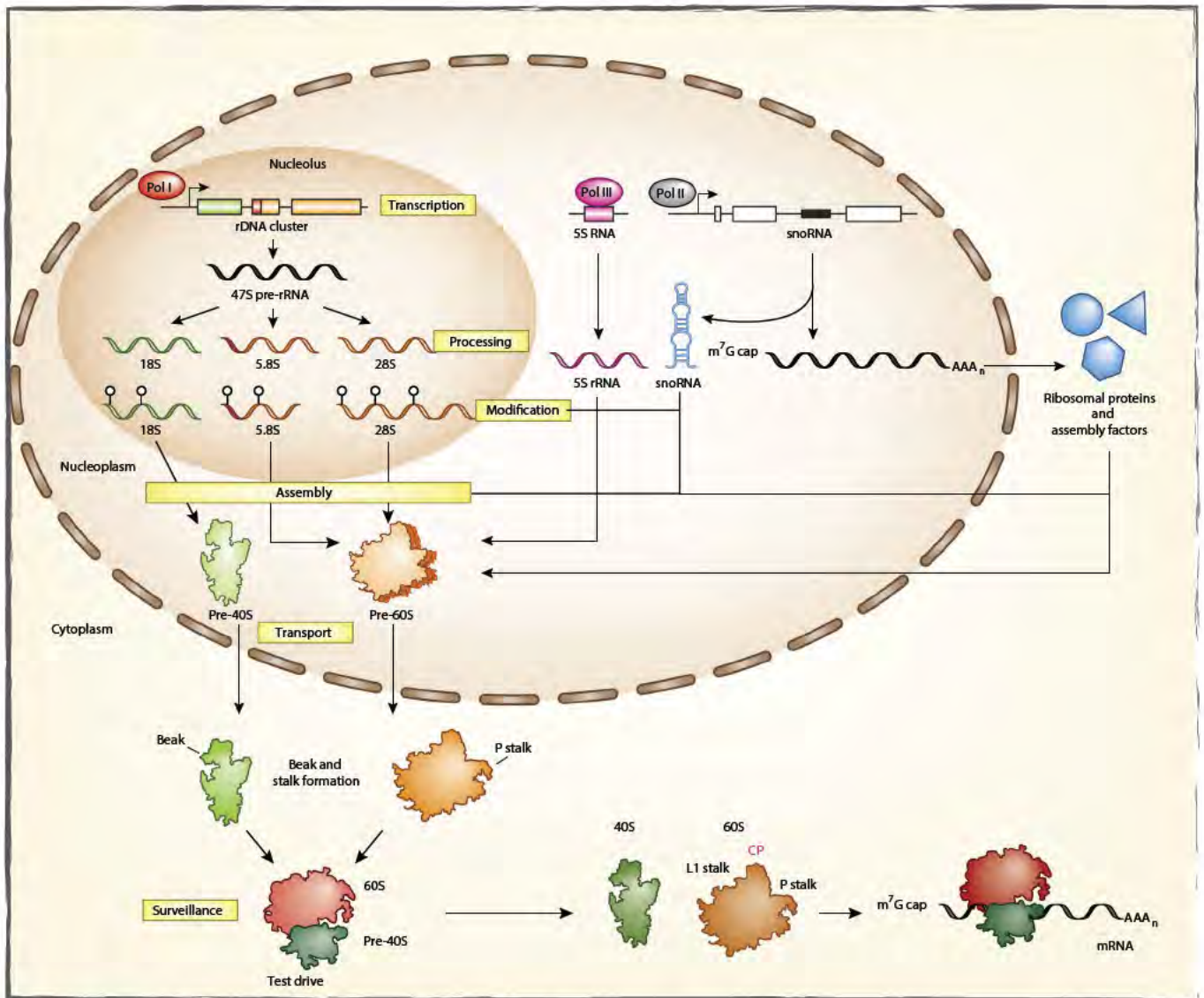


Figure 40 : Schéma de la biogénèse des ribosomes. Le long ARNr précurseur 47S (35S chez *S. cerevisiae*) est synthétisé par la Pol I. Il est ensuite clivé, mûri en trois ARNs 28S (25S chez *S. cerevisiae*), 18S et 5,8S qui sont ensuite assemblés avec des protéines ribosomiques afin de former les particules ribosomiques matures dans le cytoplasme (Lafontaine, 2015).

et par les condensines (Freeman et al., 2000; Guacci et al., 1994) : cela fait de l'ADNr un locus particulièrement attrayant pour notre étude. Dans la dernière partie de cette introduction nous allons d'abord décrire l'architecture de l'ADNr puis nous aborderons le rôle des SMCs sur l'organisation de cette séquence.

i. Aperçu de la biogénèse des ribosomes

Chaque minute, une cellule de levure *S. cerevisiae* produit environ 2 000 ribosomes (Warner, 1999). Ce processus, appelé biogénèse des ribosomes, nécessite l'activité des trois ARN polymérases nucléaires et fait intervenir plus de 200 facteurs de maturation différents. C'est donc un processus énergivore pour la cellule qui a lieu dans un corps nucléaire dédié, le nucléole (voir plus haut). La transcription de l'ADNr par la Pol I est considérée comme la première étape de la biogénèse des ribosomes. Brièvement, la polymérase synthétise un long ARN précurseur 37S (S pour l'unité de sédimentation Svedberg) clivé co-transcriptionnellement par l'endonucléase Rnt1, générant ainsi le transcrit 35S (47S chez les mammifères (Kufel et al., 1999)). Ce transcrit 35S est ensuite mûré par une succession de clivages endonucléolytiques et exonucléolitiques. Certaines bases sont également modifiées par des pseudo-uridylation et des 2'-O-méthylations guidés par de petits ARN non codants, les ARNsno. Une fois mûré, le 35S donne naissance aux trois ARNr non codants constituant le ribosome mature : le 25S (28S chez les mammifères), le 18S et le 5,8S. Un quatrième ARNr, le 5S, est produit séparément par la Pol III. Au cours de nombreuses étapes de maturation, l'ARNr 18S est assemblé avec 33 protéines ribosomiques afin de former la petite sous-unité du ribosome et les ARNr 25S, 5,8S et 5S sont assemblés avec 46 protéines ribosomiques pour former la grande sous-unité du ribosome. Les dernières étapes de maturation ainsi que l'assemblage des particules ribosomiques se font dans le cytoplasme où les ribosomes fonctionnels peuvent alors initier la traduction des ARN messagers en protéines (Figure 40, pour revue (Lafontaine, 2015)).

ii. Architecture de l'ADNr

Dans les cellules humaines, les répétitions d'ADNr sont réparties sur les cinq chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21, 22) et forment des loci appelés NORs (pour « *Nucleolar Organizing Regions* ») apparaissant comme des constriction secondaires sur les chromosomes métaphasiques (les premières étant les centromères) (Henderson et al., 1972). On compte entre 200 et 300 copies

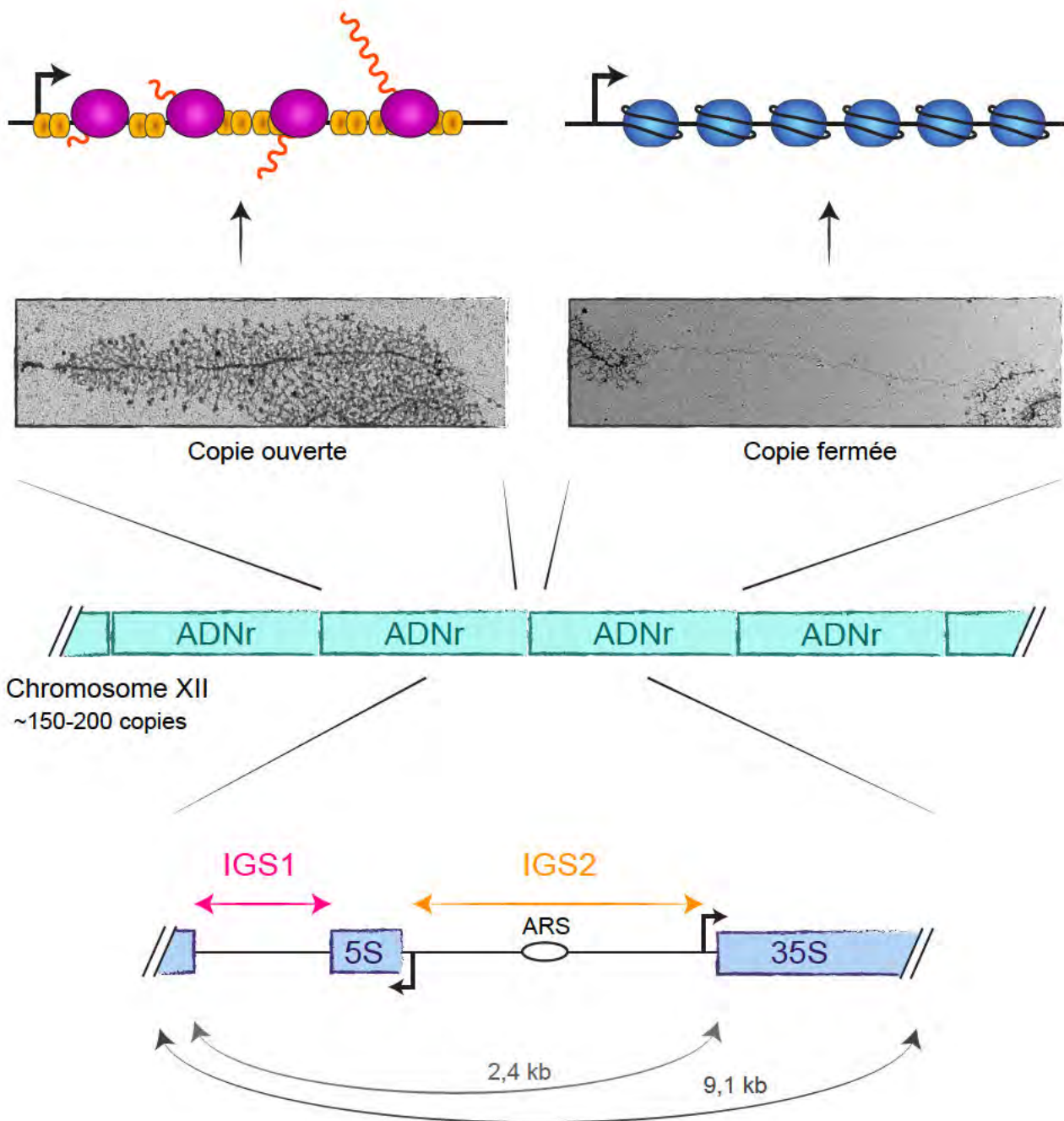


Figure 41 : Le locus d'ADNr chez *S. cerevisiae*. Le locus d'ADNr se compose de 150 à 200 copies répétées en tandem (milieu). Chaque copie comprend les séquences codant le 35S, le 5S et deux séquences intergéniques IGS1 et IGS2 (bas). Les copies d'ADNr peuvent être dans un état chromatinien ouvert, enrichies en Pol I en cours de transcription (cercles roses) et Hmo1 (cercles oranges) ou dans un état chromatinien fermé, elles sont alors nucléosomales (cercles bleus) (haut). Les images de MET sont adaptées de (Albert et al., 2012).

d'ADNr par génome haploïde (pour revue (Bersaglieri and Santoro, 2019)). Ces copies de 43-45 kb sont réparties non équitablement sur les cinq NORs dont la taille peut varier entre 50 kb et 6 Mb (pour revue (Mangan et al., 2017)). Chez *S. cerevisiae*, l'ADNr se compose d'une répétition en tandem de 150-200 copies, toutes regroupées au niveau d'un locus unique sur le chromosome XII (Figure 41 milieu). Toutes les copies partagent une architecture commune : elles mesurent 9,1 kb et comprennent la séquence codant le 35S (RDN37 - 6,7 kb) et une séquence dite intergénique (IGS pour « *InterGenic Spacer* » - 2,4 kb) incluant le gène codant l'ARN 5S (RDN5). La position génomique des gènes codant l'ARN 5S au sein du locus d'ADNr est une particularité du génome de *S. cerevisiae*, car dans la plupart des organismes tels que *S. pombe* ou dans les cellules de mammifères, l'ARN 5S est synthétisé dans le nucléoplasme à partir d'un gène positionné sur un locus différent du 35S et est ensuite importé dans le nucléole afin d'être incorporé dans les particules ribosomiques en cours d'assemblage (Haeusler and Engelke, 2006). Dans le cas de la levure à bourgeon, on distingue alors deux sous-régions dans la séquence intergénique : l'IGS1 et l'IGS2 de part et d'autre du 5S (Figure 41). L'IGS1 est localisée entre le terminateur du gène codant le 35S et le gène codant l'ARN 5S. Elle comprend un gène « E-pro » impliqué dans la régulation du nombre de copies d'ADNr (voir plus bas). La séquence IGS2 est située entre le 5S et le site d'initiation de la transcription par la Pol I. Elle contient en plus du promoteur du 35S, une origine de réplication (appelée ARS pour « *Autonomously Replicating Sequence* ») (Figure 41 bas).

Même si la séquence des copies d'ADNr est identique (aux polymorphismes près), ces copies ne sont pas toutes dans le même état chromatinien. En effet, dans une cellule en phase exponentielle de croissance, on compte environ 50% de copies transcrites par la Pol I, dites ouvertes et 50% de copies non transcrites dites fermées (Conconi et al., 1989). Ces deux types de copies sont aisément distinguables par MET après étalement de la chromatine (technique de « *Miller spread* » ou « arbre de Noël », (Miller and Beatty, 1969)). Les copies actives sont chargées en ARN polymérase et en ARN en cours d'élongation (donnant la forme caractéristique d'arbres de Noël) alors que les copies fermées sont dénuées de protéines, à l'exception de quelques nucléosomes persistant sur la fibre après l'étalement de la chromatine (Figure 41 haut). On peut noter que des structures assimilables aux nucléosomes ne sont pas observables par MET sur les copies actives d'ADNr. En adéquation avec ce résultat, il a été montré que les copies fermées étaient enrichies en nucléosomes alors que les copies ouvertes en seraient dépourvues (Merz et al., 2008). En revanche, les copies ouvertes sont associées avec une petite protéine de la famille des HMGB, Hmo1 ((Merz

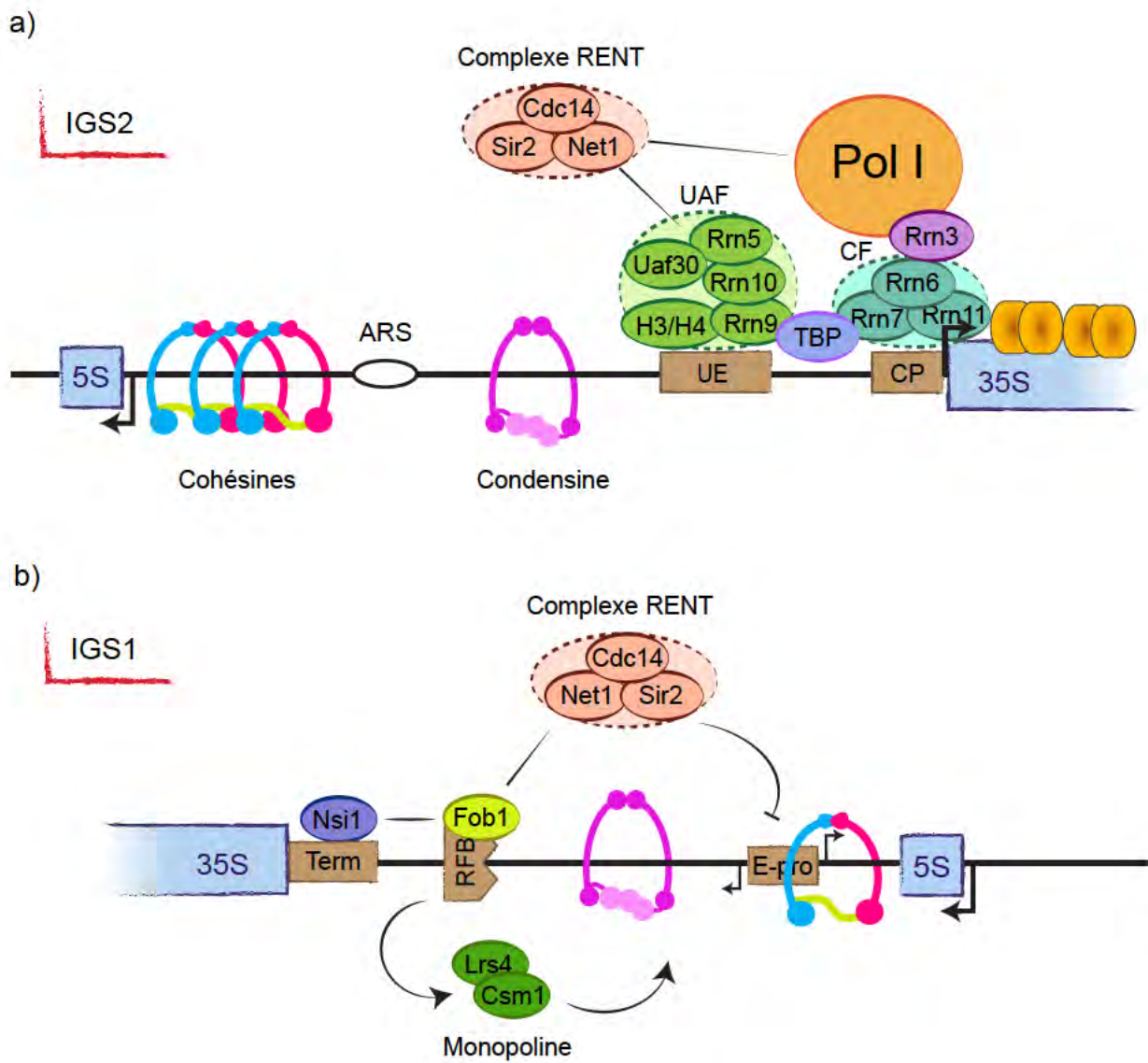


Figure 42 : Protéines enrichies aux séquences IGS1 et IGS2. a) Sont recrutées à l'IGS2 la machinerie de transcription Pol I, le complexe RENT, les cohésines et les condensines. b) L'IGS1 comprend Nsi1, Fob1, les monoplines, le complexe RENT et les cohésines dans une moindre mesure.

et al., 2008), voir Chapitre I). Hmo1 se lie sur la séquence codante du 35S et aurait un rôle dans la stimulation de la transcription par la Pol I (Gadal et al., 2002; Hall et al., 2006). De plus, lorsque fixée sur l'ADN, Hmo1 semble maintenir un état chromatinien ouvert (Wittner et al., 2011). Alors que son mécanisme d'action n'est pas connu, on peut suggérer que pareillement à son homologue humain UBF1, Hmo1 joue un rôle architectural dans l'organisation de l'ADNr, vraisemblablement par la formation de structures d'ADN proches de celles formées par les nucléosomes mais favorables à la transcription par la Pol I ((Albert et al., 2013; Stefanovsky et al., 2001) pour revue (Hamperl et al., 2013)).

De nombreuses protéines se fixent sur les séquences intergéniques de l'ADNr afin de réguler la stabilité de l'ADNr, l'organisation de la fibre dans l'espace et bien sûr la transcription par la Pol I mais également par la Pol II (Figure 42a). Le complexe d'initiation de la Pol I est constitué d'une part de l'*Upstream Activating Factor* (UAF, comprenant les sous-unités Uaf30, Rrn5, Rrn9, Rrn10 et les histones H3 et H4) et d'autre part du Core Factor (CF, composé des sous-unités Rrn6, Rrn7 et Rrn11) (pour revue (Griesenbeck et al., 2017)). Afin de permettre la transcription par la Pol I, le complexe UAF se lie sur la séquence promotrice UAS (« *Upstream Activating Sequence* », des nucléotides -148 à -50 du point +1 de transcription) et recrute, par son association avec le facteur TBP (« *TATA Binding Protein* »), le CF (Figure 42a). Ce dernier reconnaît une séquence en aval de la séquence UAS, le CE (« *Core Element* ») situé entre les nucléotides -28 et +8 par rapport au point +1. Ces facteurs de transcription servent de plateforme au recrutement de la Pol I associée au facteur d'initiation Rrn3, générant ainsi le complexe de pré-initiation. La Pol I au sein de ce complexe est alors compétente et peut initier la synthèse du pré-35S. Lorsque la polymérase entre dans une phase productive d'élongation de la transcription, à quelque centaines de nucléotides du site +1 de transcription, le facteur Rrn3 est détaché de l'enzyme et est recyclé afin de permettre l'initiation de nouveaux cycles de transcription (Beckouet et al., 2008).

Le complexe RENT (« *REgulator of Nucleolar silencing and Telophase exit* ») est également accumulé sur la région promotrice du 35S (Huang and Moazed, 2003). Il comprend trois protéines aux rôles distincts : Net1, Sir2 et Cdc14 ((Shou et al., 1999), Figure 42). Net1 stimule la transcription par la Pol I, mais son mécanisme d'action n'est pas entièrement élucidé (Hannig et al., 2019; Shou et al., 2001). Sir2 est une histone déacétylase, responsable de la mise en silence de la transcription par la Pol II. Cette protéine fait également partie du complexe Sir (en association

avec Sir3 et Sir4) impliqué dans la répression de la transcription aux séquences télomériques (pour revue (Taddei and Gasser, 2012)). Enfin, Cdc14 est une protéine phosphatase décrite comme séquestrée dans le nucléole en interphase (Shou et al., 1999). Lors de l'anaphase, la phosphorylation de Net1 par le complexe MEN (« *Mitotic Exit Network* ») provoque le relargage de Cdc14 dans le noyau qui induit notamment l'activation du complexe APC, des condensines et la sortie de mitose (Shou et al., 2002). De nombreuses protéines sont également associées à l'IGS1. Tout d'abord, la protéine Nsi1 est considérée comme le facteur de terminaison de la transcription Pol I et est donc accumulée à l'extrémité 3' de la séquence codante du 35S ((Merkl et al., 2014; Reiter et al., 2012), pour revue (Németh et al., 2013), Figure 42b). En aval de cette séquence se fixe la protéine Fob1 qui joue un rôle majeur dans la régulation de la stabilité de l'ADNr. Fob1 (« *Fork blocking* ») se lie sur la séquence RFB (« *Replication Fork Barrier* ») et a été nommée ainsi en raison de sa capacité à bloquer la progression bidirectionnelle des fourches de réplication ((Brewer and Fangman, 1988; Kobayashi and Horiuchi, 1996; Linskens and Huberman, 1988), Figure 42b). En effet, la progression de la fourche de réplication provenant de l'unité de transcription du 35S en amont de Fob1 (fourche qui progresse dans le même sens que la transcription) n'est pas bloquée par la protéine. Au contraire, la fourche provenant de l'unité en aval de Fob1, qui est donc contraire au sens de transcription, est bloquée par la protéine (Kobayashi et al., 1992). On peut noter que le blocage de la fourche de réplication induit la formation d'une cassure double brin au site RFB (Weitao et al., 2003). Cette cassure serait réparée par recombinaison homologue avec la copie d'ADNr symétrique sur la chromatide sœur, maintenue à proximité par les cohésines (pour revue (Kobayashi, 2011)). Il est postulé que le blocage des fourches par Fob1 prévienne la collision entre les machineries de transcription et de réplication, qui pourrait à la fois nuire à la synthèse des ARNr et causer des dommages à l'ADN. De plus, Fob1 agit comme une plateforme de recrutement pour le complexe RENT (en plus de sa fixation sur les séquences promotrices) (Huang and Moazed, 2003) et pour les condensines ((Johzuka and Horiuchi, 2009), Figure 42b). Le recrutement des condensines s'effectue par l'intermédiaire du complexe monopoline (composé des sous-unités Csm1 et Lrs4) et est essentiel pour la compaction et la ségrégation de l'ADNr en mitose ((Johzuka and Horiuchi, 2009; Lavoie et al., 2004), voir plus bas). Le recrutement du complexe RENT (et plus particulièrement de Sir2 – voir plus haut) serait requis pour la mise en silence d'un promoteur bidirectionnel, appelé E-pro, présent à proximité du site RFB (Huang and Moazed, 2003). La répression de la transcription du E-pro est déterminante

pour la stabilité du nombre de copies d'ADNr (Kobayashi et al., 2004). En effet la perte de Sir2 en 3' du 35S provoque l'initiation de la transcription par la Pol II au promoteur E-pro, ce qui déplacerait les cohésines de cette séquence. La recombinaison de la cassure provoquée par le blocage de la fourche de réplication serait alors asymétrique sur la chromatide sœur, conduisant à la perte ou au gain de copies d'ADNr (Kobayashi, 2011). Ainsi, dans une population en phase exponentielle de croissance, le nombre de copies d'ADNr peut varier d'une cellule à l'autre. Il faut noter qu'en absence de Fob1, la formation de cassures d'ADN et donc la recombinaison de l'ADNr sont atténuées. En fait, la délétion du gène codant pour Fob1 provoque même la stabilisation du nombre de copies d'ADNr (Kobayashi et al., 1998). Ainsi des souches ayant un nombre stable de copies peuvent être propagées en absence Fob1 (Ide et al., 2010). De manière intéressante, une souche de levure ne comportant que 25 copies d'ADNr a ainsi pu être générée (Cioci et al., 2003). Elle est viable et ne présente pas de défauts de croissance notables. Dans cette souche, la totalité des copies est transcrite par la Pol I, qui est alors massivement recrutée sur les gènes d'ADNr (Cioci et al., 2003). En effet, l'analyse en MET de chromatine étalée selon la méthode de *Miller spread* a révélé la présence d'environ 120 polymérases par gènes dans cette souche, contre 60 dans une souche contrôle (Albert et al., 2011). Enfin, Fob1 a également été montré comme capable de dimérisation (Choudhury et al., 2015). L'interaction entre deux protéines Fob1 accumulées sur différentes copies d'ADNr pourrait favoriser la formation de boucles au sein de l'ADNr, entre les séquences IGS1.

Pour finir, les cohésines et les condensines sont également enrichies aux séquences d'ADNr (Figure 42). Comme mentionné plus haut, les condensines sont recrutées *via* les monoplines et Fob1 dans l'IGS1. Elles sont également accumulées au niveau des séquences promotrices du 35S dans l'IGS2 ; cependant leur mode de recrutement n'est pas élucidé (Johzuka and Horiuchi, 2009). Il pourrait impliquer la TBP (Iwasaki et al., 2015) mais également le facteur Rrn9, comme cela a été montré chez *S. pombe* (Nakazawa et al., 2008). Les cohésines sont enrichies dans l'IGS2, entre le promoteur du 35S et le 5S, au niveau d'une séquence dénommée CAR pour « *Cohesin Associated Region* » (Laloraya et al., 2000). Nous allons maintenant aborder comment ces deux complexes régulent l'organisation spatiale de l'ADNr.

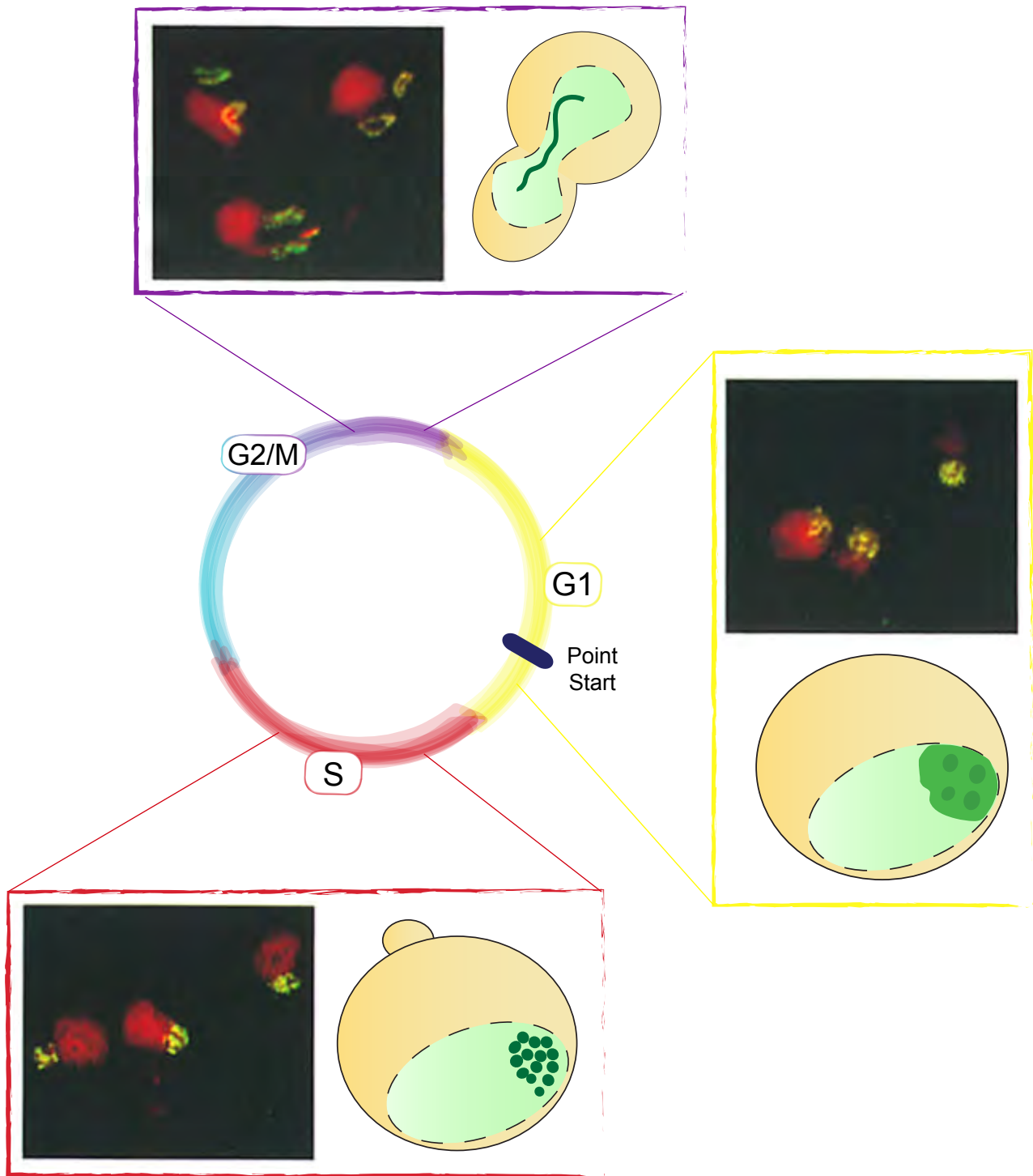


Figure 43 : Organisation de l'ADNr au cours du cycle cellulaire. L'ADNr adopte successivement des formes de «*puffs*», «*clusters*» (ou colliers de perle) et lignes au cours des phases G1, S et mitose respectivement. Images adaptées de (Guacci et al., 1994).

iii. Organisation au cours du cycle cellulaire par les SMCs

Depuis les années 90, de nombreux laboratoires ont tiré profit de la nature répétée de l'ADNr et ont étudié son organisation par FISH. Il est aujourd'hui établi que l'organisation de l'ADNr est régulée au cours du cycle cellulaire et qu'elle dépend notamment des cohésines et des condensines (Figure 43). Dans les cellules en phase G1, l'ADNr adopte une morphologie de « *puff* », c'est-à-dire qu'aucune organisation apparente n'est visualisable : il apparaît comme une masse uniforme. Lors de la phase S, le « *puff* » est réorganisé et forme des « *clusters* ». Il s'agit de petites masses distinctes au sein de l'ADNr qui ont également été décrites comme définissant un collier de perle ou « *necklace* ». Enfin, lors de l'entrée en mitose, l'ADNr est compacté et apparaît telle une ligne ou une boucle aisément identifiable sous le microscope (Guacci et al., 1994; Lavoie et al., 2004). Compte tenu de ces réorganisations importantes et facilement distinguables sous un microscope, *i.e.* un état décompacté en forme de « *puff* » et un état compacté en forme de ligne, l'ADNr est devenu un modèle permettant de sonder l'organisation et la compaction de l'ensemble des chromosomes dans différents contextes (Castano et al., 1996; D'Ambrosio et al., 2008a, 2008b; Freeman et al., 2000; Guacci et al., 1994, 1997; Lavoie et al., 2004; Lopez-Serra et al., 2013; Thattikota et al., 2018; Wang et al., 2016). Ainsi, il est apparu que les cohésines et les condensines sont impliquées dans la réorganisation et dans la compaction de l'ADNr en mitose (Freeman et al., 2000; Guacci et al., 1994, 1997; Hartman et al., 2000). En effet, en absence de l'un ou de l'autre de ces complexes, l'ADNr ne forme pas une ligne en mitose mais maintient une forme de « *puff* », soit un état décompacté. Un enjeu a donc été de comprendre le rôle respectif des cohésines et des condensines dans l'organisation de l'ADNr.

Afin de répondre à cette question, Lavoie et ses collaborateurs ont synchronisé une population de levure en G1 tout en invalidant soit les condensines, soit les cohésines. Les cellules ont été relâchées dans le cycle cellulaire puis de nouveau arrêtées en mitose en présence de Nocodazole. Enfin, les auteurs ont induit à cette étape du cycle l'expression du complexe SMC invalidé en G1 (Lavoie et al., 2002). Lors de l'expression des condensines en mitose, l'ADNr en « *puff* » a été réorganisé en une ligne mitotique. Les condensines ne semblent pas requises lors de la phase S pour compacter l'ADNr. Au contraire, l'expression des cohésines en mitose n'a pas conduit à la réorganisation de l'ADNr, maintenant une organisation en « *puff* ». Les auteurs ont conclu que les cohésines étaient requises lors de la phase S pour établir la compaction et la réorganisation de l'ADNr. Dans cette étude, les auteurs ont également invalidé simultanément les

cohésines et les condensines en G1 puis les ont exprimées en mitose. De manière intéressante, ils ont pu constater que l'ADNr se compactait sous forme d'une ligne dans ces conditions. Ainsi, il apparaît qu'en absence de condensines, les cohésines ne sont plus requises lors de la phase S pour établir la compaction de l'ADNr. Ces données suggèrent que les cohésines et les condensines ont des rôles distincts à l'ADNr et que les cohésines établissent d'abord une organisation de l'ADNr favorable à sa compaction par les condensines. Les auteurs ont également postulé qu'en absence de cohésines, l'activité des condensines serait dérégulée et induirait une réorganisation de l'ADNr ne permettant pas sa compaction lors de la réexpression des cohésines. Au contraire, lors de l'invalidation des condensines, l'ADNr serait décompacté mais maintiendrait une organisation sous-jacente dépendante des cohésines favorable à sa re-compaction ((Lavoie et al., 2002), voir Discussion). Par quels mécanismes les cohésines et les condensines permettent-elles la compaction de l'ADNr en mitose ?

A cause de la nature répétée de l'ADNr, il est difficile de mettre en évidence la formation de boucles intra-chromosomiques par les cohésines. En effet, la formation de ces boucles est étudiée majoritairement par Hi-C (ou techniques dérivées), technique non applicable au locus d'ADNr. En revanche, comme sur le reste du génome, la cohésine établit de la cohésion entre les chromatides sœurs (Sullivan and Uhlmann, 2003; Sullivan et al., 2004). Comme abordé précédemment, cette fonction est notamment requise pour la maintenance du nombre de copies de l'ADNr (pour revue (Kobayashi, 2011)). En utilisant une version modifiée de la sous-unité des cohésines Scc1 afin de la rendre clivable artificiellement par la protéase du virus du tabac (TEV, « *Tobacco Etch Virus* »), Sullivan et ses collaborateurs ont étudié l'effet du clivage précoce des cohésines. Ils ont pu mettre en évidence que le clivage de Scc1 en métaphase provoquait la dissociation des cohésines des chromosomes et la ségrégation de l'ensemble du génome, à l'exception de l'ADNr (Sullivan et al., 2004). Ainsi même en absence de cohésines, les deux loci d'ADNr présent sur les chromatides sœurs ne sont pas résolus et sont maintenus à proximité l'un de l'autre. Cela suggère l'existence d'une autre forme de cohésion au niveau de l'ADNr, qui serait indépendante des cohésines. Les condensines et la topoisomérase II sont requises afin de résoudre cette seconde forme de cohésion (D'Ambrosio et al., 2008a; Sullivan et al., 2004).

Les condensines (Figure 44a) sont enrichies sur les séquences d'ADNr mais également sur les centromères et sur les bras des chromosomes, aux sites de fixation du facteur de transcription de la Pol III, TFIIC (Bachelier-Bassi et al., 2008; D'Ambrosio et al., 2008b; Freeman et al., 2000;

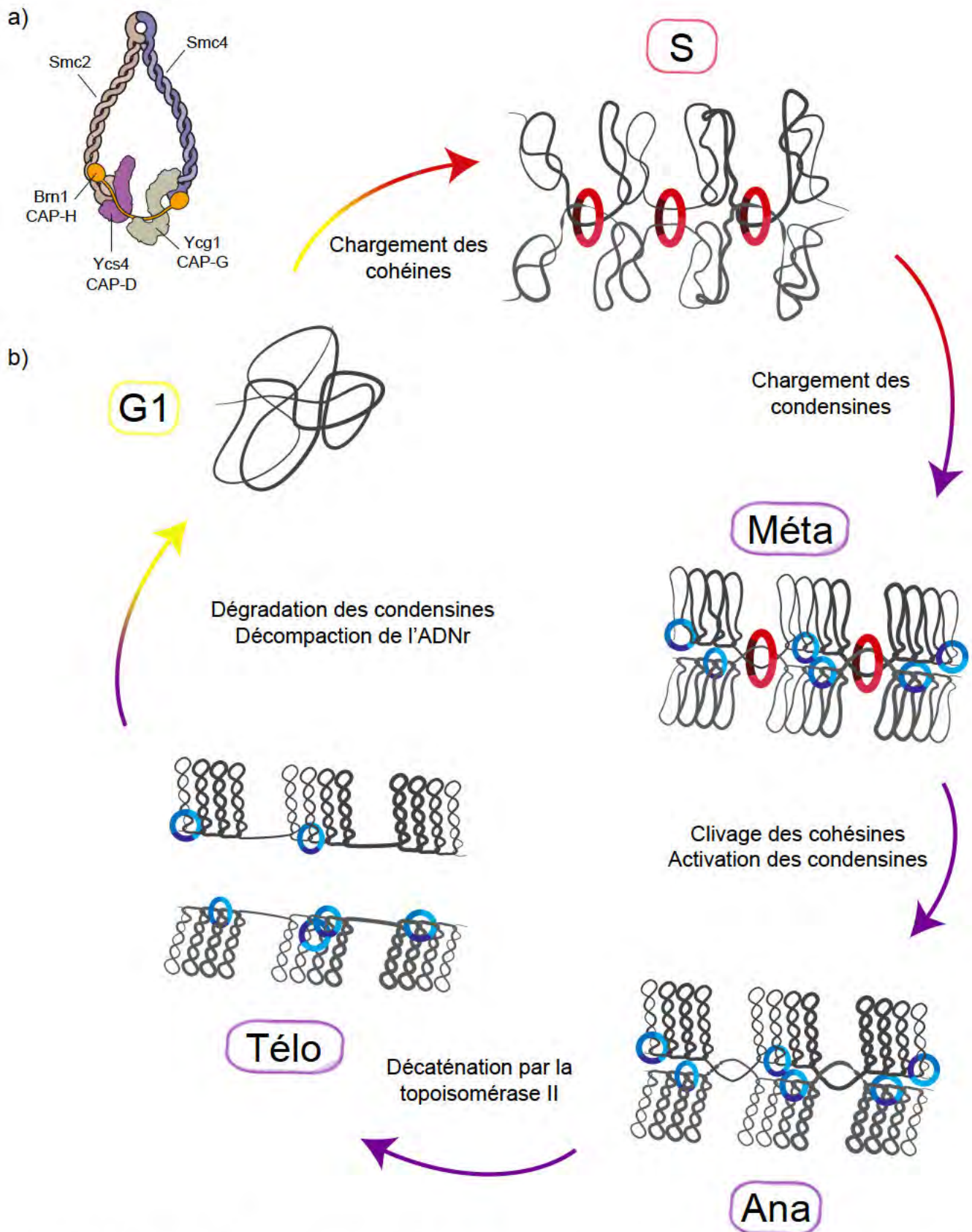


Figure 44 : Modèle de réorganisation de l'ADNr au cours du cycle cellulaire par les cohésines et les condensines. a) Schéma du complexe condensine. Le nom des sous-unités est indiqué pour la levure *S. cerevisiae* (haut) et pour les cellules de mammifères (bas). Adapté de (Wells et al., 2017). b) Modèle : les cohésines sont chargées en G1 et établissent la cohésion. Les condensines sont chargées pendant la mitose. En anaphase les cohésines sont clivées, les condensines sont activées et recrutent la topoisomérase II. Cette dernière résout les caténations entre les chromatides sœurs et décompacte les chromosomes en fin de mitose.

Leonard et al., 2015). Alors qu'elles sont associées à l'ADNr de la phase G1 à la mitose (Freeman et al., 2000), elles ne sont recrutées aux centromères qu'en début de mitose (Bachelier-Bassi et al., 2008; Leonard et al., 2015) puis déplacées sur les bras des chromosomes en fin de cycle (Leonard et al., 2015). L'expression de la sous-unité Ycg1 est régulée au cours du cycle cellulaire : minimale en G1, elle est maximale en mitose (Doughty et al., 2016). Ainsi, les condensines sont présentes sur les chromosomes en G1 mais l'essentiel de leur recrutement s'effectue en mitose. Après chargement sur l'ADN en mitose, la sous-unité Smc4 des condensines est phosphorylée par le couple mitotique CDK-cycline, Cdk1-Clb2 (Robellet et al., 2015). Cette phosphorylation, essentielle pour la viabilité cellulaire a pour fonction de stabiliser les condensines sur l'ADN (Robellet et al., 2015). Lors de l'anaphase, alors que le niveau de Cdk1 diminue dans la cellule dû à l'action du complexe APC, la polo kinase Cdc5 phosphoryle les sous-unités Brn1, Ycs4 et Ycg1 et induit l'hyper-phosphorylation des condensines (St-Pierre et al., 2009). De plus, la protéine Aurora B (également nommée Ipl1 chez *S. cerevisiae*) participe indirectement à cette phosphorylation (St-Pierre et al., 2009). L'hyper-phosphorylation des condensines conduit à leur « activation » ; elles initient alors la compaction des chromosomes en introduisant des super-enroulements positifs dans l'ADN (Leonard et al., 2015; Robellet et al., 2015; St-Pierre et al., 2009). Ces super-enroulements provoquent le recrutement de la topoisomérase II, qui induit la décaténation des chromatides sœurs et donc la résolution de la cohésion indépendante des cohésines (Baxter et al., 2011). On peut noter qu'en absence des condensines, la topoisomérase II n'est pas recrutée à l'ADN et ne peut induire la décaténation des chromatides sœurs (D'Ambrosio et al., 2008a; Leonard et al., 2015). Ainsi, les condensines permettent d'une part la compaction de l'ADNr en introduisant des super-enroulements positifs et d'autre part sa ségrégation en recrutant la topoisomérase II. On peut noter qu'Ipl1 pourrait également contribuer à la condensation de l'ADNr par la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 provoquant le recrutement d'histones déacétylases et la condensation de l'ADN (Neurohr et al., 2011; Wilkins et al., 2014). Une fois l'ADNr ségrégué dans les deux cellules filles, les sous-unités des condensines Brn1 et Ycs4 sont ubiquitinylées par Cdc48 et dégradées (Thattikota et al., 2018). La dissociation des condensines de l'ADN et le relâchement des super-enroulements positifs par la topoisomérase II conduisent à la décompaction de l'ADN (Baxter et al., 2011; Thattikota et al., 2018).

Pour résumer l'action des SMC sur l'ADNr (Figure 44b) : les cohésines établissent la cohésion des chromatides sœurs lors de la phase S et contribuent à la réorganisation de l'ADNr.

Les cohésines sont clivées en métaphase par la séparase, ce qui déclenche l'entrée en anaphase. Les condensines sont alors hyper-phosphorylées et compactent l'ADNr. Elles recrutent également la topoisomérase II qui permet la ségrégation de l'ADNr dans les deux cellules filles. Alors qu'il semblerait à première vue que les deux complexes SMC soient régulés par différents mécanismes, leur action est en fait étroitement liée. En effet, la séparase en plus d'induire le clivage protéolytique de Scc1, induit la phosphorylation de Net1 et le relargage de Cdc14 dans le nucléoplasme (Sullivan and Uhlmann, 2003; Sullivan et al., 2004), provoquant l'activation de Cdc5 et l'hyper-phosphorylation des condensines (Sullivan et al., 2004; Wang et al., 2004). Ainsi, la séparase participe à l'activation des condensines et donc à la résolution de la cohésion indépendante des cohésines. Conformément à ce modèle, la ségrégation de l'ADNr en mitose peut être déclenchée indépendamment de l'activité de la séparase en clivant les cohésines avec la TEV et en surexprimant Cdc14 en métaphase (Sullivan et al., 2004).

En conclusion, la compaction et la ségrégation de l'ADNr sont établies grâce à l'action distincte mais complémentaire des cohésines et des condensines. Certaines questions restent néanmoins en suspens concernant le mode d'action de ces deux complexes. Il serait intéressant d'étudier le mécanisme d'action des condensines et notamment de comprendre les liens existant entre la compaction de l'ADN par les condensines *via* la formation de boucles de chromatine et *via* l'introduction des superenroulements positifs. Selon une étude récente, l'hydrolyse d'ATP serait requise pour la compaction de l'ADNr par les condensines (Thadani et al., 2018). Par ailleurs, il serait également opportun d'analyser si les cohésines sont impliquées dans la formation de boucles intra-chromosomiques à l'ADNr.

RESULTATS

Chapitre I : La cohésine organise les chromosomes

A. Préambule

Des études récentes ont montré, par la technique de Hi-C, que le génome de la levure *S. cerevisiae* était réorganisé lors de la phase S : les chromosomes s'individualisent, ce qui est caractérisé par l'augmentation des interactions intra-chromosomiques, au détriment des interactions inter-chromosomiques (Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017) Cette réorganisation est dépendante des cohésines, cependant leur mécanisme d'action reste à ce jour mal compris. Même s'il est établi que de nombreuses protéines comme Wpl1, Pds5, Eco1 ou Scc3 régulent le chargement, la stabilité ou la dissociation des cohésines de l'ADN, leur contribution à l'organisation du génome n'est pas déterminée.

Dans cette étude nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes les cohésines et plus particulièrement leurs protéines régulatrices citées ci-dessus, régissaient l'organisation spatiale des chromosomes. Cette dernière a été sondée par technique de Hi-C, en utilisant comme modèle d'étude la levure à bourgeon *S. cerevisiae*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Romain Koszul (Institut Pasteur, Paris), renommée pour la maîtrise de la technique de Hi-C (Cournac et al., 2012; Lazar-Stefanita et al., 2017; Muller et al., 2018). Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que lorsqu'elles sont chargées sur l'ADN, les cohésines induisent la formation de multiples boucles de chromatine. Comme détaillé dans le Chapitre IV de l'introduction, ces boucles seraient vraisemblablement formées suite à la translocation des cohésines sur l'ADN. Puis, nous avons montré que Pds5 joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'expansion de ces boucles et ce par deux mécanismes : 1) le recrutement du facteur de dissociation des cohésines, Wpl1 et 2) le recrutement de l'acétyl-transférase Eco1. Ces résultats suggèrent, qu'outre son activité dans la cohésion des chromatides sœurs, Eco1 est également impliquée dans l'inhibition de la translocation des cohésines sur l'ADN. Par ailleurs, en absence d'inhibition, le centromère est apparu comme la barrière principale à la progression des cohésines sur l'ADN.

En conclusion, ces travaux ont permis d'approfondir le mécanisme d'action des cohésines dans l'organisation spatiale des chromosomes.

Dans cette étude j'ai participé à la construction des souches de levure et j'ai effectué les expériences de microscopie à fluorescence ainsi que leur quantification. J'ai mis au point les conditions expérimentales permettant la synchronisation des cellules dans les différentes phases du cycle et la dégradation inductible des protéines d'intérêt. J'ai également préparé les culots cellulaires, en incluant le pontage au formaldéhyde requis pour l'analyse Hi-C. La suite du protocole de préparation des échantillons a été réalisée dans le laboratoire de Romain Koszul par Agnès Thierry. L'analyse bioinformatique a été effectuée par Rémi Montagne et Axel Cournac. J'ai également contribué à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Regulation of cohesin-mediated mitotic chromosome folding by Eco1 and other partners

Lise Dauban^{4,&}, Rémi Montagne^{1,2,&}, Agnès Thierry^{1,2,&}, Luciana Lazar-Stefanita^{1,2,3,#}, Nathalie Bastié⁴, Olivier Gadal⁴, Axel Cournac^{1,2}, Romain Koszul^{1,2,*} and Frederic Beckouët^{4,*}.

¹Institut Pasteur, Unité Régulation Spatiale des Génomes, UMR 3525, CNRS, Paris, F-75015, France

²Institut Pasteur, Center of Bioinformatics, Biostatistics and Integrative Biology (C3BI), Paris, F-75015, France

³Sorbonne Université, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France

⁴Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31000, Toulouse, France

*Corresponding authors

& these authors contributed equally to this work

#present address: Institute for Systems Genetics and Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, NYU Langone Health, New York, NY 10016, USA

ABSTRACT

Cohesin, a member of the Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) complex family, holds sister chromatids together post-replication but also shapes chromosomes by promoting the formation of long-range intra-chromatid DNA loops, a process proposed to be mediated by DNA loop extrusion. Cohesin-mediated DNA loops are important for both compartmentalization of chromosomes into interacting domains during interphase and higher-order mitotic chromatin compaction. Here we describe the roles of three cohesin partners Pds5, Wpl1 and Eco1 in DNA loop formation of both un-replicated or mitotic *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. We reveal that Pds5 limits the size of DNA loops *via* at least two different pathways: a canonical Wpl1-mediated releasing activity and an Eco1-dependent mechanism. In the absence of Pds5-mediated negative regulation, the main barrier to DNA loop expansion appears to be the centromere. Our data also reveal that Eco1 acetyl transferase inhibits the cohesin activity that powers loop formation. Importantly, Eco1 employs a mechanism that is distinguishable from its role in cohesion establishment. This study revealed the key factors regulating cohesin-dependent DNA loop formation in eukaryotic cells.

INTRODUCTION

Recent advances in imaging and chromosome conformation capture techniques (3C, Hi-C; (Dekker et al., 2002)) have unveiled a hierarchy of chromatin structural arrangements (Cavalli and Misteli, 2013; Dekker and Mirny, 2016; Yu and Ren, 2017). A variety of megabase (Mb) and sub-Mb structures have been proposed to organize the chromosomes of bacteria (Le et al., 2013; Lioy et al., 2018; Marbouty et al., 2015), yeasts (Lazar-Stefanita et al., 2017; Mizuguchi et al., 2014; Muller et al., 2018; Schalbetter et al., 2017), and mammals (Dekker and Mirny, 2016; Yu and Ren, 2017), and are presumably a feature of most if not all organisms. During mitosis, this organization undergoes its most radical change when chromatin is transformed in condensed thread-like structures that facilitate chromosome segregation (Liang et al., 2015).

In many species, the cohesin and condensin SMC protein complexes play important roles in chromosome folding. They consist of a pair of SMC proteins that associate with a Kleisin protein to form a large tripartite ring capable of embracing one or two DNA molecules (Nasmyth and Haering, 2009). In addition to mediating sister chromatid cohesion during G2/M phases of the cell cycle (Gligoris et al., 2014; Haering et al., 2008), cohesin shares with condensin the ability to convert DNA fibres into chromatid thread-like structures through a mechanism that remains poorly understood (Kagey et al., 2010; Parelho et al., 2008; Wutz et al., 2017). SMC rings may organize DNA within chromatids by a DNA loop extrusion process, which consists in capturing small chromatin loops and progressively catalyzing their enlargement into large, megabase-sized structures (Fudenberg et al., 2016; Gibcus et al., 2018; Nasmyth, 2001). The precise mechanisms driving the generation of loops remain however to be fully characterized.

In mammals, condensin-dependent loops represent basic units for the folding of mitotic chromosomes into compact, higher-order chromatin structures. Cohesin-dependent loops, on the other hand, appear to contribute to long-range gene regulation in interphase, and to the segmentation of interphase chromosomes into topologically associating domains (TADs) defined as sub-megabase self-interacting regions. The organization of interphasic chromosomes into self-interacting domains has been proposed to insulate enhancers from non-cognate promoters by blocking cohesin-dependent loop progression when cohesin reaches the insulator protein CTCF bound to DNA (Nora et al., 2017). Interphasic self-interacting domains are

chromosomal features found in many studied living organisms but their dependency on cohesin and CTCF activities is not automatic. Besides mammals, the involvement of cohesin in domain formation has for instance been reported in fission yeast (Mizuguchi et al., 2014). In budding yeast *S. cerevisiae* however, no clear TADs-like structure nor DNA loops have been identified along interphase chromosomes. Nevertheless, the fact that cohesin is essential to convert the rDNA locus into a thread-like structure (Guacci et al., 1994) during mitosis raises the idea that cohesin may also mediate cis-DNA looping along the yeast chromosome. Recently, we and others showed using Hi-C that meiotic and mitotic compaction in budding yeast is dependent on cohesin (Lazar-Stefanita et al., 2017; Muller et al., 2018; Schalbetter et al., 2017). Surprisingly, we also found that condensin is dispensable for mitotic chromosome arm compaction. Instead, condensin is required for higher-order chromatin structuring at the rDNA locus during anaphase and for promoting resolution at peri-centromeric regions.

Cohesin is composed of two SMC ATPases (Smc1 and Smc3) and an α -kleisin subunit called Scc1/Rad21. This complex binds to DNA in a dynamic manner throughout the cell cycle. Cohesin loading requires ATP hydrolysis mediated by Scc2/NIPBL, that is thought to result in entrapment of DNA inside the cohesin tripartite ring (Chapard et al., 2019; Ciosk et al., 2000; Gligoris et al., 2014; Haering et al., 2002; Hu et al., 2011). Cohesin may dissociate from DNA by separase-mediated cleavage of Scc1 at anaphase onset (Uhlmann et al., 1999) and in a manner that involves a “releasing activity” at other stages of the cell cycle. This separase-independent releasing activity relies on two cohesin-associated regulatory subunits: Wpl1/Wpl1 and Pds5 (Gandhi et al., 2006; Kueng et al., 2006; Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Rowland et al., 2009). Pds5 binds within the N-terminal part of Scc1 and recruits Wpl1 (Chan et al., 2013) which opens the gate located between Scc1 and Smc3, triggering cohesin dissociation from DNA (Beckouët et al., 2016; Chan et al., 2012; Murayama and Uhlmann, 2015). When replication takes place, the releasing activity is repressed by Eco1-mediated acetylation of two conserved lysine residues (K112/113) within the Smc3 ATPase head (Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Unal et al., 2008). This results in stabilization of cohesin on DNA and establishment of sister chromatid cohesion. It has been suggested that acetylation of K112/113 is in fact stimulated by both DNA replication fork progression and the Pds5 subunit (Beckouët et al., 2010; Chan et al., 2013; Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Vaur et al., 2012). Smc3 acetylation is then maintained throughout G2 and M phases and only removed after cleavage of Scc1 and subsequent deacetylation by Hos1 (Beckouët et al., 2010).

If cohesin-mediated loops are established by loop extrusion, their lengths should depend on several parameters, notably cohesin residence time on DNA and an extrusion driving force. This prediction is supported by the observation that the length of chromatin loops in mammalian interphasic nuclei increases once cohesin turnover is abolished after inactivation of Wpl1 and Pds5 (Haarhuis and Rowland, 2017; Wutz et al., 2017). However, the mechanism(s) leading to loop enlargement remains a matter of debate. ATP hydrolysis may be the driving force for chromatin loop extrusion, as observed for the purified condensin complex (Ganji et al., 2018). Scc2, being essential for cohesin's ATPase activity could thus play a key role in stimulating the translocation process and promoting DNA loop expansion (Petela et al., 2018). Alternatively, transcribing RNA polymerases may promote loop enlargement by pushing cohesin along the DNA (Busslinger et al., 2017; Lengronne et al., 2004). Finally, the frequency of cohesin injection along chromosomes may also influence their structure.

In the present study, we show that mitotic yeast chromosomes are compacted by cohesin dependent loops. By dissecting the roles of cohesin regulatory partners in DNA loop expansion, we also show that the mechanisms regulating loop positioning are highly conserved between yeast and mammals. Moreover, we find that in addition to promoting sister chromatid cohesion Eco1 inhibits the translocation process that extends DNA loops. In the absence of negative regulation, the main barrier to loop expansion is the centromere, which remains physically connected to the microtubule-organizing center (MTOC) during the entire yeast cell cycle.

RESULTS

Yeast mitotic chromosome arms are organized by cohesin-dependent loops

To characterize *S. cerevisiae* mitotic chromosome organization we took advantage of yeast strains in which the cyclosome activator Cdc20 is under the control of the repressible MET3 promoter. To arrest the cells in mitosis, we released them from a G1 alpha-factor arrest by growing them in rich media supplemented with methionine (Figure 1A; Methods). Once arrested in metaphase, genome-wide chromatin contacts were quantified by Hi-C. Normalized contact maps (1 kb resolution) of metaphasic chromosomes differed from G1 pattern in several ways (Figure 1B). First, the broad and thicker diagonal observed in metaphase compared to G1 revealed increased contacts at short/medium range. Second, discrete dots corresponding to enriched contacts between pairs of loci, consistent with DNA loops, were also often visible along mitotic chromosomes (Figure 1B, black arrows). To better characterize chromosome

compaction we computed the contact probability curve $P_c(s)$ for each condition (Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017) (Supplemental Figure S1B; Methods). The derivative of the $P_c(s)$ curve in a log-log space can be used to facilitate the visualization of local differences (Methods). In mice, the maximum of the derivative curve also matches with the average length of extruded loops (Gassler et al., 2017). The same representation in yeast showed a net enrichment in mitosis in the contacts between loci separated by 30 kb or less, compared to G1 (Figure 1C, blue vs. orange curve). It also suggested a loop size in metaphase arrested cells of ~15 kb on average.

To directly test the role of cohesin in the maintenance of these structures, we depleted Scc1 in synchronized cells using an auxin degron strategy (Figure 1A, Methods). Efficient Scc1 depletion was quantified by a split-dots assay measuring cohesion loss (Figure 1D). Preventing cohesin loading during S phase suppressed loop formation and the overall contacts displayed little changes compared to those observed in G1-arrested cells that contain little, if any, Scc1 (Figure 1B and S1A). Therefore, DNA loops and local contact enrichment observed along mitotic chromosomes are cohesin-dependent.

To further characterize the looping signal and to analyze whether it corresponded to contacts between Scc1 enrichment sites (Petela et al., 2018), we computed the average contact signal of 80 kb windows centered on contacts between each possible pair of Scc1 enrichment sites (Petela et al., 2018) separated by increasing distances (0 kb to 140 kb, with 20 kb steps). We then divided the signal by the average contact map of random windows (Figure 1E, Methods, (Gassler et al., 2017; Muller et al., 2018)). In metaphase, a strong looping signal (in red) appeared between pairs of cohesin-binding sites separated by 40 kb or less (Figure 1F, Methods). This pile-up plots therefore confirmed that the yeast metaphasic chromosomes are organized into chromatin loops anchored at cohesin binding sites.

Cohesin dependent loops are independent of sister chromatid cohesion

Mitotic loops could arise from the bridging of cohesins involved in sister chromatid cohesion. To test this hypothesis, we generated Hi-C maps of mitotic chromosomes from cells depleted for Cdc45, which reach mitosis without replication (Tercero et al., 2000) (Figure 2A and S2A). Contact maps and their associated DNA loops, $P_c(s)$ and pile-up plots of mitotic unreplicated and replicated cells showed little, if any, differences (Figure 2B, C, and D; Figure S2B, D and E). In addition, DNA loops of unreplicated mitotic chromosomes also disappeared in the absence of Scc1 as for replicated cells (Figure 2B, C, D; Figure S2C), showing that sister cohesion is not necessary for generating Scc1-dependent metaphase structures.

To further determine whether cohesin-mediated loops along mitotic chromosomes depend on a mitosis specific activity, we induced cohesin loading on unreplicated chromosomes in G1. An engineered version of Scc1 that cannot be cleaved by separase was induced in G1 arrested cells (Uhlmann et al., 2000) (Figure 3A; S3D), and contact maps generated (Figure 3B). Loading of cohesin on G1 chromosomes led to an accumulation of loops between pairs of Scc1 binding sites (Figure 3B, and C) and a significant increase in intra-chromosomal contacts (Figure 3D; S3A, B and C). In this condition, loops appeared slightly larger than in mitosis, suggesting that their expansion is constrained in metaphase-arrested cells (Figure 3C). Altogether those results demonstrate that the establishment of cohesin-mediated DNA loops along mitotic chromosomes is independent of sister-chromatid cohesion and mitosis specific activity.

Wpl1-mediated releasing activity counteracts loop expansion

In the absence of Wpl1, cohesins cannot be released from DNA. In mammals, Hi-C studies of WAPL depleted cells revealed an enlargement of cohesin loops along interphase chromosomes which was interpreted as a hint of a loop extrusion process (Wutz et al., 2017). To gain insights into the mechanism generating cohesin loops in yeast metaphase chromosomes, we therefore tested whether intra chromosomal contacts $P_c(s)$, DNA loops and domains spread to greater distances in Wpl1 depleted cells. Wild-type and *wpl1Δ* cells were synchronized in metaphase by depleting Cdc20 (Figure S4A) and genome-wide chromatin interactions were quantified by Hi-C (Figure 4A). In Wpl1 depleted cells, the contact map displayed a very different pattern as compared to wild-type, with less short-range contacts overall (but a crispier constriction at the centromere level, clearly separating the two chromosome arms), as well as chromatin loops punctuating the map resulting in a grid-like dotted pattern (Figure 4A; Figure S4B). The former positions of wild-type loops often displayed a weaker signal in the absence of Wpl1, whereas loop anchors appeared engaged in multiple DNA looping over longer distances. Accordingly, the pile-up plots showed that loops extended over much larger distances in the absence of Wpl1, ranging in size from ~30 up to ~130 kb (Figure 4B and C) instead of being limited within a ~30 kb range as in wild type cells. The $P_c(s)$ also confirmed the decrease in short-range contacts and the enrichment over longer distances.

The resulting grid-like loop pattern was often, but not always, stronger in chromosomal regions proximal to the centromeres. This may be due to high levels of cohesin loading at centromeric regions or due to the fact that the centromere region represents a roadblock to cohesin progression.

The effects of Wpl1 depletion were further supported by performing the experiment in cells harboring *pds5-S81R*, an allele abolishing cohesin release even in presence of Wpl1 (Figure S4C, B, C and D).

In summary, our data suggest that mitotic chromosome cohesin-dependent compaction in yeast is presumably induced by loop extrusion, similarly to the mechanism observed during mammalian interphase.

Dual roles for Pds5 in DNA looping

As Wpl1 works with Pds5 to mediate “releasing activity” we tested how Pds5 contributes to DNA loop regulation. G1-arrested cells were depleted for Pds5 using the degron system, released into S-phase and arrested in metaphase (Figure S5A). Loss of both Pds5/Eco1-mediated Smc3-K113 acetylation (Figure 5A) and sister chromatid cohesion (Figure 5B) confirmed efficient Pds5 degradation. The contact map of Pds5 depleted cells was generated (Figure 5C) and compared to mitotic (Figure 5C and S5B) and *wpl1Δ* cells (Figure 5C and S5C). Side-by-side comparison and ratio-maps revealed that the absence of Pds5 increased the amount of long-range intra-chromosomal DNA contacts to a much higher extent than in *wpl1Δ* cells, as confirmed by the $P_c(s)$ curves (Figure 5C, E and S5C, D).

A close inspection of Hi-C map also revealed that, as in metazoan (Wutz et al., 2017), Pds5 depletion induced a decrease in the number of discrete spots/DNA loops compared to WT and *wpl1Δ* cells (Figure 5C). While in WT and *wpl1Δ* cells, loops bridge discrete pairs of Sec1 enriched sequences, in Pds5-depleted cells loop bases were more loosely defined, with no clearcut signal visible in the normalized Hi-C maps (Figure 5C). This was confirmed by pile-up plots showing that in Pds5 depleted cells, DNA loops did not accumulate within those cohesin-rich loci as in WT cells (Figure 5D and S5E).

In metaphase Pds5-depleted cells, the insulation of peri-centromeric regions from the rest of chromosome arms was almost entirely lost (Figure S6A): each centromere-flanking region was now able to engage in long-range contacts with the entire adjacent arm up to the telomere. In addition, the ratio plot of Pds5-depleted and wild-type mitotic maps also showed a significant loss of contacts between the two arms. As a result, each chromosome arm appears on the maps as a large self-interacting domain (Figure 5C; Figure S6B). In addition, centromere de-clustering was observed by imaging in both *wpl1Δ* and Pds5-depleted cells, although seemingly to a lesser extent in Wpl1-depleted cells. Since this effect was not observed in absence of cohesin, we postulated that engagement of each centromeric region in large loops induces a force promoting centromere de-clustering (Figure S6B).

Chromosome contact patterns observed in Pds5-depleted cells suggest that Pds5 regulates loop formation not only *via* Wpl1 mediated releasing activity, but also by an unknown, Wpl1-independent mechanism. As Pds5, but not Wpl1, is essential to maintain sister chromatid cohesion, we hypothesized that the expansion of DNA loops over longer distances in Pds5-depleted cells could result from loss of cohesion. Indeed, cohesins involved in sister chromatid cohesion may act as physical barriers halting the loop expansion process. Inactivation of Pds5 would alleviate those boundaries allowing loop expansion to proceed. To test this, we analyzed the effects of Pds5 or Wpl1 loss on 3D folding of unreplicated (*cdc45*) mitotic chromosomes (Figure S7A). The depletion of either Wpl1 or Pds5 had the same effect on chromosome structure than that observed in wild-type metaphase, with Pds5 inactivation leading to intra-chromosomal contacts bridging loci over longer distances than in *wpl1Δ* cells (Figure 6F; Figure S7B, C and D). Impact of Pds5 and Wpl1 depletion was also quantified in living cells: fluorescently-labelled centromeres and a locus positioned 400 kb away on chromosome XV got closer together compared to control cells (Figure S7E), backing the Hi-C results showing increased loop sizes.

Those results therefore demonstrate that Pds5 regulates DNA looping contacts and suppresses loop expansion through two mechanisms, the recruitment of Wpl1, as well as a Wpl1-independent pathway.

Eco1 inhibits loop expansion

Since increase in loop length in Pds5 depleted cells does not only result from the absence of releasing activity, we envisioned that Pds5 recruitment of Eco1 (Chan et al., 2013; Minamino et al., 2015; Noble et al., 2006; Vaur et al., 2012) might regulate a second mechanism required to inhibit DNA loop expansion. We tested the effects of Eco1 depletion using an inducible degron (Figure S8A and G; Methods) and showed that loss of Eco1 is sufficient to promote longer loops (Figure 6A and E). As the absence of Eco1 promotes dissociation of cohesin from DNA by Wpl1 (Chan et al., 2012), these longer loops cannot result from an increase in cohesin residence time on DNA. Therefore, this result shows that in addition to promoting sister chromatid cohesion, Eco1 also inhibits the translocation process extending DNA loops. Remarkably, loop length, contact probability ($P_c(s)$) and centromere clustering defects in Eco1 depleted cells were comparable to those observed in Wpl1 depleted cells, despite Eco1 and Wpl1 having opposing effects on releasing activity (Figure 6A, E and D; Figure S8B, C, E and F).

Unreplicated mitotic cells (*cdc45*) had shorter loops than metaphase cells lacking Eco1 (*cdc20, eco1-AID*). This implies that Eco1 inhibits DNA loop expansion independently of DNA replication fork progression. If this is so, depletion of Eco1 should promote intra-chromosomal and DNA contacts to longer distances even in the absence of replication. This was indeed the case. Depletion of Eco1 in *cdc45* cells generated long intra-chromosomal contacts and longer DNA loops compared to the control strain (Figure S9A-E).

Since Pds5 recruits both Eco1 and Wpl1 on cohesin, we tested whether their co-inactivation would mimic the effect of Pds5 depletion. Strikingly, depletion of Eco1 in *wpl1Δ* cells promoted long-range intra-chromosomal contacts and DNA loops nearly identical to those observed in Pds5 depleted cells (Figure 6B-E; Figure S8B, D and E). This suggests that loop expansion is regulated through two independent pathways, Eco1 and Wpl1.

DISCUSSION

In the present study, we show that yeast mitotic chromosomes organize into loops along individual chromatids, independently of replication. These loops are enriched in cohesin subunits at their basis. The cohesin binding factors Pds5, Wpl1 and Eco1 affect the structure and distribution of these loops, with Pds5 and Eco1 playing partially overlapping roles in regulating the expansion of these structures.

Yeast mitotic chromosomes are organized into cohesin-dependent loops

We show here that DNA loops are present along yeast mitotic chromosomes. The bases of these loops are enriched in cohesin. However, whether all cohesin deposition sites identified by ChIP-seq are involved in loop formation in all cells, or whether a loop heterogeneity exists within the population, remains to be characterized.

The mechanism mediating the accumulation of cohesin at these genomic positions may be driven by transcription (Lengronne et al., 2004): in mutants in which the releasing activity was suppressed, the remaining boundaries, which were often involved in multiple loops, were mostly positioned at the level of highly transcribed genes. We also noticed that in Pds5-depleted cells the contact signal was enriched at the level of cohesin-enriched sites, but it was not strong enough to result in discrete loop signal in the contact maps. The blurry signal we observed in pile-up plots (Figure 5D) could be that cohesin-mediated expansion of DNA loops is slowed down in these regions as a result of encounter with transcription-generated supercoiled

structures. Since release does not take place, loop expansion somehow pursues and manages to bypass these roadblocks. The precise nature of these signals will further be characterized using controlled assays.

Eco1 regulates chromosome 3D folding

We also analyzed the role of cohesin binding factors and found that Pds5 regulates loop expansion *via* at least two pathways: the previously described Wpl1-mediated releasing activity (Wutz et al., 2017) and a novel Eco1-dependent mechanism (Figure 7). These results strongly suggest that, as in mammalian cells, loops are generated through a cohesin-dependent loop extrusion mechanism. They also point out to a role of Eco1 in negatively regulating loop expansion through a mechanism independent of its canonical role in cohesion establishment. Nevertheless, one may envision an alternative model whereby the contacts observed over longer distances in Eco1-depleted cells result from cohesin loading defects due to Eco1 depletion. Indeed, the inactivation of Eco1 could reduce the amount of cohesin being loaded on the chromatin, hence decreasing the number of complexes expanding DNA loops present along a chromosome arm. The lower density of cohesin may in turn lead to longer DNA tracks being transformed into loops by the same complex before colliding into another complex, hence resulting in longer loops on average. However, this scenario appears unlikely, as recent data show that Eco1 depletion does not affect cohesin loading (Chapard et al., 2019).

Competition between Scc2 and Pds5 may regulate DNA loop expansion

One may envision that Eco1-mediated acetylation inhibits translocase activity that expands cohesin-dependent loops. It has been proposed that ATP hydrolysis stimulated by Scc2 could be the driving force for loop expansion. As Pds5 competes with Scc2 for binding the kleisin subunit (Petela et al., 2018), a possibility is that Pds5 inhibits the translocation process required to expand DNA loops. Eco1-mediated acetylation may therefore improve Pds5 binding on cohesin and consequently abolish the Scc2-mediated translocation process. This idea is reinforced by *in vivo* FRAP measurement revealing that Eco1 inactivation increases Pds5 turnover on chromosomes (Chan et al., 2013). Moreover, recent CHIP-seq data show that Eco1 inactivation reduces Pds5 association with DNA while it has no effect on cohesin ring association with DNA (Chapard et al., 2019).

Competition between Pds5 and Scc2 may control promoter-enhancer interaction during human development. This hypothesis is supported by the fact that Scc2 does not co-localize with CTCF which halts loop expansion. It has been shown by Wutz et al. (2017) that the ability

of CTCF to block loop extrusion is dependent on PDS5 proteins. At CTCF sites, replacement of Pds5 by Scc2 may be somehow inhibited, which may consequently abolish or decrease the rate of ATPase hydrolysis required to generate DNA loops.

Eco1 regulates loop expansion independently of Smc3 acetylation

Eco1 regulation of loop expansion does not seem to involve Smc3-K113 acetylation (Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Unal et al., 2008). Actually, in spite of similar acetylation defects of Smc3-K113 in both *cdc45* and *cdc20*, *eco1-AID* cells, Eco1-depleted cells display long-range intra-chromosomal contacts over longer distances than those detected upon Cdc45 depletion. This indeed indicates that Eco1 regulates loop expansion by acetylating a target other than Smc3-K113. The identity of novel types of Eco1 targets may provide new perspectives to understand how human Eco1 homologues (ESCO1 and ESCO2) regulates gene transcription or induces the developmental disorder called Robert Syndrome.

DNA looping is blocked at centromeres

Our study points out that the yeast centromere is a strong roadblock to cohesin-dependent loop progression. The nature of this boundary raises interests beyond the yeast community, as related mechanisms could apply in others species as well. In yeast, kinetochore proteins bound to centromeres are connected through microtubules to the MTOC (spindle pole body or SPB) which itself is bound to the nuclear envelope. Such a physical bridge could block the progression of incoming cohesin along the chromosome. It is also possible that the huge kinetochore complex bound to centromeres is sufficient to stop DNA loop expansion.

In wild type cells, Wpl1 mediates cohesin release and Eco1 restricts DNA loop progression from chromosome arms to centromeric regions. When those activities are impaired, loops emanating from chromosome arms can extend to centromeres, but no further, resulting in sharp, discrete boundaries as observed on the contact maps. In addition, it is likely that loops also originate from centromeres and spread towards chromosome arms.

Finally, we show that releasing centromeres from microtubules results in their repositioning inside the nuclear space when loop expansion is not inhibited by Wpl1, Pds5 or Eco1. This suggests that centromere positioning is under the control of opposite forces emanating from microtubules and, presumably, a loop extrusion-like mechanism that promote loop expansion. Inhibiting such a loop extrusion mechanism in wild-type cells may favor the insulation of clustered centromeres away from chromosome arms, and consequently improve or stabilize microtubule attachment and chromosome segregation. It remains to be investigated

whether similar mechanisms occur in species with larger epigenetically defined centromeres compared to the budding yeast point centromere, and whether the attachment of microtubules is mandatory to block DNA looping.

Acknowledgements

We thank K. Nasmyth and T.U. Tanaka for sharing strains and K. Shiahige for the Smc3 antibody. We thank Aurèle Piazza, Luis Aragon, Julien Mozziconacci, Christophe Chopard, Olivier Cuvier and OG and RK teams for discussions and comments on the manuscript. LD was supported by ARC fellowships. This research was supported by funding to R.K. from the European Research Council under the Horizon 2020 Program (ERC grant agreements 260822).

Authors contributions

LD, RK and FB designed research. LD and AT performed the experiments, with help from LLS who initiated the study. RM analyzed the data, with contributions from AC who designed some computational tools. All authors interpreted the data. LD, RK, FB wrote the manuscript, with contributions from RM.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

Data Availability

Sample description and raw contact maps are accessible on the GEO database through the following accession number: XXX. Raw sequences are accessible on SRA database through the following accession number: PRJNA528616.

Figure 1 A

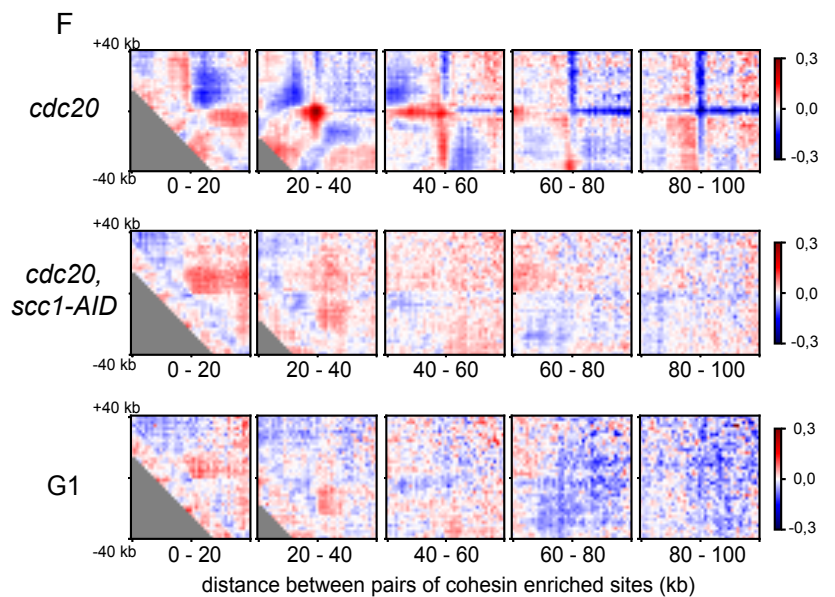
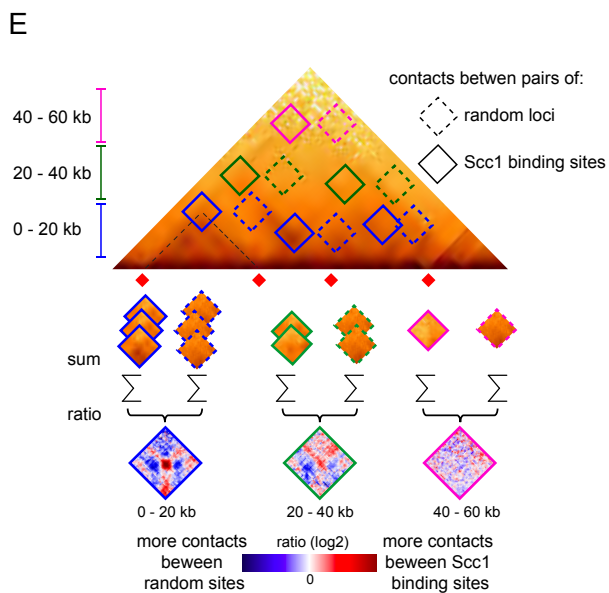
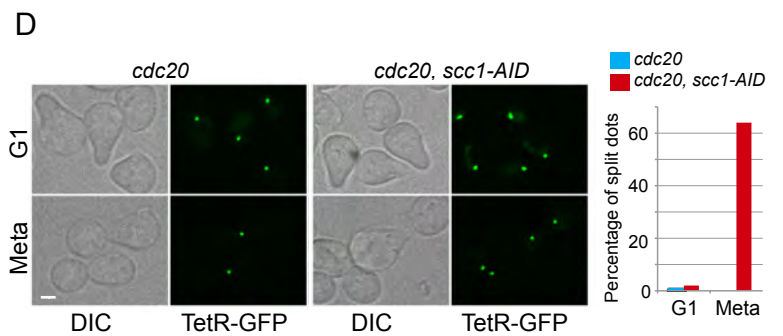
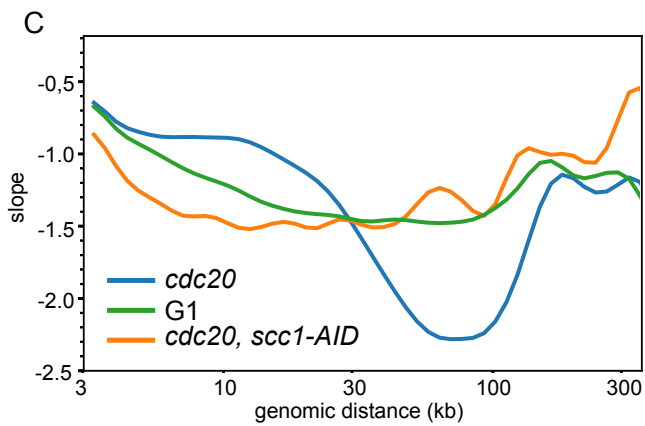
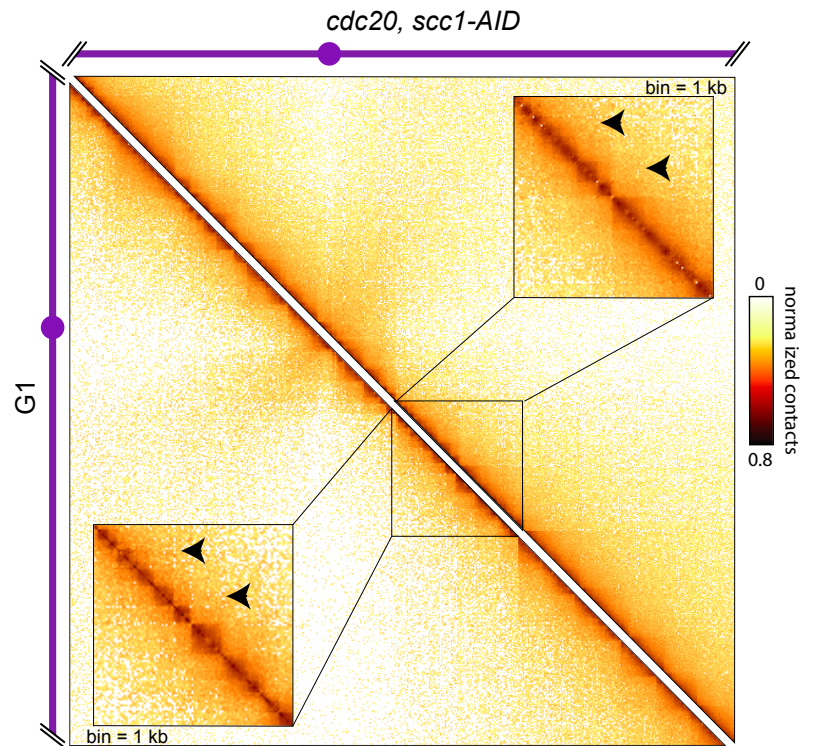
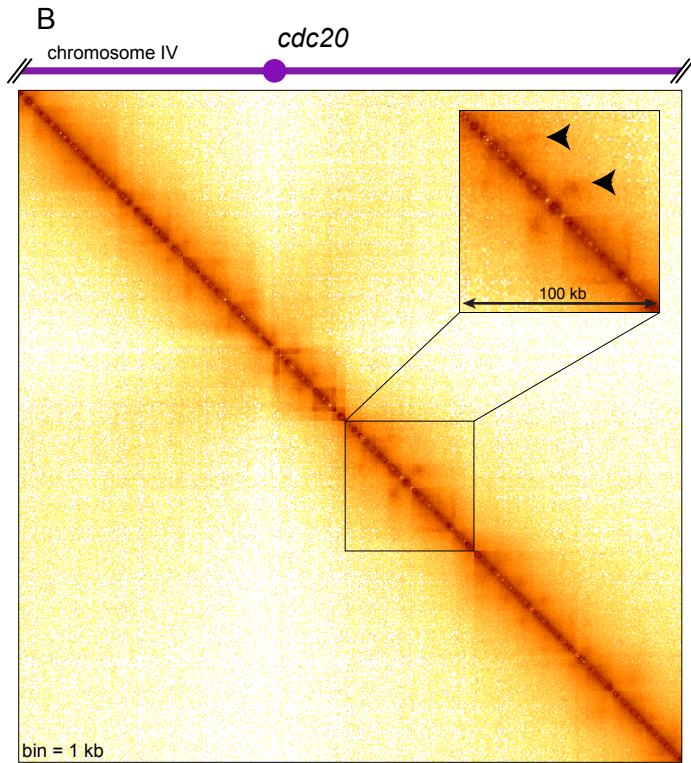
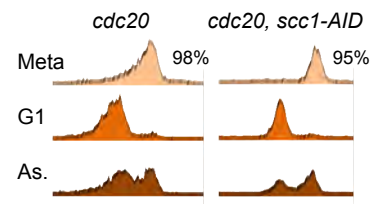
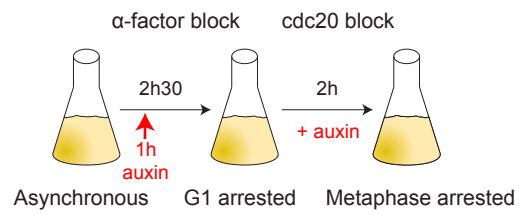


Figure 3

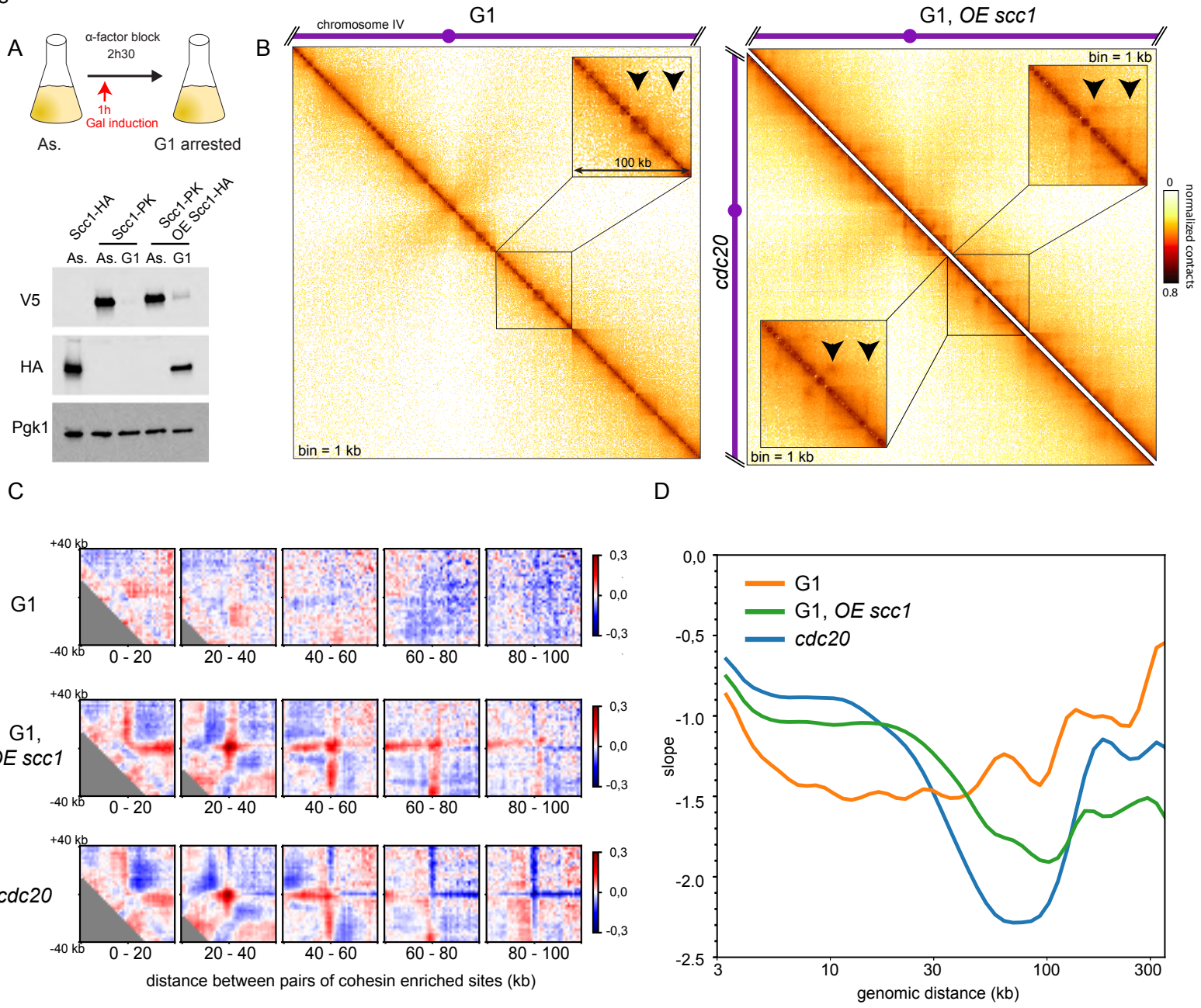


Figure 4

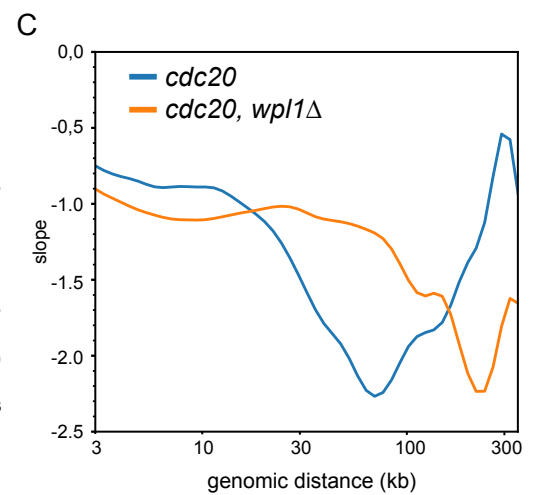
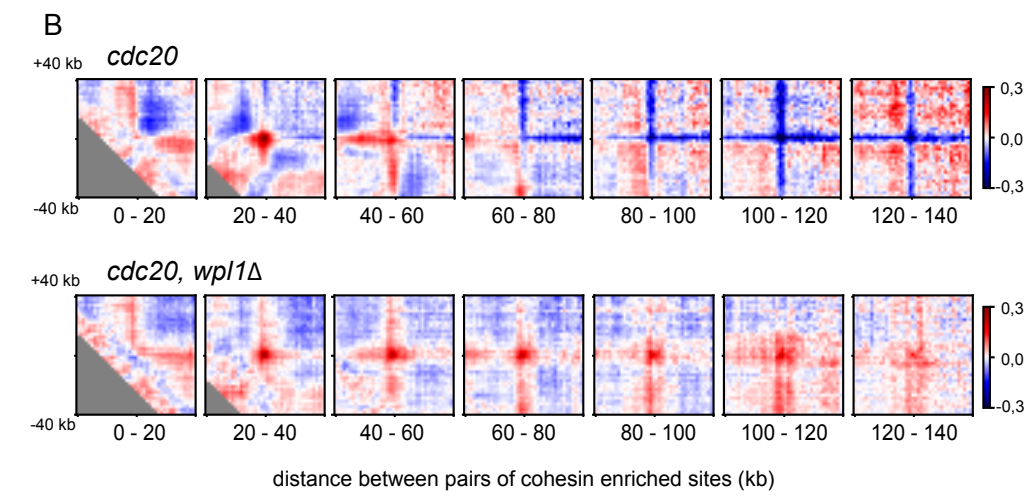
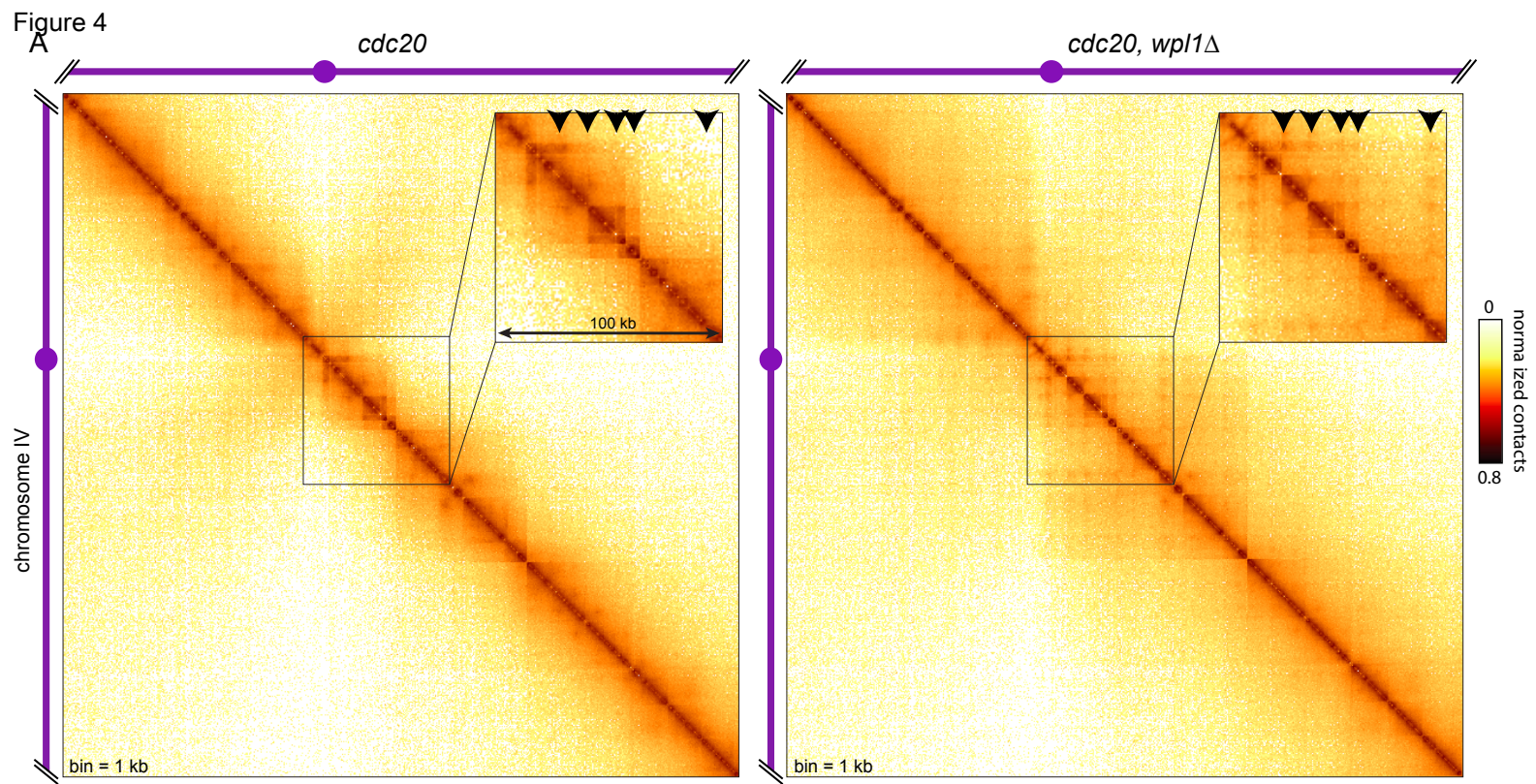
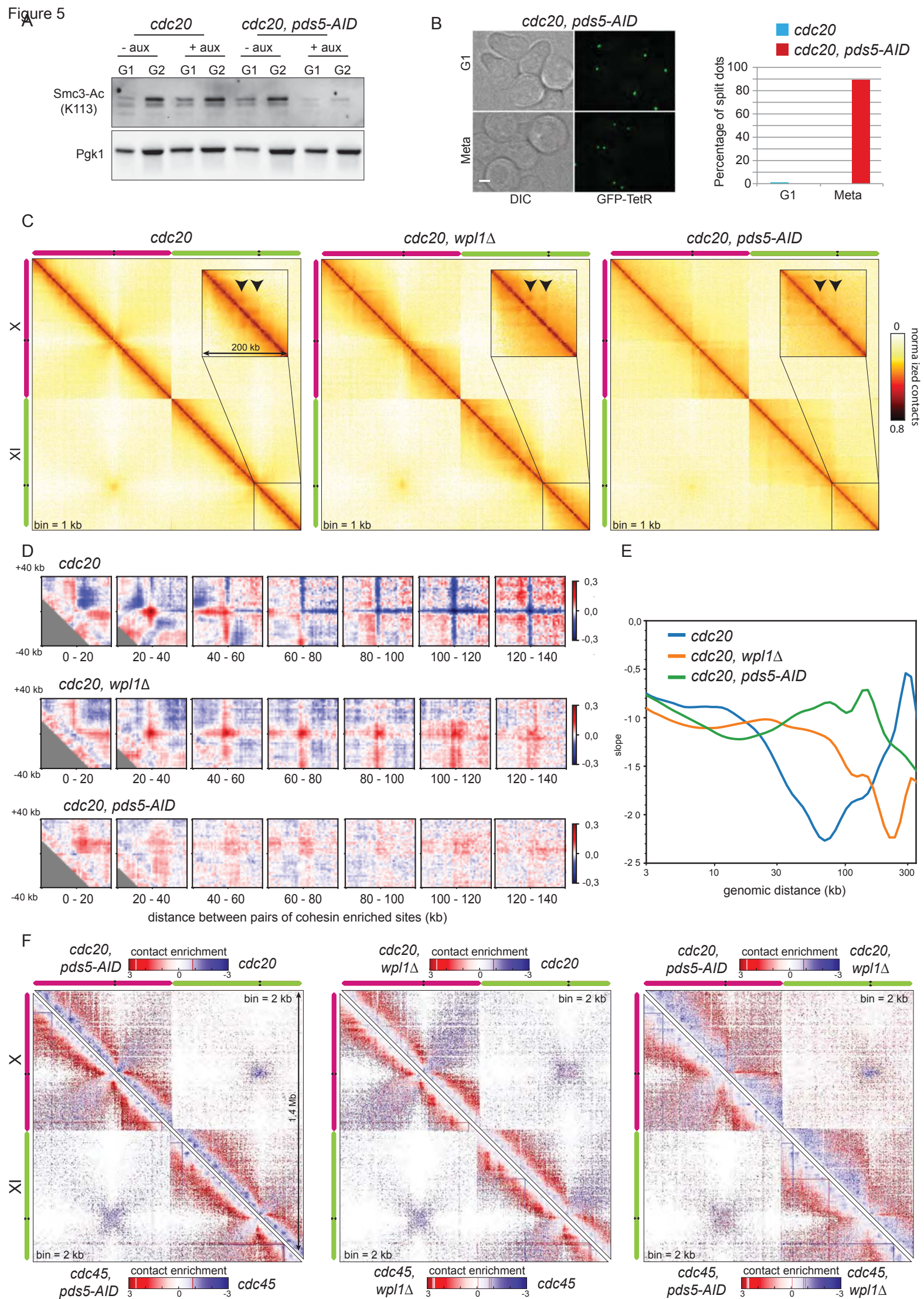


Figure 5



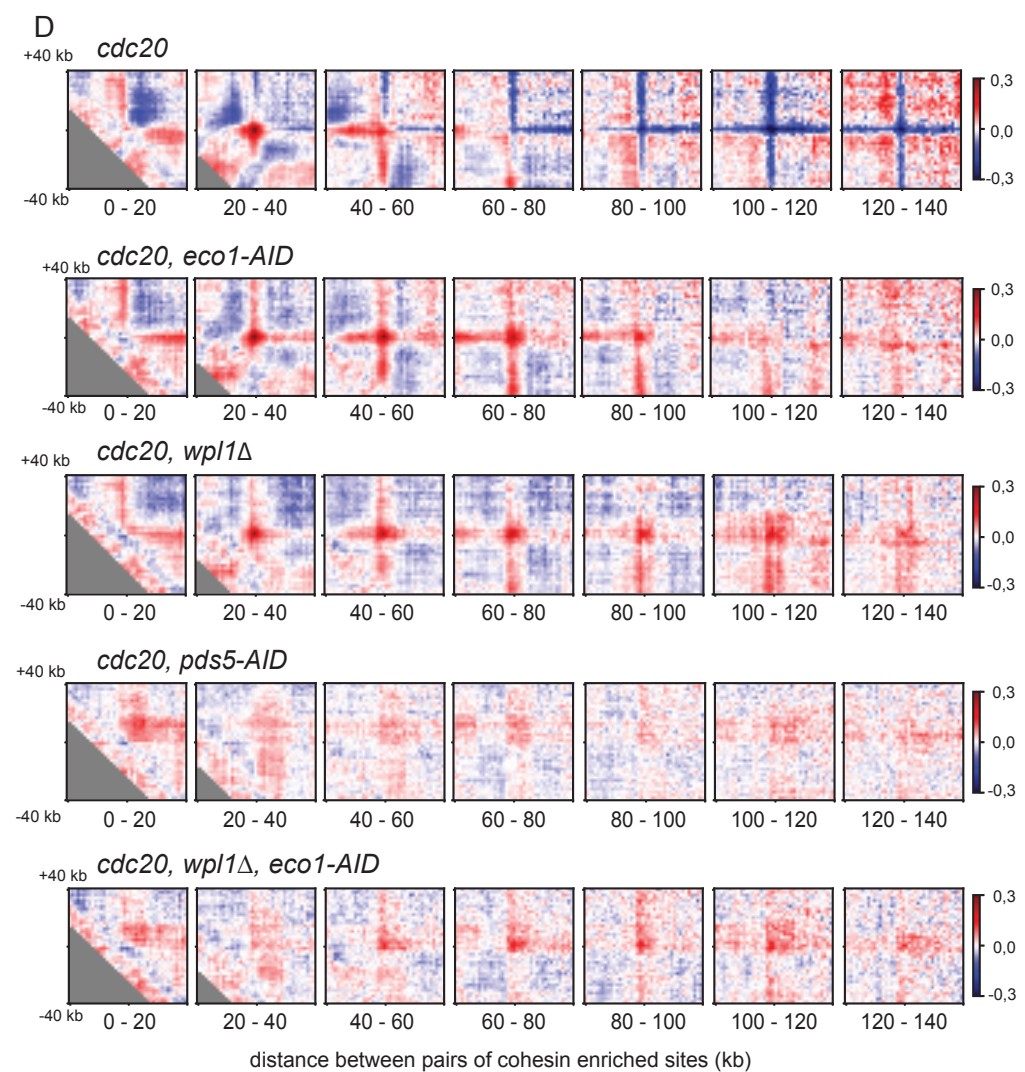
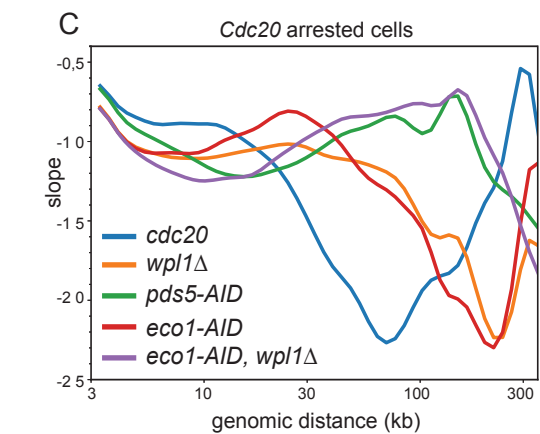
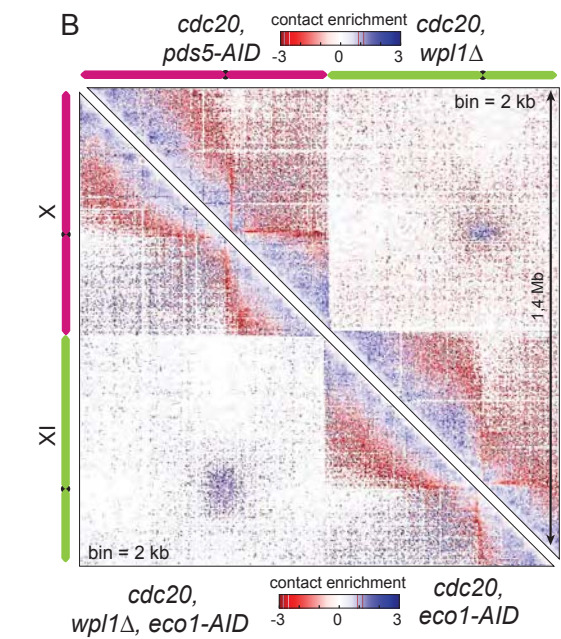
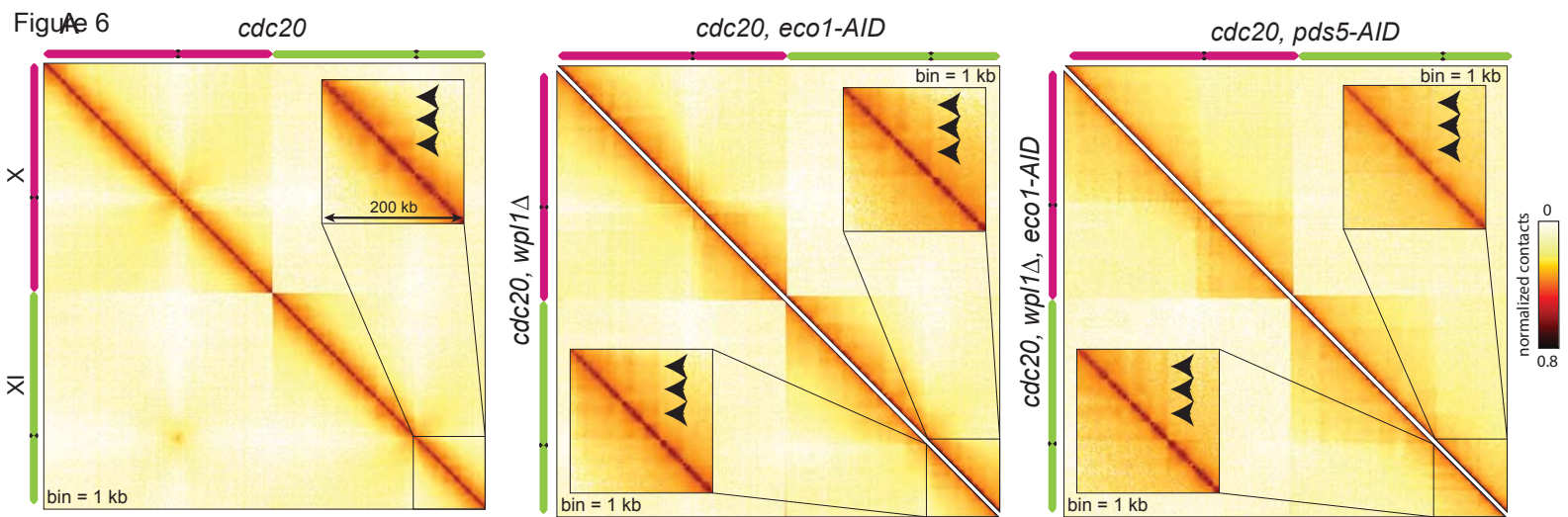


Figure 7

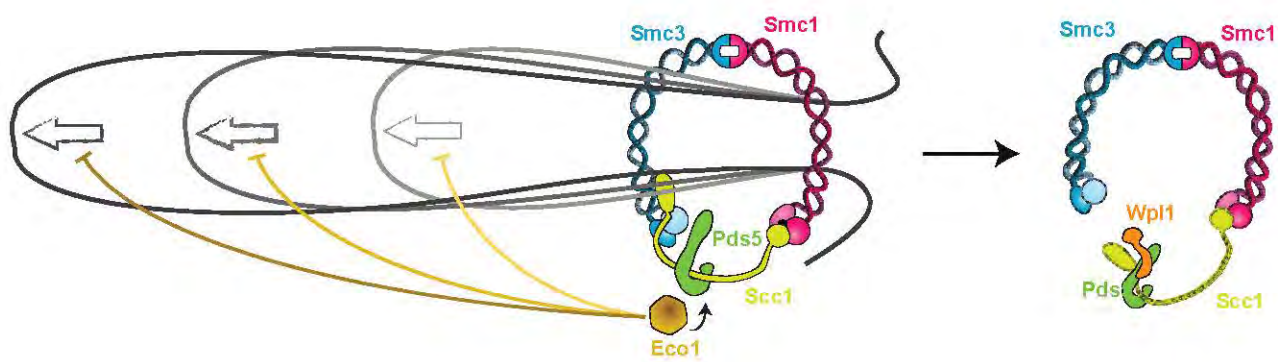


Figure Legends

Figure 1. Mitotic yeast chromosomes are organized as cohesin-dependent loops and domains: A) Left panel: schematic representation of the experimental protocol used to process cells from G1 to metaphase in absence or presence of Scc1 (strains FB133-57B and yLD127-20b). Right panel: cell-cycle arrest monitored by flow cytometry. Percentage of bi-nucleated (anaphase) cells was measured to evaluate the efficiency of the metaphase arrest. B) Contact maps of a part of chromosome IV (1 kb bins) for control and Scc1-depleted, metaphase-arrested strains (strains FB133-57B and yLD127-20b) and G1 arrested cells (strain FB09-9C). Scc1 ChIP-Seq profile (Petela et al., 2018) is shown on the side of the map of the metaphase-arrested control. C) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance (log scale). D) Percentage of cells with paired or unpaired fluorescently labelled URA3 loci (*ura3::3xURA3 tetO112; tetR-GFP*), carrying or not a Scc1-AID degron (strains yLD126-36c and FB124), in presence of auxin. Scale bar, 2 μ m. E) Schematic representation of the analysis pipeline to generate agglomerated ratio plots. F) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions (Methods). Number of pairs is indicated underneath each window. Ratios are ordered according to the distance between Scc1 enriched positions. Blue color: more contacts between the random genomic regions. Red signal: more contacts between Scc1-enriched regions.

Figure 2. Cohesin-dependent loops and domains on mitotic yeast chromosomes are dependent on sister chromatid cohesion. A) Schematic representation of the experimental protocol to make unreplicated mitotic cells in absence or presence of Scc1 (strains FB154 and FB149-11B). B) Contact maps of a part of chromosome IV (1 kb bin) for unreplicated mitotic cells with or without Scc1 (strains FB154 and FB149-11B) and for metaphase-arrested strain FB133-57B. C) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance (log scale). D) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions.

Figure 3. Expression of Scc1 in G1 arrested cells induces DNA looping A) Upper panel: Schematic representation of the experimental protocol followed to overexpress a HA-tagged, non-cleavable Scc1 in G1 (strains FB09-9C and FB09-4A). Lower panel: western blot assessing expression of non-cleavable Scc1 (*OE scc1*) with anti-HA antibody and expression of endogenous Scc1 (Scc1-PK) with anti-V5 antibody. B) Contact maps of a part of chromosome IV (1 kb bin) G1 arrested cells with or without Scc1 (strains FB09-9C and

FB09-4A) and for metaphase-arrested strain (FB133-57B). C) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions. D) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance.

Figure 4. Wpl1 restricts DNA loop expansion A) Contact maps of chromosome IV (1 kb bin) of wild type and *wpl1Δ* strains arrested in metaphase (strains FB133-57B and FB133-49B). B) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions. C) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance.

Figure 5. A Wpl1-independent pathway regulates cohesin-dependent loops during mitosis. A) Pds5 depletion was monitored by western blot through the Pds5-dependent acetylation of Smc3-K113. Pgk1, loading control. B) Sister-chromatid cohesion was monitored by detecting paired/unpaired fluorescently labelled URA3 loci in presence or absence of Pds5 (strains yLD126-36c and yLD126-38b). Scale bar, 2 μm. C) Hi-C contact maps of metaphase cells in presence or absence of Pds5 or Wpl1 (1 kb bin). Chromosomes X and XI are represented with pink and green lines, respectively. D) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on contacts between pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions. Scc1-enriched positions were identified in strains expressing Pds5 (WT and *wpl1Δ* condition,) or not (Pds5-depleted cells). Blue color: more contacts between random genomic regions. Red signal: more contacts between Scc1 enriched regions. E) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance (log scale) for metaphase arrested strains. F) Log₂ ratio between Hi-C maps from metaphase-arrested strains or *cdc45* depleted cells containing or not Wpl1 or Pds5 (1 kb bin). Blue to red color scale reflects the enrichment in contacts in one population with respect to the other.

Figure 6. Eco1 counteracts loop expansion. A) and B) Hi-C maps (1 kb bin) for strains FB133-57B (WT), FB133-20C (*eco1-AID*), FB133-49B (*wpl1Δ*) and FB133-1D (*wpl1Δ eco1-AID*) and yLD121-1a (*pds5-AID*) arrested in metaphase. The chromosomes are indicated for each map. C) Log₂ ratio between the indicated Hi-C maps (chromosome IV, 2 kb bin). D) E) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance (log scale) for metaphase arrested strains. E) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions.

Figure 7. Model showing the two Pds5-regulated pathways inhibiting DNA loop expansion through a loop extrusion mechanism. Left: Eco1 inhibits cohesin translocase activity; right: Wpl1 opens the Smc3-Scc1 gate and dissociates cohesin from DNA.

Supplementary Figure Legends

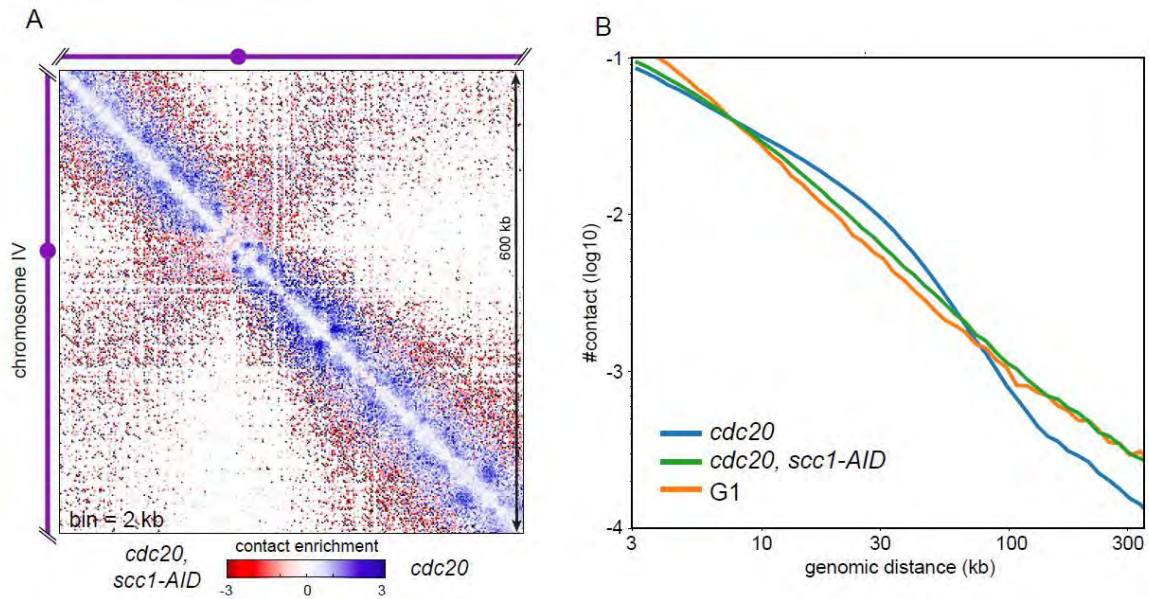


Figure S1. A) Log₂ ratio between Hi-C maps (chromosome IV) from wild type metaphase cells (FB133-57B) vs. metaphase cells depleted for Scc1 (*yLD127-20b*). Blue to red color scale reflects the enrichment in contacts in one population with respect to the other. B) Contact probability as a function of genomic distance $P_c(s)$ (log scale) for strains arrested in metaphase (*cdc20*) or in G1.

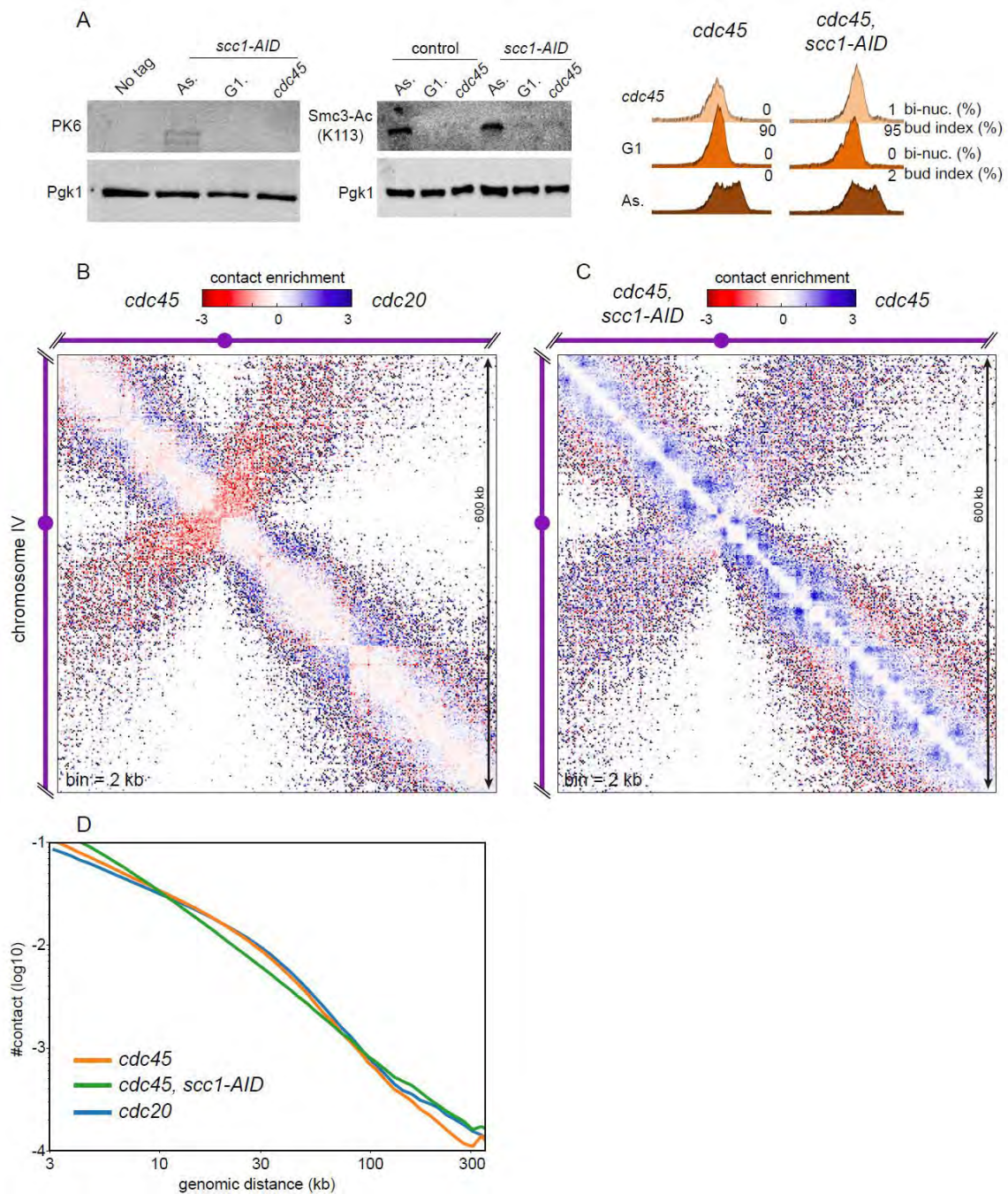


Figure S2. A) Left panel: Western blot against PK tag to assess efficient Scc1 depletion in Cdc45 arrested cells. Middle panel: lack of Smc3-K113 acetylation was also tested (strains FB154 (*cdc45-AID*) and FB149-11B (*cdc45-AID, scc1-AID*)). Pgk1, loading control. Right panel: the absence of replication in Cdc45 blocked cells was monitored by flow cytometry. Percentage of bi-nucleated (anaphase) cells (upper) and budding index (lower) were measured. B) Log2 ratio between Hi-C maps (chromosome IV, 2 kb bin) from wild type metaphase cells (strain FB133-57B) vs. cells depleted for Cdc45 (strain FB154) and cells depleted for Cdc45 (strain FB154) vs. Cdc45 depleted cells without Scc1 (strain FB149-11B). D) Contact

probability as a function of genomic distance $P_c(s)$ (log scale) for strains arrested in G1 (strain FB09-9C), in metaphase (strain FB133-57B) and for cells depleted for Cdc45 (strain FB154).

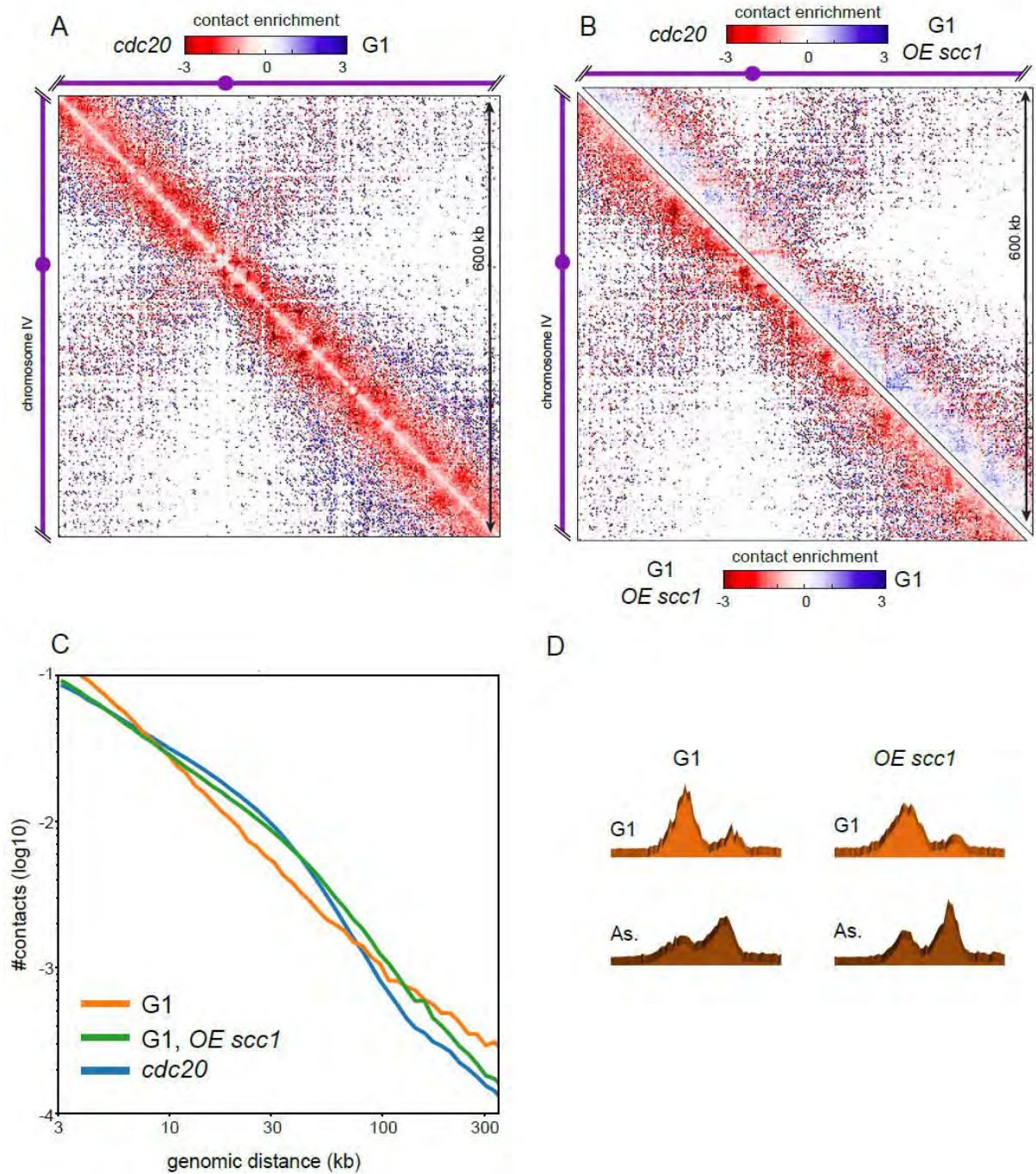


Figure S3. A) Log₂ ratio between Hi-C maps (chromosome IV) of wild type metaphase cells (FB133-57B) vs. G1 arrested cells (FB09-9C). B) Log₂ ratio between Hi-C maps (chromosome IV). Left side: G1 arrested cells (FB09-9C) vs. G1 arrested cells expressing Scc1 (FB09-4A), right side: wild type metaphase cells (FB133-57B) vs. G1 arrested cells expressing Scc1 (FB09-4A). C) $P_c(s)$ for strains arrested in G1, expressing or not non-cleavable version of Scc1 and for strains arrested in metaphase. D) Cell cycle arrest was monitored by flow cytometry.

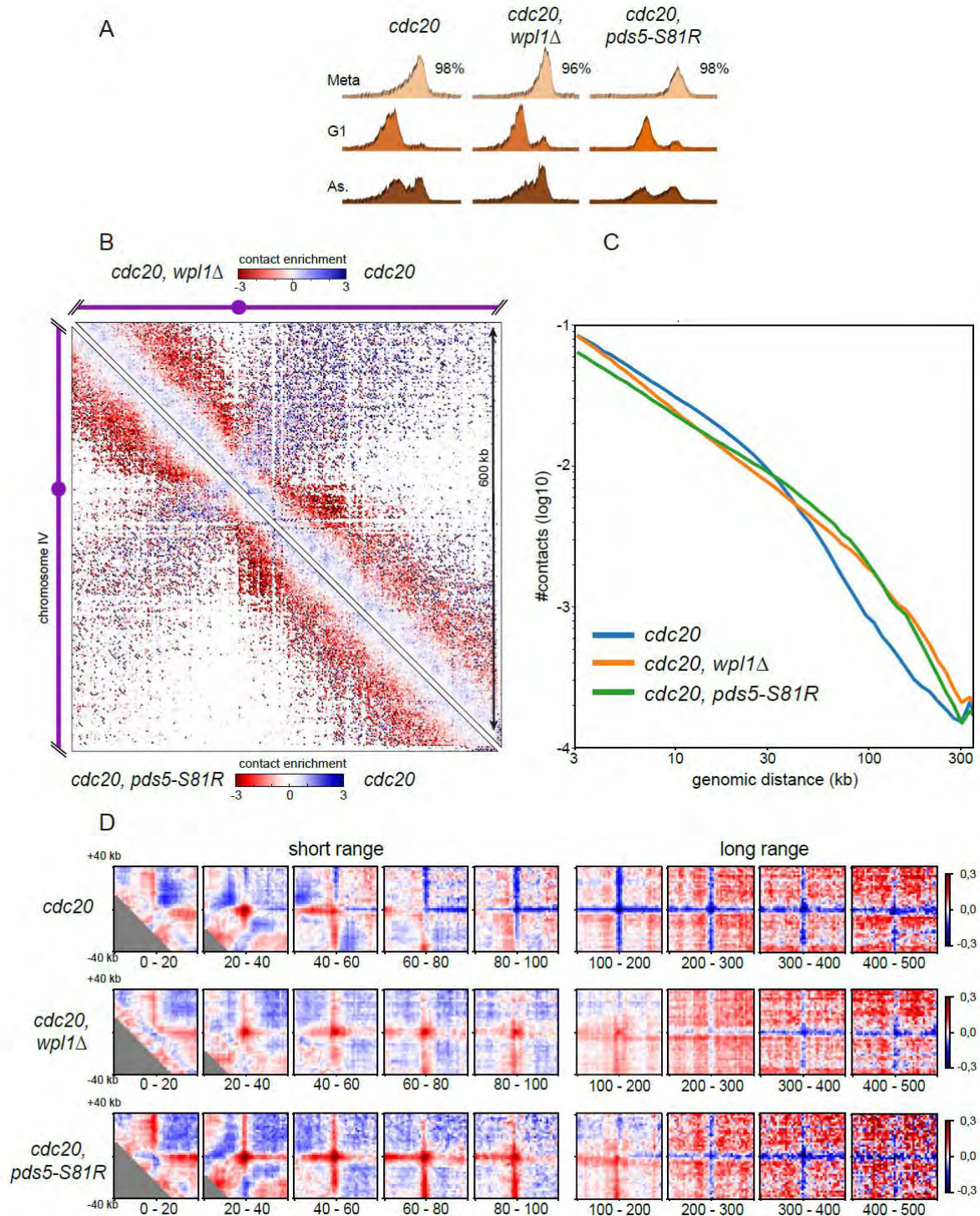


Figure S4. A) Metaphase arrest was monitored by flow cytometry for FB133-57B (control), FB133-49B (*wpl1Δ*) and yLD118-1a (*pds5-S81R*). Percentage of bi-nucleated (anaphase) cells was measured to evaluate the efficiency of the metaphase arrest. B) Log2 ratio between Hi-C maps: *pds5-S81R* vs. control and *wpl1Δ* vs. control. C) Contact probability as a function of genomic distance $P_c(s)$ (log scale) for control, *wpl1Δ* and *pds5-S81R* cells arrested in metaphase. D) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on contacts

between pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions. Scc1-enriched positions were identified in *pds5-S81R* strain arrested in metaphase. E) log-ratios between the cumulated normalized intra-chromosomal contacts made in 80 kb windows (2 kb bin) centered on positions identified by in-house algorithm for loop calling in control, *wpl1* Δ and *pds5-S81R* cells arrested in metaphase.

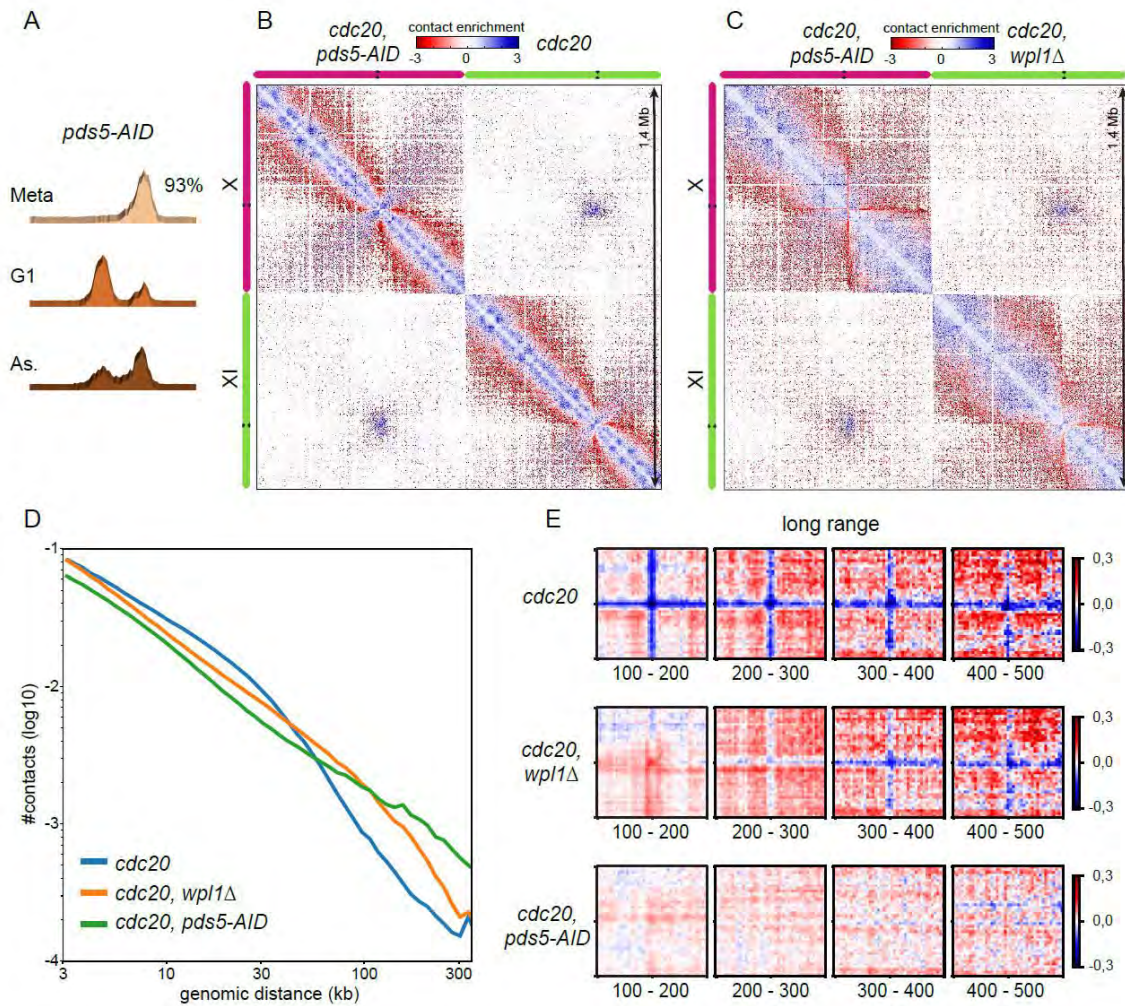


Figure S5. A) Cell cycle arrest was monitored by flow cytometry. Percentage of bi-nucleated (anaphase) cells was measured to evaluate the efficiency of the metaphase arrest. B) Log₂ ratio between Hi-C maps (chromosome X and XI): wild type metaphase cells (FB133-57B) vs. metaphase cells depleted for Pds5 (yLD121-1a). C) Log₂ ratio between Hi-C maps (chromosome X and XI, 2 kb bin): *wpl1Δ* metaphase cells (FB133-49B) vs. metaphase cells depleted for Pds5 (yLD121-1a). D) $P_c(s)$ for control, *wpl1Δ* and *pds5-AID* strains arrested in metaphase. E) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions (Methods). Number of pairs is indicated underneath each window. Ratios are ordered according to the distance between Scc1 enriched positions. Blue color: more contacts between the random genomic regions. Red signal: more contacts between Scc1-enriched regions

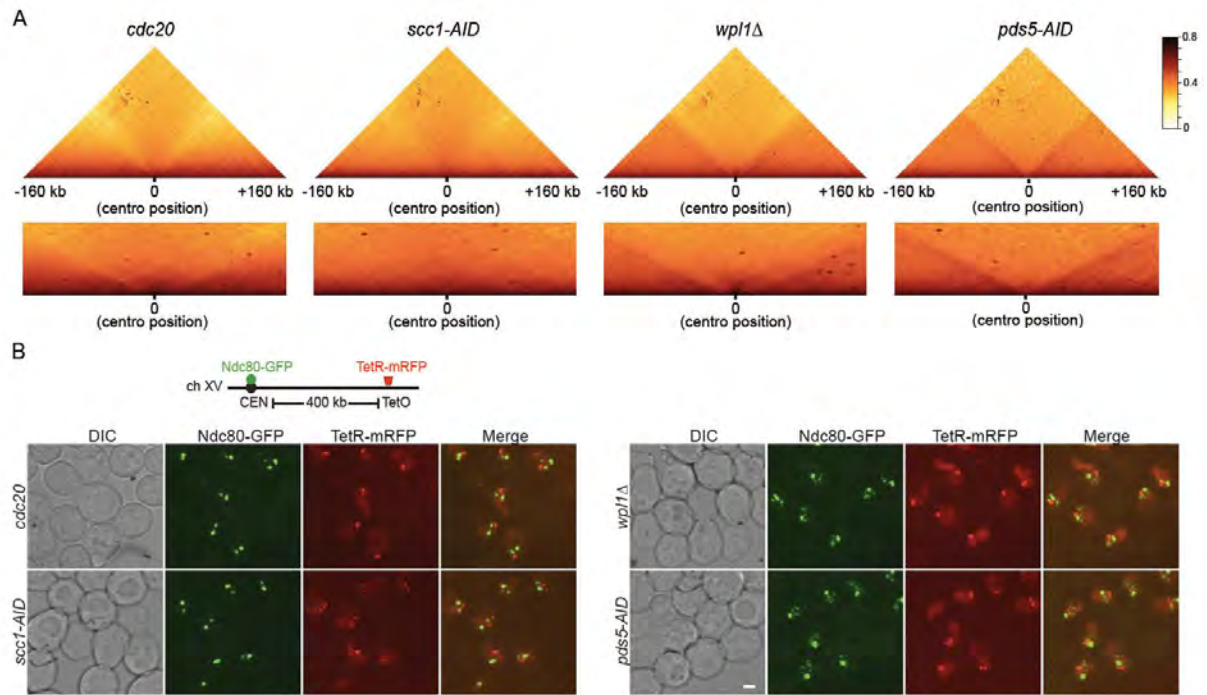


Figure S6. A) Hi-C maps averaged on 16 x 80 kb windows centered on centromeres (1 kb bin) for metaphase arrested strains FB133-57B (*cdc20*), yLD127-20b (*scc1*), FB133-49B (*wpl1Δ*), yLD121-1a (*pds5-AID*). B) H) Fluorescent imaging of strains yLD165-11a (*cdc20*), yLD166-1a (*scc1-AID*), yLD162-1d (*wpl1Δ*) and yLD163-2d (*pds5-AID*) harboring a fluorescently labelled kinetochore (Ndc80-GFP) and a HIS3 gene (TetO/TetR-mRFP). Cells were arrested in media containing nocodazole and Ncd80-GFP and Ter-mRFP were visualized with spinning disk confocal microscopy. Scale bar, 2 μ m.

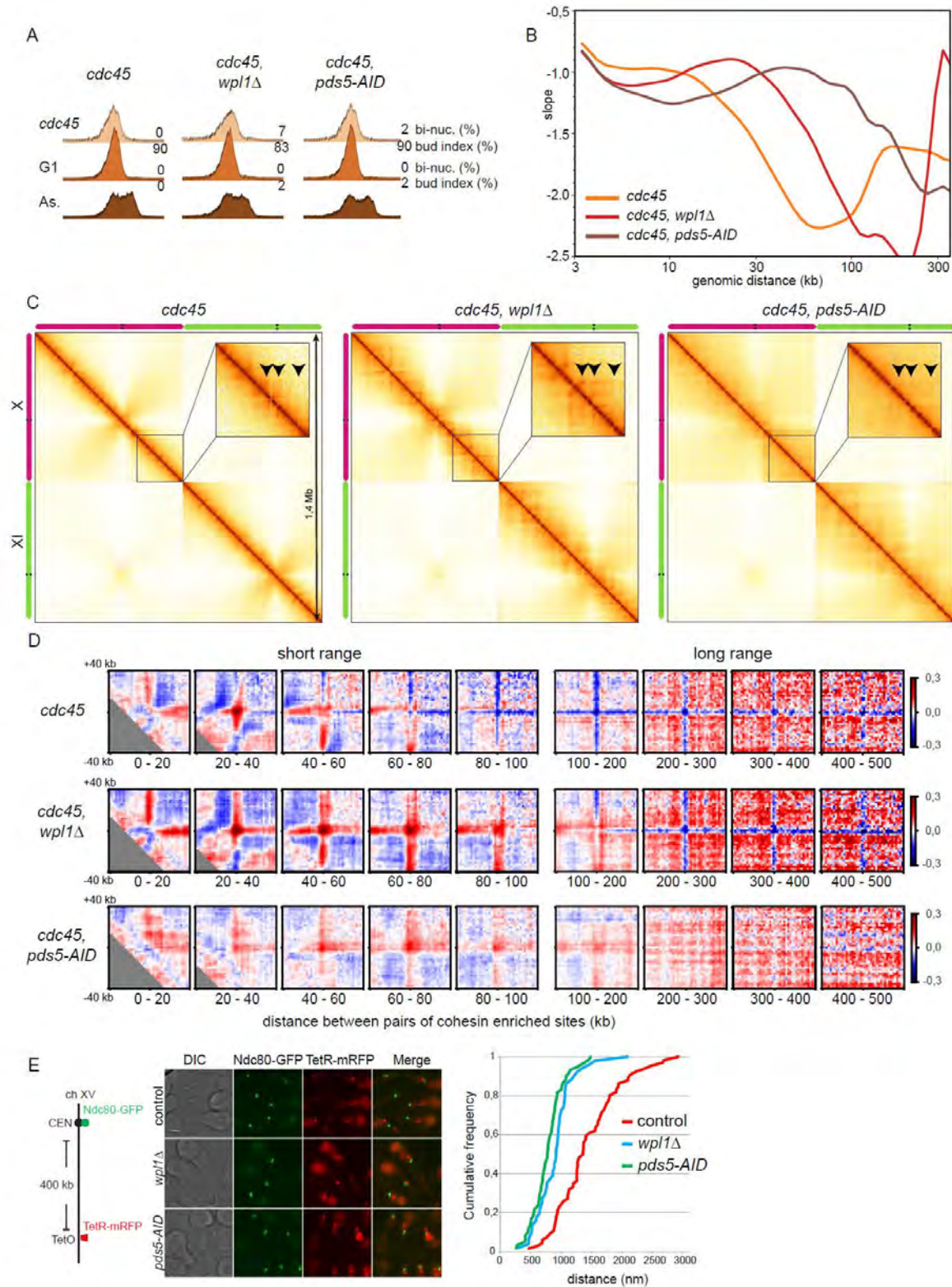


Figure S7. A) Unreplicated mitotic cells without Pds5 or Wpl1 were generated with strains FB154 (control), FB148-3C (*wpl1Δ*) and FB156-5a (*pds5-AID*). Cell cycle was monitored by flow cytometry. Percentage of bi-nucleated (anaphase) cells and budding indexes were measured. B) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance (log scale). C) Hi-C contact maps of unreplicated mitotic cells in absence of Pds5 or

Wpl1 (1 kb bin). D) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on contacts between pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions. Scc1-enriched positions were identified in control, *wpl1Δ* and Pds5 depleted strains. E) Log-ratios between the cumulated normalized intra-chromosomal contacts made in 80 kb windows (2 kb bin) centered on positions identified by in-house algorithm for loop calling in control, *wpl1Δ* and Pds5-depleted cells. F) Fluorescent imaging yLD162-13a (control), yLD162-2b (*wpl1Δ*) and yLD163-22a (*pds5-AID*) strains harboring fluorescently labelled kinetochores (Ndc80-GFP) and HIS3 gene (TetO/TetR-mRFP, 400 kb away from the chromosome XV centromere). Cells were arrested in early S phase by expressing a non-degradable version of Sic1 protein. Scale bar, 2 μm. Distances between kinetochores and the HIS3 locus were measured in each condition and plotted as cumulative distributive functions.

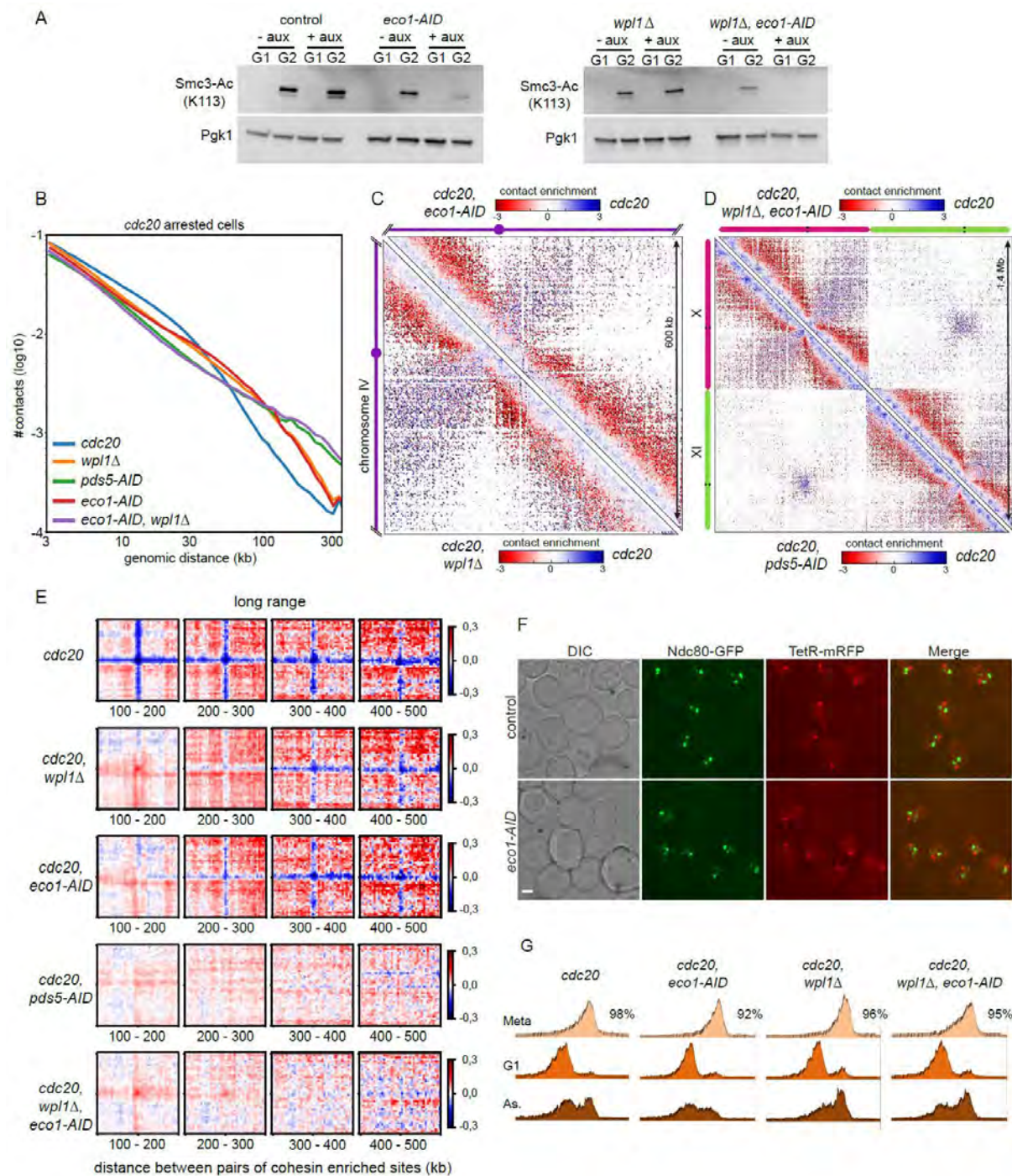


Figure S8. A) Cells were processed from G1 to metaphase in absence or presence of Wpl1 and/or Eco1 (strains FB133-57B (control), FB133-20C (*eco1-AID*), FB133-49B (*wpl1Δ*), and FB133-1D (*eco1-AID/wpl1Δ*)). Eco1 depletion was monitored by western blot against acetylation of its target Smc3-K113. Pgk1, loading control. B) Contact probability as a function of genomic distance $P_c(s)$ (log scale) for FB133-57B (*cdc20*), FB133-49B (*wpl1Δ*), FB133-20C (*eco1-AID*), yLD121-1a (*pds5-AID*) and FB133-1D (*eco1-AID/wpl1Δ*) cells arrested in metaphase. C) and D) Log2 ratio between the indicated Hi-C maps (2 kb bin). E) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on contacts between pairs of Scc1-enriched or

randomly chosen positions. Scc1-enriched positions were identified in the indicated strains. F) Fluorescent imaging of control and *Eco1-AID* strains harboring a fluorescently labelled kinetochore (Ndc80-GFP) and HIS3 gene (TetO/TetR-mRFP). Cells were arrested in G2 using nocodazole treatment (strains FB133-57B (control) and FB133-20C (*eco1-AID*)). G) Cell cycle was monitored by flow cytometry. Percentage of bi-nucleated (anaphase) cells was measured.

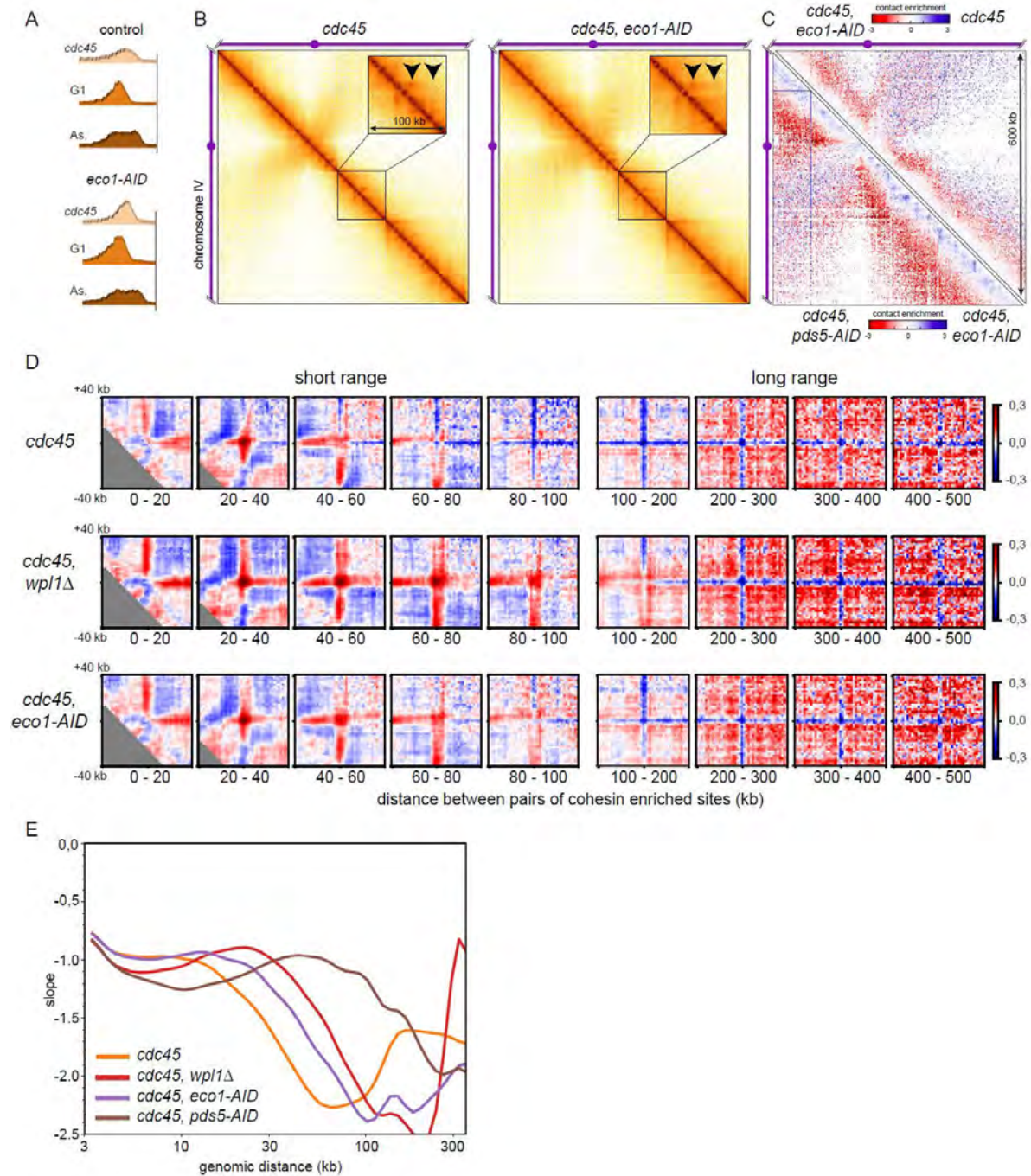


Figure S9. A) Unreplicated mitotic cells with or without Eco1 were generated with strains FB154 (control) and FB162-1C (*eco1-AID*). A) Cell cycle was monitored by flow cytometry. Bi-nucleated (anaphase) cells and budding indexes were measured. B) Hi-C contact maps of unreplicated mitotic cells in presence or absence of Eco1 (1 kb bin). C) Log2 ratio between the indicated Hi-C maps (2 kb bin). D) Agglomerated ratio plots of 80 kb windows (2 kb bin) centered on contacts between pairs of Scc1-enriched or randomly chosen positions. Scc1-enriched positions were identified in the indicated strains. E) Derivative of the curve plotting contact probability as a function of genomic distance (log scale).

STAR Methods

Method details

Media and culture conditions.

All strains are derivatives of W303. Yeast strains used in this work are listed in Supplementary Table 2. Strain yLD118-1a (MET3-CDC20) was grown overnight at 30°C in 150ml of synthetic complete medium deprived of methionine (SC-Met) (SC: 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco)), supplemented with a mix of amino-acids, uracil and adenine, 2% glucose) to reach $4,2 \times 10^8$ cells. To induce metaphase arrest, cells were arrested in G1 for 2h30 by addition of alpha-factor (Antibody-online, ABIN399114) every 30min (1µg/ml final), washed 3 times and released in rich medium (YPD: 1% bacto peptone (Difco), 1% bacto yeast extract (Difco) and 2% glucose) supplemented with methionine (2mM final). 2h latter cells were fixed for Hi-C. Strains yLD127-20b, yLD121-1a, FB133-57B, FB133-20C, FB133-49B, FB133-1D were processed as described above except auxin addition (Sigma-Aldrich, I3750) (1mM final) to the media 1h after starting alpha-factor treatment. Cells were released from G1 in YPD supplemented with methionine and auxin (1mM final). Strains FB08-5C, FB08-6A, FB09-4A, FB09-9C were grown overnight in 300ml of YP medium supplemented with raffinose 2% (Sigma-Aldrich, R0250) to reach $8,4 \times 10^8$ cells. Expression of Scc1(R180D,268D)-HA was induced 1h after starting alpha-factor treatment by addition of newly-made galactose (Sigma-Aldrich, G0750) (2% final) to the cultures. Cells were fixed for Hi-C after 2h30 in alpha-factor. Strains FB154, FB149-11B, FB148-3C, FB156-5a (CDC45-AID) were grown overnight in 150ml YPD to reach $4,2 \times 10^8$ cells. G1 arrest and auxin addition were conducted as previously, (except auxin concentration, 2mM final), cells were released in YPD media supplemented with auxin (2mM final) for 80min and fixed for Hi-C.

Flow cytometry

About $2,8 \times 10^6$ were fixed in ethanol 70% and stored at -20°C. Cells were the pelleted, washed and incubated overnight in Tris-HCl 50mM pH 7,5 complemented with RNase A (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) at 37°C. Cells were pelleted, resuspended 400µl of 1,0mg/ml propidium iodide (Fisher, P3566) in 50mM Tris pH 7,4, NaCl, MgCl₂ and incubated for 1 h at room temperature. Flow cytometry was performed on a CyFlow® ML Analyzer (Partec) and data were analyzed using FloMax software.

Microscopy

Strains FB124, yLD126-38b, yLD126-36c were grown overnight in SC-Met at 30°C. The next day cells were diluted in fresh media. Exponentially growing cells were arrested in G1 with alpha-factor treatment, induced with auxin (1mM final), washed and arrested in metaphase as described above. Strains yLD162-13a, yLD162-2b, yLD163-22a were grown overnight in YP-raffinose at 30°C. The next day, after dilution in fresh media, exponentially growing cells were arrested in G1 with alpha-factor treatment and while being induced with auxin (1mM final). Expression of non-degradable Sic1 was induced 30min before release by addition of galactose (2% final) to the media. Cells were washed and released in YP supplemented with raffinose and galactose for 120min. Cells were placed on 2% agarose pads made of synthetic complete medium plus glucose. Live cell imaging was performed under a spinning disk confocal system (Nipkow Revolution, Andor Technology) with an EM charge-coupled device (CCD) camera (DU 888; Andor Technology) mounted on an inverted microscope (IX-81; Olympus) featuring a CSU22 confocal spinning disk unit (Yokogawa Corporation of America). Image acquisition was done at 30°C. 41 Z-stacking images with 0.25µm intervals were acquired by using IQ2 software with 200ms exposure time. Were used: 100× objective lens (Plan-Apochromat, 1.4 NA, oil immersion; Olympus) and single laser lines for excitation, diode pumped solid state lasers (DPSSL). GFP fluorescence was excited at 488 nm (50 mW; Coherent) and mCherry fluorescence at 561 nm (50 mW; Cobolt jive). Green and red fluorescence were collected using a bi-bandpass emission filter (Em01-R488/568-15; Semrock). Pixel were 65nm in size.

Acetylation assays

A pellet from 10^7 cells was frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C overnight. The cell pellet was resuspended in 100µl H₂O, 20µl trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, T8657) and broken with glass beads at 4°C. Precipitated proteins were resuspended in Laemmly buffer/Tris HCl pH 8,0 and extracted by cycles of 5min heating at 80°C- 5min vortexing at 4°C. Eluates were analyzed by SDS-PAGE followed by western blotting with antibodies anti-V5 tag (VWR, MEDMMM-0168-P), anti-Pgk1 (Invitrogen, 459250) and anti-Smc3-K113Ac (Beckouët et al., 2010).

Hi-C libraries

Hi-C was performed as described (Lazar-Stefanita et al., 2017), except cells were disrupted using a Precellys apparatus (Bertin Instruments) instead of processed through zymolyase treatment. Aliquots of $1-3 \times 10^9$ cells in 150 ml YPD/synthetic medium were fixed in 3% formaldehyde (Sigma, F8775) for 20 min at room temperature and quenched with 25 ml glycine

2.5 M for 20 min at 4°C. Cross-linked cells were recovered through centrifugation, washed with YPD and a 150 mg pellet was stored at -80°C. Hi-C DNA libraries were 500 bp sheared using CovarisS220 apparatus, and the biotin-labeled fragments were selectively captured by Dynabeads Myone Streptavidin C1 (Invitrogen). The resulting libraries were used as template for the Illumina amplification by PE-PCR primers and paired-end sequenced on a NextSeq500 Illumina platform. All Hi-C libraries are listed in Supplementary Table 1.

Processing of the reads and contact map generations

Pairs of reads were aligned independently using Bowtie2 in its most sensitive mode against the latest *S. cerevisiae* W303 reference genome (GCA_002163515.1), corrected for a chromosomal inversion on chromosome 16 revealed by the Hi-C data. Alignment was done using an iterative procedure and each uniquely mapped read was assigned to a restriction fragment. Uncuts, loops and religation events were filtered as described (Cournac et al., 2012). Contact matrices were built with resolutions of 2 or 20kb (bin sizes) and normalized using the sequential component procedure (Cournac et al., 2012). Log-ratios were generated by dividing 2 normalized contact maps, with the same resolution, by one another and then computing the log₂ of the resulting matrix.

Computation of the contact probability as a function of genomic distance

Contact probability as a function of genomic distance $P_c(s)$ was determined as described (Muller et al., 2018). Intra- chromosomal pairs of reads were selected and partitioned by chromosome arms. Pairs oriented towards different directions or separated by less than 1.5 kb were discarded. For each chromosome, the remaining pairs were log- binned as a function of their genomic distance s using the formula: $\text{bin} = [\log_{1.1}(s)]$. The number of read pairs in each bin was counted and weighed by the bin size $1.1(1+\text{bin})$, as well as the difference between the length of the chromosome and the genomic distance.

Identification of cohesin binding-sites and generation of agglomerated-plot

Data from (Petela et al., 2018) were used to generate Scc1 ChIP-Seq profiles with a 2kb resolution. Bins with a signal over 1.5 were labelled as cohesin binding sites (CBS). CBS were determined for wild type and Pds5-AID (Petela et al., 2018) strains. All possible pairs of CBS within chromosomal arms were determined and partitioned according to their genomic distance. In 2kb resolution contact maps, windows surrounding these positions were extracted and averaged. The resulting observed signal was divided by the expected signal, generated by

averaging the windows around random positions having the same genomic distance as the pairs of CBS. For each window, undercovered bins were defined as bins with a total number of reads under $median (number\ of\ reads / bin) - SD$ and excluded of the averaging operations to reduce noise.

Supplementary Table 1. Hi-C libraries

Strain name	Phenotype	Arrest	Total number of reads	Reads with both ends aligned	Reads in contact map	Uncuts (% aligned read pairs)	inter/ (inter + intra) %
FB133-57B	-	M	115 181 529	74 785 457	55 761 559	23	29
yLD127-20b	<i>scc1-AID</i>		139 396 391	100 318 992	38 393 392	59	45
FB133-49B	<i>wpl1Δ</i>		124 084 984	80 552 158	63 345 225	20	28
yLD118-1a	<i>pds5-S81R</i>		28 291 983	20 412 247	14 044 165	29	28
yLD121-1a	<i>pds5-AID</i>		132 682 389	89 067 843	42 402 725	51	41
FB133-20C	<i>eco1-AID</i>		82 461 332	49 920 951	34 040 564	29	27
FB133-1D	<i>wpl1Δ + eco1-AID</i>		50 544 556	31 939 506	24 990 250	20	30
FB09-9C	-	G1	138 160 380	81 733 469	19 814 303	73	48
FB09-4A	OE <i>scc1</i>		134 032 677	92 929 058	51 358 907	43	34
FB154	<i>cdc45</i>	M, no replication	226 741 018	85 801 135	34 540 698	60	21
FB149-11B	<i>cdc45 + scc1-AID</i>		54 639 308	38 119 307	31 872 880	14	32
FB148-3C	<i>cdc45 + wpl1Δ</i>		57 375 740	41 396 282	34 518 348	14	17
FB159-5a	<i>cdc45 + pds5-AID</i>		126 476 226	89 067 843	42 402 725	10	22
FB162-1c	<i>cdc45 + eco1-AID</i>		147 317 971	73 288 820	42 419 690	41	20

Supplementary Table 2. Strain list

Strain name	Genetic background	Genotype	Cell cycle phase	Reference
yLD118-1a	W303	Mat a, <i>ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, can1-100, pds5S81R::HIS3, TRP1:Metp:CDC20</i>	Metaphase	This study
yLD127-20b	W303	Mat a, <i>ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, can1-100, Scc1-PK3-aid::KanMX4, his3::ADH1promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, TRP1:Metp:CDC20</i>	Metaphase	This study
yLD121-1a	W303	Mat a, <i>ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, can1-100, his3::ADH1promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, Pds5-AID::KanMx, TRP1:Metp:CDC20</i>	Metaphase	This study
FB09-4A	W303	Mat a, <i>his3-11,15, trp1-1, can1-100, Scc1-PK9::KanMX, leu::GalScc1(R180D,268D)-HA3::LEU (single integrant), rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, FOB1</i>	G1 (alpha-factor)	This study
FB09-9C	W303	Mat a, <i>leu2-3,112, trp1-1, his3-11,15, can1-100, Scc1-PK9::KanMX, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1 (alpha-factor)	This study
FB133-57B	W303	Mat a, <i>ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, TRP1:Metp:CDC20</i>	Metaphase	This study
FB133-20C	W303	Mat a, <i>ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-</i>	Metaphase	This study

		9myc::URA3, Eco1-PK3-aid::KanMx4, TRP1:Metp:CDC20		
FB133-49B	W303	Mat a, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, wpl1Δ:: hghMX, TRP1:Metp:CDC20	Metaphase	This study
FB133-1D	W303	Mat a, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Eco1-PK3-aid::KanMx4, wpl1Δ:: hghMX, TRP1:Metp:CDC20	Metaphase	This study
FB154	W303	Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5-aid::KanMX4, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3	Metaphase without replication	This study
FB149-11B	W303	Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5-aid::KanMX4, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, Scc1-PK3-aid::KanMX4,	Metaphase without replication	This study
FB148-3C	W303	Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5-aid::KanMX4, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, wpl1Δ:: hghMX	Metaphase without replication	This study
FB156-5a	W303	Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5-aid::KanMX4, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, Pds5-Pk3-AID::KanMx4	Metaphase without replication	This study
FB162-1c	W303	Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5-aid::KanMX4, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, Eco1-PK3-aid::KanMx4	Metaphase without replication	This study
FB124	W303	Mat a, ade2-1, trp1-1, can1-100, MET3p-CDC20::NatMX4, tetR-GFP:LEU2, ura::3XURA3tetO112, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, Scc1-PK3-AID::KanMX4	Metaphase	This study
yLD126-38b	W303	Mat a, ade2-1, trp1-1, can1-100, MET3p-CDC20::NatMX4, tetR-GFP:LEU2, ura::3XURA3tetO112, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, Pds5-AID::KanMx	Metaphase	This study
yLD126-36c	W303	Mat a, ade2-1, trp1-1, can1-100, MET3p-CDC20::NatMX4, tetR-GFP:LEU2, ura::3XURA3tetO112, his3::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::HIS3	Metaphase	This study
yLD162-13a	W303	Mat a, ADE2, trp1-1, can1-100, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV	Early S	This study

		his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, leu2::Gal1p-Sic1(9m)/His3p-Gal1/His3p-Gal2/Gal1p-Gal4::LEU2		
yLD162-2b	W303	Mat a, ADE2, trp1-1, can1-100, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, leu2::Gal1p-Sic1(9m)/His3p-Gal1/His3p-Gal2/Gal1p-Gal4::LEU2, wpl1Δ::hghMX	Early S	This study
yLD163-22a	W303	Mat a, ADE2, trp1-1, can1-100, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, leu2::Gal1p-Sic1(9m)/His3p-Gal1/His3p-Gal2/Gal1p-Gal4::LEU2, Pds5-AID::KanMx	Early S	This study
yLD162-10b	W303	Mata, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3	Metaphase (Noco)	This study
yLD166-1a	W303	Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Scc1-PK3-aid::KanMX4	Metaphase (Noco)	This study
yLD162-1d	W303	Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, wpl1Δ::hghMX	Metaphase (Noco)	This study
yLD163-2d	W303	Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Pds5-AID::KanMx	Metaphase (Noco)	This study
yLD165-11a	W303	Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Eco1-PK3-aid::KanMx4	Metaphase (Noco)	This study

K26270	W303	S. cerevisiae Mat a, SCC1-HA6::HIS3, ura3::ADH1P-OsTIR1-9MYC::URA3, PDS5-PK3-AID::KANMX4, leu2::GAL1P-SIC1(9m)/HIS3P-GAL1/HIS3P-GAL2/GAL1P-GAL4::LEU2	G2	14
K26277	W303	S. cerevisiae Mat a, SCC1-HA6::HIS3, leu2::GAL1P-SIC1(9m)/HIS3P-GAL1/HIS3P-GAL2/GAL1P-GAL4::LEU2	G2	14

Bibliography

- Beckouët, F., Hu, B., Roig, M.B., Sutani, T., Komata, M., Uluocak, P., Katis, V.L., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2010). An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion. *Mol. Cell* *39*, 689–699.
- Beckouët, F., Srinivasan, M., Roig, M.B., Chan, K.-L., Scheinost, J.C., Batty, P., Hu, B., Petela, N., Gligoris, T., Smith, A.C., et al. (2016). Releasing activity disengages cohesin's smc3/scc1 interface in a process blocked by acetylation. *Mol. Cell* *61*, 563–574.
- Busslinger, G.A., Stocsits, R.R., van der Lelij, P., Axelsson, E., Tedeschi, A., Galjart, N., and Peters, J.-M. (2017). Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature* *544*, 503–507.
- Cavalli, G., and Misteli, T. (2013). Functional implications of genome topology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 290–299.
- Chan, K.-L., Roig, M.B., Hu, B., Beckouët, F., Metson, J., and Nasmyth, K. (2012). Cohesin's DNA exit gate is distinct from its entrance gate and is regulated by acetylation. *Cell* *150*, 961–974.
- Chan, K.-L., Gligoris, T., Upcher, W., Kato, Y., Shirahige, K., Nasmyth, K., and Beckouët, F. (2013). Pds5 promotes and protects cohesin acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 13020–13025.
- Chapard, C., Jones, R., van Oepen, T., Scheinost, J.C., and Nasmyth, K. (2019). Sister DNA Entrapment between Juxtaposed Smc Heads and Kleisin of the Cohesin Complex. *Mol. Cell*.
- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., Shevchenko, A., and Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol. Cell* *5*, 243–254.
- Dekker, J., and Mirny, L. (2016). The 3D genome as moderator of chromosomal communication. *Cell* *164*, 1110–1121.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., and Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science* *295*, 1306–1311.
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L.A. (2016). Formation of chromosomal domains by loop extrusion. *Cell Rep.* *15*, 2038–2049.
- Gandhi, R., Gillespie, P.J., and Hirano, T. (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr. Biol.* *16*, 2406–2417.
- 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.
- Gassler, J., Brandão, H.B., Imakaev, M., Flyamer, I.M., Ladstätter, S., Bickmore, W.A., Peters, J.-M., Mirny, L.A., and Tachibana, K. (2017). A mechanism of cohesin-dependent loop extrusion organizes zygotic genome architecture. *EMBO J.* *36*, 3600–3618.
- Gibcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M.T., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* *359*.
- Gligoris, T.G., Scheinost, J.C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K.-L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2014). Closing the cohesin ring: structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science* *346*, 963–967.
- Guacci, V., Hogan, E., and Koshland, D. (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J. Cell Biol.* *125*, 517–530.
- Haarhuis, J.H., and Rowland, B.D. (2017). Cohesin: building loops, but not compartments. *EMBO J.* *36*, 3549–3551.
- Haering, C.H., Löwe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* *9*, 773–788.
- Haering, C.H., Farcas, A.-M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The

cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 454, 297–301.

Hu, B., Itoh, T., Mishra, A., Katoh, Y., Chan, K.-L., Upcher, W., Godlee, C., Roig, M.B., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2011). ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. *Curr. Biol.* 21, 12–24.

Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430–435.

Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127, 955–967.

Lazar-Stefanita, L., Scolari, V.F., Mercy, G., Muller, H., Guérin, T.M., Thierry, A., Mozziconacci, J., and Koszul, R. (2017). Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. *EMBO J.* 36, 2684–2697.

Le, T.B.K., Imakaev, M.V., Mirny, L.A., and Laub, M.T. (2013). High-resolution mapping of the spatial organization of a bacterial chromosome. *Science* 342, 731–734.

Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G.P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2004). Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* 430, 573–578.

Liang, Z., Zickler, D., Prentiss, M., Chang, F.S., Witz, G., Maeshima, K., and Kleckner, N. (2015). Chromosomes progress to metaphase in multiple discrete steps via global compaction/expansion cycles. *Cell* 161, 1124–1137.

Lioy, V.S., Cournac, A., Marbouty, M., Duigou, S., Mozziconacci, J., Espéli, O., Bocard, F., and Koszul, R. (2018). Multiscale Structuring of the E. coli Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. *Cell* 172, 771–783.e18.

Marbouty, M., Le Gall, A., Cattoni, D.I., Cournac, A., Koh, A., Fiche, J.-B., Mozziconacci, J., Murray, H., Koszul, R., and Nollmann, M. (2015). Condensin- and Replication-Mediated Bacterial Chromosome Folding and Origin Condensation Revealed by Hi-C and Super-resolution Imaging. *Mol. Cell* 59, 588–602.

Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., et al. (2015). Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2. *Curr. Biol.* 25, 1694–1706.

Mizuguchi, T., Fudenberg, G., Mehta, S., Belton, J.-M., Taneja, N., Folco, H.D., FitzGerald, P., Dekker, J., Mirny, L., Barrowman, J., et al. (2014). Cohesin-dependent globules and heterochromatin shape 3D genome architecture in *S. pombe*. *Nature* 516, 432–435.

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

Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell* 163, 1628–1640.

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

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 43, 525–558.

Noble, D., Kenna, M.A., Dix, M., Skibbens, R.V., Unal, E., and Guacci, V. (2006). Intersection between the regulators of sister chromatid cohesion establishment and maintenance in budding yeast indicates a multi-step mechanism. *Cell Cycle* 5, 2528–2536.

Nora, E.P., Goloborodko, A., Valton, A.-L., Gibcus, J.H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, L.A., and Bruneau, B.G. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization.

Cell 169, 930–944.e22.

Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., et al. (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132, 422–433.

Petela, N.J., Gligoris, T.G., Metson, J., Lee, B.-G., Voulgaris, M., Hu, B., Kikuchi, S., Chapard, C., Chen, W., Rajendra, E., et al. (2018). Scc2 Is a Potent Activator of Cohesin's ATPase that Promotes Loading by Binding Scc1 without Pds5. *Mol. Cell* 70, 1134–1148.e7.

Rolef Ben-Shahar, T., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M., and Uhlmann, F. (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321, 563–566.

Rowland, B.D., Roig, M.B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouët, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., et al. (2009). Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol. Cell* 33, 763–774.

Schalbetter, S.A., Goloborodko, A., Fudenberg, G., Belton, J.-M., Miles, C., Yu, M., Dekker, J., Mirny, L., and Baxter, J. (2017). SMC complexes differentially compact mitotic chromosomes according to genomic context. *Nat. Cell Biol.* 19, 1071–1080.

Tercero, J.A., Labib, K., and Diffley, J.F. (2000). DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *EMBO J.* 19, 2082–2093.

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

Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375–386.

Unal, E., Heidinger-Pauli, J.M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S.P., and Koshland, D.E. (2008). A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321, 566–569.

Vaur, S., Feytout, A., Vazquez, S., and Javerzat, J.-P. (2012). Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin-chromosome interaction. *EMBO Rep.* 13, 645–652.

Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D.A., Stocsits, R.R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M.J., et al. (2017). Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *EMBO J.* 36, 3573–3599.

Yu, M., and Ren, B. (2017). The Three-Dimensional Organization of Mammalian Genomes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 265–289.

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
DpnII	New England Biolabs	Cat# R0543L
T4 DNA ligase	Thermo Scientific	Cat# EL0012
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific	Cat# F-530S
Critical Commercial Assays		
MinElute PCR purification Kit	QIAGEN	Cat# 28004
QIAquick PCR purification Kit	QIAGEN	Cat# 28104
Deposited Data		
HiC Data, see Table S1	This paper	SRA: pending
ChIP-seq of Scc1, ChIP (<i>S. cerevisiae</i> W303, arrest 1hour after G1 synchro)	Hu et al., 2015	SRA: SRR2065092
ChIP-seq of Scc1, input (<i>S. cerevisiae</i> W303, arrest 1hour after G1 synchro)	Hu et al., 2015	SRA: SRR2065097
ChIP-seq of Scc1, input (<i>S. cerevisiae</i> W303 Pds5-AID,)	Petela et al. 2018	SRA: SRR6218577
ChIP-seq of Scc1, input (<i>S. cerevisiae</i> W303 Pds5-AID,)	Petela et al., 2018	SRA: SRR6218576
Imaging data		
Will be deposited in Mendeley dataset	This paper	DOI URL to be included
Software and Algorithms		
Bowtie2	Langmead and Salzberg, 2012	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
SCN procedure	Cournac et al., 2012; 2016	N/A
Yeast strain name		
yLD118-1a Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, can1-100, pds5S81R::HIS3, TRP1:Metp:CDC20	This study	N/A
yLD127-20b Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, can1-100, Scc1-PK3-aid::KanMX4,	This study	N/A

his3::ADH1promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, TRP1:Metp:CDC20		
yLD121-1a Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, can1-100, his3::ADH1promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, Pds5-AID::KanMx, TRP1:Metp:CDC20	This study	N/A
FB09-4A Mat a, his3-11,15, trp1-1, can1-100, Scc1-PK9::KanMX, leu::GalScc1(R180D,268D)-HA3::LEU (single integrant), rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2 , FOB1	(Dauban et al. 2019)	N/A
FB09-9C Mat a, leu2-3,112, trp1-1, his3-11,15, can1-100, Scc1-PK9::KanMX, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2	(Dauban et al. 2019)	N/A
FB133-57B Mat a, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, TRP1:Metp:CDC20	This study	N/A
FB133-20C Mat a, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Eco1-PK3-aid::KanMx4, TRP1:Metp:CDC20	This study	N/A
FB133-49B Mat a, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-	This study	N/A

Bibliography

9myc::URA3, wpl1Δ:: hghMX, TRP1:Metp:CDC20		
FB133-1D Mat a, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, ura::ADH1 promoter-OsTIR1- 9myc::URA3, Eco1-PK3- aid::KanMx4, wpl1Δ:: hghMX, TRP1:Metp:CDC20	This study	N/A
FB154 Mat a, ade2-1, ura3- 1, leu2-3,112, trp1-1, can1- 100, CDC45-Flagx5- aid::KanMX4, his3::ADH1promoter- OsTIR1-9myc::HIS3	This study	N/A
FB149-11B Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5- aid::KanMX4, his3::ADH1promoter- OsTIR1-9myc::HIS3, Scc1- PK3-aid::KanMX4	This study	N/A
FB148-3C Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5- aid::KanMX4, his3::ADH1promoter- OsTIR1-9myc::HIS3, wpl1Δ:: hghMX	This study	N/A
FB156-5a Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5- aid::KanMX4, his3::ADH1promoter- OsTIR1-9myc::HIS3, Pds5- Pk3-AID::KanMx4	This study	N/A
FB162-1c Mat a, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, CDC45-Flagx5- aid::KanMX4, his3::ADH1promoter-	This study	N/A

OstIR1-9myc::HIS3, Eco1-PK3-aid::KanMx4		
FB124 Mat a, ade2-1, trp1-1, can1-100, MET3p-CDC20::NatMX4, tetR-GFP:LEU2, ura::3XURA3tetO112, his3::ADH1promoter-OstIR1-9myc::HIS3, Scc1-PK3-AID::KanMX4	This study	N/A
yLD126-38b Mat a, ade2-1, trp1-1, can1-100, MET3p-CDC20::NatMX4, tetR-GFP:LEU2, ura::3XURA3tetO112, his3::ADH1promoter-OstIR1-9myc::HIS3, Pds5-AID::KanMx	This study	N/A
yLD126-36c Mat a, ade2-1, trp1-1, can1-100, MET3p-CDC20::NatMX4, tetR-GFP:LEU2, ura::3XURA3tetO112, his3::ADH1promoter-OstIR1-9myc::HIS3	This study	N/A
yLD162-13a Mat a, ADE2, trp1-1, can1-100, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OstIR1-9myc::URA3, leu2::Gal1p-Sic1(9m)/His3p-Gal1/His3p-Gal2/Gal1p-Gal4::LEU2	This study	N/A
yLD162-2b Mat a, ADE2, trp1-1, can1-100, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1	This study	N/A

promoter-OsTIR1-9myc::URA3, leu2::Gal1p-Sic1(9m)/His3p-Gal1/His3p-Gal2/Gal1p-Gal4::LEU2, wpl1Δ:: hghMX		
yLD163-22a Mat a, ADE2, trp1-1, can1-100, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, leu2::Gal1p-Sic1(9m)/His3p-Gal1/His3p-Gal2/Gal1p-Gal4::LEU2, Pds5-AID::KanMx	This study	N/A
yLD162-10b Mata, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3	This study	N/A
yLD166-1a Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Scc1-PK3-aid::KanMX4	This study	N/A
yLD162-1d Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, wpl1Δ:: hghMX	This study	N/A

yLD163-2d Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Pds5-AID::KanMx	This study	N/A
yLD165-11a Mat a, ADE2, can1-100, trp1-1, YGL117-TetR-mRFP-NATMX, ChrXV his3::tetO112::HIS3 (+710kb), NDC80-3XGFP::KanMX4, ura::ADH1 promoter-OsTIR1-9myc::URA3, Eco1-PK3-aid::KanMx4	This study	N/A
K26270 Mat a, SCC1-HA6::HIS3, ura3::ADH1P-OsTIR1-9MYC::URA3, PDS5-PK3-AID::KANMX4, leu2::GAL1P-SIC1(9m)/HIS3P-GAL1/HIS3P-GAL2/GAL1P-GAL4::LEU2	This study	N/A
K26277 Mat a, SCC1-HA6::HIS3, leu2::GAL1P-SIC1(9m)/HIS3P-GAL1/HIS3P-GAL2/GAL1P-GAL4::LEU2	This study	N/A

Dauban, L., Kamgoue, A., Wang, R., Léger-Silvestre, I., Beckouët, F., Cantaloube, S. and Gadal, O. 2019. Quantification of the dynamic behaviour of ribosomal DNA genes and nucleolus during yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Structural Biology*.

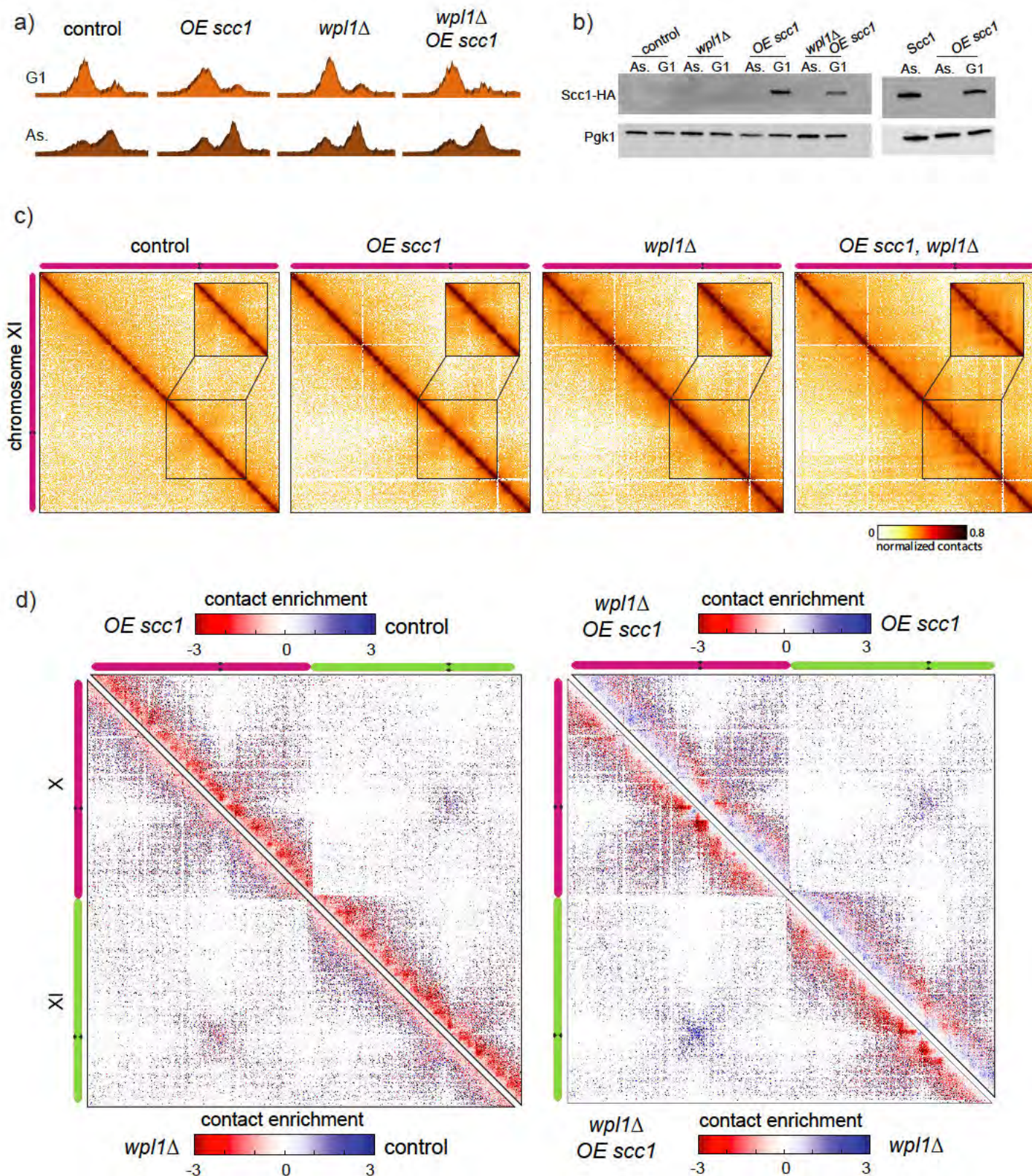


Figure 45 : Les contacts à longue distance sont favorisés lorsque les cohésines sont stabilisées par invalidation de *Wpl1* en G1. Les souches contrôle (FB09-9C), *OE scc1* (FB09-4A), *wpl1Δ* (FB08-6A) et *OE scc1, wpl1Δ* (FB08-5C) sont arrêtées en G1 en présence de galactose pour induire l'expression de *scc1*. L'arrêt des cellules en G1 et l'accumulation de *scc1* ont été contrôlés par cytométrie en flux (a) et Western blot (b) respectivement. c) Cartes de contacts Hi-C du chromosome XI pour les souches indiquées. 1 pixel, 2 kb. d) Log2 ratio entre les cartes de contacts générées dans les conditions indiquées, pour les chromosomes X et XI. L'échelle de couleur de rouge à bleu reflète l'enrichissement de contacts dans une population par rapport à l'autre. 1 pixel, 2 kb.

C. Résultats supplémentaires

Certains résultats générés au cours de cette collaboration n'ont pas été intégrés dans la publication présentée ci avant. J'ai choisi de détailler ici nos résultats qui ont permis de préciser le rôle de Wpl1 sur l'organisation du génome en G1. Les souches et les méthodes utilisées sont détaillées dans la partie Annexe I.

Au cours des travaux présentés dans l'article incorporé ci-dessus, nous avons montré que l'expression des cohésines en phase G1 (cohésines non clivables par la séparase ; G1, *OE scc1*) suffisait à réorganiser le génome. En effet, dans ces conditions les contacts chromosomiques à longue distance sont favorisés et des domaines d'interactions semblables à ceux observés en mitose sont formés. Toutefois, la taille des boucles de chromatine détectées en G1 (75 kb, *OE scc1*) était supérieure à celle des boucles détectées en mitose (35 kb, *cdc20*) (voir la Figure 1 de l'article I).

Nous nous sommes demandés si la stabilisation des cohésines en G1, par invalidation de Wpl1, pouvait conduire à l'élargissement des boucles de chromatine (Tedeschi et al., 2013; Wutz et al., 2017). Pour cela, des souches de levure invalidées pour Wpl1 (*wpl1Δ*) ont été synchronisées en G1 et l'expression de Scc1 non clivable a été induite par ajout de galactose dans le milieu. Ces cellules ont été traitées pour l'analyse en Hi-C (Figure 45a, b). De manière surprenante, nous avons observé une légère réorganisation des chromosomes en G1 lors de la seule invalidation de Wpl1, sans expression des cohésines (*wpl1Δ*). Des domaines d'interaction étaient visualisables le long des bras des chromosomes (Figure 45c) et les régions centromériques semblaient plus isolées du reste du génome (Figure 45d). Cependant les pics d'enrichissement des cohésines ne semblaient pas former de boucles stables (Figure 46) et les dérivées des courbes de probabilités de contacts entre les conditions *wpl1Δ* et contrôle avaient un profil similaire (Figure 47, gauche). L'invalidation de *WPL1* semble donc induire une réorganisation mineure des chromosomes en G1. Wpl1 étant impliquée dans la dissociation des cohésines de l'ADN (Rowland et al., 2009; Sutani et al., 2009), on peut envisager que lors de la mitose les cohésines n'aient pas été entièrement dissociées des chromosomes et que la présence résiduelle de complexes sur l'ADN entraîne une réorganisation mineure des chromosomes en G1. Afin d'éviter tout biais lié au cycle précédent sur nos résultats, nous avons cherché à invalider Wpl1 en G1 de manière conditionnelle. Cependant l'ajout d'auxine dans une souche Wpl1-AID n'a conduit qu'à une dégradation partielle de la

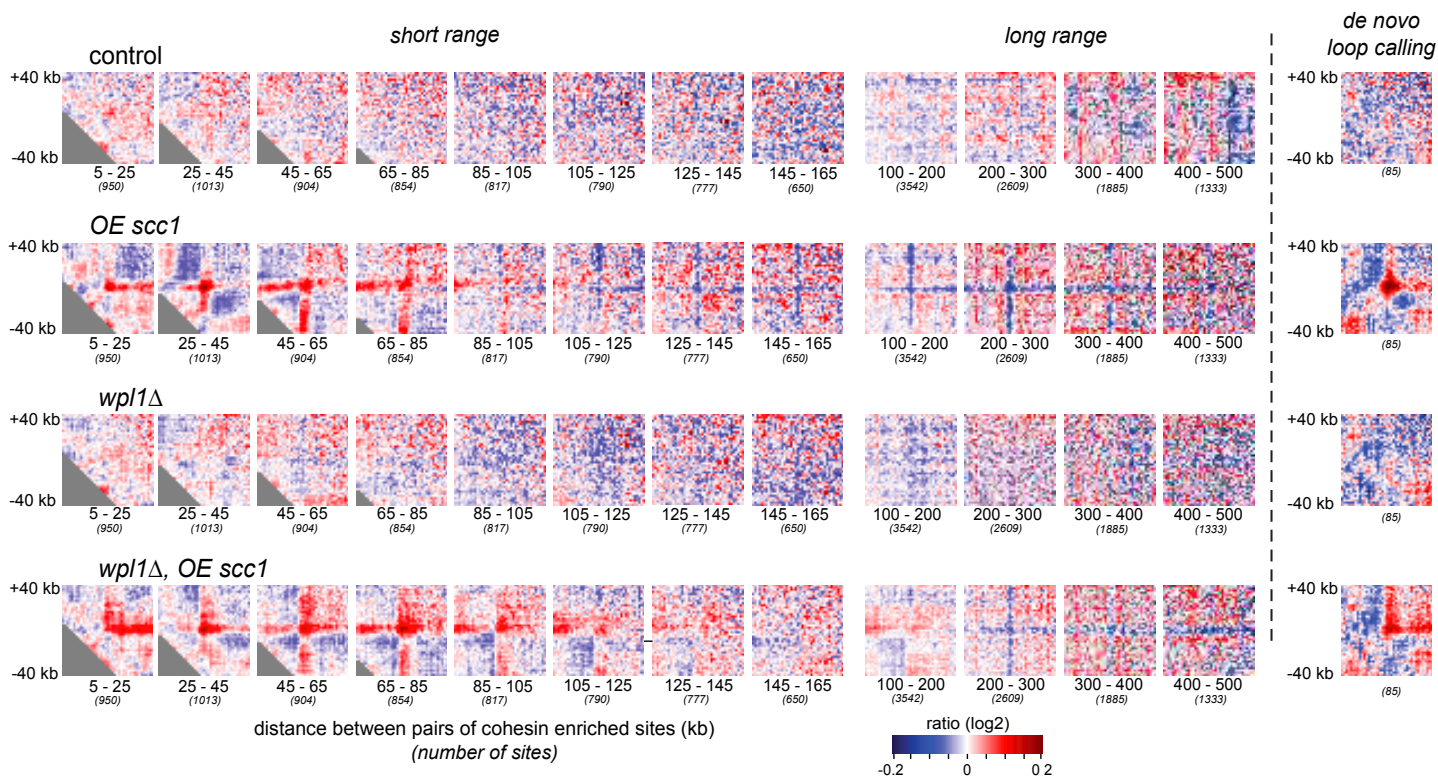


Figure 46 : Wpl1 inhibe l'expansion des boucles de chromatine dépendantes des cohésines en G1. Cartes de contacts agglomérées, centrées sur le site d'interaction entre deux pics d'enrichissement de cohésines, séparés par des distances croissantes. Un signal rouge au centre de la carte reflète l'interaction entre des pics de cohésine séparés par la distance considérée. Mêmes souches et conditions que celles utilisées en Figure 45.

protéine. Nous n'avons donc pas été en mesure d'analyser la réorganisation des chromosomes après inactivation de Wpl1 en G1.

En revanche, la surexpression de Scc1 en l'absence de Wpl1 (*wpl1Δ*, *OE scc1*) a conduit à une réorganisation plus importante des chromosomes : la taille des domaines d'interaction paraissait augmentée, que ce soit par rapport aux conditions *wpl1Δ* ou *OE scc1* seules (Figure 45c). De plus, des contacts entre les pics d'enrichissement des cohésines généraient dans ces conditions des boucles stables pouvant atteindre 95 kb (*wpl1Δ*, *OE scc1*, Figure 46). Nous avons également constaté une augmentation modeste des contacts à longue distance (Figure 47, gauche). Toutefois, ces réorganisations étaient peu visibles sur la carte de contact du ratio entre les conditions *wpl1Δ*, *OE scc1* et *OE scc1* (la carte apparaît majoritairement blanche, Figure 45d). La stabilisation des cohésines sur l'ADN par invalidation de Wpl1 semblait réorganiser majoritairement les régions centromériques qui apparaissent alors engagées dans des interactions longues distances avec les bras des chromosomes (Figure 45d).

En conclusion, l'expression de cohésines non clivables en G1 induit la formation de contacts à longue distance le long des chromosomes et la stabilisation de boucles de chromatine pouvant atteindre 75 kb. La stabilisation des cohésines par invalidation de Wpl1 dans ces conditions conduit à une réorganisation des chromosomes, caractérisée par l'augmentation de la taille des boucles de chromatine (95kb environ) et l'engagement des centromères dans des interactions avec les bras des chromosomes.

L'invalidation de Wpl1 n'a pas les mêmes conséquences sur l'organisation des chromosomes mitotiques (*cdc20*) ou chargés « artificiellement » par les cohésines en G1 (*OE scc1*). En G1 la réorganisation des chromosomes semble impliquer majoritairement les centromères (Figure 45d) alors qu'en mitose les effets sont beaucoup plus forts et visualisables également sur les bras des chromosomes (Article I). Ceci est notamment appréciable sur la courbe de la dérivée des probabilités de contacts : comparer les conditions //*OE scc1* vs. *OE scc1*, *wpl1Δ*// avec les conditions //*cdc20* vs. *cdc20*, *wpl1Δ*// ou //*cdc45* vs. *cdc45*, *wpl1Δ*// (Figure 47). Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces résultats :

1) Une activité réduite de Wpl1 en G1 comparativement à la mitose. Le complexe cohésine étant absent des chromosomes en G1, l'activité de Wpl1 pourrait être diminuée à cette étape du

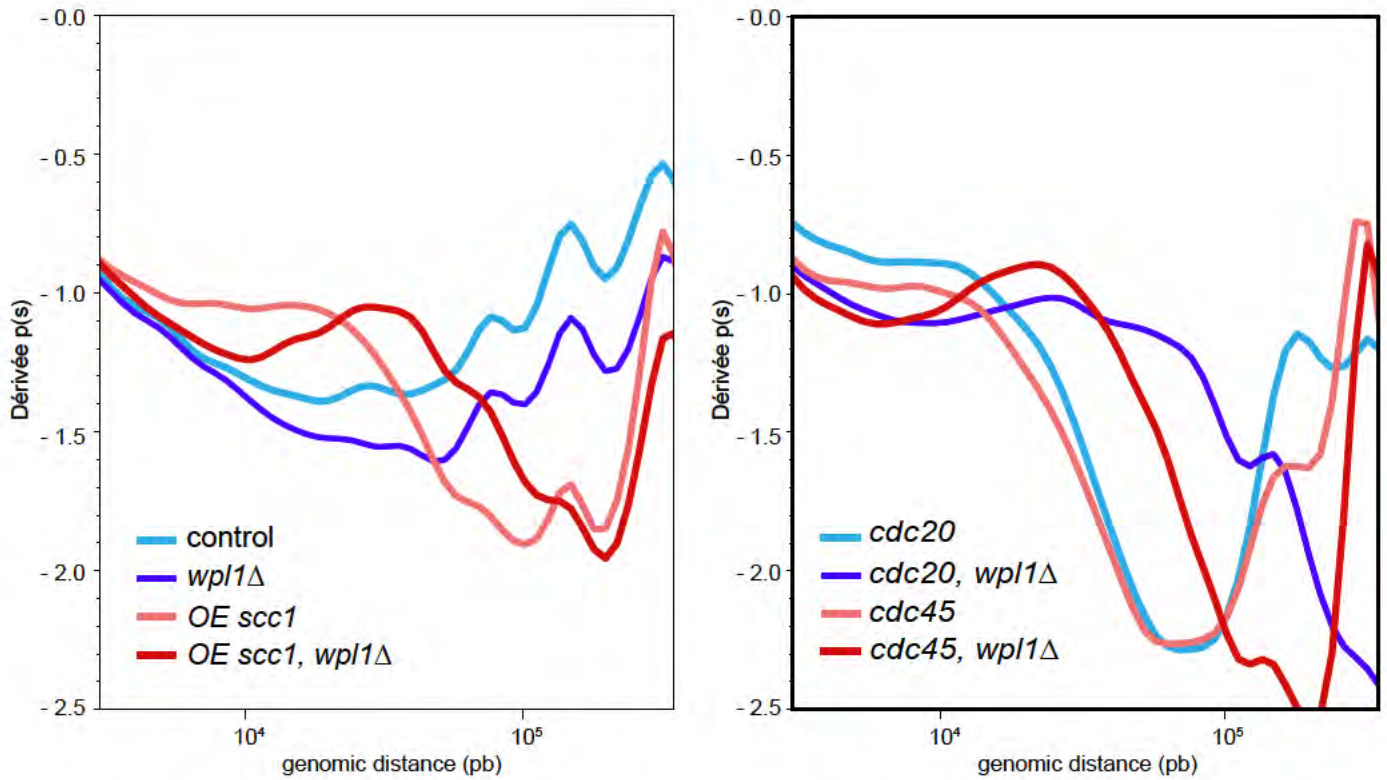


Figure 47 : Effets différentiels de l'inactivation de Wpl1 en G1 ou en mitose sur les contacts chromosomiques. Courbes représentant la dérivée de la probabilité de contacts en fonction de la distance génomique pour les souches arrêtées en G1 (gauche) ou en mitose avec ou sans réplication (droite, *cdc20* et *cdc45* respectivement). Mêmes souches et conditions que celles utilisées en Figure 45.

cycle. Les cohésines exprimées de manière ectopique et chargées sur l'ADN en G1 seraient partiellement stabilisées et conduiraient à la formation de boucles de chromatine de tailles supérieures à celles observées dans les autres étapes du cycle cellulaire. La diminution de l'activité de Wpl1 en G1 pourrait être expliquée par la réduction de l'expression de la protéine elle-même. Elle pourrait également être due à la baisse d'activité ou d'expression de Pds5, restreignant ainsi le recrutement de Wpl1 aux cohésines.

2) Une régulation différente des cohésines par les ARN polymérases en G1 et en mitose. L'état transcriptionnel de la cellule n'étant pas équivalent en G1 et en mitose (Spellman et al., 1998), on peut suggérer que le recrutement/l'activité différentielle des polymérases influence le nombre, la taille ou la base des boucles formées par les cohésines au cours du cycle cellulaire.

3) Un 3^{ème} mécanisme inhibant l'extrusion de boucles établies par les cohésines en G1. On peut envisager que la formation de grandes boucles de chromatine avant la phase S soit délétère pour établir la cohésion. L'inhibition de l'extrusion de boucles serait alors maximale en G1 et impliquerait plusieurs mécanismes : Pds5/Wpl1, Pds5/Eco1 et un autre acteur inconnu à ce jour. Ce dernier pourrait dépendre de l'activité régulée au cours du cycle cellulaire des couples CDK-cyclines (Srinivasan et al., 2019).

Chapitre II : La cohésine organise l'ADNr

A. Une analyse d'image dédiée pour sonder l'organisation 3D de l'ADNr

a. Préambule

Dans la première partie des résultats nous avons utilisé la méthode Hi-C pour étudier comment le complexe cohésine régulait l'organisation des chromosomes. Cependant une large région de 1Mb n'a pas été prise en compte dans cette analyse : l'ADNr. En effet, la technique de Hi-C basée sur du séquençage haut-débit ne permet pas de sonder la conformation de cette séquence répétée.

L'organisation correcte de l'ADNr en mitose est essentielle pour la ségrégation des chromosomes (Guacci et al., 1994). Il est aujourd'hui établi que l'ADNr adopte différentes morphologies au cours du cycle cellulaire telles que des « *puffs* », des lignes ou des boucles. Ces termes descriptifs ne reposent que sur l'observation d'images en deux dimensions. Dans le but de détailler l'organisation sous-jacente de l'ADNr, nous avons mis au point une analyse d'images dédiée permettant une analyse quantitative de l'organisation en 3D de l'ADNr. Nos résultats suggèrent que l'ADNr est constitué de sous-domaines dont la taille et l'organisation spatiale diffèrent au cours du cycle cellulaire, comme observé par microscopie à haute résolution pour la chromatine nucléoplasmique (Bintu et al., 2018). Nous avons ensuite montré l'utilité de cette approche en étudiant le mécanisme d'action des cohésines sur l'ADNr.

Dans cette étude, j'ai construit les souches permettant le marquage fluorescent de protéines endogènes liées à l'ADNr puis j'ai effectué la microscopie sur l'ADNr. J'ai procédé au traitement des images par l'analyse dédiée développée en collaboration avec Alain Kamgoué. L'analyse de la taille du nucléole au cours du cycle cellulaire et dans les souches 190 et 25 copies a été faite par Renjie Wang et Olivier Gadal. J'ai également préparé les échantillons pour l'analyse en FISH et en microscopie électronique à transmission avec Isabelle Léger. Enfin, j'ai participé à la synthèse des résultats et à la rédaction du manuscrit.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi

Quantification of the dynamic behaviour of ribosomal DNA genes and nucleolus during yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle

Lise Dauban^a, Alain Kamgoué^b, Renjie Wang^{a,1}, Isabelle Léger-Silvestre^a, Frédéric Beckouët^a, Sylvain Cantaloube^a, Olivier Gadal^{a,*}

^a Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France

^b Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Saccharomyces cerevisiae
Ribosomal DNA
Interphasic chromosome organisation
Cohesin

ABSTRACT

Spatial organisation of chromosomes is a determinant of genome stability and is required for proper mitotic segregation. However, visualization of individual chromatids in living cells and quantification of their geometry, remains technically challenging. Here, we used live cell imaging to quantitate the three-dimensional conformation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA (rDNA). rDNA is confined within the nucleolus and is composed of about 200 copies representing about 10% of the yeast genome. To fluorescently label rDNA in living cells, we generated a set of nucleolar proteins fused to GFP or made use of a tagged rDNA, in which *lacO* repetitions were inserted in each repeat unit. We could show that nucleolus is not modified in appearance, shape or size during interphase while rDNA is highly reorganized. Computationally tracing 3D rDNA paths allowed us to quantitatively assess rDNA size, shape and geometry. During interphase, rDNA was progressively reorganized from a zig-zag segmented line of small size (5,5 μm) to a long, homogeneous, line-like structure of 8,7 μm in metaphase. Most importantly, whatever the cell-cycle stage considered, rDNA fibre could be decomposed in subdomains, as previously suggested for 3D chromatin organisation. Finally, we could determine that spatial reorganisation of these subdomains and establishment of rDNA mitotic organisation is under the control of the cohesin complex.

1. Introduction

In interphase, the global organization of the 16 yeast chromosomes depends on three structural elements: centromeres (CEN), telomeres (TEL) and the nucleolus (Taddei and Gasser, 2012). All 16 CENs are tethered near the spindle-pole body by intra-nuclear microtubules (Bystricky et al., 2004; Guacci et al., 1994, 1997a, Jin et al., 1998, 2000) and TELs appear clustered in foci at the nuclear envelope (NE) (Gotta et al., 1996; Klein et al., 1992). Consequently, chromosome arms extend outwards from CEN to the periphery, defining a Rabl-like conformation (Jin et al., 2000). During the entire cell cycle, excluding telophase, diametrically opposed to the spindle-pole body, the nucleolus physically separates the repetitive ribosomal DNA (rDNA) genes from the rest of the genome (Yang et al., 1989; Bystricky et al., 2005).

rDNA is the genomic region with the highest transcriptional activity

in a cell nucleus. Massive rRNAs production initiates ribosome biogenesis, the major anabolic event of the growing cell (Potapova and Gerton, 2019). In metazoan cells (Pederson, 2011), the nucleolus is divided into three ultrastructural subdomains described by transmission electron microscopy (TEM). Fibrillar centres (FCs) enriched in RNA polymerase I (Pol I) are surrounded by the dense fibrillar component (DFC) bearing Fibrillarin (Nop1 in yeast), itself embedded in the granular component (GC) (Smirnov et al., 2016). Pol I transcription is thought to take place at the interface between FC and DFC (Pederson, 2011). In yeast, the nucleolus is a crescent shaped domain flanking the NE, which was also described as having a tripartite organisation (Léger-Silvestre et al., 1999; Trumtel et al., 2000), DFC is loaded with early pre-rRNAs, Nop1 and Gar1 proteins, while GC is filled with assembly factors such as Rlp7 or Nug2 (Gadal et al., 2002b; Léger-Silvestre et al., 1999). By *in situ* hybridization at the ultrastructural level, rDNA appears

Abbreviations: rDNA, ribosomal DNA; CEN, centromere; TEL, telomere; FC, fibrillar centre; DFC, dense fibrillar component; GC, granular component; NE, nuclear envelope; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; Pol I, RNA polymerase I; FROS, fluorescent reporter operator system; NPC, nuclear pore complexes; 3D, three dimensions; SNR, signal to noise ratio

* Corresponding author.

E-mail address: olivier.gadal@ibcg.biotoul.fr (O. Gadal).

¹ Present address: Material Science & Engineering School, Henan University of Technology, 450001 Zhengzhou, PR China.

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.08.010>

Received 5 July 2019; Received in revised form 20 August 2019; Accepted 21 August 2019

1047-8477/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

concentrated in the DFC, at the periphery of FC (Trumtel et al., 2000). However, FCs are difficult to detect in nuclear sections (strong genetic background dependency), leading to the definition of a bipartite structure encompassing FC and DFC (Thiry and Lafontaine, 2005). Nucleolar morphology is mostly analysed on asynchronous cell culture, ignoring possible cell-cycle specific reorganization of the nucleolus. Therefore, in yeast, rDNA position within nucleolar subdomains is still not elucidated (Albert et al., 2013; Taddei et al., 2010).

Due to its repetitive nature, rDNA is easily amenable to fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and live cell imaging. Using these techniques, rDNA organisation could be easily probed and it is now clear that rDNA adopts very distinct appearances following cell cycle progression. Visually, puff, line and loop morphologies were successively detected during cell cycle using fluorescent microscopy (Guacci et al., 1994; Lavoie et al., 2004). Since then, rDNA has become the gold standard locus to screen for genome organisation defects and particularly assess how stress or SMC complexes such as cohesin and condensin could affect chromatin compaction (Castano et al., 1996; D'Ambrosio et al., 2008b, 2008a; Freeman et al., 2000; Guacci et al., 1994, 1997a; Lavoie et al., 2004; Lopez-Serra et al., 2013; Thattikota et al., 2018; Wang et al., 2016a). Thus, quantitative description of rDNA organisation would have broad implications for our understanding on how chromosome conformation is achieved.

Analysis of rDNA morphology relies on visual inspection, defining structures that can be easily distinguished. Such visual classification does not allow a quantitative analysis of rDNA array organisation in three dimensions and ignores possible modification of the nucleolus. Most studies use FISH to label rDNA, which can lead to some artefacts because of cell fixation and/or denaturation steps. Other studies have used live imaging but rDNA organisation remained mostly restricted to two dimensions analysis (Lavoie et al., 2004; Miyazaki and Kobayashi, 2011). At this stage, we lack a precise quantification of rDNA geometry and of nucleolar compartment modification during cell cycle in yeast *S. cerevisiae*.

In this study, we made use of localization microscopy in living cells to quantitatively assess modifications of both nucleolar compartment and rDNA array three-dimensional organizations, during cell cycle. Using fluorescent microscopy, we could show that rDNA and *bona fide* nucleolar proteins such as Nop1 (yeast ortholog of fibrilarin) labelling are distinct and we confirmed that they could be segregated *in vivo*. Next, we defined the optimal rDNA labelling to achieve accurate segmentation in three dimensions. By quantitating rDNA reorganization during cell cycle, we could reveal the existence of spatially segregated subdomains within rDNA at all cell cycle stages. Finally, we showed that cohesin expressed in G1, and artificially stabilized on DNA, is sufficient to partially reorganize rDNA in a mitotic like conformation.

2. Materials and methods

Media and culture conditions: Yeast strains and plasmids used in this study are listed in Tables S1 and S2 respectively. Strains NOY1064 (rDNA copy number ~ 190) and NOY1071 (rDNA copy number ~ 25) were transformed with plasmid pASZ11-NUPNOP: GFP-NUP49, mCherry-NOP1 to label NPCs (Nup49) and nucleolus (Nop1). All experiments were done on exponentially growing cells. For G1 synchronisation, strain TMY3 was grown overnight in rich medium (YPD: 1% bacto peptone (Difco), 1% bacto yeast extract (Difco) and 2% glucose), the day after the culture was diluted and exponentially growing cells were arrested in G1 by addition of α -factor (Antibody-online, ABIN399114, 1 μ g/ml final) every 30 min for 2h30. After washing in cold media, cells were released synchronously and samples were taken for imaging every 10 min, for 120 min. To overexpress non-cleavable Scc1 variant (Scc1(R180D,268D)-HA, *Scc1-RR-DD*), strains FB09-4A, FB09-9C, FB08-5C, FB08-6A were grown overnight in YP medium supplemented with 2% raffinose (Sigma-Aldrich, R0250). The day after, cells were synchronised in G1 (see above) but 1 h after starting α -factor

treatment, expression of *Scc1-RR-DD* was induced by addition of newly-made galactose (Sigma-Aldrich, G0750, 2% final) to the cultures. For metaphase arrest using Nocodazole, TMY3 strain was arrested in G1 (see above) in YPD and released in Nocodazole-containing YPD (Sigma-Aldrich, M1404, 10 μ g/ml final) for 2 h. To assess effect of Scc1 depletion (Scc1-PK3-aid, *scc1-AID*), strains FB39 and yLD127-20c were grown overnight in synthetic complete medium deprived of methionine (SC-Met) (SC: 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco), supplemented with a mix of amino-acids, uracil and adenine, 2% glucose). The day after cultures were synchronised in G1 and auxin (Sigma-Aldrich, I3750) was added (1 mM final) after 1 h to induce Scc1 degradation. To arrest cells in metaphase (pMet::*CDC20*), they were released from G1 block in rich medium supplemented with methionine (2 mM final) and imaged after 2 h.

Microscopy: Confocal microscopy was performed as previously described (Albert et al., 2013).

Image Analysis: To determine the best rDNA labelling, signal over noise ratio was measured as median rDNA signal minus median background signal, divided by background standard deviation. Background corresponds to signal acquired outside of cells. Signal specificity was measured as ratio between median rDNA and nucleoplasmic/cytoplasmic GFP signals.

To assess nucleolar volume fluctuation during cell cycle progression using microfluidic device, timelapse of six representative cells were analysed in three dimensions using Nucquant image processing pipeline (Wang et al., 2016b).

3D rDNA reconstruction: rDNA reconstruction was performed by an initial segmentation, followed by key points extraction. Key points were next connected to minimize rDNA path outside of segmented area. Segger segmentation was used, an extension to UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). A our density map and B_i the segmented regions:

$$A = \cup_{i=1..n} B_i. \quad (1)$$

Key points extraction was next defined such as for each B_i the barycenter is designated by $P_i^g = (x_i^g, y_i^g, z_i^g)$. For two regions B_i and B_j we denote by $P_i^c = (x_i^c, y_i^c, z_i^c)$ and $P_j^c = (x_j^c, y_j^c, z_j^c)$ the nearest points in the two regions. Path connecting key points was computed using a graph matrix. We fixed the parameter $\delta_{\max} = 150$ nm, the value beyond which no connection is possible between two key points. The graph matrix is such that:

$$S(i, j) \equiv S_i, j(\delta_{\max}) = 1 \text{ if distance}(P_i^g, c, P_j^g, c) < \delta_{\max} \quad (2a)$$

$$S(i, j) \equiv S_i, j(\delta_{\max}) = 0 \text{ elsewhere} \quad (2b)$$

We used depth-first search (DFS) algorithm to find all possible paths $(\zeta_i)_{i=1..K}$ that cross all the vertices in the graph. 3D rDNA geometry, in which *len* is the length of the rDNA, is define such as ζ_{opt} :

$$\text{opt} = \text{Argi} = 1..K \min\{\text{len}(\zeta_i)\} \quad (3)$$

Fluorescent *in situ* hybridization: Yeast cells were cultivated in YPD and treated for G1 and G2/M synchronization as described in “Media and culture conditions” section. The spheroplasts were prepared according to Guacci et al. with minor modifications (Guacci et al., 1994). Cells were fixed in 4% formaldehyde for 2 h at RT, washed 3 times with milliQ water and suspended in 1 ml of 1,2 M sorbitol, 0,1 M Phosphate buffer, pH 7,5 (sorbitol buffer). To digest the cell wall, the cells were then resuspended in a mix containing [50 μ g/ml] Zymolyase 100 T and 1/500 vol β -mercapto-ethanol in sorbitol buffer during 45–60 min at RT. The cell wall degradation was controlled under a microscope and stopped by adding 1 vol of 1% Triton X100. Spheroplasts were transferred on poly-L-lysine (0,1% in water) coated coverslips and let for 15 min at RT. The suspension was then removed from coverslips and replaced with 0.5% SDS for 3 min at RT. The 0,5% SDS was removed and replaced by fresh 0,5% SDS for an additional 10 min incubation at RT. Coverslips were then submerged in 3:1 methanol/acetic acid for

5 min at RT, dried at RT and stored until FISH procedure. The FISH was performed according to Guacci et al. (Guacci et al., 1994) and Waminal et al. (Waminal et al., 2018). The coverslips were treated with RNase (100 µg/ml in 2 × SSC) 1 h at 37 °C and washed 4 times with 2xSSC at RT. The spheroplasts were then dehydrated in an ethanol series of 2 min (70%, 80% and 95% at –20 °C) and air-dried. The coverslips were next incubated with Proteinase K (200 µg/ml in 20 mM Tris, pH7.4, 2 mM CaCl₂) for 15 min at 37 °C and then dehydrated by an ethanol series of 1 min (70%, 80%, 90%, 100%, –20 °C). Subsequently, the DNA in spheroplasts was denatured by incubating the coverslip for 5 min in 70% formamide/2 × SSC. The spheroplasts were then immediately dehydrated by an ethanol series of 1 min (70%, 80%, 90%, 100%, –20 °C); at this step, they were ready for hybridization. To visualize the rDNA, we used, as probe, a mix of eleven Cy3-labelled oligonucleotides complementary to sequences spanned over the *S. cerevisiae* rDNA locus (Table S3). Probes at ~[19 ng/µl] were denatured in 50% formamide, 10% dextran sulfate, 400 µg/ml salmon sperm DNA for 5 min at 70 °C. Hybridization of 20 µl probe/coverslip proceeded for 2 h at RT, in a humid chamber.

Coverslips were then washed at RT, 5 min in 2xSSC, 10 min in 0,1 × SSC, 5 min in 2 × SSC and 1 min in PBS/Igepal 0,1%. The DNA was counterstained with premixed 4'-6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) solution (25 µg/ml in Mowiol). Metamorph was used to acquire images with an inverted fluorescent Olympus IX81 microscope equipped with a sCMOS Hamamatsu ORCA-Flash 4.0 camera. Acquisitions were made with a UPlan SApo X100 1.4 oil objective and using a Cy3 Lumencore SpectraX (λ excitation = 542/33) illumination was combined with an emission Chroma dual band filter set Cy3/Cy5 (51007). The panel of photos was prepared with Photoshop.

Transmission Electron Microscopy: Electron microscopy was performed as previously described (Albert et al., 2011).

Flow cytometry: About 2.8 × 10⁶ were fixed in ethanol 70% and stored at –20 °C. Cells were the pelleted, washed and incubated overnight in Tris-HCl 50 mM pH 7,5 complemented with RNase A (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) at 37 °C. Cells were pelleted, resuspended 400 µl of 1,0 mg/ml propidium iodide (Fisher, P3566) in 50 mM Tris pH 7,4, NaCl, MgCl₂ and incubated for 1 h at room temperature. Flow cytometry was performed on a CyFlow® ML Analyzer (Partec) and data were analysed using FloMax software.

3. Results

3.1. Fluorescent microscopy allows to physically distinguish rDNA from Nop1-labelled dense fibrillar component (DFC)

rDNA being confined inside the nucleolus, we first decided to better define the relationship between nucleolar architecture and rDNA organisation in yeast. Due to the small size of the yeast nucleolus (1 µm⁻³ (Wang et al., 2016b)), sub-nucleolar domains (FC, DFC and GC) are mostly defined by electron microscopy and are more challenging to discriminate when using light microscopy (with resolution limited to 200 nm). To tackle this issue, we decided to track proteins bound to rDNA (Rpa190, Uaf30, Net1; Fig. 1a) relative to Nop1 labelling (Fig. 1b). Nop1 is the yeast ortholog of fibrillarin, an essential methyltransferase modifying rRNAs and histones (Tessarz et al., 2014; Tollervey et al., 1991). It is a *bona fide* marker of DFC compartment and is not physically associated with rDNA (Gadal et al., 2002b). rDNA bound proteins were tagged with GFP and live cell imaging was performed. Signals were qualitatively different: Nop1 was crescent-shaped, appearing homogeneous from cell to cell while rDNA bound proteins formed dot-like structures, confirming previous report (Ha et al., 2012). These dot like structures were reminiscent of puffs, lines or loops of various sizes previously reported by FISH (Guacci et al., 1994). In agreement with these results, we also reproduced these patterns by FISH (Suppl. Fig. S1). To confirm this apparent difference in morphology between Nop1 labelling and the one from rDNA bound

proteins, we compared both fluorescent signals in the same nucleus. We took advantage of the previously described TMY3 strain, in which rDNA was labelled with Fluorescent Repressor/Operator System (FROS), allowing LacI-GFP to specifically bind to *lacO*-modified rDNA repeats (Miyazaki and Kobayashi, 2011). We introduced in TMY3 strain mCherry-Nop1 fusion protein to test relative localization of Nop1 and rDNA (Fig. 1c). LacI-GFP signal appeared as dot-like structures, reminiscent of what was observed for Net1, Uaf30 or Rpa190 labelling. Nop1 appeared broader and embedded rDNA. Besides their close proximity, yeast rDNA and Nop1 appeared as morphologically different nucleolar subdomains, visible at the fluorescent microscopy resolution.

To gain insight into the interplay between rDNA and nucleolus organizations, we then explored consequence of rDNA copy number variation or decreased rRNA synthesis on nucleolar morphology. We took advantage of yeast strains in which rDNA copy number has been decreased by 8-fold (from 190 to about 25 copies; (Kobayashi et al., 1998)) without detectable growth defect (Albert et al., 2011; French et al., 2003). We labelled Uaf30 to track rDNA and analysed both rDNA morphology and nucleolar volume. Nucleoporin Nup57 was also labelled in these strains to allow nuclear periphery detection and nuclear volume quantification. Reducing rDNA copy number resulted in a strong decrease in length and intensity of the rDNA signal (Fig. 2a). Surprisingly, Nop1 signal appeared unchanged and still accounted for about one third of the total nuclear volume in strain harbouring reduced rDNA copy number (Fig. 2b). Using a dedicated image analysis pipeline, we measured nucleolar/nuclear volume ratio. Nop1 signal was segmented defining nucleolus, and nuclear volume was computed by fitting volume of an ellipsoidal shape to 3D nuclear pore complexes (NPC) positions (Fig. 2c; red: nucleolus, ellipsoidal mesh: nucleus, blue spheres: detected NPCs) (Berger et al., 2008). We could show that nucleolus/nucleus ratio significantly increased, with median shifting from 26,7% (± 0.07) to 33,3% (± 0.08) in strains harbouring 190 and 25 rDNA copies respectively (note that nuclear volume is marginally increased in 25 rDNA copies strain). Therefore, upon decreased rDNA copy number, nucleolar volume is not reduced but even enlarged by 6%.

Other evidence for differential behaviour between nucleolar rDNA-bound and unbound proteins came from the fact that they harbour distinct segregation properties during mitosis (Girke and Seufert, 2019). Additionally rapamycin treatment, or other environmental conditions quickly repressing Pol I transcription, physically segregate fluorescently tagged rDNA-bound proteins apart from unbound ones (Ha et al., 2012; Mostofa et al., 2018). Along the same line, we previously reported that about 5-fold reduction in rRNA production, due to Pol I lacking subunit Rpa49 (*rpa49Δ* mutant) resulted in a fragmented nucleolus (Albert et al., 2011). By introducing *rpa49Δ* allele in strain bearing mCherry-Nop1 construct and FROS-modified rDNA, we confirmed that Nop1 signal spread in the entire nucleus and formed droplets, appearing as foci of higher intensities (Fig. 2d). In this condition, rDNA remained confined and did not localise with intense Nop1 clusters. Therefore, upon acute reduction of rRNA synthesis, rDNA-bound and unbound proteins can be physically segregated as distinct subdomains.

In conclusion, upon active rRNA synthesis, rDNA array is confined inside the nucleolus but occupies a defined region that can be distinguished from bulk Nop1 staining using fluorescent microscopy. Still, rDNA array and Nop1 behave differently, with decreased rDNA repeats increasing nucleolar volume and reduced rRNA production segregating rDNA away from nucleolar proteins.

3.2. Ranking rDNA fluorescent markers to optimize rDNA labelling

More than 200 proteins are present in the yeast nucleolus but at variable concentrations and a small number of which is directly bound to rDNA (Fig. 3a) (Huh et al., 2003; Kulak et al., 2014; Peng et al., 2012). To study rDNA reorganisation in three dimensions during cell cycle, our first goal was to determine the best rDNA-labelling marker in living cells. As protein concentration is crucial for high-quality

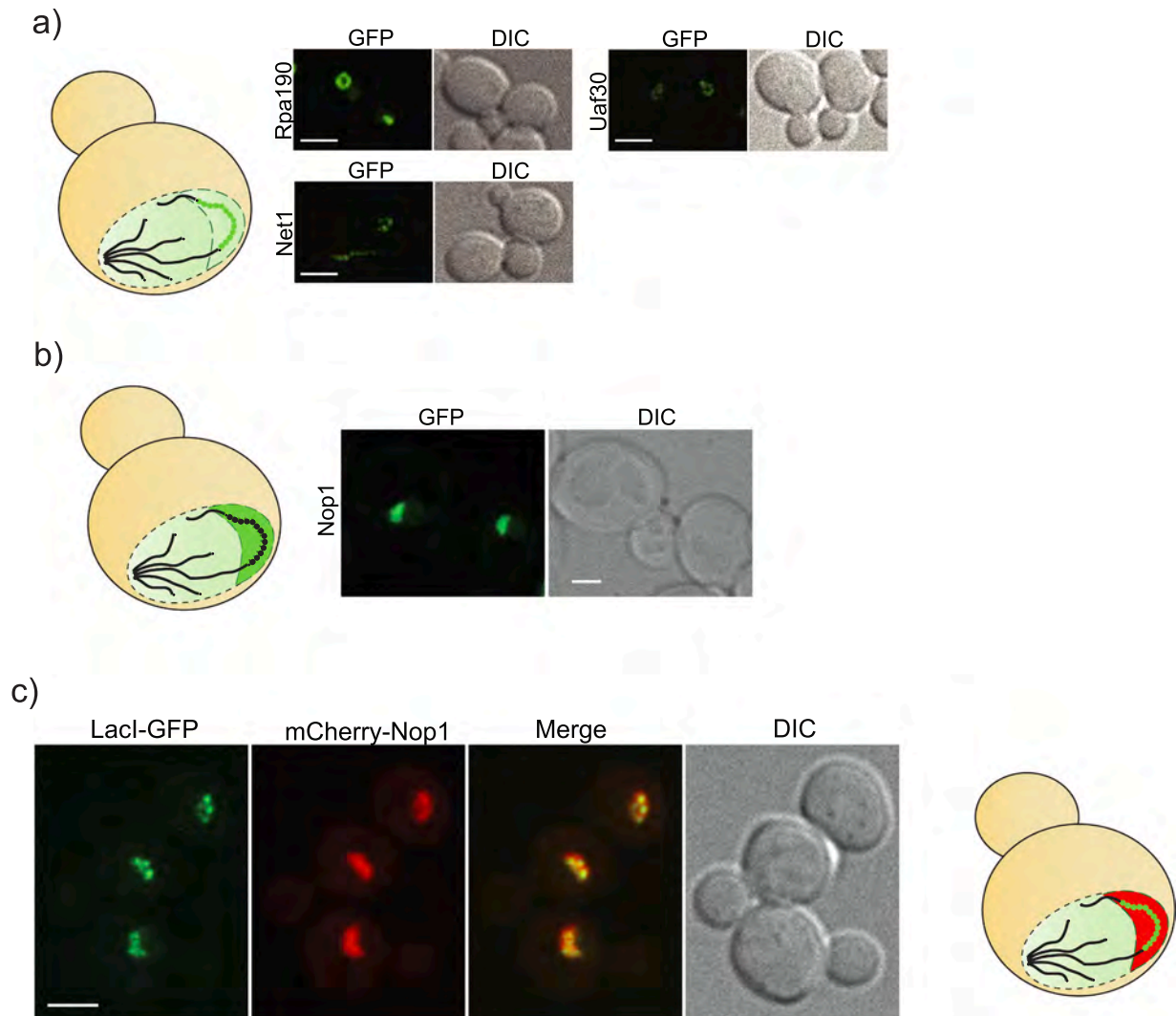


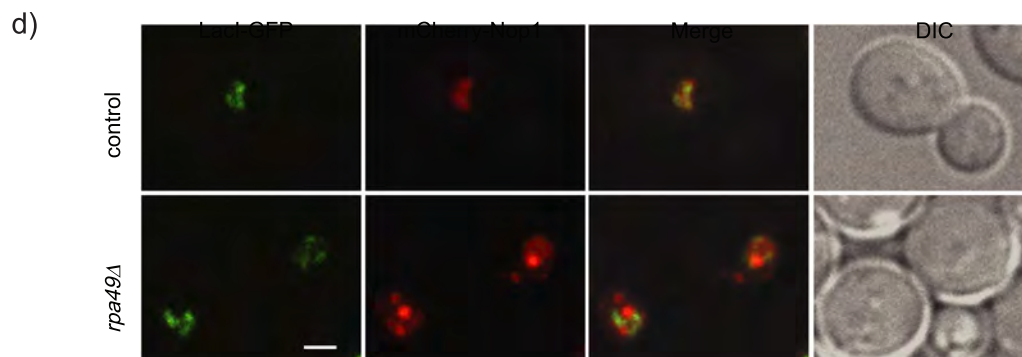
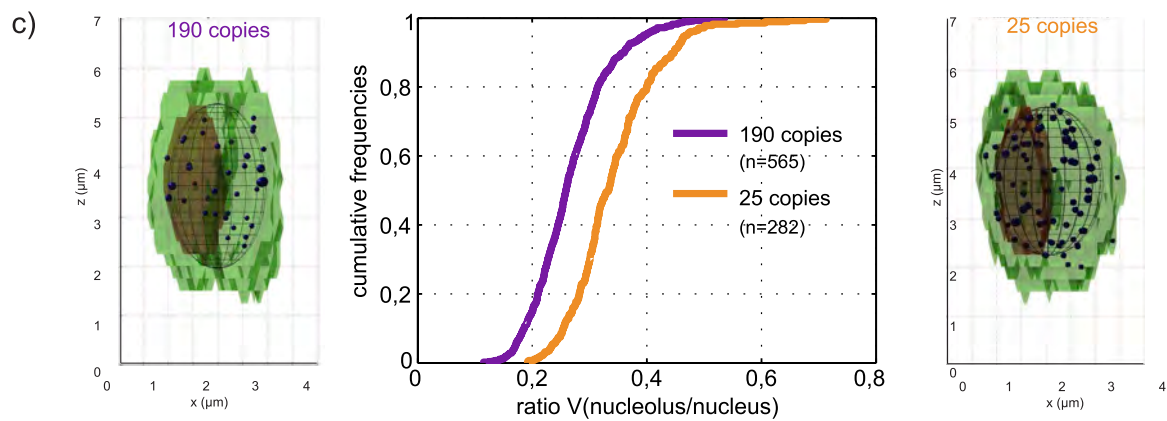
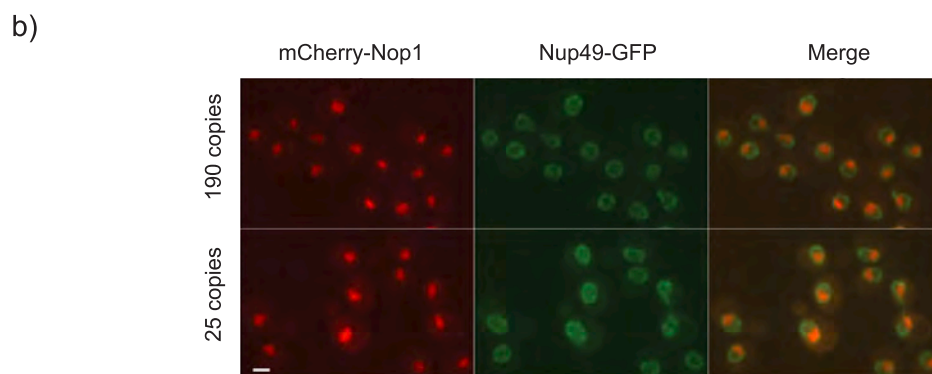
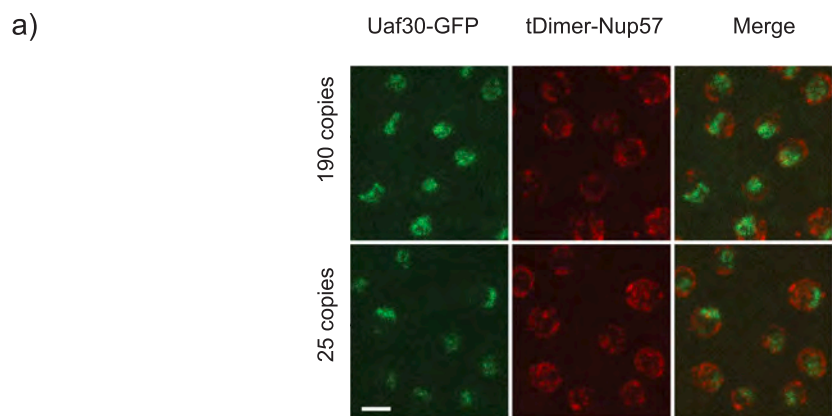
Fig. 1. Fluorescent microscopy allows to physically distinguish rDNA from bulk nucleolar compartment. a) Right: exponentially growing cells were imaged for GFP-tagged Rpa190, Net1 or Uaf30 (strains yLD11-1a, yLD3-1a and yLD12-1a respectively) under confocal microscope. Left: Scheme representing rDNA labelling. Scale bar, 2 μm. b) Scheme representing Nop1 staining (left) and images from GFP-Nop1 expressing strain (right, strain yLD166-1a) treated as in a). Scale bar, 2 μm. c) Exponentially growing culture of strain TMY3 expressing mCherry-Nop1 (yLD31-1a) was imaged under confocal microscope to assess colocalisation between nucleolar protein Nop1 and rDNA bound LacI-GFP. Scale bar, 2 μm.

fluorescent staining, we performed confocal imaging of several fluorescently tagged endogenous rDNA bound proteins to determine reporters allowing the best rDNA segmentation (Fig. 3). Strain bearing all rDNA units modified to contain FROS system was also included (Fig. 3b, (Miyazaki and Kobayashi, 2011)). We then quantitated signal-to-noise ratio (SNR, see materials and methods) and signal specificity for each candidate using maximal intensity projection of 3D stacks (Fig. 3c). Signal specificity was defined as ratio between rDNA and nucleoplasmic signals. Among rDNA bound proteins, we tested the largest Pol I subunit Rpa190, its associated transcription factors Core Factor and UAF or termination protein Nsi1, all known as components of rRNA transcription machinery (Hamperl et al., 2013). We also tested regulatory factors enriched at rDNA such as the replication-fork barrier protein Fob1, RENT (Regulator of nucleolar silencing and telophase exit) complex subunits (Cdc14, Sir2, Net1), condensin subunits (Smc4 and Ycg1) or HMGB-box protein Hmo1 (Gadal et al., 2002a; Ha et al., 2012; Lu et al., 1996). SNR ratio (Fig. 3c, upper panel) generally correlated with protein abundance per cell, with Rpa190 being the most abundant protein with 10^4 proteins per cell and a SNR of 250. However, Hmo1 signal was a striking exception with a low SNR with up to 2.10^4 proteins per cell (Ghaemmaghami et al., 2003; Kulak et al., 2014; Peng et al.,

2012). We next used signal specificity to evaluate quality of rDNA labelling (Fig. 3c, lower panel). With a significant signal in the nucleoplasm, Rpa190 or Hmo1 were not specific for rDNA and thus could not be good predictors of rDNA organisation. When considering both SNR and specificity of rDNA labelling, Net1 appeared as the best candidate to label rDNA, followed by LacI-GFP expressed in the FROS-tagged rDNA strain and Cdc14.

3.3. Cell cycle dependent association of Net1 with rDNA

Our first ranking amongst rDNA bound proteins based on signal intensity and specificity suggested that Net1-GFP allowed an optimal rDNA labelling. However, another prerequisite for our study was that rDNA association of Net1 tagged proteins remained unchanged throughout the cell cycle. Net1 is part of the RENT complex together with Sir2 and Cdc14 and has been described as a Pol I activator (Hannig et al., 2019; Shou et al., 2001; Straight et al., 1999). It is bound to rDNA in two genomic regions: within the IGS2 via its association to the replication fork barrier protein Fob1 and at Pol I promoter (Hannig et al., 2019; Huang and Moazed, 2003). Cdc14 has been proposed to contribute to Pol I repression during anaphase, possibly by acting on Pol I



(caption on next page)

Fig. 2. rDNA copy number modification and rRNA transcription modulate nucleolar size and morphology. a) rDNA from cells harbouring approximately 190 or 25 rDNA copies (yLD26-1a and yLD27-1a respectively) was imaged by tagging Uaf30 with GFP. tDimer-Nup57 stains nuclear pore complexes (NPCs). Scale bar, 2 μ m. b) Nucleolus was labelled with Nop1 in strains harbouring 190 or 25 rDNA copies (NOY1064 and NOY1071 respectively bearing plasmid pASZ11-NUPNOP: GFP-NUP49, mCherry-NOP1). Scale bar, 2 μ m. c) Quantification of ratio between nucleolar and nuclear volumes in the two same strains as in b) (middle, see materials and methods). Right and left: examples of nucleus (green) and nucleolus (red) 3D segmentations. Ellipsoidal mesh represents nuclear volume fitted to NPCs (blue spheres) positions. d) rDNA (LacI-GFP) and nucleoli (mCherry-Nop1) were labelled in exponentially growing, control and *rpa49 Δ* strains (yLD31-1a and yLD42-1a respectively). Scale bar, 2 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

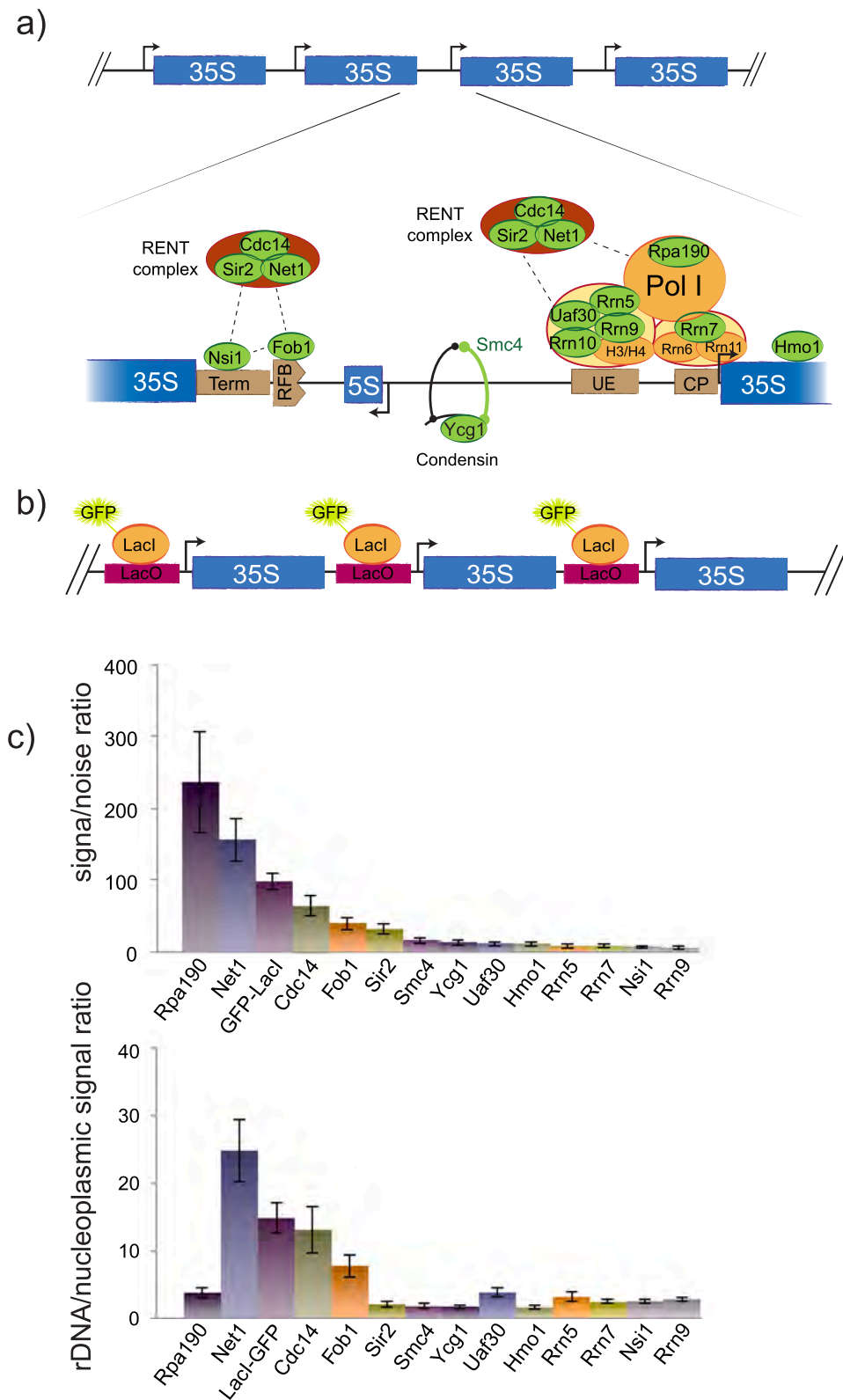


Fig. 3. Defining the optimal *in vivo* labelling to track rDNA. a) Top: rDNA array is assembled by tandemly repeated rDNA genes, each comprising the coding region for the long rRNA precursor 35S and an intergenic sequence. Bottom: magnification of an intergenic sequence and its bound proteins. Proteins depicted in green were tagged with GFP to track rDNA array. b) Schematic representation of rDNA in TMY3 strain (Miyazaki and Kobayashi, 2011): LacO repetitions were inserted in every intergenic sequences of rDNA copies and expression of LacI-GFP fusion protein enabled its labelling. c) Signal was quantified for each GFP-tagged construct by measuring signal/noise ratio (top) and signal specificity (bottom). The latter reflects signal enrichment at rDNA compared to nucleoplasm (see materials and methods). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

promoter (Clemente-Blanco et al., 2009). Moreover, Cdc14 plays a crucial role in mitosis exit and is released from rDNA during anaphase (Suppl. Fig. S2; Shou et al., 1999; Visintin et al., 1999). To evaluate if Net1 association with rDNA was also cell cycle regulated, we compared *in vivo* rDNA labelling by Net1 and LacI-GFP. We introduced a Net1 allele bearing a red fluorescent protein (tDimer) in the FROS tagged rDNA strain (Fig. 4, upper panel). Labelling patterns of Net1 and LacI were similar in both interphase and anaphase. Next, we evaluated rDNA labelling in a *fob1Δ* strain in which Net1 is dissociated from IGS2 but remains anchored at Pol I promoter (Huang and Moazed, 2003). In this condition, we observed dissociation of Net1 from rDNA during anaphase, suggesting that Net1-rDNA association is at least partly regulated by the cell cycle (Fig. 4, lower panel).

As a consequence, we decided to use TMY3 strain, harbouring FROS insertions, to track rDNA along the entire cell cycle.

3.4. 3D analysis of nucleolar volume and rDNA organisation along cell cycle

We performed confocal live imaging of asynchronous cells harbouring FROS-labelled rDNA. Analysis of projected images revealed bright but heterogeneous rDNA signals appearing as puffs, necklaces and lines, as previously described in populations synchronised at various cell cycle stages (Fig. 5a) (Guacci et al., 1994; Miyazaki and Kobayashi, 2011). Consistent with the differential behaviour between nucleolus and rDNA array described above, while rDNA is reorganised during cell cycle progression, we could not detect such modifications in nucleolar volume or morphology. Indeed, we first used microfluidic device to measure nuclear and nucleolar volumes during an entire cell cycle of about 90 min (with stack acquisition every 15 min). After determining nuclear volume by approximating nuclear envelope position in 3D and evaluating nucleolar volume by 3D-segmentation of Nop1

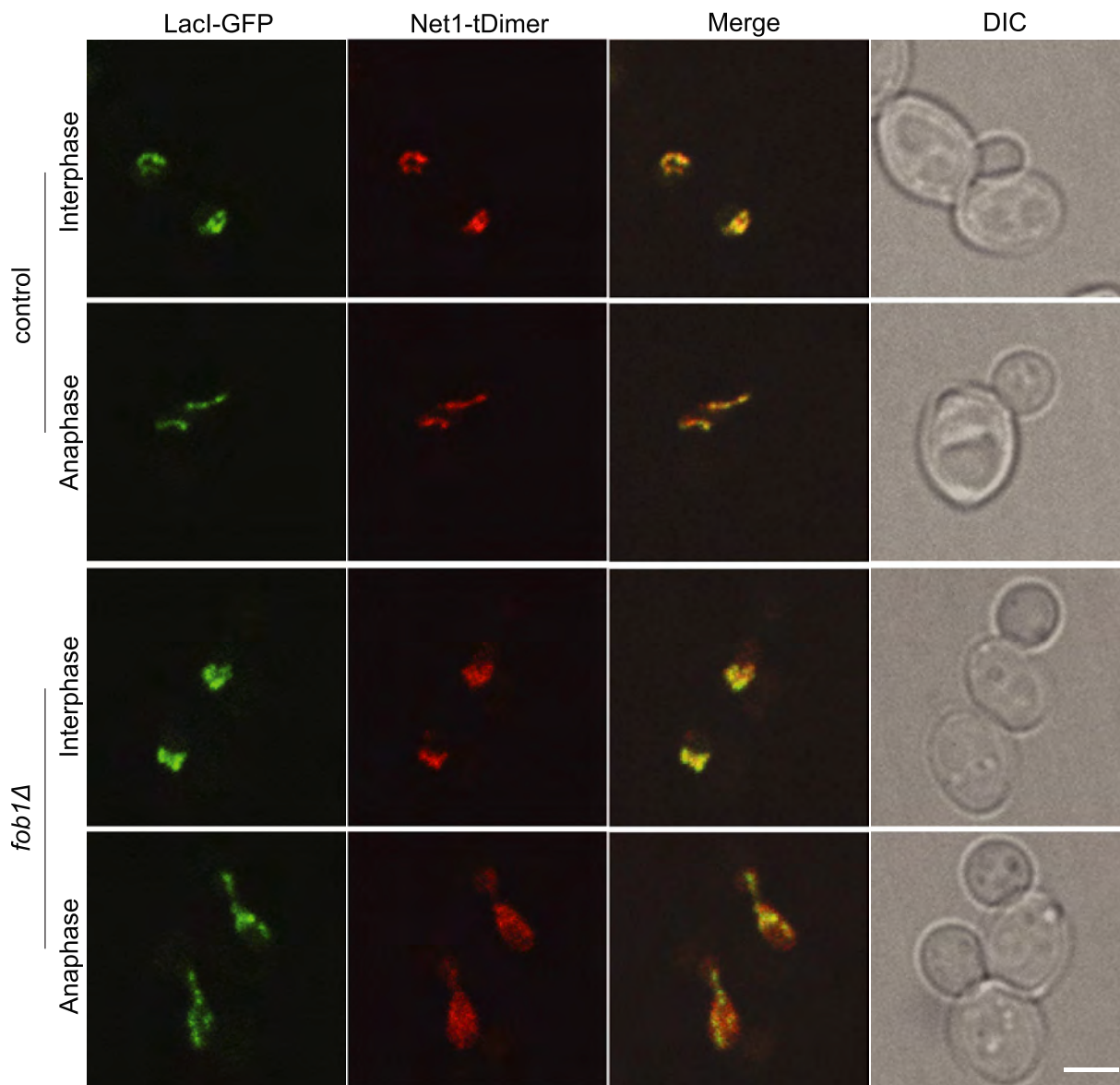


Fig. 4. Net1 association with rDNA is cell-cycle regulated. Asynchronous control (yLD30-1a) and *fob1Δ* (yLD41-1a) cells harbouring rDNA (LacI-GFP) and Net1 (tDimer) staining were imaged under confocal microscope. Anaphase cells were sorted based on rDNA morphology (*i.e.* long and stretched lines). Scale bar, 2 μ m.

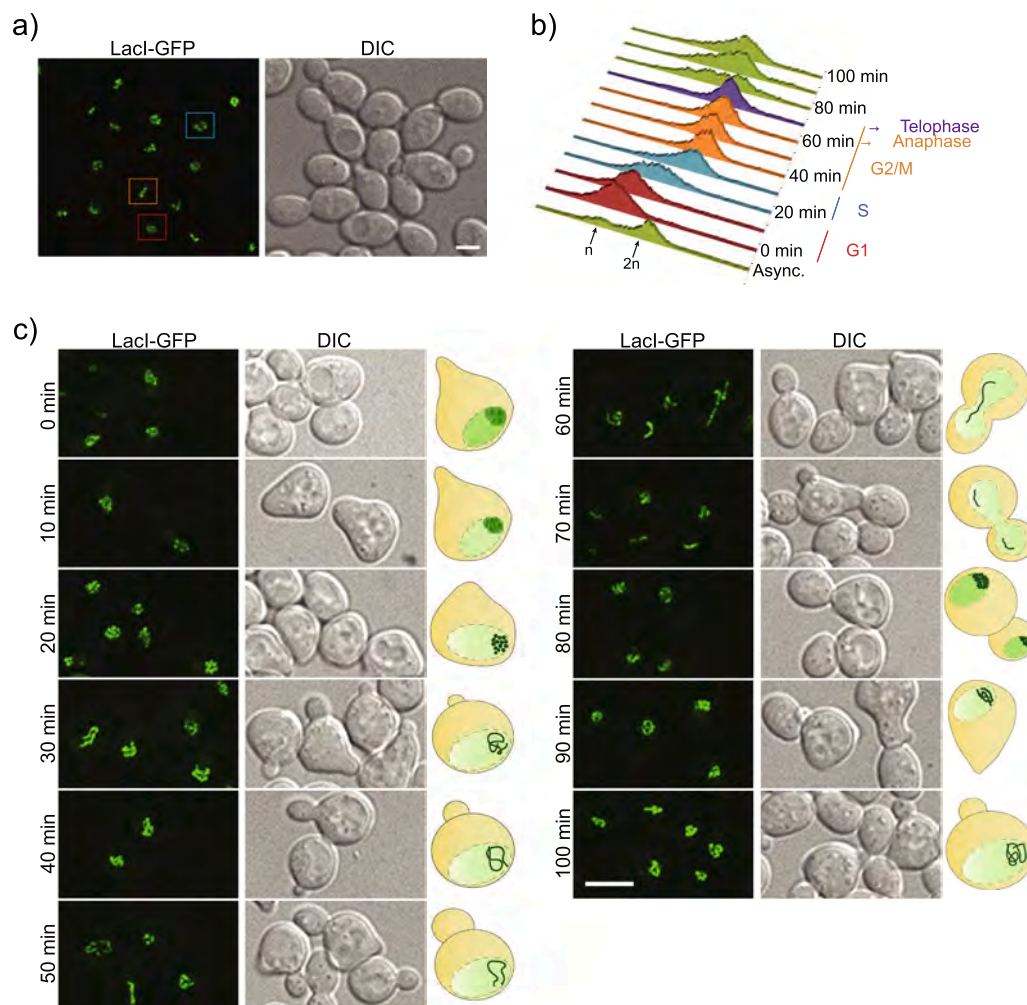


Fig. 5. Cell cycle dependent rDNA re-organisation. a) Confocal imaging of asynchronous FROS-modified strain (TMY3). rDNA adopts different patterns appearing as puffs (red square), loops (blue square) and lines (orange square). Scale bar, 2 μ m. b), c) Same strain as in a) was arrested in G1 with α -factor and released synchronously in the cell cycle. Samples were taken every 10 min and processed for flow cytometry (b) and imaging (c). Representative schemes are depicted on the right of each imaging panel. Scale bar, 2 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

staining, we noticed no significant modulation of nuclear/nucleolar ratio during the entire cell cycle (Suppl. Fig. S3) (Wang et al., 2016b). However, as cell cycle proceeds, nucleoli might be subjected to morphological restructuring undetectable by fluorescent imaging. To test this hypothesis, we synchronised cells either in G1, S or metaphase and analysed nucleolar morphology. To best preserve ultrastructure, we performed cryo-fixation, cryo-substitution, resin embedding, and ultrathin sectioning to visualize nuclear and nucleolar morphology by transmission electron microscopy (TEM). Analysis of nuclear sections suggested that nucleoli were not subjected to major reorganisations in the cell cycle stages considered (Suppl. Fig. S4). Altogether, these results suggested that modifications of nucleolar volume or of its internal organisation was not involved in cell-cycle dependent rDNA morphology reorganisation. This is consistent with previous study investigating nucleolar size using soft-X-ray tomography (Uchida et al., 2011). To study rDNA reorganisations in a large number of cells, yeast culture (from rDNA-FROS-modified strain) was synchronised in G1 with α -factor treatment, washed, released synchronously in fresh media and imaged every 10 min, for 100 min (Fig. 5b, c). In G1, rDNA adopted puff structures, visualised as blurred signals. Dot-like structures (necklaces) became apparent at 20 min and clear lines were established from S phase (30 min) to anaphase onset (60 min). At the end of anaphase (70 min), rDNA arranged in short stretched lines and reorganised as puffs as cells re-entered G1 phase (80 min). Even if α -factor synchronisation has been shown to enlarge nucleolar size (Wang et al., 2016b), rDNA organisation did not seem markedly impacted by α -factor treatment, as rDNA morphologies documented here are similar to the one observed in asynchronous populations.

Two-dimensions (2D) projections of rDNA fluorescent signal could result in overlaying of subdomains and consequently in loss of information (resulting in a puff structure). To circumvent this problem, we quantified rDNA organisation in 3D, using a dedicated image analysis pipeline (Fig. 6a, see materials and methods). Briefly, acquired images were deconvolved and fluorescent signal for each nucleus was segmented in three dimensions. We could observe that in all cells and for every cell cycle stage considered, rDNA was organized as several volumes of high intensities, separated by “constrictions” of lower signal. Therefore, segmented rDNA was further divided into subdomains, using a watershed algorithm. Subdomains number was slightly increased during the entire cell cycle, being the lowest in telophase with 5 rDNA subdomains per nucleus and the highest in metaphase with 8 subdomains (Suppl. Fig. S5). In order to explore rDNA geometry, we next decided to compute a segmented line, with each segment connecting neighbouring subdomains by their mass centres (see materials and methods). Among all possible paths, we chose the segmented line minimizing inter-domains distance (distance separating green points; Fig. 6a). Using our computational analysis of rDNA, we could extract parameters from this domains-connecting segmented line and used them to explore and quantify rDNA morphological reorganisation along the yeast cell cycle.

We identified three parameters allowing to discern rDNA reorganisation during cell cycle: heterogeneity in subdomains volumes, rDNA length and rDNA geometry (see materials and methods). First, we computed volumes of all subdomains present in one nucleus. Their standard deviation gave information on heterogeneity of domain volumes. Then, rDNA length was measured along the segmented line as

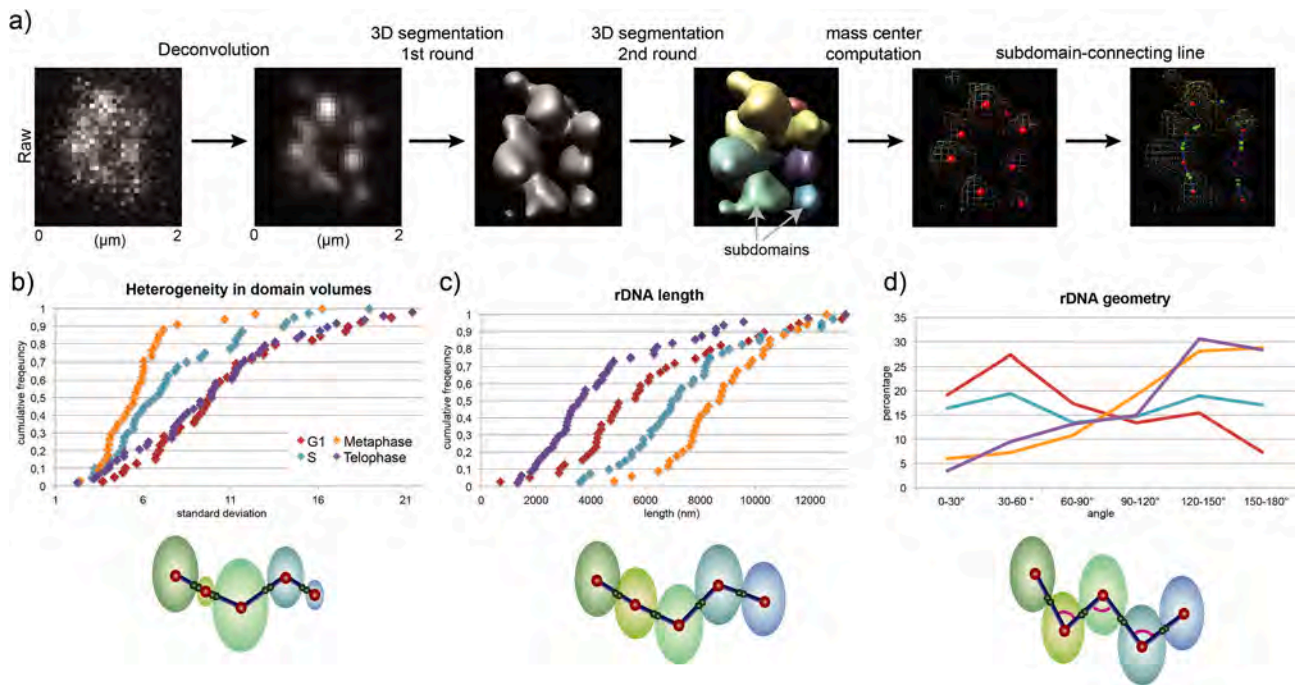


Fig. 6. 3D analysis of cell cycle dependent rDNA reorganisation. a) Raw images were deconvolved and fluorescent signal was segmented in 3D. Second round of 3D segmentation enabled division of each cell signal into subdomains. Mass centres were computed and connected by the line with the shortest inter-subdomains distance (see materials and methods). Three parameters were finely extracted from the chosen line: heterogeneity in domain volumes (b), length (c) and geometry (d). Each of these parameters were quantified for cells arrested in G1 (0 min), S (30 min), metaphase (Nocodazole-arrested) and telophase (90 min) and plotted as cumulative distribution functions. G1, n = 39; S, n = 40; Meta, n = 34; Telo, n = 48.

the sum of mass centres-mass centres distances. Finally, 3D angles within the segmented line connecting neighbouring subdomains were measured and divided in bins of 30° to estimate rDNA geometry. As cell cycle progressed, domain volumes became homogeneous (Fig. 6b) and rDNA length increased from 5,5 μm in G1 to 8,7 μm in metaphase (Fig. 6c). Mitotic rDNA compaction resulted in rDNA shortening up to 3,5 μm in telophase (Fig. 6c). Regarding rDNA geometry, G1 favoured acute angles resulting in a zig-zag rDNA conformation. Conversely, mitotic rDNA lines specifically showed increased proportion of obtuse angles compared to acute ones (Fig. 6d). Note that to achieve a better synchronisation and to increase sampling in metaphase, cells were synchronised using the microtubules depolymerizing drug, nocodazole.

Confocal imaging followed by 3D image analysis provided a quantitative description of rDNA reorganisation during cell cycle. Rather than rDNA being simply compacted (from puffs to necklaces, then lines), we could document that rDNA is re-arranged spatially from heterogeneous subdomains, interconnected as an irregular zig-zag segmented line of small size to homogeneous domains, shaping a straighter line of longer length. With such quantitative definition of the rDNA geometry, we could then investigate how different factors contribute to its organisation.

3.5. Cohesin loading is sufficient to promote mitotic-like rDNA organisation in G1

Cohesin complex, belonging to the Structural Maintenance of Chromosomes family, is a ring shaped complex originally described for its role in sister chromatids cohesion (Guacci et al., 1997a; Losada et al., 1998; Michaelis et al., 1997). It is now established that cohesin is also involved in 3D genome organisation by triggering DNA looping (Kagey et al., 2010; Parelho et al., 2008). In budding yeast, cohesin is loaded on DNA in late G1. At this stage, its association with DNA is dynamic because of a releasing activity, mediated by Wpl1, which dissociates the ring from DNA. Cohesin acetylation during replication abrogates Wpl1 activity and stabilises cohesin on DNA, allowing cohesin establishment.

Using Hi-C and FISH techniques, it has been shown that cohesin reorganises all genomic regions, including rDNA locus, from late G1 until mitosis (Dauban et al., 2019; Guacci et al., 1997b, 1994; Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017). To study cohesin-mediated mitotic organisation of rDNA in living cells, we degraded cohesin kleisin subunit Scc1 using an auxin-degron strategy, in TMY3 strain (see materials and methods). Upon cohesin depletion, mitotic rDNA did not organize into a stretched line anymore but rather appeared as a zig-zag line of small size, reminiscent of the one observed in G1-arrested cells (Fig. 7a). To uncouple the effect of cohesin from the contribution of S phase and mitosis specific processes on rDNA organisation, we checked whether cohesin loading on DNA in early G1 would be sufficient to promote mitotic-like rDNA organisation. To test this possibility, we expressed cohesin in early G1-arrested cells and evaluated rDNA geometry. Fully functional cohesin complex is absent from early G1 chromosomes in budding yeast because of separate activity cleaving Scc1 from mitosis to G1 (Uhlmann et al., 1999). To overcome separate activity, we expressed a non-cleavable variant of Scc1 (*Scc1-RR-DD*), in G1-arrested cells (Suppl. Fig. 6a) (Uhlmann et al., 1999). Expression of *Scc1-RR-DD* in G1 cells induced slight changes in rDNA organisation (Fig. 7b, left panel, Suppl. Fig. 6b). Image analysis revealed homogenisation of rDNA subdomain volumes, a characteristic of rDNA reorganisation prior to mitosis (Fig. 7c). While a tendency to an increased proportion of obtuse angles was detected, no increase in line length could be measured (Fig. 7c). We concluded that cohesin loading in G1 only partially reorganised rDNA from a G1 to a mitotic-specific configuration. This partial effect could be due to Wpl1 activity removing cohesin from DNA at this stage (Haarhuis et al., 2017; Kueng et al., 2006; Wutz et al., 2017). Indeed, cohesin needs to be stabilised on DNA in S phase to allow cohesin establishment and genome reorganisation. Therefore, cohesin stabilisation could also be necessary in G1 to promote mitotic-like rDNA 3D folding. To test this hypothesis, we stabilised cohesin on DNA by removing Wpl1 (*wpl1Δ*) and analysed consequence on rDNA organisation. Surprisingly, Wpl1 deletion by itself impacted rDNA organisation in G1. Subdomains folded into a more linear structure, as indicated by the modest increase in obtuse angles and their

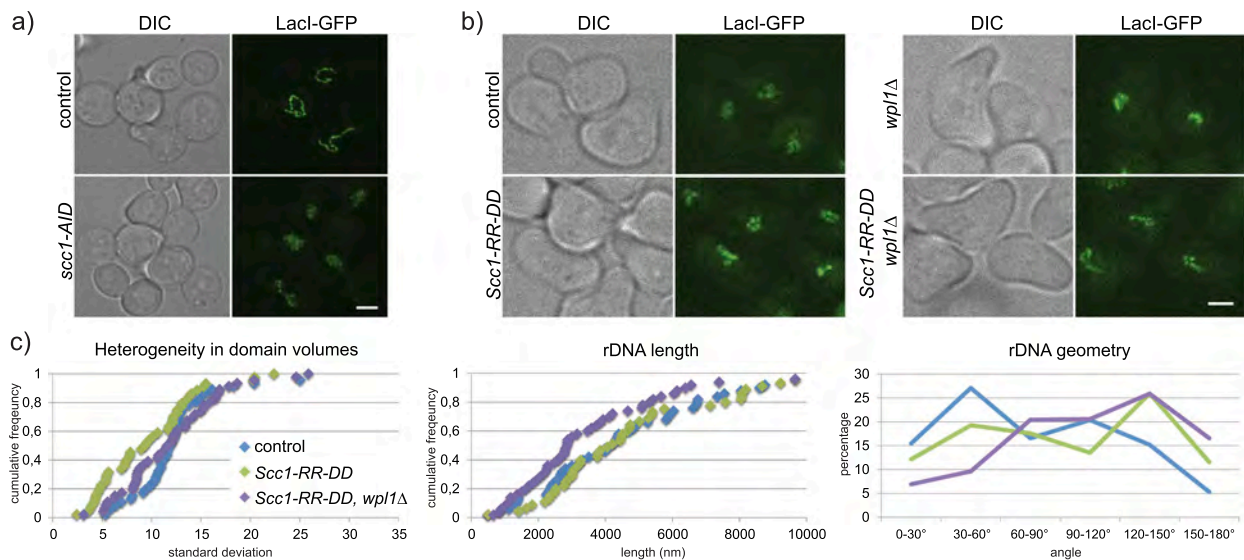


Fig. 7. Cohesin loading is sufficient to promote mitotic-like rDNA organisation in G1. a) Control strain (FB39) and strain expressing *scc1-AID* (yLD127-20c) were synchronised in G1 in the presence of auxin, released in the cell cycle and arrested in metaphase after 2 h by Cdc20 depletion (see materials and methods). Scale bar, 2 μ m b) Expression of a non-cleavable variant of Scc1 (*Scc1-RR-DD*) was induced in G1-arrested cells, in the presence or absence of Wpl1 (strains FB09-4A, FB09-9C, FB08-5C, FB08-6A). Scale bar, 2 μ m. c) Image analysis was performed on images from b), heterogeneity in domain volumes (left), line length (middle) and line geometry (right) are displayed as cumulative distribution functions. Control, n = 50; *Scc1-RR-DD*, n = 45; *wpl1Δ*, *Scc1-RR-DD* n = 50.

volumes heterogeneity drastically increased (Suppl. Fig. S6c). rDNA length and subdomains number per nucleus were not impacted by Wpl1 deletion (Suppl. Fig. S6b, c). Nevertheless, overexpressing Scc1 in *wpl1Δ* cells further impacted rDNA organisation. A distinct line could be observed in 2D projections, reminiscent of mitotic organisation (Fig. 7b, right panel). 3D image analysis confirmed a significant increase in obtuse angles, previously documented to be a feature of rDNA geometry in mitosis (Fig. 7c and see Fig. 6d). The volume of the subdomains remained unchanged while rDNA line length shortened when compared to control or Scc1 over-expression in presence of Wpl1. As a conclusion, cohesin stabilisation in G1-arrested cells was sufficient to reshape rDNA from a zig-zag organisation to a linear one but did not fully recapitulate a mitotic structure. Indeed, subdomains volume did not homogenize and rDNA line length was not increased (Fig. 7c and Fig. 6b,c). This suggests that at least another mechanism should be acting in mitosis to generate a stretched mitotic rDNA.

In conclusion, cohesin alone can establish linear rDNA organisation in G1, but other cell cycle regulated events are required to establish a fully organized rDNA in mitosis, visible as an elongated line, made of homogenous domains.

4. Discussion

In this work, we quantified rDNA 3D organisation changes following cell cycle progression and measured involvement of cohesin in this process. Despite the small size of the yeast nucleolus, we could clearly establish that rDNA occupies only a fraction of this volume. rDNA seems organised as a succession of subdomains, reminiscent of the spatially segregated globules organising bulk chromatin, as previously detected by super-resolution imaging in metazoan nuclei (Bintu et al., 2018). Finally, we could show that cohesin ring dictates geometry between these subdomains, as artificially expressing Scc1 in G1-arrested cells led to rDNA reorganisation into a “mitotic-like” geometry.

4.1. Hierarchical relationship between nucleolar morphology, rRNA production by Pol I and rDNA genomic organisation

Some *in silico* models suggest that specific chromatin properties of rDNA could be sufficient to organize the nucleolus. When chromatin was modelled as a hetero-polymer, an increased diameter for rDNA

fibre relative to the rest of the DNA was sufficient to recapitulate a crescent-shaped nucleolar distribution abutting the NE (Wong et al., 2013, 2012). Alternatively, modelling enrichment of dynamic cross-links within rDNA was sufficient to segregate nucleolar chromatin from bulk chromosomes (Hult et al., 2017).

However, several experimental works in budding yeast reported a rather loose relationship between nucleolar morphology and rDNA genomic organisation. When rDNA repeats were deleted from endogenous loci and ectopically inserted at various positions within chromosome arms, nucleolar morphology was not massively impaired (Oakes et al., 2006; Zhang et al., 2017). Moreover, formation of a fragmented, NE-associated, nucleolus was observed when rDNA genes were removed from chromosomal DNA and expressed from multicopy plasmids (Trumtel et al., 2000; Zhang et al., 2017). We show here that nucleolus has a normal morphology and is even increased in size while rDNA length is 8-fold shortened. Therefore, modification of rDNA genomic organisation has surprisingly mild consequences on nucleolar architecture.

Besides, large bodies of works have shown a direct relationship between pre-rRNA production and nucleolar assembly (Rudra and Warner, 2004). Pre-rRNA abundance is directly correlated to nucleolar size when Pol I is transcribing rDNA genes (Neumüller et al., 2013), while reduced production of rRNAs by RNA polymerase II, either from artificial constructs or from rDNA genes, leads to a massively altered and detached nucleolus from NE (Oakes et al., 1993; Trumtel et al., 2000). However, even if Pol I activity is modulated during cell cycle (Clemente-Blanco et al., 2009; Iacovella et al., 2015), nucleolar/nuclear volume ratio measured here was not significantly modified following cell cycle progression (Suppl. Fig. S3). Therefore, nucleolar volume seems largely insensitive to transient variations of Pol I activity during cell cycle. Compensatory regulation of rRNA processing or decay may buffer variation of Pol I induced rRNA production. Thus, pre-rRNA accumulation remains the driving force for nucleolar assembly and slight changes in Pol I transcription do not lead to nucleolar volume variation.

The nucleolus, the prominent compartment in the nucleus, is now considered to be the paradigm of liquid-liquid phase separation (LLPS) (Feric et al., 2016). Once rRNAs are produced by Pol I, they are bound by early rRNA processing factors, which have the capacity to phase separate into droplets and trigger the formation of a nucleolar compartment. This property is observed on the fragmented nucleolus of *rpa49Δ* Pol I mutant, in which nucleolar material was detected as large

“droplets” separated from rDNA genes (this study).

Our results support the model suggesting that high rDNA transcription rate by Pol I results in massive rRNA production driving nucleolar assembly (Hernandez-Verdun et al., 2002) by liquid-liquid phase separation (Feric et al., 2016).

4.2. rDNA is organized by “chromatin blobs” at all cell cycle stages

Using three-dimensional imaging, we could document that the 2 Mb-long rDNA is subdivided into subdomains at all cell cycle stages. Such spatially segregated conformations were not previously documented in G1 or mitosis, but only in S-phase (Guacci et al., 1994; Lavoie et al., 2004). In G1, subdomains were continuously overlaid thus they could not be distinguished and appeared as a blurred puff using 2D visualisation. Subdomains have been detected previously in S-phase, in a necklace appearance (Lavoie et al., 2004). As they are homogenous and have a straight geometry in mitosis, they were described as a “line”. *What are those subdomains?* It is well established that about half of the rDNA genes are actively transcribed and randomly distributed along the repeats (Conconi et al., 1989; Dammann et al., 1995, 1993). With an average of 6 subdomains per rDNA, about 30 rDNA genes would be expected to be present in each subdomain; implying that this spatial organisation does not reflect cluster of active or inactive rDNA genes. We propose that such subdomains organisation could reflect intrinsic properties of the chromatin polymer. Indeed, we previously suggested that chromosomes could be subdivided in a series of polymer beads, called blobs, which most likely arise from intrinsic properties of an extended polymer chain (Socol et al., 2019; Wang et al., 2015). Importantly, such subdomains are also reminiscent of spatially segregated globular conformations observed when 1.2 Mb of chromatin were visualized using super-resolution imaging (Bintu et al., 2018). Super-resolution is not required to detect rDNA subdomains because of spatial segregation of rDNA away from bulk nucleoplasmic chromatin.

4.3. Geometrical reorganization of rDNA during the cell cycle.

In this work, we also documented a global reorganization of rDNA subdomains, from a zig-zag segmented line of small size (5,5 μm) in G1, to a long, homogeneous line of 8,7 μm in metaphase. Central roles of cohesin and condensin complexes in rDNA organisation were previously established (Freeman et al., 2000; Guacci et al., 1994). In budding yeast, intact cohesin subunit Scc1 is absent in G1, giving us the opportunity to uncouple cohesin loading from cell cycle progression. By artificially expressing a stable Scc1 variant in G1 and removing Wpl1 to stabilize cohesin binding on DNA, we could observe that cohesin loading reshaped rDNA global geometry into a line-like one. In metazoan cells, cohesin also deeply influences size and geometry of chromatin subdomains/globules. Its absence provokes a high variability in size and position of chromosomal interacting subdomains from cell to cell, abolishing topologically associating domains detected at the population average level (Bintu et al., 2018). Thus, cohesin harbours a conserved function of folding chromatin subdomains into higher organised structures along the entire genome, including rDNA array.

5. Conclusion

In this study, we could quantitate nucleolar size and rDNA 3D reorganization during the entire cell cycle. Using live cell imaging, we could precisely decipher how cohesin activity impacts rDNA organisation, independently of cell cycle. While rDNA is used as a “gold-standard” to study chromosome organisation, development of super-resolution imaging of budding yeast chromosome arms would be required to investigate if nucleoplasmic chromatin follows a rDNA-like cell-cycle dependent reorganisation.

Funding

Funding was obtained from CBI (Centre de Biologie Integrative – Toulouse), Agence Nationale de la Recherche (ANR) [SinFONIE]; L. D. was supported by a Ph.D. Fellowship from the Ministere de l’Education Nationale Ph.D. Fellowship and l’Association pour la Recherche contre le Cancer Fellowship.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank the LITC imaging platform of Toulouse TRI for their assistance, the METI platform for the TEM acquisitions and Image processing platform for imaging pipeline. We also thank Pr. Gleizes’ group in CBI who kindly provided the probes used for FISH experiments. We also thank Alexandre Heurteau and Ludmilla Recoules for statistical test.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.08.010>.

References

- Albert, B., Léger-Silvestre, I., Normand, C., Ostermaier, M.K., Pérez-Fernández, J., Panov, K.I., Zomerdijk, J.C.B.M., Schultz, P., Gadal, O., 2011. RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *J. Cell Biol.* 192, 277–293. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006040>.
- Albert, B., Mathon, J., Shukla, A., Saad, H., Normand, C., Léger-Silvestre, I., Villa, D., Kamgoue, A., Mozziconacci, J., Wong, H., Zimmer, C., Bhargava, P., Bancaud, A., Gadal, O., 2013. Systematic characterization of the conformation and dynamics of budding yeast chromosome XII. *J. Cell Biol.* 202, 201–210. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208186>.
- Berger, A.B., Cabal, G.G., Fabre, E., Duong, T., Buc, H., Nehrbass, U., Olivo-Marin, J.-C., Gadal, O., Zimmer, C., 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat. Meth.* 5, 1031–1037. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1266>.
- Bintu, B., Mateo, L.J., Su, J.-H., Sinnott-Armstrong, N.A., Parker, M., Kinrot, S., Yamaya, K., Boettiger, A.N., Zhuang, X., 2018. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science* 362. <https://doi.org/10.1126/science.aau1783>.
- Bystricky, K., Heun, P., Gehlen, L., Langowski, J., Gasser, S.M., 2004. Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16495–16500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402766101>.
- Bystricky, K., Laroche, T., van Houwe, G., Blaszczyk, M., Gasser, S.M., 2005. Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. *J. Cell Biol.* 168, 375–387. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409091>.
- Castano, I.B., Brzoska, P.M., Sadoff, B.U., Chen, H., Christman, M.F., 1996. Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in. *Genes Dev.* 10, 2564–2576.
- 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* 458, 219–222. <https://doi.org/10.1038/nature07652>.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T., Sogo, J.M., 1989. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57, 753–761. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90790-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90790-3).
- D’Ambrosio, C., Kelly, G., Shirahige, K., Uhlmann, F., 2008a. Condensin-dependent rDNA decatenation introduces a temporal pattern to chromosome segregation. *Curr. Biol.* 18, 1084–1089. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.058>.
- D’Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., Uhlmann, F., 2008b. Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* 22, 2215–2227. <https://doi.org/10.1101/gad.1675708>.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., Sogo, J.M., 1993. Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 21, 2331–2338.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., Sogo, J.M., 1995. Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5294–5303.
- Dauban, L., Montagne, R., Thierry, A., Lazar-Stefanita, L., Gadal, O., Cournac, A., Koszul,

- R., Beckouet, F., 2019. A major role for Eco1 in regulating cohesin-mediated mitotic chromosome folding. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/589101>.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., Brangwynne, C.P., 2016. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell* 165, 1686–1697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.047>.
- Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., Strunnikov, A., 2000. The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J. Cell Biol.* 149, 811–824.
- French, S.L., Osheim, Y.N., Cioci, F., Nomura, M., Beyer, A.L., 2003. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol. Cell Biol.* 23, 1558–1568. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.5.1558-1568.2003>.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., Thuriaux, P., 2002a. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.* 21, 5498–5507.
- Gadal, O., Strauss, D., Petfalski, E., Gleizes, P.-E., Gas, N., Tollervy, D., Hurt, E., 2002b. Rlp7p is associated with 60S preribosomes, restricted to the granular component of the nucleolus, and required for pre-rRNA processing. *J. Cell Biol.* 157, 941–951. <https://doi.org/10.1083/jcb.200111039>.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., Weissman, J.S., 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741. <https://doi.org/10.1038/nature02046>.
- Gerke, P., Seufert, W., 2019. Compositional reorganization of the nucleolus in budding yeast mitosis. *Mol. Biol. Cell* 30, 591–606. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-08-0524>.
- Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H., Gasser, S.M., 1996. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 134, 1349–1363.
- Guacci, V., Hogan, E., Koshland, D., 1994. Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J. Cell Biol.* 125, 517–530.
- Guacci, V., Hogan, E., Koshland, D., 1997a. Centromere position in budding yeast: evidence for anaphase A. *Mol. Biol. Cell* 8, 957–972.
- Guacci, V., Koshland, D., Strunnikov, A., 1997b. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* 91, 47–57. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80008-8).
- Ha, C.W., Sung, M.-K., Huh, W.-K., 2012. Nsi1 plays a significant role in the silencing of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 40, 4892–4903. <https://doi.org/10.1093/nar/gks188>.
- Haarhuis, J.H.I., van der Weide, R.H., Blomen, V.A., Yáñez-Cuna, J.O., Amendola, M., van Ruiten, M.S., Krijger, P.H.L., Teunissen, H., Medema, R.H., van Steensel, B., Brummelkamp, T.R., de Wit, E., Rowland, B.D., 2017. The cohesin release factor WAPL restricts chromatid loop extension. *Cell* 169, 693–707.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.013>.
- Hamperl, S., Wittner, M., Babl, V., Perez-Fernandez, J., Tschochner, H., Griesenbeck, J., 2013. Chromatin states at ribosomal DNA loci. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2012.12.007>.
- Hannig, K., Babl, V., Hergert, K., Maier, A., Pilsl, M., Schächner, C., Stöckl, U., Milkereit, P., Tschochner, H., Seufert, W., Griesenbeck, J., 2019. The C-terminal region of Net1 is an activator of RNA polymerase I transcription with conserved features from yeast to human. *PLoS Genet.* 15, e1008006. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008006>.
- Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Gébrane-Younès, J., 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J. Cell Sci.* 115, 2265–2270.
- Huang, J., Moazed, D., 2003. Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes Dev.* 17, 2162–2176. <https://doi.org/10.1101/gad.1108403>.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O’Shea, E.K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691. <https://doi.org/10.1038/nature02026>.
- Hult, C., Adalsteinsson, D., Vasquez, P.A., Lawrimore, J., Bennett, M., York, A., Cook, D., Yeh, E., Forest, M.G., Bloom, K., 2017. Enrichment of dynamic chromosomal cross-links drive phase separation of the nucleolus. *Nucl. Acids Res.* 45, 11159–11173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx741>.
- Iacovella, M.G., Golfieri, C., Massari, L.F., Busnelli, S., Pagliuca, C., Dal Maschio, M., Infantino, V., Visintin, R., Mechtler, K., Ferreira-Cerca, S., De Wulf, P., 2015. Rio1 promotes rDNA stability and downregulates RNA polymerase I to ensure rDNA segregation. *Nat. Commun.* 6, 6643. <https://doi.org/10.1038/ncomms7643>.
- Jin, Q., Trelles-Sticken, E., Scherthan, H., Loidl, J., 1998. Yeast nuclei display prominent centromere clustering that is reduced in nondividing cells and in meiotic prophase. *J. Cell Biol.* 141, 21–29.
- Jin, Q.W., Fuchs, J., Loidl, J., 2000. Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 11), 1903–1912.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., Taatjes, D.J., Dekker, J., Young, R.A., 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430–435. <https://doi.org/10.1038/nature09380>.
- Klein, F., Laroche, T., Cardenas, M.E., Hofmann, J.F., Schweizer, D., Gasser, S.M., 1992. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J. Cell Biol.* 117, 935–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.5.935>.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M., Horiuchi, T., 1998. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* 12, 3821–3830.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., Peters, J.-M., 2006. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127, 955–967. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.040>.
- Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., 2014. Minimal, encapsulated proteomic sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat. Meth.* 11, 319–324. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2834>.
- 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 Dev.* 18, 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. *EMBO J.* 36, 2684–2697. <https://doi.org/10.15252/embj.201797342>.
- Léger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., 1999. Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 108, 103–113.
- Lopez-Serra, L., Lengronne, A., Borges, V., Kelly, G., Uhlmann, F., 2013. Budding yeast Wapl controls sister chromatid cohesion maintenance and chromosome condensation. *Curr. Biol.* 23, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.030>.
- Losada, A., Hirano, M., Hirano, T., 1998. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 12, 1986–1997. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.1986>.
- Lu, J., Kobayashi, R., Brill, S.J., 1996. Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. *J. Biol. Chem.* 271, 33678–33685. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33678>.
- Michaelis, C., Ciosk, R., Nasmyth, K., 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)80007-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80007-6).
- Miyazaki, T., Kobayashi, T., 2011. Visualization of the dynamic behavior of ribosomal RNA gene repeats in living yeast cells. *Genes Cells* 16, 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01506.x>.
- Mostofa, M.G., Rahman, M.A., Koike, N., Yeasmin, A.M., Islam, N., Waliullah, T.M., Hosoyamada, S., Shimobayashi, M., Kobayashi, T., Hall, M.N., Ushimaru, T., 2018. CLIP and cohesin separate rDNA from nucleolar proteins destined for degradation by nucleophagy. *J. Cell Biol.* 217, 2675–2690. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706164>.
- Neumüller, R.A., Gross, T., Samsonova, A.A., Vinayagam, A., Buckner, M., Founk, K., Hu, Y., Sharifpoor, S., Rosebrock, A.P., Andrews, B., Winston, F., Perrimon, N., 2013. Conserved regulators of nucleolar size revealed by global phenotypic analyses. *Sci. Signal.* 6, ra70. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004145>.
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W., Nomura, M., 1993. Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol. Cell Biol.* 13, 2441–2455.
- Oakes, M.L., Johzuka, K., Vu, L., Eliason, K., Nomura, M., 2006. Expression of rRNA genes and nucleolus formation at ectopic chromosomal sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 26, 6223–6238. <https://doi.org/10.1128/MCB.02324-05>.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., Cobb, B.S., Yokomori, K., Dillon, N., Aragon, L., Fisher, A.G., Merckenschlager, M., 2008. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.011>.
- Pederson, T., 2011. The nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000638>.
- Peng, M., Taouatas, N., Cappadona, S., van Breukelen, B., Mohammed, S., Scholten, A., Heck, A.J.R., 2012. Protease bias in absolute protein quantitation. *Nat. Meth.* 9, 524–525. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2031>.
- Petersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Potapova, T.A., Gerton, J.L., 2019. Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. *Chromosome Res.* 27, 109–127. <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9600-5>.
- Rudra, D., Warner, J.R., 2004. What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev.* 18, 2431–2436. <https://doi.org/10.1101/gad.1256704>.
- Schalbetter, S.A., Goloborodko, A., Fudenberg, G., Belton, J.-M., Miles, C., Yu, M., Dekker, J., Mirny, L., Baxter, J., 2017. SMC complexes differentially compact mitotic chromosomes according to genomic context. *Nat. Cell Biol.* 19, 1071–1080. <https://doi.org/10.1038/ncb3594>.
- Shou, W., Sakamoto, K.M., Keener, J., Morimoto, K.W., Traverso, E.E., Azzam, R., Hoppe, G.J., Feldman, R.M., DeModena, J., Moazed, D., Charbonneau, H., Nomura, M., Deshaies, R.J., 2001. Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol. Cell* 8, 45–55.
- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., Deshaies, R.J., 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97, 233–244. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80733-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80733-3).
- Smirnov, E., Cmarko, D., Mazel, T., Hornáček, M., Raška, I., 2016. Nucleolar DNA: the host and the guests. *Histochem. Cell Biol.* 145, 359–372. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1407-x>.
- Socol, M., Wang, R., Jost, D., Carrivain, P., Vaillant, C., Le Cam, E., Dahirel, V., Normand, C., Bystrycky, K., Victor, J.-M., Gadal, O., Bancaud, A., 2019. Rouse model with transient intramolecular contacts on a timescale of seconds recapitulates folding and fluctuation of yeast chromosomes. *Nucl. Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkz374>.
- Straight, A.F., Shou, W., Dowd, G.J., Turck, C.W., Deshaies, R.J., Johnson, A.D., Moazed, D., 1999. Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97, 245–256. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80734-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80734-5).
- Taddei, A., Gasser, S.M., 2012. Structure and function in the budding yeast nucleus.

- Genetics 192, 107–129. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140608>.
- Taddei, A., Schober, H., Gasser, S.M., 2010. The budding yeast nucleus. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2, a000612. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000612>.
- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., Kouzarides, T., 2014. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. Nature 505, 564–568. <https://doi.org/10.1038/nature12819>.
- 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. Mol. Cell 69, 664–676.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.030>.
- Thiry, M., Lafontaine, D.L.J., 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. Trends Cell Biol. 15, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.02.007>.
- Tollervy, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Hurt, E.C., 1991. The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarlin) is required for pre-rRNA processing in yeast. EMBO J. 10, 573–583.
- Trumtel, S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulières, F., Gas, N., 2000. Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. Mol. Biol. Cell 11, 2175–2189. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.6.2175>.
- Uchida, M., Sun, Y., McDermott, G., Knoechel, C., Le Gros, M.A., Parkinson, D., Drubin, D.G., Larabell, C.A., 2011. Quantitative analysis of yeast internal architecture using soft X-ray tomography. Yeast 28, 227–236. <https://doi.org/10.1002/yea.1834>.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., Nasmyth, K., 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. Nature 400, 37–42. <https://doi.org/10.1038/21831>.
- Visintin, R., Hwang, E.S., Amon, A., 1999. Cfl1p prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. Nature 398, 818–823.
- Waminal, N.E., Pellerin, R.J., Kim, N.-S., Jayakodi, M., Park, J.Y., Yang, T.-J., Kim, H.H., 2018. Rapid and efficient FISH using pre-labeled oligomer probes. Sci. Rep. 8, 8224. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26667-z>.
- Wang, D., Mansidior, A., Prabhakar, G., Hochwagen, A., 2016a. Condensin and Hmo1 mediate a starvation-induced transcriptional position effect within the ribosomal DNA array. Cell Rep. 14, 1010–1017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.005>.
- Wang, R., Kamgoue, A., Normand, C., Léger-Silvestre, I., Mangeat, T., Gadal, O., 2016b. High resolution microscopy reveals the nuclear shape of budding yeast during cell cycle and in various biological states. J. Cell Sci. 129, 4480–4495. <https://doi.org/10.1242/jcs.188250>.
- Wang, R., Mozziconacci, J., Bancaud, A., Gadal, O., 2015. Principles of chromatin organization in yeast: relevance of polymer models to describe nuclear organization and dynamics. Curr. Opin. Cell Biol. 34, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.004>.
- Wong, H., Arbona, J.-M., Zimmer, C., 2013. How to build a yeast nucleus. Nucleus 4, 361–366. <https://doi.org/10.4161/nucl.26226>.
- Wong, H., Marie-Nelly, H., Herbert, S., Carrivain, P., Blanc, H., Koszul, R., Fabre, E., Zimmer, C., 2012. A predictive computational model of the dynamic 3D interphase yeast nucleus. Curr. Biol. 22, 1881–1890. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.069>.
- Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D.A., Stocsits, R.R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M.J., Walther, N., Koch, B., Kueblbeck, M., Ellenberg, J., Zuber, J., Fraser, P., Peters, J.-M., 2017. Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. EMBO J. 36, 3573–3599. <https://doi.org/10.15252/embj.201798004>.
- Yang, C.H., Lambie, E.J., Hardin, J., Craft, J., Snyder, M., 1989. Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. Chromosoma 98, 123–128.
- Zhang, W., Zhao, G., Luo, Z., Lin, Y., Wang, L., Guo, Y., Wang, A., Jiang, S., Jiang, Q., Gong, J., Wang, Y., Hou, S., Huang, J., Li, T., Qin, Y., Dong, J., Qin, Q., Zhang, J., Zou, X., He, X., Zhao, L., Xiao, Y., Xu, M., Cheng, E., Huang, N., Zhou, T., Shen, Y., Walker, R., Luo, Y., Kuang, Z., Mitchell, L.A., Yang, K., Richardson, S.M., Wu, Y., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., Yang, H., Lin, J., Chen, G.-Q., Wu, Q., Bader, J.S., Cai, Y., Boeke, J.D., Dai, J., 2017. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. Science 355. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3981>.

Supplementary Figure

Table S1: Yeast strains used in the study

Strain name	Genotype	Background	Reference
W303-1a	<i>MATa, leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	W303	(Thomas and Rothstein, 1989)
yLD166-1a	<i>MATa, leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i> + [pUN-GFP-NOP1]	W303	This study
yLD31-1a	<i>MATa, trp1-1, can1-100, his3-11,13, rDNA::pTM-lacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i> + [pUN100-mCherry-NOP1]	W303	This study
yLD26-1a	<i>MATa, his3-11,15, trp1-1, ade2-1, can1-100, fob1Δ::HIS3, UAF30-GFP::URA3, NUP57-tDimer::LEU2</i> , rDNA copy no. ~190	W303	This study
yLD27-1a	<i>MATa, leu2-3,112, his3-11,15, trp1-1, ade2-1, can1-100, fob1Δ::KAN-MX, UAF30::GFP-URA3, NUP57-tDimer::LEU2</i> , rDNA copy no. ~25	W303	This study
NOY1064	<i>MATa, leu2-3,112, ura3-1, his3-11, trp1-1, ade2-1, can1-100, fob1Δ::HIS3</i> , rDNA copy no. ~190	W303	(Machín et al., 2006)
NOY1071	<i>MATa, leu2-3,112, ura3-1, his3-11, trp1-1, ade2-1, can1-100, fob1Δ::HIS3</i> , rDNA copy no. ~25	W303	(Machín et al., 2006)
yCNOD99-1a	<i>MATa his3-Δ1, leu2-Δ0, C, ura3-Δ0, ade2-801, lys2-801, lys2-Δ::KAN-MX, nup49Δ::HPH-MX6</i> + [pASZ11-NUPNOP: GFP-NUP49, mCherry-NOP1]	S288C	(Wang et al., 2016)
TMY3	<i>MATa, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, his3-11,13, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	W303	(Miyazaki and Kobayashi, 2011)
yLD1-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, HMO1-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD2-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, FOB1-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD3-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, NET1-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD4-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, RRN7-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD5-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, RRN5-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD6-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, RRN9-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD7-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, SIR2-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD8-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, CDC14-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD9-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, SMC4-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD10-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, NSI1-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD11-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, RPA190-GFP::URA3</i>	S288C	This study

yLD12-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, UAF30-GFP::URA3</i>	S288C	This study
yLD13-1a	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, YCG1-GFP::URA3</i>	S288C	This study
FB39	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, his3-11,13, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, TRP1::P_{MET3}-CDC20</i>	W303	This study
yLD127-20c	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, SCC1-PK3-aid::KanMX4, his3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::HIS3, TRP1: P_{MET3}-CDC20</i>	W303	This study
yLD30-1a	<i>MATa, trp1-1, can1-100, his3-11,13, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, NET1-tDimer::LEU2</i>	W303	This study
yLD41-1a	<i>MATa, trp1-1, can1-100, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, NET1-tDimer::LEU2, fob1Δ::HIS3</i>	W303	This study
yLD42-1a	<i>MATa, trp1-1, can1-100, his3-11,13, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, rpa49Δ::HPH + [pUN100-mCherry-NOP1]</i>	W303	This study
FB09-4A	<i>MATa, his3-11,15, trp1-1, can1-100, SCC1-PK9::KAN-MX, leu2::P_{GAL}-SCC1(R180D,268D)-HA3::LEU (single integrant), rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	W303	This study
FB09-9C	<i>MATa, leu2-3,112, trp1-1, his3-11,15, can1-100, Scc1-PK9::KAN-MX, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	W303	This study
FB08-5C	<i>MATa, his3-11,15, trp1-1, can1-100, SCC1-PK9::KAN-MX, wpl1Δ::HPH-MX, leu::P_{GAL}-SCC1(R180D,268D)-HA3::LEU, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	W303	This study
FB08-6A	<i>MATa, leu2-3,112, trp1-1, his3-11,15, can1-100, SCC1-PK9::KAN-MX, wpl1Δ::HPH-MX, rDNA::pTM-LacO50(URA3), ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	W303	This study

Table S2: Plasmids used

Name	Yeast genes	References
pUN-GFP-NOP1	<i>ARS/CEN, LEU2, GFP-NOP1</i>	(Hellmuth et al., 1998)
pUN100-mCherry-NOP1	<i>ARS/CEN, LEU2, mCHERRY-NOP1</i>	(Berger et al., 2008)
pASZ11-NUPNOP	<i>ARS/CEN, ADE2, GFP-NUP49, mCHERRY-NOP1</i>	(Berger et al., 2008)

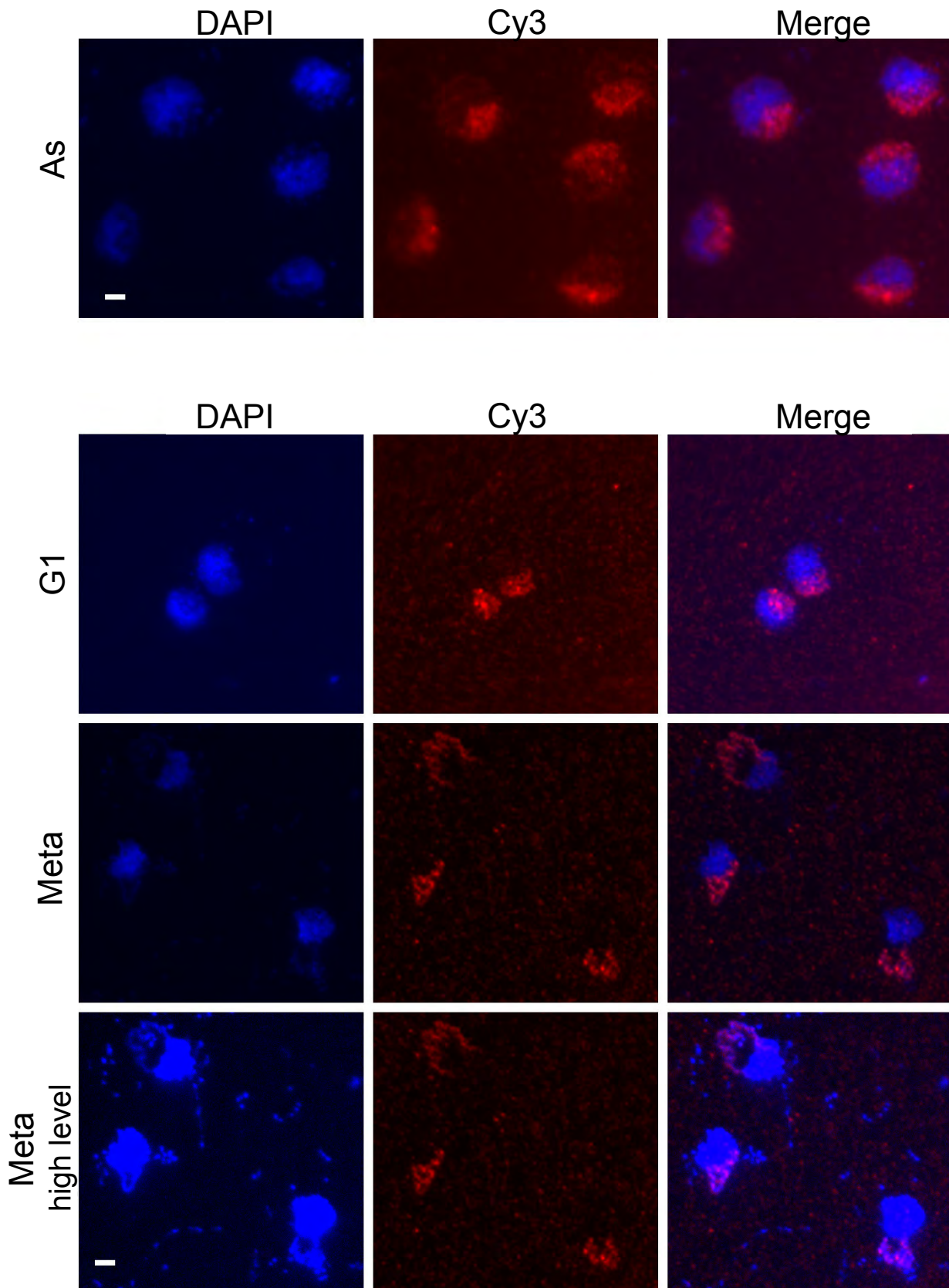
Table S3: Oligos used for rDNA labelling by FISH

Name	Sequence	Nucleotide modified
------	----------	---------------------

18S-01 Sc	TXG TTC CTC GTT AAG GXA TTT ACA TTG TAC TCA TXC C	Cy3-modified on X
18S-02 Sc	TGX TAC GAC TTT TAG TTC CXC TAA ATG ACC AAG TTT GXC C	Cy3-modified on X
25S-01 Sc	CCC GTT CCC TTG GCT GTG GTT TCG CTA GAX A	Cy3-modified on X
ITS1-01 Sc	TXG CAC AGA AAT CTC XCA CCG TTT GGA AXA GCA AGA AAG AAA CXT ACA AGC XT	Cy3-modified on X
ITS2-01 Sc	AXA GGC CAG GAA TTT CAA GTX AAC TCC AAA GAG TAT CAC XC	Cy3-modified on X
ITS2-02 Sc	ACX TTA AGA ACA TTG TTC GCC XAG ACG CTC TCT TCT TAX C	Cy3-modified on X
5S ext Sc	AXA AAG AAA TAA AGA XTG CAG CAC CTG AXT	Cy3-modified on X
5S-01 Sc	CXC GGT CAG GCT CTT ACC AGC XTA ACT ACA GTT GAX AGG ACG	Cy3-modified on X
ETS1 A0 Sc	AXC CTT CGC TGC XCA CCA ATG GAA XCG CAA GAT GCC CAC GAX G	Cy3-modified on X
ETS1 A0 sens Sc	CAX CGT GGG CAT CTX GCG ATT CCA TTG GXG AGC AGC GAA GGA XT	Cy3-modified on X
ITS1 compl Sc	GCT TGT AAG TTT CTT TCT TGC TAT TCC AAA CGG TGA GAG ATT TCT GTG C	Cy3 modification on 5'

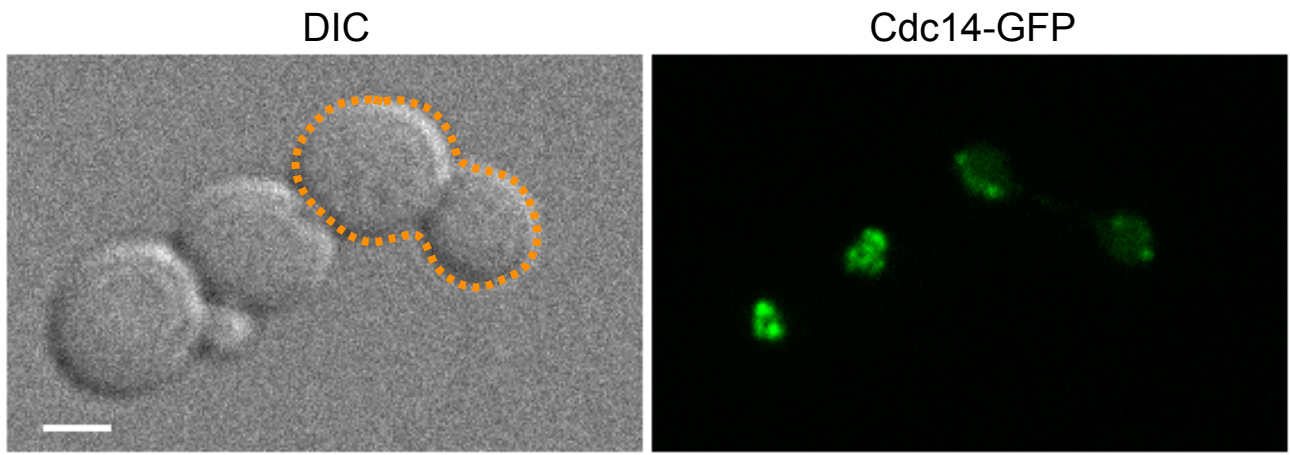
Bibliography

- Berger, A.B., Cabal, G.G., Fabre, E., Duong, T., Buc, H., Nehrbass, U., Olivo-Marin, J.-C., Gadal, O., Zimmer, C., 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat. Methods* 5, 1031–1037. doi:10.1038/nmeth.1266
- Hellmuth, K., Lau, D.M., Bischoff, F.R., Künzler, M., Hurt, E., Simos, G., 1998. Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6374–6386. doi:10.1128/mcb.18.11.6374
- Machín, F., Torres-Rosell, J., De Piccoli, G., Carballo, J.A., Cha, R.S., Jarmuz, A., Aragón, L., 2006. Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction. *J. Cell Biol.* 173, 893–903. doi:10.1083/jcb.200511129
- Miyazaki, T., Kobayashi, T., 2011. Visualization of the dynamic behavior of ribosomal RNA gene repeats in living yeast cells. *Genes Cells* 16, 491–502. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01506.x
- Thomas, B.J., Rothstein, R., 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619–630. doi:10.1016/0092-8674(89)90584-9
- Wang, R., Kamgoue, A., Normand, C., Léger-Silvestre, I., Mangeat, T., Gadal, O., 2016. High resolution microscopy reveals the nuclear shape of budding yeast during cell cycle and in various biological states. *J. Cell Sci.* 129, 4480–4495. doi:10.1242/jcs.188250



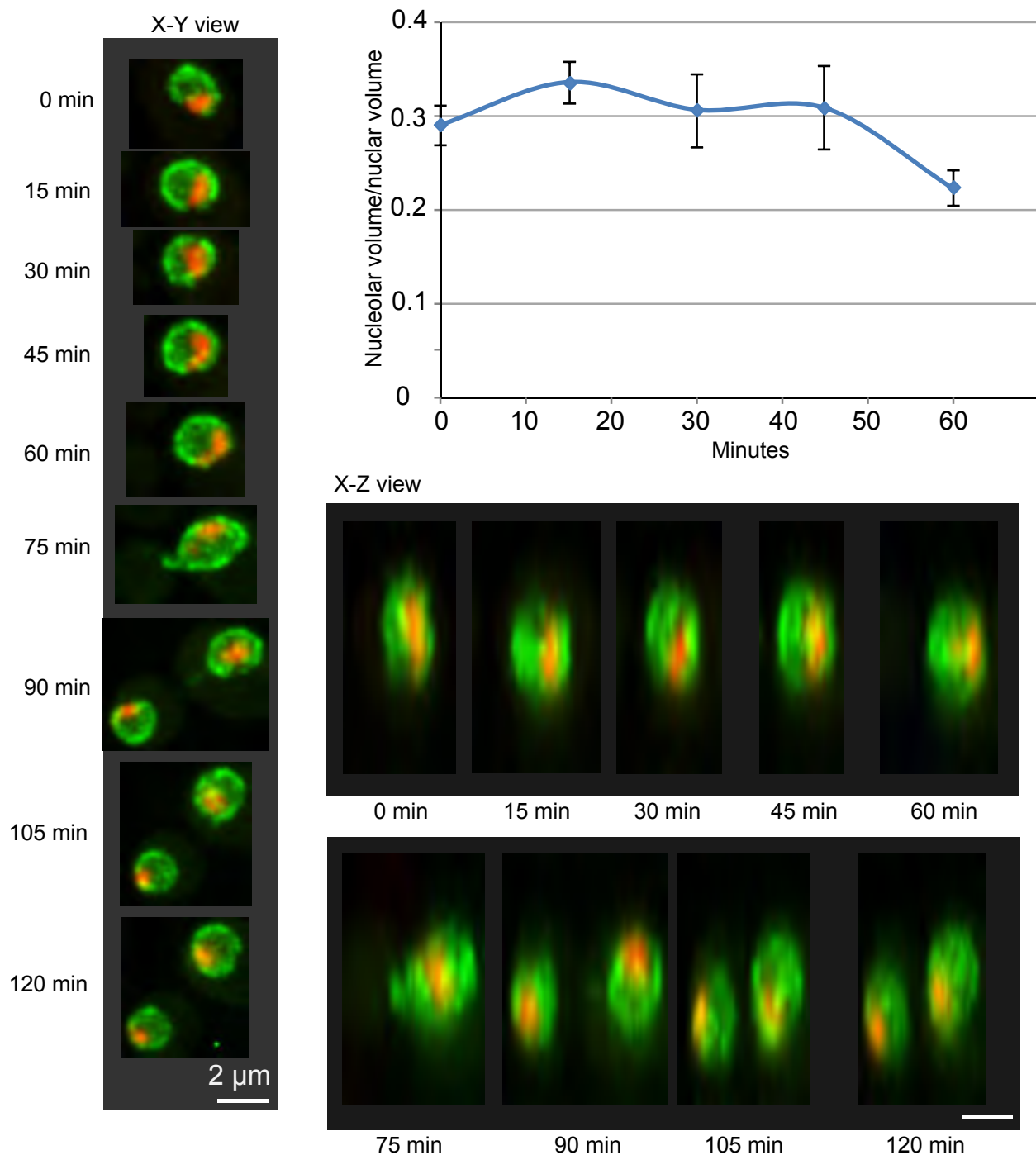
Supplementary Figure S1: Cell cycle dependent rDNA reorganisation visualised by FISH.

rDNA of W303-1a yeast cells was detected by FISH using a set of different oligo-probes containing Cy3 modified bases (see materials and methods), DNA was stained with DAPI. Top: asynchronous cells, bottom: cells arrested in G1 with alpha-factor or in metaphase with Nocodazole. Note that metaphasic rDNA loops can be visualised with DAPI after changing the picture grey levels dynamic (high level). Scale bar, 2 μ m.



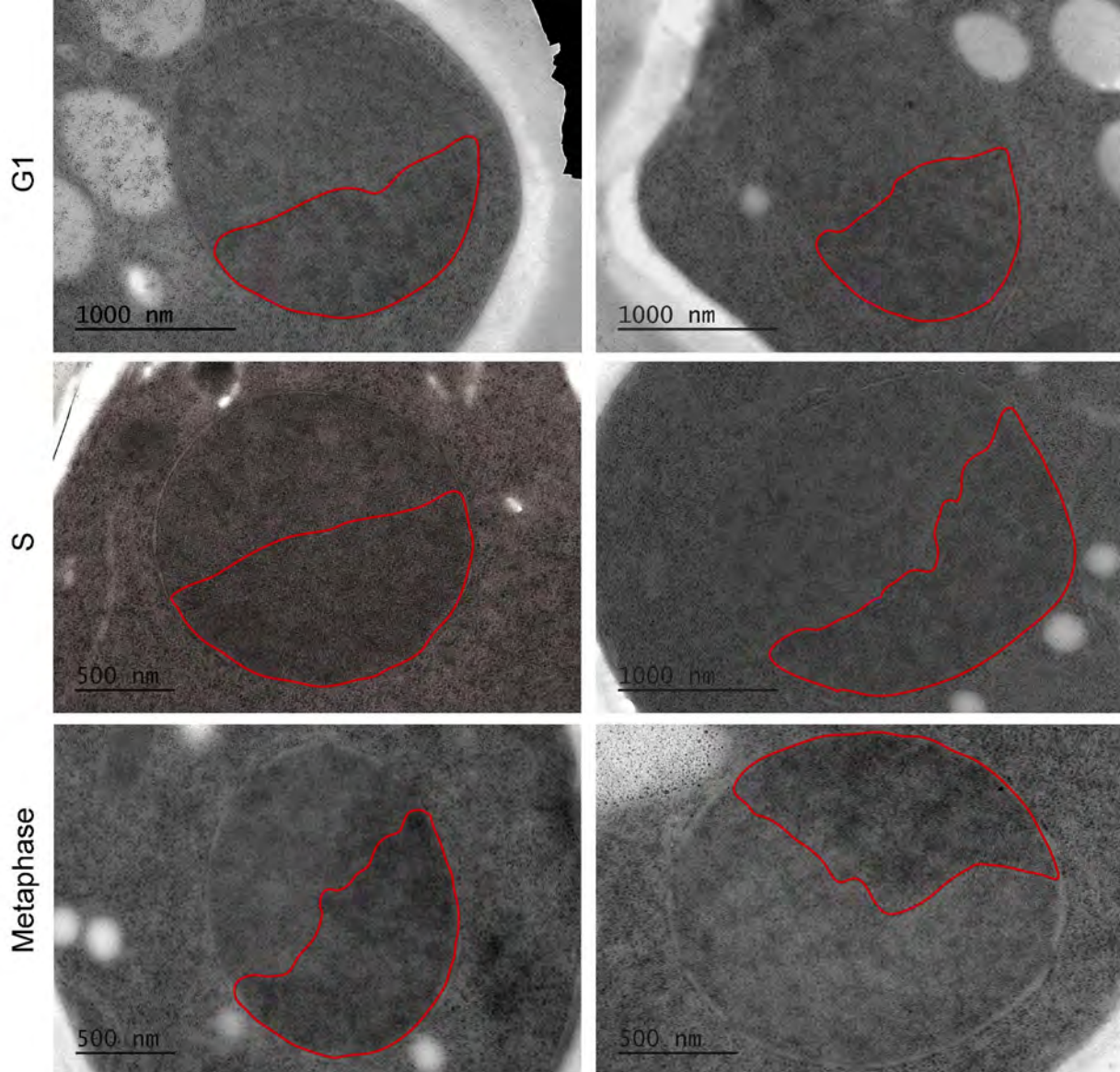
Supplementary Figure S2: Cdc14 localisation to rDNA is cell cycle regulated.

Asynchronous population of strain expressing Cdc14 tagged with GFP (yLD8-1a) was imaged under confocal microscope. Mitotic cell is highlighted in orange. Scale bar, 2 μ m.



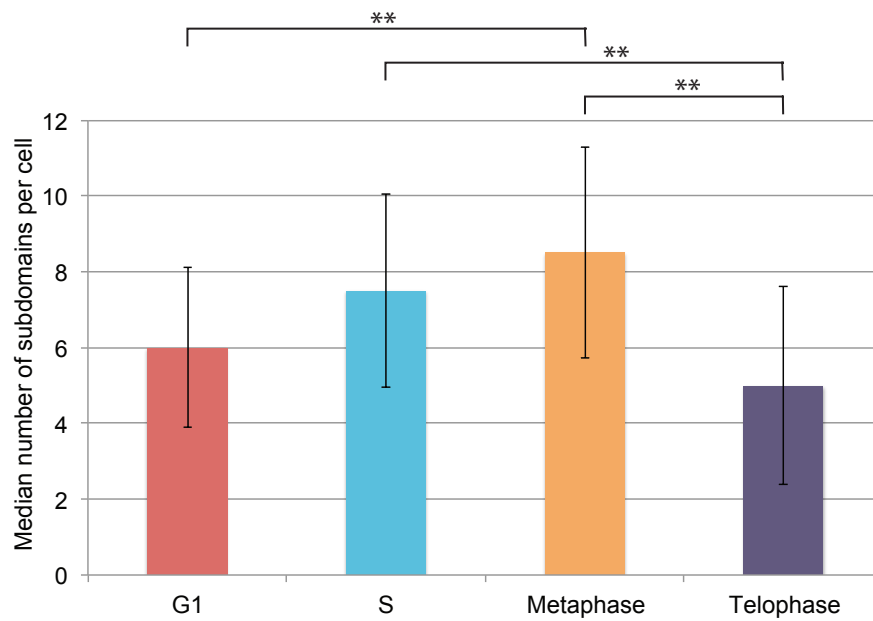
Supplementary Figure S3: Nucleolar volume remains constant along cell cycle.

Strain $\gamma\text{CNOD99-1a}$ was grown on microfluidic device and images were acquired every 15 min. Nucleolar/nuclear volume ratio was determined at each time point (top right panel). 2D-projections of a cell progressing through cell cycle are shown from X-Y view (left panel) and X-Z view (bottom right panel). Scale bar, 2 μm .



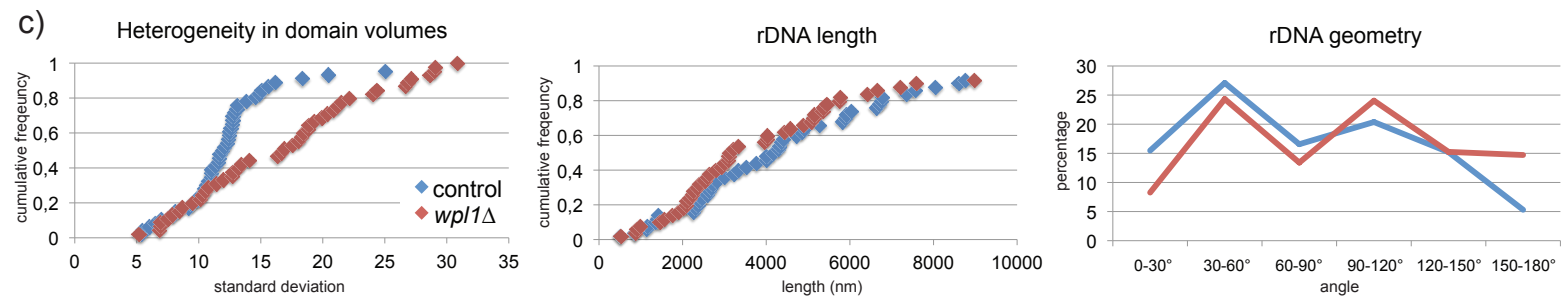
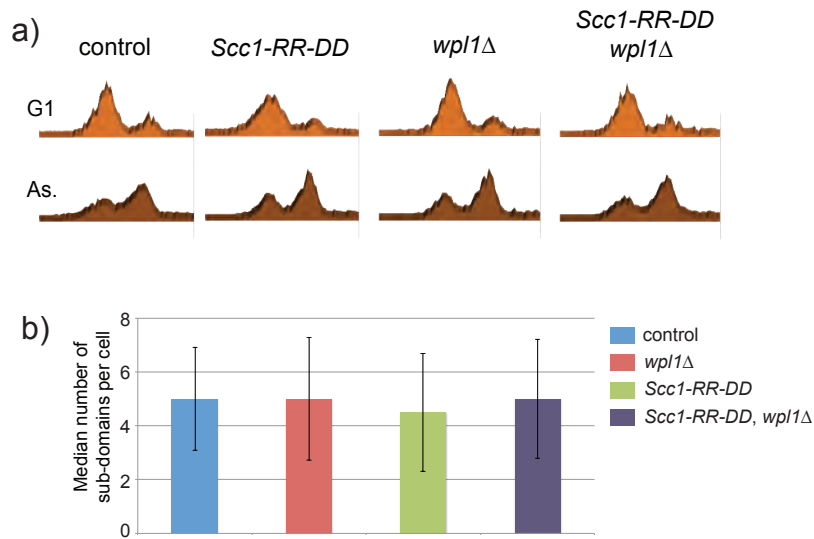
Supplementary Figure S4: Nucleolar morphology is not impacted by cell cycle progression.

TMY3 strain was synchronised in G1 with alpha-factor treatment, washed and released in Nocodazole containing media. Samples were taken for cryo-fixation and subsequent TEM imaging at 0 min, 30 min and 120 min after release (G1, S and metaphase-arrested conditions respectively). Red lines highlight nucleoli.



Supplementary Figure S5: rDNA subdomain number is not massively altered during cell cycle progression.

Median number of subdomains per cell was computed for the same conditions as in Fig 3. Kolmogorov-Smirnov statistical test was performed to test for significant difference. **, p-value < 0,01.



Supplementary Figure S6: Wpl1 deletion has a slight effect on rDNA organisation in G1.

a) G1 arrest of control (FB09-9C), overexpressing *Scc1-RR-DD*, (FB09-4A), *wpl1*Δ (FB08-6A) and overexpressing *Scc1-RR-DD, wpl1*Δ (FB08-5C) strains was assessed by flow cytometry.

b) Median number of subdomains per cell was computed for the same strains as in a).

c) Heterogeneity in domain volumes (left), rDNA length (middle) and rDNA geometry (right) were quantified for control and *wpl1*Δ cells and displayed as cumulative distribution functions. Control, n=50 ; *wpl1*Δ, n=50.

c. Discussion

Dans l'étude présentée ci avant, nous avons pu montrer, par développement d'une analyse d'images dédiée, que l'ADNr confiné à l'intérieur du compartiment nucléolaire était constitué de sous-domaines quelle que soit l'étape du cycle cellulaire considérée. Avec la progression du cycle, le nombre de sous-domaines par cellule varie peu alors que leur volume et leur organisation spatiale sont modifiés. Ainsi le « *puff* » observé en G1 résulte de la superposition de plusieurs sous-domaines de volumes variables, alors que la ligne mitotique est engendrée par l'alignement de sous-domaines de volumes comparables. Nous avons également montré que les cohésines jouaient un rôle dans la réorganisation spatiale de ces sous-domaines.

Par la suite, nous avons cherché à disséquer le mécanisme d'action des cohésines sur l'organisation de l'ADNr au cours du cycle cellulaire. Ces résultats supplémentaires sont présentés dans la section suivante.

De nombreux acteurs autres que les cohésines peuvent également jouer un rôle important dans l'organisation tridimensionnelle de l'ADNr. Les condensines compactent cette fibre en mitose et leur déplétion conduit à une désorganisation massive de l'ADNr, similaire à celle observée en condition de déplétion des cohésines (Lavoie et al., 2002, 2004; Lazar-Stefanita et al., 2017). Cependant la désorganisation de l'ADNr après déplétion des condensines est réversible (l'ADNr se réorganise en ligne lors de la réexpression des condensines) alors qu'elle ne l'est pas après déplétion des cohésines (l'ADNr reste sous forme de « *puff* », lors de la réexpression des cohésines, (Lavoie et al., 2002)). De plus, lorsque les cohésines et les condensines ne sont exprimées qu'à partir de la mitose, l'ADNr semble adopter une organisation typique de cette phase du cycle (Lavoie et al., 2002). Ces résultats suggèrent un rôle complémentaire mais distinct de ces deux complexes sur l'ADNr. Tout comme les cohésines, les condensines pourraient réguler la géométrie des sous-domaines de l'ADNr, mais également leur nombre et/ou leur taille. L'utilisation de notre analyse d'images permettra de mieux comprendre le rôle respectif des cohésines et des condensines sur l'organisation de l'ADNr.

Par ailleurs, il est décrit que l'activité de la Pol I est régulée au cours du cycle cellulaire (Clemente-Blanco et al., 2009; Wittner et al., 2011). Cela pourrait également avoir une influence sur l'organisation 3D de l'ADNr. En effet, une chute de la transcription par la Pol I est associée à une compaction (*i.e.* une diminution du volume total) du nucléole et de l'ADNr (Mostofa et al., 2018; Tsang et al., 2003). Cependant la cinétique entre ces événements n'est pas établie. La chute

de la transcription pourrait induire la compaction de l'ADNr, ceci engendrant une compaction du nucléole (phénomène direct). Alternativement la chute de la transcription pourrait entraîner en premier lieu une réduction du volume nucléolaire, ce qui compacterait alors l'ADNr (phénomène indirect). La corrélation entre un ADNr compacté et une chute de la transcription par la Pol I est donc difficilement interprétable sur le plan mécanistique (voir le mutant *rpa49Δ* dans l'article II, (Tsang et al., 2003)). Nous proposons d'explorer cette corrélation dans différentes phases du cycle cellulaire en analysant simultanément la taille du nucléole et l'organisation de l'ADNr lors de l'inactivation rapide de la transcription par la Pol I. En effet, une telle inactivation de la transcription pourrait permettre de découpler des effets directs (compaction de l'ADNr), d'effets indirects (compaction du nucléole puis de l'ADNr) de la transcription sur l'organisation de l'ADNr. Classiquement, l'inhibition de la transcription par la Pol I est induite par l'ajout de rapamycine dans le milieu de culture (Mostofa et al., 2018; Tsang et al., 2003). La rapamycine induit la répression d'un complexe senseur de la présence de nutriments dans la cellule, TORC1 (Heitman et al., 1991; Schmelzle and Hall, 2000). Cette répression conduit à une réponse générale de la cellule dont l'inhibition de la traduction et de la transcription par la Pol I et par la Pol III ((Dennis et al., 1999; Powers and Walter, 1999; Tsang and Zheng, 2007; Zaragoza et al., 1998) pour revues (Dennis et al., 1999; Powers and Walter, 1999; Tsang and Zheng, 2007; Zaragoza et al., 1998)). Ainsi le traitement des cellules à la rapamycine n'induit pas une inhibition spécifique de la transcription par la Pol I. En revanche, l'inhibition rapide et spécifique de la transcription par la Pol I peut être obtenue par l'ajout du composé anti-cancéreux, le BMH-21, dans les cultures de levures (Peltonen et al., 2014; Wei et al., 2018). Nous proposons de synchroniser les cellules à différentes phases du cycle cellulaire (G1, G1/S, métaphase par exemple), d'induire l'inhibition de la transcription par la Pol I et d'analyser les conséquences sur le volume nucléolaire ainsi que sur l'organisation de l'ADNr.

Cela permettrait d'analyser s'il existe un lien entre la transcription de l'ADNr et le nombre ou le volume des sous-domaines détectés par notre analyse d'images et de ce fait de préciser quelle pourrait être leur nature et leur fonction.

Enfin, il serait intéressant de tester le rôle de certaines protéines telles que Fob1 ou Hmo1 sur l'organisation de l'ADNr (voir Chapitre IV de l'introduction). Pour rappel, Fob1 se lie sur le site RFB et est impliquée dans de nombreux processus comme le blocage de la progression bidirectionnelle des fourches de réplication (Kobayashi and Horiuchi, 1996), le recrutement des

condensines (Johzuka and Horiuchi, 2009) ou la mise en silence de gènes adjacents transcrits par l'ARN Pol II (Huang and Moazed, 2003). Capable de dimérisation, elle est également décrite comme impliquée dans la formation de boucles entre différentes copies d'ADNr (Choudhury et al., 2015). Hmo1 appartient à la famille des HMG-B et lie les régions dénuées de nucléosomes, sans spécificité de séquence (Hall et al., 2006; Kamau et al., 2004; Lu et al., 1996; Murugesapillai et al., 2014). Tout comme son orthologue UBF1 chez les mammifères, Hmo1 est enrichi sur la région codant les ARNr (Albert et al., 2013; Gadai et al., 2002; Hall et al., 2006). D'après les données préliminaires que nous avons pu acquérir, altérer le niveau d'expression de ces deux protéines ne semble pas conduire à une réorganisation massive de l'ADNr. En effet l'inactivation de Fob1 et la surexpression d'Hmo1 induisent des changements mineurs de l'ADNr, difficilement détectables lors de la projection des images en 2D. Il serait donc intéressant d'analyser l'organisation en 3D de l'ADNr dans ces conditions afin de détecter d'éventuelles réorganisations imperceptibles en 2D.

Aujourd'hui basée sur de la microscopie à fluorescence conventionnelle, il est évident qu'extrapoler cette analyse d'images sur des images acquises en microscopie à haute résolution (PALM (« *Photo-Activated Localisation Microscopy* ») ou SIM par exemple) permettra une compréhension beaucoup plus détaillée des processus étudiés.

En conclusion, cette analyse d'image est prometteuse et contribuera à élucider le rôle de différents acteurs protéiques dans l'organisation tridimensionnelle de l'ADNr.

B. Un rôle additionnel de Pds5 dans l'organisation de l'ADNr

a. Préambule

Il est établi dans la littérature que les cohésines sont essentielles pour organiser l'ADNr (Guacci et al., 1997; Heidinger-Pauli et al., 2010; Lavoie et al., 2002). Nous avons pu approfondir ces résultats en mettant en évidence que les cohésines régulaient la géométrie en 3D des sous-domaines composant l'ADNr (Guacci et al., 1997; Heidinger-Pauli et al., 2010; Lavoie et al., 2002).

Les cohésines sont recrutées à l'ADNr de la fin de la phase G1 jusqu'en mitose (Glynn et al., 2004; Laloraya et al., 2000) et y régulent de nombreux processus essentiels (Potapova and Gerton, 2019). Déréguler/invalidier les cohésines affecte la morphologie du nucléole, la transcription par la Pol I et la biogénèse des ribosomes (Bose et al., 2012; Gard et al., 2009; Harris et al., 2014) ; l'instabilité génomique du locus est également accrue dans ces conditions, par l'accroissement des recombinaisons et des cassures doubles brins (Heidinger-Pauli et al., 2010; Ide et al., 2010). Enfin, l'organisation de l'ADNr au cours du cycle cellulaire et sa ségrégation lors de la mitose sont altérés en absence des cohésines (Guacci et al., 1994, 1997; Heidinger-Pauli et al., 2010). Cependant, le mécanisme d'action de ce complexe à l'ADNr reste à élucider.

Des résultats non inclus dans la publication précédente sont présentés dans cette section. Tout d'abord nous avons analysé les conséquences de la déplétion des cohésines à différentes phases du cycle cellulaire. Puis, sachant que Pds5, Wpl1 et Eco1 sont impliquées dans l'organisation des chromosomes (Article I), nous avons analysé leur contribution à l'organisation de l'ADNr. Comme dans le travail soumis pour publication, nous avons utilisé la souche TMY3 permettant la visualisation de l'ADNr en microscopie à fluorescence, combiné aux différents outils génétiques utilisés lors des deux études précédentes.

Nos résultats suggèrent que les cohésines sont requises pour établir l'organisation de l'ADNr avant la phase S mais également pour la maintenir jusqu'en métaphase. En revanche, Pds5 semble nécessaire pour établir l'organisation de l'ADNr mais pas pour la maintenir. De plus, l'invalidation de Wpl1 et d'Eco1 ne « phénocopie » pas celle de Pds5. Même s'ils restent à confirmer, ces résultats suggèrent un nouveau rôle de Pds5 dans l'organisation de l'ADNr et semblent indiquer une contribution différente des cohésines sur les chromosomes et sur l'ADNr.

Les souches utilisées dans cette section ainsi que les méthodes sont détaillées en Annexe II.

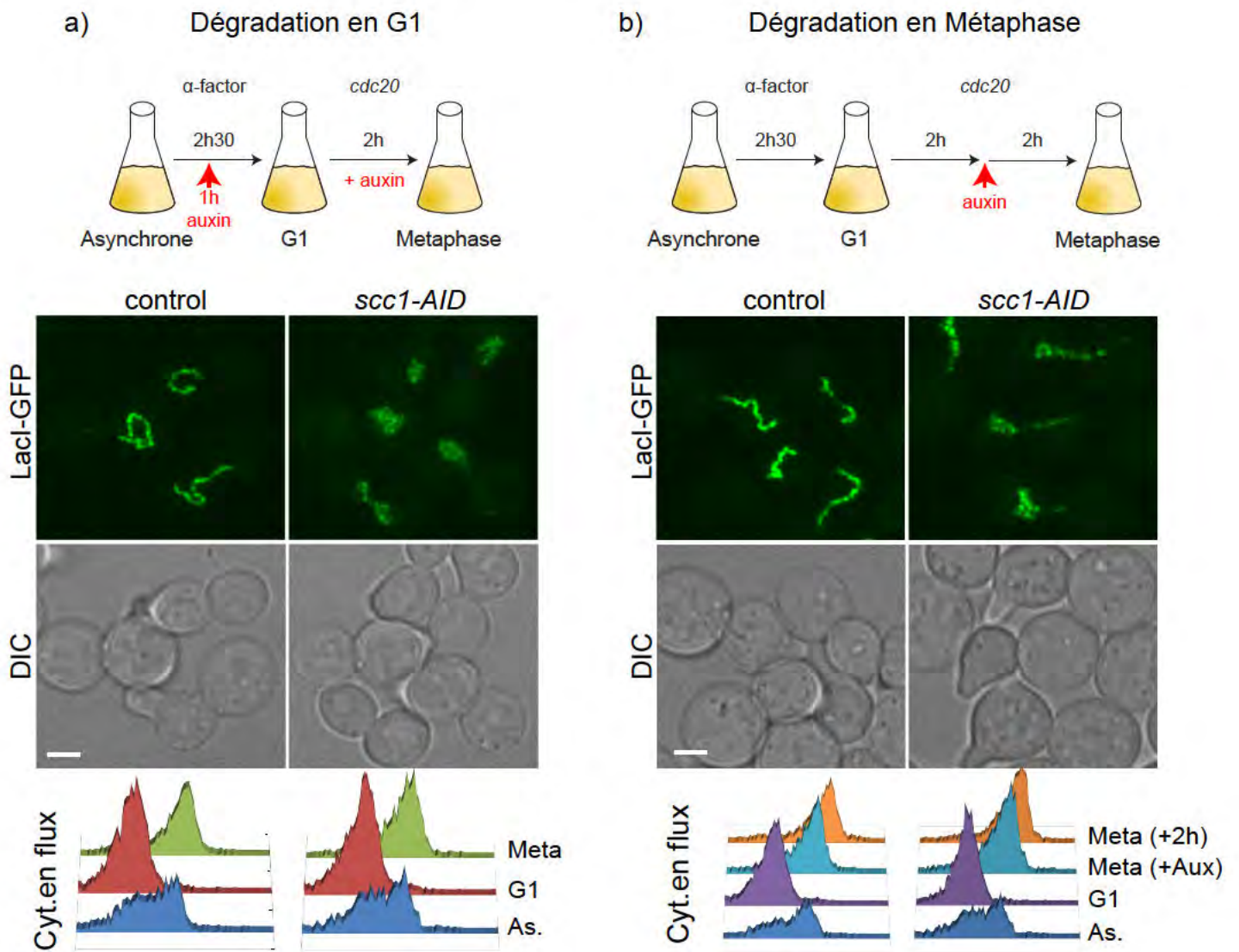


Figure 48 : Les cohésines maintiennent l'organisation mitotique de l'ADNr. a) Les souches contrôle (FB39) et exprimant *Sccl-AID* (yLD127-20c) sont arrêtées en G1 en présence d'auxine puis arrêtées en métaphase par déplétion de *Cdc20*. L'organisation de l'ADNr est observée par microscopie confocale (panel haut) et l'arrêt des cellules dans les différentes phases du cycle est quantifié par cytométrie en flux (panel bas). Echelle, 2 μ m; As, asynchrones; Meta, métaphase. b) Les souches contrôle (yLD130-26a), exprimant *Sccl-AID* (yLD127-20c) sont arrêtées en G1 puis arrêtées en métaphase par déplétion de *Cdc20* pendant 2h. L'auxine est ajoutée et les cellules sont imagées après 2h. Echelle, 2 μ m. Panel bas: cytométrie en flux. As, asynchrones; Meta, métaphase.

b. Résultats supplémentaires

Bien que l'analyse en 3D de l'organisation de l'ADNr apporte un niveau d'informations sans précédent, les données sont lourdes à générer. En effet, la méthode d'analyse d'images nécessite l'utilisation de différents logiciels (Huygens, Matlab, Chimera et Excel) ainsi que des étapes manuelles de segmentation et de validation des données. Elle pourrait donc être optimisée afin d'offrir à l'utilisateur une interface simplifiée et réduire le temps d'analyse. Pour l'heure, le traitement des images étant lourd et chronophage, de telles analyses n'ont malheureusement pas pu être menées de façon systématique. Je vais donc détailler ici les observables permettant de mieux comprendre le rôle de la cohésine sur l'organisation spatiale de l'ADNr et qui ne nécessitent pas, dans un premier temps, une exploration de l'organisation 3D de l'ADNr.

La cohésine maintient l'organisation mitotique de l'ADNr

Pour rappel, la dégradation des cohésines en G1 conduit à une désorganisation de l'ADNr mitotique en cellules vivantes (Fig. 7 de l'article II, Figure 48a). Nous nous sommes demandés si la dégradation des cohésines en mitose conduirait également à la perte d'organisation de cette fibre. En d'autres termes, nous avons cherché à comprendre si la cohésine était requise pour maintenir l'organisation de l'ADNr en mitose. Pour cela nous avons induit la dégradation des cohésines dans des cellules arrêtées en métaphase (méthode en Annexe II). Cela a conduit à la perte d'organisation de l'ADNr et à la formation d'un « *puff* », comparable à celui observé en phase G1 du cycle cellulaire (Figure 48b). Ces résultats suggèrent que les cohésines sont requises en mitose pour maintenir l'ADNr sous forme compactée.

La cohésine est suffisante pour organiser l'ADNr avant la réplication

Lors de la phase S, l'ADNr est sujet à de profondes réorganisations. En effet, il se transforme progressivement d'un « *puff* » en une ligne. Alors que le recrutement des cohésines sur l'ADN est initié à la transition G1/S (après le passage du point Start mais avant la réplication, (Uhlmann et al., 1999), voir les Chapitres II et III de l'introduction), on peut imaginer qu'un couplage entre le chargement des cohésines et la fourche de réplication soit nécessaire pour organiser l'ADNr sous forme de ligne. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à savoir si le chargement des cohésines en fin de phase G1, avant la réplication, était suffisant pour induire la réorganisation de l'ADNr sous forme de ligne. Pour cela nous avons synchronisé les cellules en

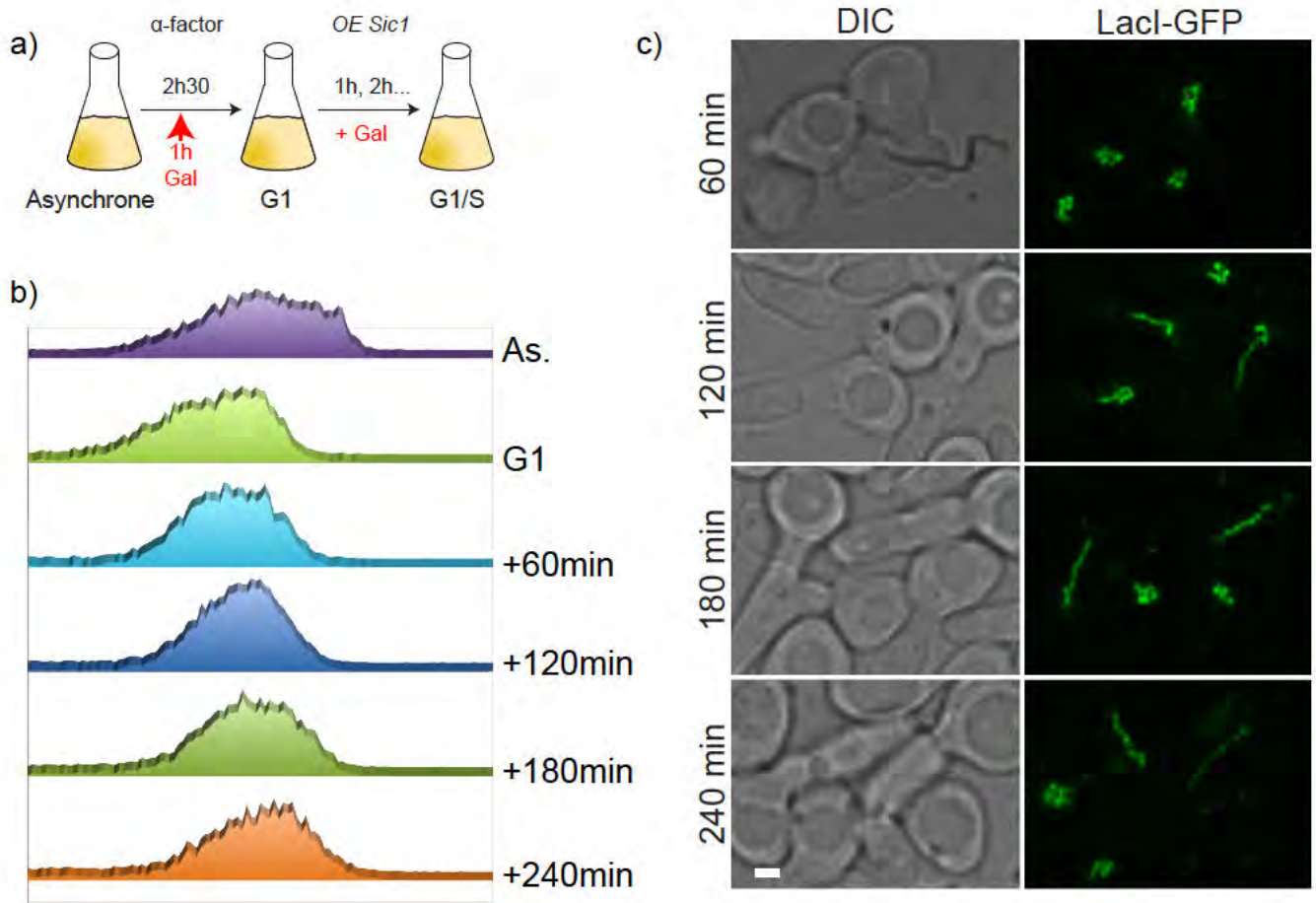


Figure 49 : Avant la réplication, l'ADNr forme une ligne semblable à celle observée en mitose. a) La souche FB05-5b (marquage de l'ADNr, *OE-Sic1*) est synchronisée en G1 par ajouts d'alpha-facteur, relarguée dans le cycle et arrêtée avant la réplication par surexpression d'une forme non dégradable de Sic1 (par induction au galactose (Gal)). Des échantillons sont pris toutes les heures après relargage. As, asynchrones. b) L'arrêt des cellules est mesuré par cytométrie en flux. c) Imagerie de l'ADNr de 60 min à 240 min après relargage. Echelle, 2 μ m.

G1/S par surexpression d'une version non-dégradable de Sic1, *OE Sic1* (Figure 49a, voir Chapitre III de l'introduction).

L'absence de chromosomes répliqués a été vérifiée par cytométrie en flux (Figure 49b). Dans cette condition, les cohésines sont chargées sur l'ADN (Uhlmann and Nasmyth, 1998) et l'ADNr forme une ligne semblable à celle observée en mitose (Figure 49c). Toutefois, les bourgeons des cellules synchronisées ont une morphologie particulièrement allongée dans cette condition. La ligne formée par l'ADNr pourrait alors résulter de l'action des cohésines et/ou de l'engagement d'une partie du noyau contenant l'ADNr dans cette structure longiforme. Dans ce dernier cas l'organisation de l'ADNr serait alors une conséquence de l'altération de la géométrie nucléaire. Afin de différencier ces deux possibilités nous avons cherché à invalider les cohésines (en dégradant Scc1 (*scc1-AID*)) et à analyser les conséquences sur l'organisation de l'ADNr. Malheureusement la dégradation de Scc1 (*scc1-AID*) dans ces conditions n'étant pas efficace pour des raisons inconnues, nous n'avons pas été en mesure de conclure sur le rôle des cohésines dans l'organisation de l'ADNr lors de la surexpression de Sic1. Néanmoins, nous avons observé dans l'article présenté ci avant que l'expression de Scc1 dans des cellules arrêtées en G1 induisait une organisation de l'ADNr proche de celle observée en mitose. Bien que l'expression des cohésines soit artificielle dans cette condition, cela suggère que le chargement des cohésines est suffisant pour organiser l'ADNr avant même le passage de la fourche de réplication.

Pds5 est requis pour organiser l'ADNr mitotique

Sur la base du rôle majeur de Pds5 dans l'organisation des chromosomes (Article I), nous avons étudié son rôle potentiel dans l'organisation de l'ADNr. L'allèle *pds5-AID* a été intégré dans la souche TMY3, les cellules traitées à l'auxine ont été synchronisées en G1, relâchées, arrêtées en métaphase (*cdc20*) et observées en microscopie à fluorescence (Figure 50a). La déplétion de Pds5 conduit à une désorganisation de l'ADNr qui apparaît similaire à celle observée en condition de déplétion de Scc1 (Figure 50b milieu et bas, (Hartman et al., 2000)). Cependant, Pds5 n'étant pas requis pour le chargement des cohésines sur l'ADN (Hartman et al., 2000; Petela et al., 2018), les cohésines restent associées à l'ADNr en absence de Pds5. Ainsi, tout comme Scc1, Pds5 est requis pour organiser l'ADNr mitotique. Cependant les « *puffs* » observés en absence de Scc1 ou de Pds5 sont de natures différentes et sont causés soit par l'absence, soit par la dérégulation des cohésines

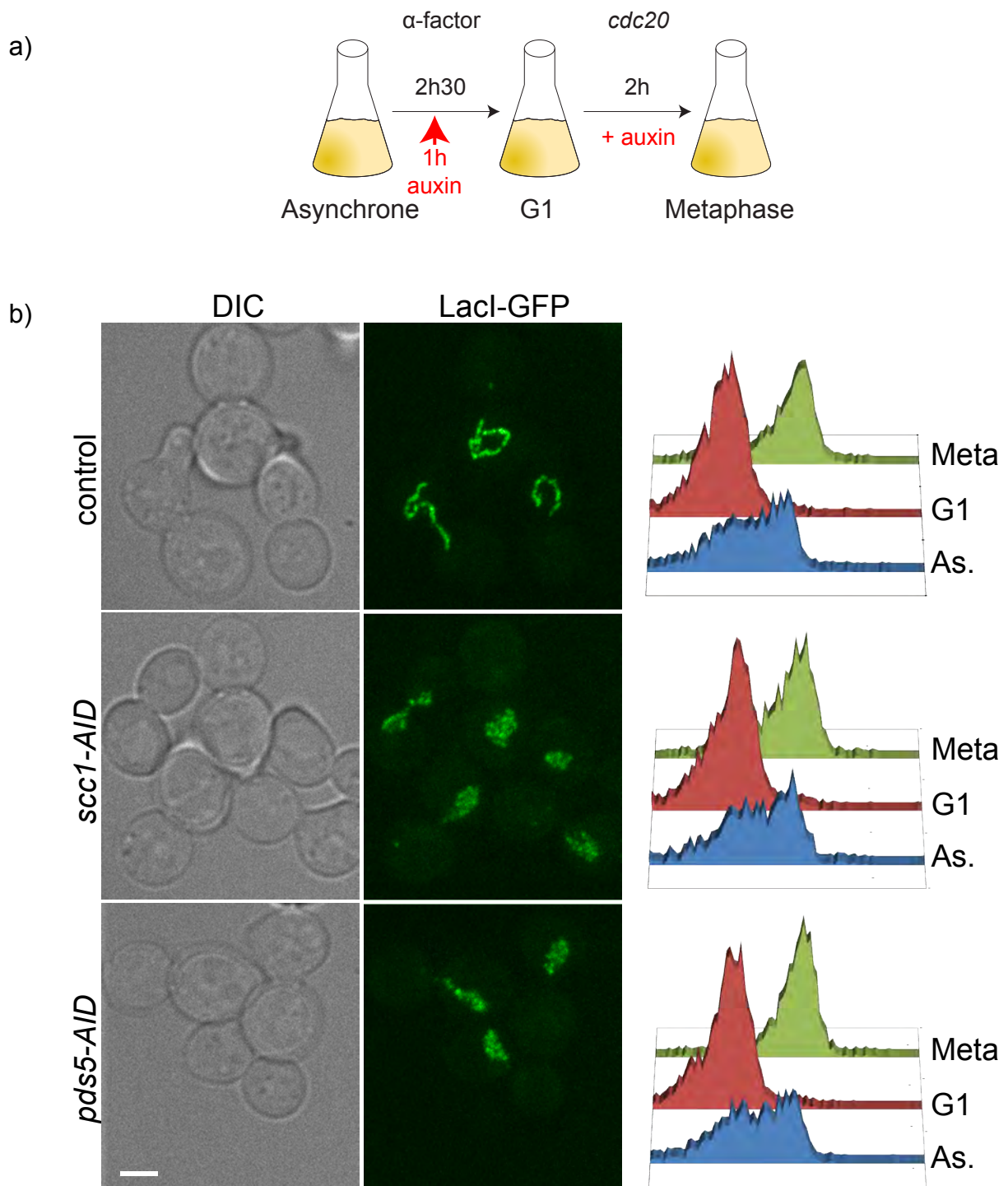


Figure 50 : Pds5 est requis pour organiser l'ADNr mitotique. a) Les souches contrôle (FB39), exprimant *scc1-AID* (yLD127-20c) ou *pds5-AID* (yLD130-4d) sont arrêtées en G1 par ajouts d'alpha-facteur en présence d'1 mM d'auxine. Les cellules sont relarguées de manière synchrone dans le cycle cellulaire et arrêtées en métaphase par déplétion de Cdc20. b) L'organisation de l'ADNr est observée par microscopie confocale (panel gauche) et l'arrêt des cellules dans les différentes phases du cycle est quantifié par cytométrie en flux (panel droit). Echelle, 2 μ m; As, asynchrones.

(Article I). Par la suite nous avons poursuivi la caractérisation de l'organisation de l'ADNr en absence de Pds5.

Contrairement au cohésines, Pds5 n'est pas requis pour maintenir l'organisation de l'ADNr mitotique

Nous nous sommes ensuite demandés si l'activité de Pds5 était requise en mitose pour maintenir l'organisation de l'ADNr. Nous avons arrêté les cellules en métaphase (*cdc20*), invalidé Pds5 à cette phase du cycle et imagé les cellules après 2h (Figure 51a). La déplétion de Pds5 ne conduit pas à la désorganisation massive de l'ADNr, qui conserve une organisation en ligne comparable à celle observée en condition contrôle (Figure 51b). Ce résultat pourrait s'expliquer par une dégradation incomplète de Pds5 dans ces conditions. Cependant, l'ajout d'auxine dans cette souche conduit bien à la perte de cohésion des chromatides sœurs (Figure 51c). De plus, des cartes de contacts générées dans les mêmes conditions révèlent une réorganisation profonde des chromosomes (Figure 51d, e). En effet, la dégradation de Pds5 en métaphase conduit à la formation d'interactions à très longues distances et à une restructuration importante des bras des chromosomes (Figure 51d, e). On peut noter que la dégradation de Pds5 en G1 ou en métaphase a sensiblement les mêmes effets sur l'organisation des chromosomes. La dégradation de Pds5 en métaphase est donc suffisante pour induire une réorganisation massive de l'ensemble des chromosomes, à l'exclusion de l'ADNr. Même si cette hypothèse paraît peu probable, il reste néanmoins possible qu'un taux de dégradation plus important soit nécessaire pour visualiser les effets sur l'ADNr. Nous proposons que Pds5 ne soit pas impliqué dans le maintien de l'organisation de l'ADNr en mitose.

En conclusion, Pds5 semble requis pour l'établissement de l'organisation de l'ADNr mitotique et non pour son maintien.

En absence de Pds5, l'ADNr est hyper-compacté avant la réplication

Par la suite, nous avons étudié si Pds5 était nécessaire pour établir l'organisation de l'ADNr non répliqué. Pour cela, nous avons invalidé Pds5 et synchronisé les cellules en G1/S (*OE Sic1*, Figure 52a, b). L'absence de Pds5 provoque l'hyper-compactation de l'ADNr qui forme alors une ligne de petite taille (Figure 52c).

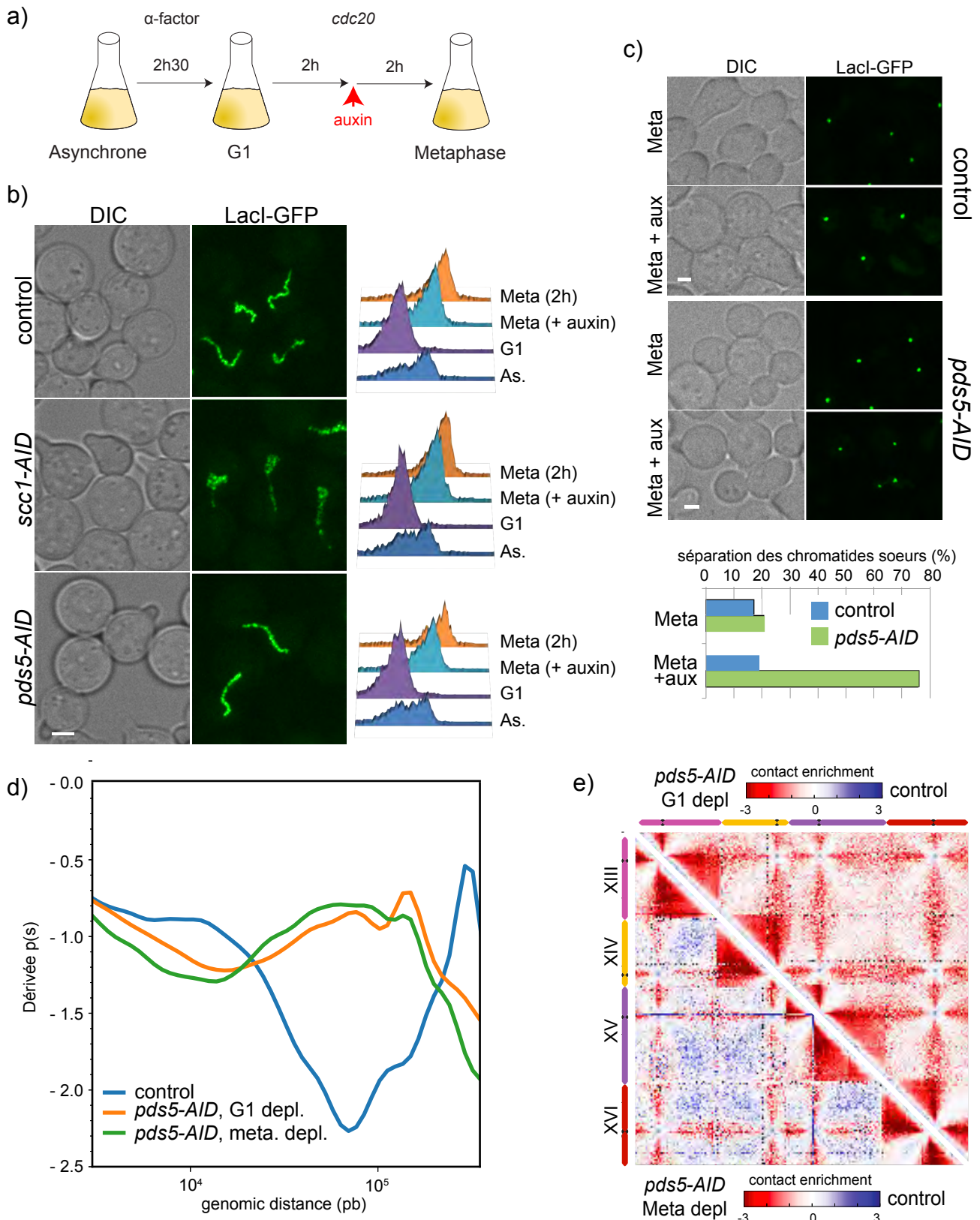


Figure 51 : Pds5 n'est pas requis pour maintenir l'organisation de l'ADNr mitotique. a) Les souches contrôle (yLD130-26a), exprimant *scc1-AID* (yLD127-20c) ou *pds5-AID* (yLD130-4d) sont arrêtées en G1 par ajouts d'alpha-facteur, relarguées dans le cycle et synchronisées en métaphase par déplétion de Cdc20 pendant 2h. L'auxine est ajoutée et les cellules sont imagées après 2h. Echelle, 2 μ m. b) Panel gauche: microscopie, panel droit: cytométrie en flux. As, asynchrones. c) Les souches contrôle (yLD126-36c) ou *pds5-AID* (yLD126-38b) sont traitées comme en a) et le pourcentage de cellules présentant des chromatides soeurs séparées est mesuré. Echelle, 2 μ m. d) Courbe représentant la dérivée de la probabilité de contacts en fonction de la distance génomique dans les souches contrôle (FB133-57B) et *pds5-AID* (yLD121-1a). e) Log2 ratio entre les cartes de contacts générées dans les conditions indiquées, pour les chromosomes XII, XIV, XV et XVI. L'échelle de couleur de rouge à bleu reflète l'enrichissement de contacts dans une population par rapport à l'autre. 1 pixel, 20 kb.

Des données publiées par le laboratoire de Frank Uhlmann ont montré que l'inactivation de Wpl1 (allèle *wpl1Δ*) induisait une compaction de l'ADNr mitotique (Lopez-Serra et al., 2013). Sachant que Pds5 est impliqué dans le recrutement de Wpl1 aux cohésines, on peut imaginer que l'hyper-compaction de l'ADNr observée en absence de Pds5 avant la réplication, soit due à la perte du recrutement de Wpl1. Cependant, l'inactivation de Wpl1 (*wpl1Δ*) induit une compaction de l'ADNr en G1/S moins importante que celle provoquée par la dégradation de Pds5 (Figure 52c). Ainsi, l'hyper-compaction de l'ADNr en absence de Pds5 ne semble pas être due uniquement à la perte de Wpl1. Il faut néanmoins rester prudent dans l'interprétation des résultats de la souche *wpl1Δ*. En effet, nous avons pu observer précédemment que l'organisation des chromosomes était légèrement modifiée dans cette souche en G1 (voir les résultats supplémentaires, chapitre I). On ne peut donc pas exclure un effet indirect de cet allèle sur l'organisation de l'ADNr.

Le rôle de Pds5 sur l'organisation de l'ADNr est donc complexe : la dégradation en G1 de Pds5 conduit 1) à l'hyper-compaction de l'ADNr avant la réplication et 2) à sa désorganisation en métaphase (voir plus haut). Ceci suggère l'existence d'un mécanisme régulant l'organisation de l'ADNr dont l'activité serait dépendante du cycle cellulaire (voir Discussion).

Un rôle additionnel pour Pds5 dans l'organisation de l'ADNr, au-delà du recrutement de Wpl1 et Eco1

En plus d'assurer le recrutement de Wpl1, Pds5 est impliqué dans l'acétylation des cohésines par Eco1 (Chan et al., 2013). La désorganisation de l'ADNr mitotique observée suite à la perte de Pds5 dès la phase G1 (Figure 50b) pourrait être due à la perte d'une ou de ces deux fonctions. L'absence de Wpl1 provoque une forte compaction de l'ADNr mitotique et non la formation d'un « *puff* » (Figure 53b, voir aussi (Lopez-Serra et al., 2013)). Il est donc peu probable que l'effet observé en absence de Pds5 soit uniquement dû à un défaut de recrutement de Wpl1. En revanche, il pourrait être causé par un défaut d'acétylation des cohésines ou d'un de ces régulateurs. Nous avons donc cherché à savoir si l'inactivation d'Eco1 mimait la perte de Pds5 sur l'organisation de l'ADNr. Pour cela l'allèle *eco1-AID* a été inséré dans la souche TMY3 puis les cellules ont été arrêtées en métaphase (*cdc20*) après traitement à l'auxine et synchronisation en G1 (Figure 53a). Lorsqu'Eco1 est dégradée, on discerne une ligne qui semble moins distincte que celle observée dans la condition contrôle (Figure 53b). La déplétion d'Eco1 induit donc une

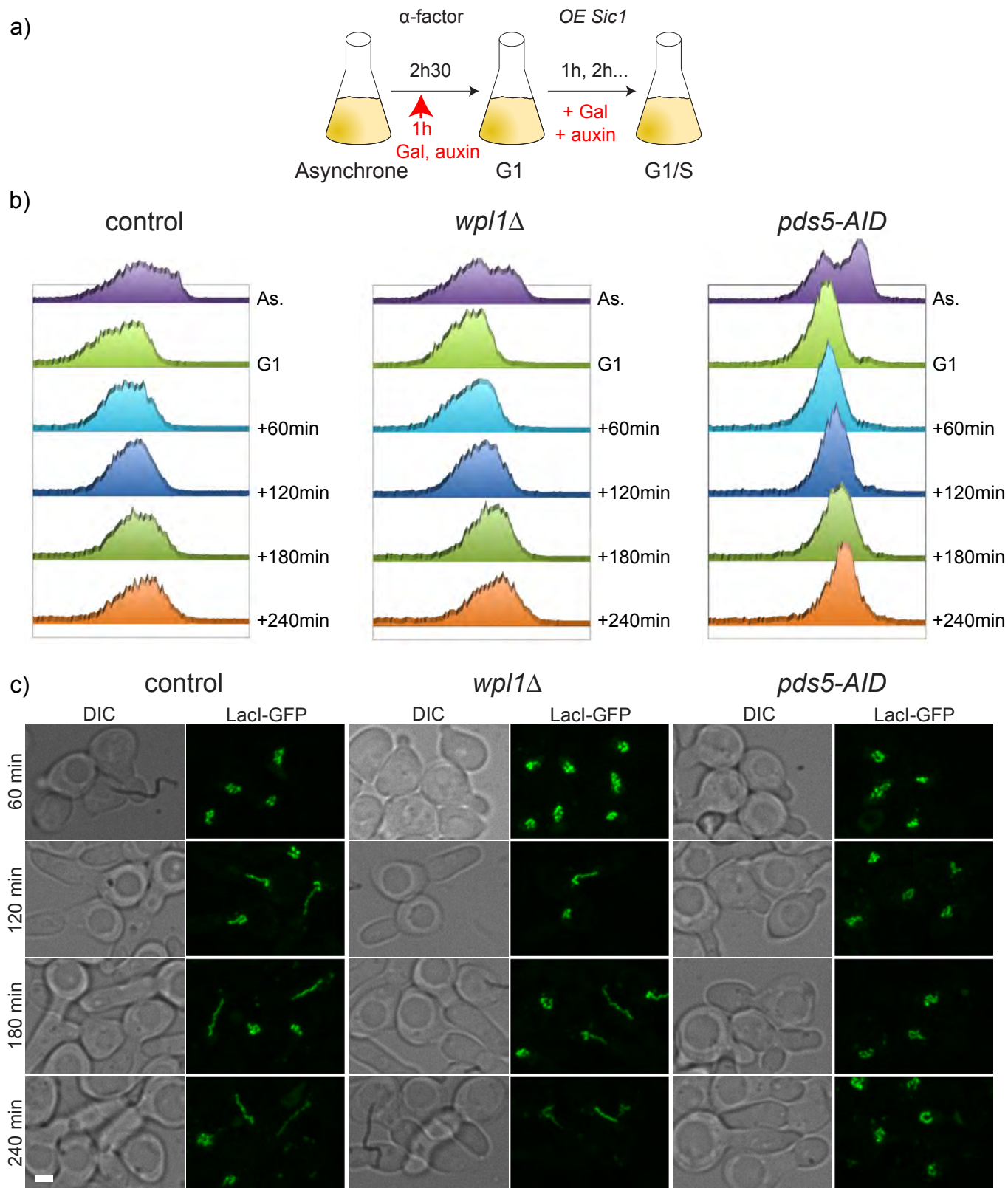


Figure 52 : En absence de Pds5, l'ADNr est hyper-condensé avant la réplication. a) Schéma de synchronisation des souches contrôle (FB05-5b), *wpl1* Δ (yLD149-2b) et *pds5-AID* (yLD150-12d) en G1/S. L'ajout de galactose (Gal) permet la surexpression de Sic1 et l'auxine induit la dégradation de Pds5 dans la souche *pds5-AID*. b) L'arrêt des cellules est mesuré par cytopmétrie en flux. c) Imagerie de l'ADNr de 60 min à 240 min après relargage. Echelle, 2 μ m.

réorganisation de l'ADNr, mais qui n'est pas comparable à celle provoquée par l'absence de Pds5. Un effet beaucoup plus drastique de la déplétion d'Eco1-AID a été décrit dans une étude précédente, dans laquelle les auteurs sondaient l'organisation de l'ADNr par FISH (formation d'un « *puff* » dans 80% des cellules, (Bloom et al., 2018)). Cette divergence de résultats pourrait être due à la dégradation incomplète d'Eco1 dans nos conditions. En effet, nous avons constaté que la dégradation d'Eco1 induisait une perte partielle de l'acétylation de Smc3 (Figure 53c). Cependant, ces mêmes conditions ont conduit à une réorganisation des chromosomes observable en Hi-C (Article I). Il serait opportun de vérifier la perte de cohésion dans ces conditions. La disparité entre nos résultats pourrait également être expliquée par la différence entre les procédures expérimentales utilisées (FISH vs cellules vivantes). En conclusion, il semble que l'effet induit par l'inactivation de Pds5 ne puisse être attribué au défaut de recrutement soit d'Eco1, soit de Wpl1.

Comme observé sur les chromosomes en Hi-C (Article I), on peut imaginer que la co-invalidation de Wpl1 et d'Eco1 soit nécessaire pour induire la désorganisation de l'ADNr semblable à la condition de déplétion de Pds5. Pour tester cette hypothèse, nous avons induit la dégradation d'Eco1 dans une souche invalidée pour Wpl1 et analysé l'organisation de l'ADNr mitotique. L'absence des deux protéines provoque la formation d'une ligne plus courte et moins distincte que celle observée en condition contrôle (comme observé dans les conditions *wpl1Δ* et *eco1-AID* séparément, Figure 53b, (Guacci and Koshland, 2012)). Toutefois la co-déplétion des deux protéines ne « phénocopie » pas celle de Pds5 (Figure 50b). En d'autres termes, la désorganisation de l'ADNr observée en absence de Pds5 n'est pas due à la perte simultanée des activités d'Eco1 et de Wpl1. Cela confirme un rôle additionnel de Pds5 dans l'organisation de l'ADNr.

c. Discussion

Dans cette section nous avons pu montrer que Pds5 participait dès l'entrée en phase S à établir l'organisation de l'ADNr. Il n'est ensuite plus requis pour maintenir l'organisation de cette fibre en mitose. Wpl1 et Eco1 sont également impliqués dans l'organisation de l'ADNr, mais dans une moindre mesure.

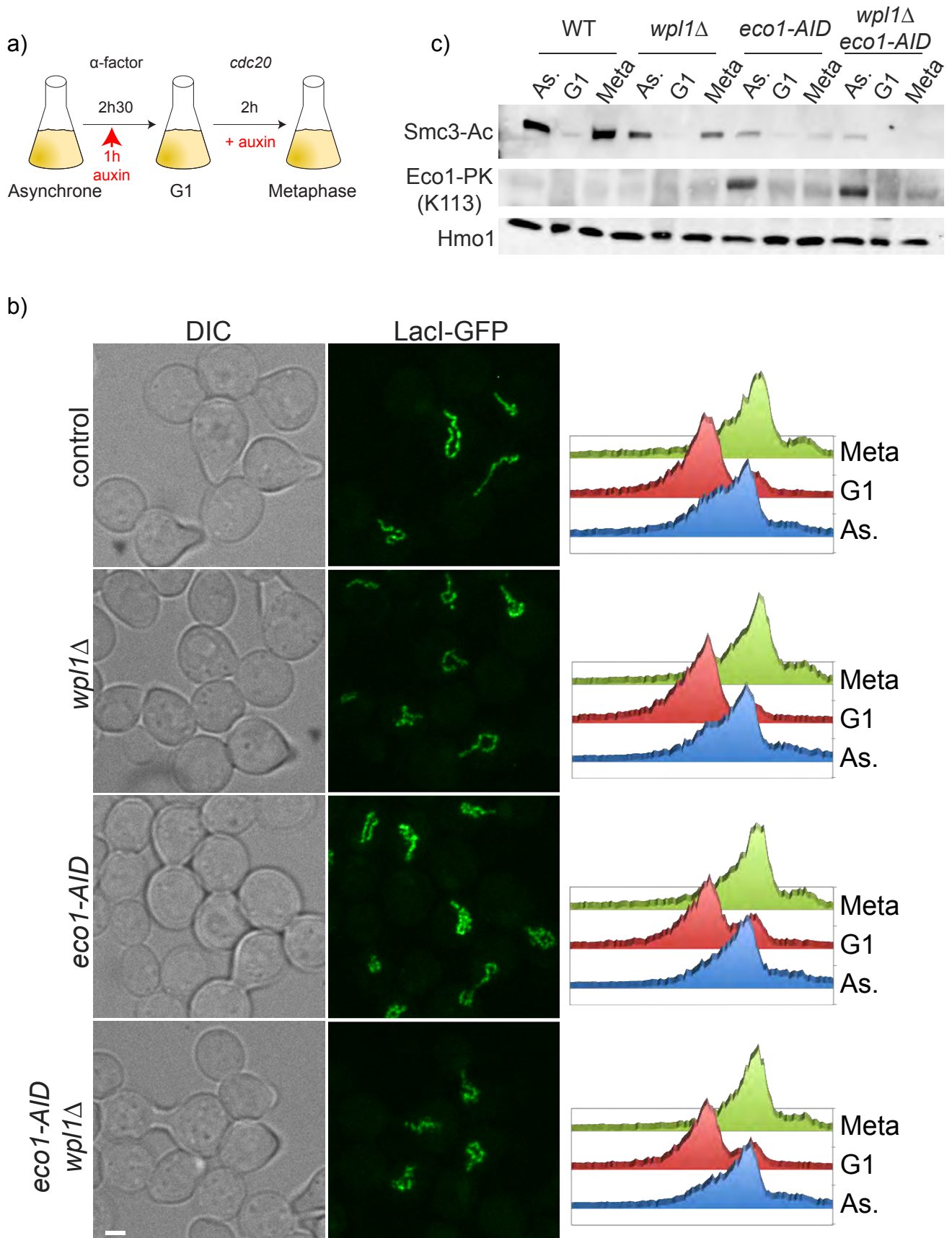


Figure 53 : La déplétion de Wpl1 et d'Eco1 en G1 ne conduit pas à la formation d'un «puff» en mitose. a) Schéma de synchronisation des souches contrôle (yLD144-6b), *wpl1Δ* (yLD144-14d), exprimant *eco1-AID* (yLD136-1b) et *wpl1Δ*, *eco1-AID* (yLD136-3b). Echelle, 2 μ m. b) Panel gauche microscopie, panel droit: cytométrie en flux. As, asynchrones. c) L'accumulation de Smc3-K113-Ac et de Eco1 est testée par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre Smc3-Ac et l'étiquette PK/V5 respectivement. Hmo1, témoin de charge.

Analyser l'ADNr en 3D

Les données présentées ici reposent intégralement sur l'observation d'images en 2D. Dans certaines conditions comme la déplétion en G1 de Scc1 ou de Pds5 (Figure 50b) la désorganisation de l'ADNr est telle que l'analyse d'images ne semble pas nécessaire. En revanche, d'autres conditions comme la déplétion en mitose d'Eco1, de Wpl1 ou des deux conduisent à des réarrangements plus subtils de l'ADNr (Figure 53b). Il serait alors opportun d'étudier finement l'ADNr, en 3D dans ces diverses conditions. De même on pourrait envisager de sonder l'organisation 3D de l'ADNr avant la réplication en absence de Pds5 (Figure 52b). Cela permettrait de comprendre le rôle précis de ces protéines dans l'organisation 3D de l'ADNr.

Les condensines, la pièce manquante du puzzle

Nous avons vu dans la partie Résultats que la dégradation de Pds5 en G1, induisait une décompaction massive de l'ADNr en mitose (*cdc20*) (Figure 50b) et une apparente compaction de ce locus avant la réplication (*OE Sic1*) (Figure 52b). Dans cette dernière condition, l'inactivation des cohésines reste nécessaire afin de confirmer leur rôle dans l'établissement de la ligne observée (voir plus haut). Néanmoins, ces données suggèrent l'existence d'un processus additionnel, dépendant du cycle cellulaire qui régulerait l'organisation de l'ADNr.

Les condensines, tout comme les cohésines, sont essentielles pour l'organisation de l'ADNr mitotique (Lavoie et al., 2002, 2004). Elles y sont enrichies tout au long du cycle cellulaire (D'Ambrosio et al., 2008b; Freeman et al., 2000) mais ne sont actives et stables sur l'ADN qu'en mitose, après phosphorylation de la sous-unité Smc4 par le couple mitotique Cdk1/Clb2 (Robellet et al., 2015). Par ailleurs il a été montré que l'activité combinée des condensines et des cohésines était essentielle pour l'organisation correcte de l'ADNr (Lavoie et al., 2002; Shen and Skibbens, 2017).

Ainsi nous proposons que la régulation des condensines au cours du cycle cellulaire soit à l'origine dans différences de morphologie de l'ADNr observées en condition d'inactivation de Pds5. Avant la réplication, le niveau de Clb2 dans la cellule est bas, les condensines sont liées à l'ADNr, mais inactives. La dérégulation de l'extrusion de boucles (médiée ici par les cohésines) en absence de Pds5, conduit à une compaction massive de l'ADNr (Figure 52b, Article I). Après la phase S, Clb2 est accumulée et phosphoryle une des sous-unités catalytiques du complexe condensine, Smc4 (Robellet et al., 2015). Les condensines sont alors activées et peuvent à leur tour

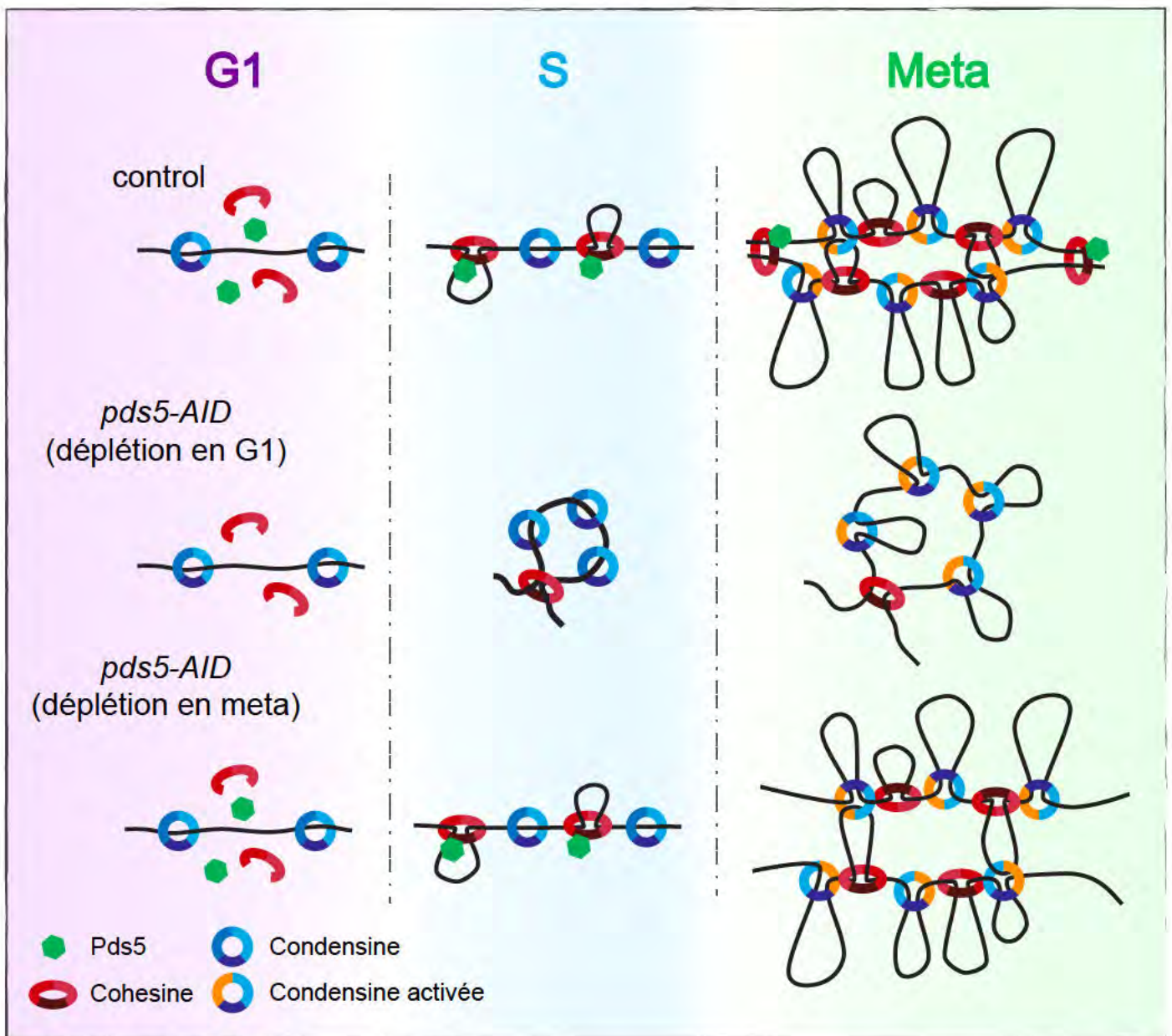


Figure 54 : Modèle d'organisation de l'ADNr par les condensines et les cohésines au cours du cycle cellulaire. En G1 les condensines sont chargées sur l'ADNr mais ne sont actives. En phase S, grâce à l'accumulation de Scc1, les cohésines sont également chargées sur l'ADNr et initient l'extrusion de boucles. L'expansion de ces boucles est bloquée par Pds5, générant des boucles de grandes tailles lorsque la protéine est déplétée (panel du milieu). Enfin, Pds5 ne s'associe qu'avec les cohésines impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs en mitose. La seconde fraction non liée par Pds5 organise alors l'ADNr, avec l'action complémentaire du complexe condensine maintenant activé et également engagé dans des processus de LE.

initier un processus d'extrusion de boucles. Cependant, cela conduirait à la formation d'un « puff » en mitose car l'organisation sous-jacente de l'ADNr n'aurait pas été correctement établie (Figure 50b). Ainsi les cohésines formeraient un squelette sur lequel les condensines agiraient lors de la mitose (Figure 54).

Pour tester notre modèle nous proposons de mimer l'activation des condensines en G1/S (dans des conditions *OE Sic1, pds5-AID*) et d'analyser si cela conduit à la désorganisation de l'ADNr en « puff ». Pour cela l'allèle phospho-mimétique *smc4-7EE* pourrait être utilisé (Robellet et al., 2015) en combinaison avec l'allèle *smc4-AID* (l'expression de l'allèle seul *smc4-7EE* étant létale). De la même manière, l'inactivation simultanée des condensines et de Pds5 en G1 pourrait permettre l'organisation de l'ADNr sous forme de ligne de taille réduite (*i.e.* compactée) à la fois en G1/S (*OE Sic1*) et en mitose (*cdc20*).

D'autre part, nous avons montré que Pds5 organisait l'ADNr en recrutant Wpl1, Eco1 et également par un autre mécanisme alternatif encore inconnu. Nous proposons que Pds5 soit également requis pour réguler l'activité des condensines en mitose. Ainsi Pds5 établirait l'organisation de l'ADNr en co-régulant les cohésines et les condensines. Il serait intéressant de comparer l'activité et la distribution des condensines en mitose, en présence et en absence de Pds5 ; par exemple par western blots avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées des condensines (formes actives) et par immuno-précipitation de chromatine (ChIP). L'interaction entre Pds5 et les condensines pourrait être sondée par des expériences de co-immuno-précipitations. Des tests *in vitro* peuvent également être envisagés afin de tester la capacité des condensines, incubées ou non au préalable avec Pds5, à extruder de l'ADN. Enfin, nous proposons de sonder l'organisation de l'ADNr à la transition G1/S dans une souche invalidée pour Wpl1 et Eco1 (*OE Sic1, wpl1Δ, eco1-AID*). En effet, les condensines étant inactives en début de cycle (Robellet et al., 2015), la co-invalidation des deux protéines devrait, selon notre hypothèse, phénotyper l'absence de Pds5.

Par ailleurs, Pds5 pourrait réguler la transcription par la Pol I. Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'activité de cette ARN polymérase est régulée au cours du cycle cellulaire et joue un rôle majeur dans l'organisation de l'ADNr. Ainsi, Pds5 pourrait contrôler l'organisation de l'ADNr en co-régulant les cohésines et la transcription par la Pol I.

Pds5 n'est pas requis pour le maintien de l'organisation de l'ADNr en mitose

D'après nos résultats, Pds5 ne semble pas requis pour maintenir l'organisation de l'ADNr en mitose (Figure 51b). De plus, il a été récemment reporté l'existence d'une compétition entre Pds5 et Scc2 pour leur recrutement aux cohésines (Petela et al., 2018). La liaison de Scc2 semble stimuler l'activité ATPasique du complexe et sa translocation sur l'ADN, alors que Pds5 aurait l'effet inverse. Ainsi les cohésines liées à l'ADNr en mitose pourraient être préférentiellement associées à Scc2, et non à Pds5, et actives dans la formation et l'expansion de boucles de chromatine. L'ADNr mitotique serait alors organisé grâce à la double action des cohésines et des condensines, toutes deux actives en extrusion de boucles.

La cohésion dépendante des cohésines ne semble pas organiser l'ADNr

Au locus de l'ADNr, il est décrit que la cohésion entre les deux chromatides sœurs est établie d'une part par les cohésines qui embrassent topologiquement les deux chromatides et d'autre part par des caténations entre les fibres d'ADN formées lors de la réplication en phase S (D'Ambrosio et al., 2008a; Sullivan et al., 2004). La ségrégation fidèle de l'ADNr requiert la séparation physique des chromatides sœurs par l'action combinée de la séparase (qui clive les cohésines) et de la topoisomérase II (qui, après activation par les condensines, dénoue les caténations) (Charbin et al., 2014; D'Ambrosio et al., 2008a; Sullivan and Uhlmann, 2003; Sullivan et al., 2004). On peut se demander quel est l'impact de la cohésion sur l'organisation de l'ADNr et plus précisément quelle est la part relative de chaque type de cohésion dans cette organisation.

Lors de la dégradation en G1 de Pds5 (Figure 50b), d'Eco1 ou d'Eco1 combinée à l'absence de Wpl1 (Figure 53b) la cohésion dépendante des cohésines est abolie (Guacci and Koshland, 2012; Hartman et al., 2000; Skibbens et al., 1999; Tóth et al., 1999) ; dans ces conditions l'organisation de l'ADNr est maintenue proche des conditions contrôles. Ainsi, la cohésion dépendante des cohésines ne semble avoir que peu d'influence sur l'organisation spatiale de l'ADNr. Afin d'abolir la cohésion provoquée par l'accumulation des caténations, nous proposons de sur-exprimer la topoisomérase II en mitose (*cdc20*) et d'analyser l'organisation de l'ADNr. Il serait également intéressant d'observer les conséquences de la perte des deux formes de cohésion à l'ADNr. Pour cela on peut envisager d'invalider Pds5 en mitose tout en sur-exprimant la topoisomérase II.

Eco1 a-t-elle un rôle sur l'organisation de l'ADNr indépendant de Wpl1?

L'acétylation des lysines K112 et K113 de Smc3 par Eco1 bloque l'action de Wpl1 et stabilise les cohésines sur l'ADN (Chan et al., 2012; Lopez-Serra et al., 2013). Dans l'hypothèse où la seule fonction d'Eco1 serait d'inhiber Wpl1, la double invalidation d'Eco1 et de Wpl1 devrait « phénotypier » celle de Wpl1 uniquement. Or l'invalidation de Wpl1 conduit à une compaction de l'ADNr (formation d'une ligne de taille réduite, Figure 53b, (Lopez-Serra et al., 2013)) alors que la double perte de Wpl1 et d'Eco1 provoque la formation d'une ligne courte et sensiblement désorganisée (Figure 53b). Ceci suggère une fonction supplémentaire d'Eco1, en plus de l'inhibition de Wpl1. Il serait intéressant d'analyser si cette autre fonction implique également l'acétylation des lysines K112 et K113, ou celle d'autres résidus. Nous proposons d'étudier l'organisation de l'ADNr mitotique dans des souches *wpl1Δ* exprimant des versions non acétylables des résidus 112 et 113 (où la lysine a été remplacée par une arginine) (Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Unal et al., 2008). Dans le cas où l'acétylation de K112 et K113 aurait pour seule fonction de contrecarrer Wpl1 et que la fonction supplémentaire d'Eco1 nécessiterait l'acétylation d'autres résidus, ces mutations ne devraient pas altérer l'organisation de l'ADNr. On pourrait alors envisager une approche par spectrométrie de masse pour l'identification de ces nouvelles cibles d'Eco1. De plus, alors que l'acétylation de K112 et K113 par Eco1 est concomitante à la réplication (Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Skibbens et al., 1999; Tóth et al., 1999; Unal et al., 2008), il serait intéressant d'étudier si cette autre fonction d'Eco1 dépend également de la réplication. Pour cela nous proposons d'invalider Eco1 en G1/S et de sonder l'organisation de l'ADNr. Si son organisation est perturbée, cela conduirait à la mise en évidence d'une nouvelle activité d'Eco1, avant la réplication.

DISCUSSION

Les travaux présentés ci-avant ont permis d'approfondir le rôle des cohésines dans l'organisation du génome de la levure *S. cerevisiae*. Dans un premier temps nous avons mis en évidence par technique de Hi-C que les chromosomes de levure s'organisaient en domaines d'associations d'environ 40 kb dont la formation et la maintenance dépendaient des cohésines. Ces domaines constituent un mode de repliement de la chromatine de *S. cerevisiae* bien qu'ils ne soient pas aussi grands que les TADs observés dans les cellules de mammifères. Nous avons ensuite identifié qu'une protéine régulatrice des cohésines, Pds5, inhibait l'expansion de ces domaines. Cela semble nécessiter l'action de deux autres protéines auxiliaires, Wpl1 et Eco1, toutes deux recrutées aux cohésines par Pds5. Dans un second temps nous avons analysé par microscopie à fluorescence l'organisation spatiale d'une fibre de chromatine isolée du reste du génome, l'ADNr. Après le développement d'une analyse d'images dédiée, nous avons constaté que l'ADNr s'organisait en une succession de domaines dont l'organisation 3D dépendait des cohésines. Pds5 semble également jouer un rôle dans l'organisation de l'ADNr. Cependant nos travaux suggèrent un rôle additionnel de Pds5, en plus du recrutement de Wpl1 et d'Eco1, dans ce processus. Dans cette dernière partie nous allons discuter de ces résultats et présenter les perspectives de ce travail.

Élucider le mécanisme d'action d'Eco1 dans l'organisation du génome

Un résultat surprenant de notre étude a été que la dégradation d'Eco1 conduisait à une réorganisation des chromosomes comparable à celle observée en absence de Wpl1. En absence de Wpl1 les cohésines sont stabilisées sur l'ADN et peuvent donc induire l'expansion de la taille des domaines (Haarhuis et al., 2017; Wutz et al., 2017). En revanche en absence d'Eco1 les cohésines engendrent également l'agrandissement des domaines, bien qu'elles soient dissociées de l'ADN par Wpl1. On peut donc se demander quel est le mécanisme d'action d'Eco1 sur les cohésines et comment des cohésines dynamiques sur l'ADN peuvent établir de larges domaines de 100 kb.

A. Eco1 organise-t-elle le génome indépendamment de la réplication ?

Eco1 ayant été décrite en premier lieu pour son rôle dans l'établissement de la cohésion des chromatide sœurs, l'action de cette protéine sur les cohésines semble être limitée à la phase S. Il a cependant été observé que la surexpression d'Eco1 en mitose induisait l'établissement de la cohésion à cette phase du cycle (Unal et al., 2007). Ceci suggère qu'Eco1 peut être active dans des phases du cycle cellulaire autres que la phase S. En adéquation avec ces résultats, nous avons observé dans l'étude présentée dans l'article I que les domaines établis dans des cellules mitotiques non répliquées invalidées pour Pds5 (*cdc45*, *pds5-AID*) étaient de taille supérieure à ceux établis en absence de Wpl1 (*cdc45*, *wpl1Δ*). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait qu'Eco1 soit recrutée aux cohésines et qu'elle inhibe l'expansion des boucles de chromatine en absence de Wpl1 mais pas en absence de Pds5. Des données préliminaires obtenues au laboratoire suggèrent que la dégradation d'Eco1 dans la condition *cdc45* conduit à l'agrandissement des domaines établis par les cohésines. Ainsi, Eco1 semble organiser le génome indépendamment de la réplication et de sa fonction d'établissement de la cohésion des chromatide sœurs.

Dans ce contexte on peut alors se demander si Eco1 est active dès la phase G1 afin d'inhiber l'expansion des domaines et des boucles de chromatine. Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'invalider Eco1 tout en surexprimant une version non phosphorylable de Sic1 (*OE Sic1*). Nous pouvons également envisager d'invalider Eco1 dans des souches arrêtées en α -facteur

et exprimant la version de *Scc1* non clivable par la séparase (*OE scc1*). Cette dernière expérience pourra également être réalisée dans une souche de levure invalidée pour *Wpl1* afin d'analyser si la dégradation d'*Eco1* conduit à l'agrandissement de la taille des domaines par rapport à la condition *OE scc1, wpl1Δ*. Les données générées nous permettront d'approfondir le rôle d'*Eco1* dans l'organisation du génome et mettre en évidence une potentielle indépendance entre les deux fonctions d'*Eco1*.

B. *Eco1* organise-t-elle le génome en mitose ?

Au cours de notre étude nous avons dégradé *Pds5* en mitose et nous avons pu mettre en évidence par Hi-C que cela conduisait à la formation de domaines dont la taille et la disposition le long des bras des chromosomes étaient comparables à ceux formés lors de la dégradation de *Pds5* en G1. Ces résultats sont présentés dans la section Résultats Supplémentaires en lien avec l'article II, Figure 51. Nos expériences montrent que *Pds5* inhibe l'expansion des boucles de chromatine à la fois dans les phases G1/S et en mitose. Dans le cas où le mécanisme responsable de l'agrandissement des boucles de chromatine est similaire dans les deux conditions (dégradation de *Pds5* en G1 et en mitose), *Wpl1* et *Eco1* seraient également actives en mitose pour inhiber l'expansion des domaines établis par les cohésines. L'action de dissociation des cohésines de l'ADN par *Wpl1* en mitose a précédemment été décrite (Chan et al., 2012; Lopez-Serra et al., 2013). Comme mentionné précédemment, *Eco1* semble également établir la cohésion des chromatides sœurs en mitose lorsqu'elle est surexprimée (Unal et al., 2007) mais son rôle dans l'organisation du génome à cette étape du cycle reste à être démontré.

Pour cela nous proposons d'invalider *Eco1* en mitose et d'analyser la taille des domaines formés dans cette condition. Une augmentation de la taille des domaines établis par les cohésines lors de la dégradation d'*Eco1* suggérerait une activité de cette dernière en mitose. Il serait alors intéressant d'analyser si la co-déplétion de *Wpl1* et d'*Eco1* en mitose conduit à une réorganisation du génome comparable à celle observée lors de la dégradation de *Pds5* à cette étape du cycle.

Au contraire, si la dégradation d'*Eco1* ne conduit pas à l'expansion de la taille des domaines, *Eco1* ne serait pas active en mitose. *Pds5* inhiberait alors l'expansion des domaines par un autre mécanisme que celui du recrutement d'*Eco1* : il pourrait être requis pour le maintien de l'acétylation d'une cible d'*Eco1* depuis son établissement en G1/S jusqu'en mitose. Ce scénario est envisageable car il a été décrit qu'après la réplication *Pds5* maintenait l'acétylation de *Smc3* en

contrecarrant l'action de la déacétylase Hos1 (Chan et al., 2013). En absence de Pds5 la déacétylation des cibles d'Eco1 provoquerait la levée de l'inhibition des cohésines, qui établiraient alors des domaines de grandes tailles. Dans le cas où les cibles d'Eco1 seraient, comme Smc3, ciblées par la déacétylase Hos1, il serait intéressant de dégrader Pds5 en mitose, en présence ou en absence de Hos1. En effet, les domaines formés en présence de la déacétylase (*i.e.* perte de l'acétylation) devraient être supérieurs en taille comparativement à ceux établis en absence de la protéine (*i.e.* maintien de l'acétylation).

D'après les hypothèses énoncées ci-dessus le rôle d'Eco1 dans l'organisation du génome reposerait sur son activité acétyl-transférase, or cela n'a pas encore été démontré.

C. Le rôle d'Eco1 dans l'organisation du génome nécessite-t-il son activité acétyl-transférase ?

Il est aujourd'hui établi que l'acétylation de Smc3 par Eco1 est nécessaire pour l'établissement de la cohésion en phase S. Chez *S. cerevisiae* ce sont les lysines K112 et K113 qui sont acétylées, dans les cellules de mammifères ce sont les lysines K105 et K106 (Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Unal et al., 2008; Zhang et al., 2008a). Nous avons montré dans l'article I que l'inhibition de l'expansion des domaines par Eco1 n'impliquait pas l'acétylation de Smc3-K113 (comparer les conditions *cdc45* et *cdc20*, *eco1-AID*). On peut donc se demander si l'activité acétyl-transférase d'Eco1 est requise pour son rôle dans l'organisation du génome. Nous pouvons imaginer qu'Eco1 inhibe l'expansion des domaines établis par les cohésines *via* des interactions protéines-protéines (recrutement de facteurs additionnels aux cohésines) et non par l'acétylation de protéines cibles. Afin de tester cette hypothèse nous envisageons d'exprimer une version d'Eco1 dont l'activité catalytique est déficiente (*eco1-R222G*, *K223G* ou *eco1-W216G* (Chao et al., 2017; Gard et al., 2009; Heidinger-Pauli et al., 2009)) et d'analyser l'organisation des chromosomes par Hi-C dans des cellules arrêtées en métaphase (*cdc20*).

a. Hypothèse 1 : L'activité acétyl-transférase d'Eco1 est requise pour l'organisation du génome

i. Eco1 acétyle Pds5

Si la taille des domaines est similaire entre les conditions *cdc20* et *cdc20, eco1-R222G, K223G*, l'activité acétyl-transférase d'Eco1 serait requise pour inhiber la progression des cohésines sur l'ADN. Il faudrait alors identifier les résidus ciblés par Eco1. Pour cela une approche de spectrométrie de masse peut être envisagée, par comparaison de l'acétylome des cellules exprimant ou non Eco1. Cette approche permettra d'analyser la capacité d'Eco1 à acétyler d'autres cibles que Smc3. Par exemple, on peut envisager que Pds5 soit une autre cible d'Eco1. En effet, il a été décrit qu'en absence d'Eco1, Pds5 est plus dynamique sur l'ADN (Chan et al., 2012). L'acétylation par Eco1 de Pds5 aurait donc pour fonction de stabiliser cette dernière sur cohésines. De plus, Pds5 semble inhiber l'hydrolyse d'ATP présumée nécessaire pour la progression des cohésines sur l'ADN (Petela et al., 2018). Ainsi le recrutement d'Eco1 par Pds5 favoriserait l'acétylation de cette dernière, qui serait alors stabilisée sur l'anneau de cohésine et bloquerait l'expansion des boucles de chromatine et inhibant l'hydrolyse d'ATP.

ii. Eco1 acétyle les histones

Il est possible que l'analyse par spectrométrie de masse ne révèle pas de nouvelles cibles d'Eco1. En effet, les protéines ciblées par Eco1 pourraient être peu abondantes dans les cellules et difficiles à détecter lors de l'analyse de l'acétylome d'une cellule. Alternativement, Eco1 pourrait acétyler des protéines également ciblées par d'autres acétyl-transférases et sa dégradation n'aurait alors que peu d'effets sur le niveau d'acétylation de ses protéines. Afin d'identifier de telles cibles, il serait opportun d'analyser l'interactome d'Eco1 (Tarassov et al., 2008). Cette analyse pourrait révéler des interactions entre Eco1 et des protéines impliquées dans l'organisation de la chromatine telles que des remodeleurs chromatinien ou des histones. Il est communément admis que l'acétylation des histones conduit à la déstabilisation des nucléosomes et à l'ouverture de la chromatine (pour revue (Kouzarides, 2007)). De plus les cohésines sont accumulées dans des régions chromatinien ouvertes comme les promoteurs des gènes ou à proximité des gènes fortement transcrits (Busslinger et al., 2017; Lengronne et al., 2004). On peut donc envisager qu'Eco1 inhibe la progression des cohésines sur l'ADN en contribuant à l'ouverture de régions chromatinien propices au blocage des cohésines. Afin de valider cette hypothèse, nous

envisageons de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation et des tests d'acétylation *in vivo* afin de sonder si Eco1 interagit avec les histones et si elle les acétyle *in vivo*.

b. Hypothèse 2 : L'activité acétyl-transférase d'Eco1 n'est pas requise pour l'organisation du génome

Dans le cas où l'expression de la version d'Eco1 dont l'activité catalytique est défectueuse (*eco1-R222G, K223G*) conduit à l'expansion de la taille des domaines établis par les cohésines, Eco1 régulerait l'organisation du génome indépendamment de son activité acétyl-transférase. Cette activité enzymatique serait alors requise pour l'établissement de la cohésion lors de la phase S (acétylation de Smc3) mais pas pour l'organisation du génome. Il serait alors primordial de comprendre par quel mécanisme Eco1 inhibe la progression des cohésines sur l'ADN.

i. Eco1 déstabilise l'interface Smc3-Scc1

On peut imaginer qu'Eco1, indépendamment de son rôle stabilisateur de l'interface Smc3-Scc1 par l'acétylation de Smc3-K112 et K113 lors de l'établissement de la cohésion en phase S, ait un rôle déstabilisateur de cette même interface. Pour rappel, l'interface Smc3-Scc1 est considérée comme la porte de sortie de l'ADN de l'anneau de cohésine (Chan et al., 2012; Gligoris et al., 2014; Lopez-Serra et al., 2013). Il est possible qu'Eco1 n'influence pas la translocation mais l'association des cohésines avec l'ADN. D'après cette hypothèse Wpl1 et Eco1 auraient un rôle similaire mais indépendant dans la déstabilisation de l'interface Smc3-Scc1. Leur co-déplétion conduirait à la stabilisation des cohésines sur l'ADN et donc à l'agrandissement des domaines. Il est important de mentionner que dans les cellules de poulet les cohésines sont plus stables sur l'ADN suite à la triple invalidation de WAPL, ESCO1 et ESCO2 comparativement à la seule invalidation de WAPL (Kawasumi et al., 2017). De plus, la réorganisation de la chromatine en « *vermicelli* » est plus prononcée dans le triple mutant que dans le simple (Kawasumi et al., 2017). Ces résultats suggèrent un rôle d'ESCO1 et d'ESCO2 dans la stabilisation des cohésines sur l'ADN, indépendamment de celui de WAPL. Par ailleurs nous avons mentionné dans la partie introductive de ce manuscrit (Chapitre III) que les orthologues d'Eco1 dans les cellules de mammifères, ESCO1 et ESCO2, n'étaient pas recrutés aux cohésines par les mêmes mécanismes. ESCO1 s'associe à l'anneau *via* Pds5 alors que ESCO2 interagit avec le facteur de réplication Mcm2 (Ivanov et al., 2018; Minamino et al., 2015). Il est également établi chez la levure qu'Eco1

interagit à la fois avec Pds5 et avec le facteur de réplication PCNA (Moldovan et al., 2006; Noble et al., 2006). Ainsi, on propose qu'Eco1 recrutée aux cohésines *via* Pds5 inhibe la progression des boucles établies par les cohésines en déstabilisant l'interface Smc3-Scc1 et régule ainsi l'organisation du génome. Alternativement, Eco1 recrutée aux cohésines par l'intermédiaire de PCNA aurait un rôle stabilisateur de l'interface Smc3-Scc1 par l'acétylation Smc3-K112 et K113 et permettrait l'établissement de la cohésion des chromatide sœurs. Cette double fonction d'Eco1 pourrait favoriser l'établissement de la cohésion lors de la phase S : Eco1 déstabilise transitoirement l'interface Smc3-Scc1 afin de permettre l'entrée du second brin d'ADN dans l'anneau, puis elle la stabilise et établit la cohésion en acétylant Smc3. Selon cette hypothèse, Eco1 régulerait la dynamique des cohésines à l'ADN. Afin de la vérifier, nous proposons d'invalider Eco1 dans des cellules non répliquées (*cdc45*) et d'analyser par FRAP si cela conduit à une stabilisation de l'anneau sur l'ADN. De plus, si l'interface Smc3-Scc1 est déstabilisée à la fois par Wpl1 et par Eco1, les cohésines seraient très stable lors de la double invalidation de Wpl1 et d'Eco1 alors qu'elles garderaient un certain dynamisme lors de la seule invalidation de l'une ou de l'autre de ces protéines. Afin de valider qu'Eco1 participe à l'ouverture de cette interface nous pourrions tirer parti d'une protéine de fusion entre Smc3 et Scc1, empêchant l'ouverture de cette interface (allèle *SMC3-SCC1*, (Gruber et al., 2006)). L'invalidation simultanée de Wpl1 et d'Eco1 conduirait à une stabilisation des cohésines sur l'ADN comparable à celle observée lors de l'expression de la protéine de fusion Smc3-Scc1. Il serait également intéressant d'analyser par Hi-C si l'expression de Smc3-Scc1 conduit à une réorganisation des chromosomes similaire à celle observée dans la souche *wpl1Δ, eco1-AID*.

Par ailleurs, on ne peut exclure qu'Eco1 déstabilise une autre interface de l'anneau de cohésine : Smc1-Scc1 ou Smc1-Smc3. De manière analogique, on pourrait induire artificiellement la fermeture de ces interfaces (Gruber et al., 2006) afin d'analyser une régulation potentielle de leur ouverture par Eco1.

En conclusion, élucider le mode d'action d'Eco1 chez la levure *S. cerevisiae* permettra d'approfondir à la fois les rôles respectifs de ces orthologues ESCO1 et ESCO2, mais également de comprendre les différents modes de régulation des cohésines impliquées dans la formation des boucles chromatiniennes ou dans la cohésion des chromatides sœurs.

L'organisation de l'ADNr par les complexes SMCs

A. Réciprocité entre cohésines et condensines à l'ADNr

Nos données de microscopie suggèrent un rôle additionnel de Pds5 dans l'organisation de l'ADNr, en plus du recrutement de Wpl1 et d'Eco1. Comme nous avons pu en discuter dans la partie Résultats, nous suggérons que Pds5 ait un rôle dans la régulation des condensines. Afin de le vérifier nous proposons d'étudier le recrutement, la dynamique ou l'activation des condensines et présence et en absence de Pds5. Chez la levure *S. cerevisiae* le rôle des condensines en mitose se limite essentiellement au regroupement des centromères et à la compaction de l'ADNr (Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017). Peu d'informations sont disponibles quant à la régulation de ce complexe : modes de recrutement et de dissociation de l'ADN, mécanisme de translocation... Il serait donc intéressant d'approfondir le mécanisme d'action des condensines et plus particulièrement de comprendre les liens existant entre les condensines et les cohésines pour la compaction de l'ADNr. Pour rappel, la déplétion des condensines et/ou des cohésines conduit à la désorganisation de l'ADNr en mitose et à la formation d'un « *puff* » dont la ségrégation dans les deux cellules filles est compromise. Les résultats montrant qu'en absence de cohésines, les condensines dérèglent l'organisation de l'ADNr alors que la réciproque ne semble pas être vraie, suggèrent une orchestration étroite de l'action des deux complexes (Lavoie et al., 2002). Ils laissent également supposer que les cohésines organisent spatialement l'ADNr puis que les condensines le compactent. Ainsi les cohésines seraient incapables de générer un degré suffisant de compaction de l'ADNr et les condensines ne pourraient pas établir une organisation de la fibre propice à sa ségrégation. De quelle nature pourrait-être l'organisation spatiale dictée par les cohésines ?

a. Les cohésines bloquent la progression des condensines sur l'ADN

On peut envisager que la cohésine (conférant la cohésion ou formant des boucles de chromatine) établisse des frontières au sein de l'ADNr séparant chaque copie d'ADNr. Les condensines, dont la progression serait stoppée par les cohésines, compacteraient alors indépendamment chaque copie d'ADNr. En absence de cohésines les condensines établiraient des boucles entre copies adjacentes, dérègleraient la transcription du 35S et compromettraient la ségrégation de l'ADNr. Alternativement les cohésines pourraient favoriser la ségrégation spatiale

entre les copies actives et les copies inactives d'ADNr. Les condensines compacteraient alors des copies d'ADNr dans un état chromatinien comparable. En absence de cohésines les condensines pourraient compacter des copies d'ADNr dans différents états chromatiniens et nuire à l'organisation spatiale et à la ségrégation de l'ADNr. Par ailleurs en absence de condensines les frontières établies par les cohésines ne seraient pas altérées mais ne permettraient pas une compaction suffisante de l'ADNr. En résumé, étudier les rôles respectifs des cohésines et des condensines dans l'organisation de l'ADNr sera clef pour comprendre comment le haut niveau de compaction de cette fibre est atteint et comment il permet d'assurer la ségrégation de l'ADNr dans les deux cellules filles.

b. Les cohésines sont dérégulées dans le double mutant *wpl1Δ, eco1-AID*

Ce modèle postulant la formation par les cohésines de frontières délimitant des régions compactées par les condensines (Figure 54, haut) pourrait également expliquer le phénotype inattendu de l'ADNr dans la souche *wpl1Δ, eco1-AID*. Dans cette souche l'ADNr adopte une organisation qui n'a encore jamais été rapportée dans la littérature : il apparaît comme une ligne centrale entourée d'un halo plus diffus (Figure 53).

Pour rappel, les frontières établies par les cohésines sur l'ADNr pourraient être établies par des cohésines impliquées dans la formation de boucles de chromatine ou par des cohésines maintenant la cohésion des chromatides sœurs. Dans l'article I présenté ci-avant nous avons mis en évidence que l'activité des cohésines actives en extrusion de boucles était dérégulée dans la souche *wpl1Δ, eco1-AID* : des boucles de grandes tailles sont accumulées au détriment des boucles de plus petites tailles. Les cohésines impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs semblent également défailtantes dans la souche *wpl1Δ, eco1-AID* puisqu'il a été rapporté que les chromosomes de cette souche présentaient un défaut important de cohésion (Guacci et al., 2015). Ces données suggèrent que les deux fonctions des cohésines sont impactées en absence Wpl1 et d'Eco1. Nous suggérons ainsi que dans la souche *wpl1Δ, eco1-AID* les frontières établies par les cohésines (quelle que soit leur nature) à l'ADNr sont moins nombreuses ou qu'elles ne permettent plus de bloquer les condensines. Ces dernières compacteraient alors des régions d'ADNr plus grandes, contenant plus de copies d'ADNr, qui pourraient s'étendre dans l'espace nucléaire. Ainsi, dans une souche sauvage l'ADNr formerait une ligne composée des régions liées par les cohésines et des copies d'ADNr compactées par les condensines. Dans la souche *wpl1Δ, eco1-AID*, l'ADNr

serait réorganisé en une ligne constituée des séquences enrichies en cohésines entourée par un halo diffus composé des grands domaines compactés par les condensines.

B. L'ADNr comme modèle de l'organisation du génome ?

Chez la levure *S. cerevisiae* la compaction mitotique est effectuée par les cohésines et dépend entre autres de Pds5, Wpl1 et Eco1. Les condensines n'ont qu'un rôle mineur dans cette réorganisation. Il y a cependant une exception, l'ADNr. En effet, cette séquence est compactée par les condensines en mitose et Pds5 joue un rôle supplémentaire dans son organisation. Aux vues de ces différences, la compaction de l'ADNr par les complexes SMCs ne semble donc pas refléter la compaction du reste du génome par ces mêmes complexes. Considérer l'ADNr comme modèle de la compaction de la chromatine nucléoplasmique semble donc pour le moins délicat chez la levure *S. cerevisiae*. Cependant, la compaction de l'ADNr de *S. cerevisiae* par les condensines en anaphase renvoie à la compaction des chromosomes chez *S. pombe* ou dans les cellules de mammifères. De plus nous avons pu analyser dans l'article II que l'ADNr, tout comme les chromosomes des cellules de mammifères, se divisait en sous-domaines identifiables en microscopie à fluorescence. Ainsi nous suggérons que les mécanismes de compaction de l'ADNr de *S. cerevisiae* s'approchent de ceux actifs chez *S. pombe* ou dans les cellules de mammifères. La levure *S. cerevisiae* apparaît donc comme un bon modèle permettant d'étudier à la fois la compaction mitotique dépendante des cohésines (chromatine nucléoplasmique) et celle dépendante des condensines (ADNr).

ANNEXES

Annexe I : Partie Résultats, stabilisation des cohésines en G1, souches et méthodes

Table des souches

Nom de souche	Genotype	Phase du cycle	Fond génétique	Référence
FB09-4A	<i>MATa, his3-11,15, trp1-1, can1-100, SCC1-PK9::KAN-MX6, leu2::P_{GAL}-SCC1(R180D,268D)-HA3::LEU2 (single integrant), RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1	W303	Article I
FB09-9C	<i>MATa, leu2-3,112, trp1-1, his3-11,15, can1-100, SCC1-PK9::KAN-MX6, rDNA::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1	W303	Article I
FB08-5C	<i>MATa, his3-11,15, trp1-1, can1-100, SCC1-PK9::KAN-MX6, wpl1Δ::HPH-MX6, leu2::P_{GAL}-SCC1(R180D,268D)-HA3::LEU2, rDNA::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1	W303	Article II
FB08-6A	<i>MATa, leu2-3,112, trp1-1, his3-11,15, can1-100, SCC1-PK9::KAN-MX6, wpl1Δ::HPH-MX6, rDNA::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1	W303	Article II

Matériel et méthodes

Des cultures en phase exponentielle des souches présentées ci-dessus (milieu YP raffinose 2%) sont arrêtées en G1 par ajouts successifs d'α-facteur (Antibody-online, ABIN399114, 1 μg/ml final), toutes les 30 min. L'expression de Scc1 (*OE scc1, P_{GAL}-SCC1(R180D,268D)-HA3*) est induite par ajout de galactose 2% 1h après le début de l'arrêt. Après 2h30 d'arrêt, le formaldéhyde est ajouté directement aux cultures.

La suite du protocole de préparation des culots, le traitement des données de Hi-C, l'analyse par cytométrie en flux et la méthode de Western Blot sont détaillés dans l'article I.

Annexe II : Partie Résultats, un rôle additionnel de Pds5 dans l'organisation de l'ADNr, souches et méthodes

Table des souches

Nom de souche	Genotype	Phase du cycle	Fond génétique	Référence
FB39	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, his3-11,13, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, P_{MET3}-CDC20::TRP1</i>	Métaphase	W303	Article II
yLD127-20c	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, SCC1-PK3-AID::KAN-MX4, his3::ADH1promoter-OsTIR1-9myc::HIS3, P_{MET3}-CDC20::TRP1</i>	Métaphase	W303	Article II
FB05-5B	<i>MATa, trp1-1, ura3-1, his3-11,13, leu2::P_{GALI}-SIC1(9m)/P_{HIS3}-Gall/P_{HIS3}-GAL2/P_{GALI}-GAL4::LEU2, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1/S	W303	Cette étude
yLD149-2b	<i>MATa, trp1-1, can1-100, wpl1Δ::HPH-MX4, leu2::P_{GALI}-SIC1(9m)/P_{HIS3}-GAL1/P_{HIS3}-GAL2/P_{GALI}-Gal4::LEU2, his3::P_{ADH1}-OsTIR1-9myc::HIS3, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1/S	W303	Cette étude
yLD150-12d	<i>MATa, trp1-1, can1-100, PDS5-AID::KAN-MX4, leu2::P_{GALI}-SIC1(9m)/P_{HIS3}-GAL1/P_{HIS3}-GAL2/P_{GALI}-GAL4::LEU2, his3::P_{ADH1}-OsTIR1-9myc::HIS3, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2</i>	G1/S	W303	Cette étude
yLD130-4d	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, P_{MET3}-CDC20::TRP1, his3::P_{ADH1}-OsTIR1-9myc::HIS3, PDS5-AID::KAN-MX6</i>	Métaphase	W303	Cette étude
yLD130-26a	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, his3-11,13, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, P_{MET3}-CDC20::TRP1, PDS5-AID::KAN-MX6</i>	Métaphase	W303	Cette étude
yLD126-36c	<i>MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, P_{MET3}-CDC20::NAT-MX4, leu2::tetR-GFP::LEU2, ura3::3x tetO(x112)::URA3, his3::P_{ADH1}-OsTIR1-9myc::HIS3</i>	Métaphase	W303	Article I

yLD126-38b	<i>MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, P_{MET3}-CDC20::NAT-MX4, tetR-GFP:LEU2, ura3::3x tetO(x112)::URA3, his3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::HIS3, PDS5-AID::KAN-MX6</i>	Métaphase	W303	Article I
FB133-57B	<i>MATa, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, can1-100, his3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::HIS3, P_{MET3}-CDC20::TRP1</i>	Métaphase	W303	Article I
yLD121-1a	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, leu2-3,112, can1-100, his3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::HIS3, PDS5-AID::KAN-MX4, P_{MET3}-CDC20::TRP1</i>	Métaphase	W303	Article I
yLD144-6b	<i>MATa, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, his3-11,13, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2 ura3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::URA3, P_{MET3}-CDC20::NAT-MX4</i>	Métaphase	W303	Cette étude
yLD136-1b	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, his3-11,13, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, ura3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::URA3, P_{MET3}-CDC20::TRP1, ECO1-PK3-AID::KAN-MX4</i>	Métaphase	W303	Cette étude
yLD144-14d	<i>MATa, leu2-3,112, trp1-1, can1-100, his3-11,13, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ura3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::URA3, P_{MET3}-CDC20::NAT-MX4, wpl1Δ::HPH-MX4</i>	Métaphase	W303	Cette étude
yLD136-3b	<i>MATa, leu2-3,112, can1-100, his3-11,13, RDNI::pTM-lacO(x50)-URA3, ade2::pAFS144-wtGFP::ADE2, ura3::P_{ADHI}-OsTIR1-9myc::URA3, P_{MET3}-CDC20::TRP1, ECO1-PK3-AID::KAN-MX4, wpl1Δ::HPH-MX4</i>	Métaphase	W303	Cette étude

Matériel et méthodes

Pour l'arrêt en G1/S, les cultures de levures en phase exponentielle (souches FB05-5B, yLD149-2b, yLD150-12d en milieu YP raffinose 2%) sont arrêtées en G1 par ajouts successifs d' α -facteur (Antibody-online, ABIN399114, 1 μ g/ml final), toutes les 30 min. Une heure après le début de l'arrêt, l'expression de Sic1 (*OE Sic1, leu2::P_{GALI}-SIC1(9m)/ P_{HIS3}-GAL1/P_{HIS3}-GAL2/P_{GALI}-GAL4::LEU2*) est induite par ajout de galactose 2% et l'auxine est ajoutée (Sigma-Aldrich, I3750, 2 mM final) pour induire la dégradation de Pds5. Après 2h30 d'arrêt, les cellules sont lavées puis libérées dans le cycle en milieu YP raffinose 2%, galactose 2% + auxine 2 mM. Des échantillons sont prélevés toutes les heures pendant 4h.

Pour l'arrêt en métaphase (*cdc20, P_{MET3}-CDC20::TRP1*), les cultures de levures en phase exponentielle (milieu minimum sans méthionine, glucose 2%) sont arrêtées en G1 par ajouts

successifs d' α -facteur, toutes les 30 min pendant 2h30. Les cellules sont alors lavées et libérées dans le cycle cellulaire en milieu complet (YP, glucose 2%) supplémenté de Méthionine (2mM final). Afin de dégrader les protéines d'intérêt en G1 (souches FB39, yLD127-20c, yLD130-4d, yLD144-6b, yLD144-14d, yLD136-1b, yLD136-3b), l'auxine (2 mM final) est ajoutée après 1h d'arrêt en α -facteur et après relargage des cellules. Les cellules sont imagées 2h après l'entrée dans le cycle. Afin de dégrader les protéines d'intérêt en métaphase (souches yLD130-26a, yLD127-20c, yLD130-4d, yLD126-36c, yLD126-38b, FB133-57B, yLD121-1a), les cellules sont libérées dans le cycle en YP + glucose + méthionine et l'auxine est ajoutée après 2h d'incubation. Les cellules sont analysées 2h après l'induction avec l'auxine.

Pour la préparation des échantillons, les paramètres utilisés pour la microscopie à fluorescence et la cytométrie en flux, se référer à l'article II.

**Annexe III: Meeting report from the first European
OddPols meeting: Toulouse 2018**



Meeting report from the first European OddPols meeting: Toulouse 2018

Lise Dauban¹, Emilie Cerezo¹, Anthony Henras, Olivier Gadal*

Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France



ARTICLE INFO

Keywords:

RNA polymerases
Structure and function
Transcription
Chromatin
Nuclear structure
Gene silencing
Development
Genetic disorders
Cancer and diseases

ABSTRACT

The eleventh international conference on transcription by RNA polymerases I, III, IV and V (the OddPols) was held from June 26th to June 29th 2018 at the Museum of Natural History of Toulouse, France and organized by Anthony Henras and Olivier Gadal. The scientific committee was composed of David Engelke, Joachim Griesenbeck, Ross Hannan, Deborah Johnson, Richard Maraia, Christoph Müller, Craig Pikaard, David Schneider and Ian Willis. The organizers are grateful to the “Centre de Biologie Intégrative de Toulouse”, for support in the organization of the event. Participants from 13 different countries presented their newest exciting results during the scientific sessions and during extended conversation hours in the cosy atmosphere of the botanic garden of the Museum. Here we present the highlights of all oral presentations.

1. Introduction

The 2018 OddPols meeting was held for the first time in Europe, at the Museum of Natural History of Toulouse, France, under the supervision of a giraffe proposed to become the meeting mascot. The meeting gathered 85 participants who shared their science through 37 oral presentations, divided in 8 general topics and 27 posters. The scientific committee awarded prizes for the best student talk and poster to encourage the upcoming generation of OddPols specialists. Congratulations to Aishwarya Iyer Bierhoff for her talk during the session on regulation of transcription (see below). Congratulations to Marcel Böhrer for his poster dealing with the characterization of genetic and epigenetic determinants of RNA Pol IV activity in *Arabidopsis thaliana*.

2. Plenary sessions

2.1. Sessions 1,2. Structure and function of OddPols and transcription machineries

Carlos Fernández Tornero (Centro de Investigaciones Biológicas,

Spain) presented crystal and cryo electron microscopy structures of Pol I in three different states: Pol I dimers, Pol I monomers and RRN3 associated Pol I monomers. When inactive, Pol I forms a dimer in which Rpa43 subunit C terminus (the “connector” domain) of one monomer is inserted into the DNA binding cleft of the other one. To prove the existence of such inactive Pol I dimers in yeast cells, they developed an elegant microscopy approach and showed a strong increase in dimer formation upon nutrient starvation, as well as upon inhibition of either ribosome maturation or protein synthesis. Using ChIP, they further show that Pol I dimerization down regulates transcription of ribosomal DNA. As it becomes activated, structural rearrangements inside the polymerase occur that result in partial closing of the cleft. The fully activated form of the enzyme comprises Rrn3 protein bound to the stalk, limiting its flexibility, while the Rpa43 C terminus remains disordered.

Herbert Tschochner (Universität Regensburg, Germany) focused on Pol I specific heterodimer Rpa49/Rpa34.5 activity using an *in vitro* approach. The study uncoupled the functions of Rpa49 C terminal domain (A49 Ct), which shares homology with RNA polymerase II (Pol II) transcription factor TFIIE, and of the complex dimerization module composed of Rpa34.5 and A49 N terminus (A34.5/A49 Nt), related to

Abbreviations: AML, Acute Myeloid Leukemia.; A49-Ct, Rpa49 C-terminal domain; A49-Nt, Rpa49 N-terminal domain; B-WICH complex, Complex composed of SNF2h, WSTF and NMI1; ChIP, Chromatin immunoprecipitation; CBI, Centre de Biologie Intégrative de Toulouse; DSBs, Double strand breaks; ESCs, Embryonic Stem Cells; FBL, fibrillarin; MEFs, Mouse Embryonic Fibroblast; Nas, nicotinamide synthase; NORs, nucleolar organizer regions; NuRD complex, The Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex; OddPols, RNA polymerases I, III, IV and V; PIC, pre-initiation complex; Pol, RNA polymerase; rDNA, ribosomal DNA; TCS, Treacher Collins Syndrome; TFIIB, Pol III transcription factor composed of Brfl1, Bdp1 and TBP; TSS, transcription start site

* Corresponding author.

E-mail address: olivier.gadal@ibcg.birotoul.fr (O. Gadal).

¹ participated equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.051>

Received 5 December 2018; Accepted 20 December 2018

Available online 04 January 2019

0378-1119/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

TFIIF. When present in the polymerase, A49 Ct enhances DNA binding and promotes transcription speed but leads to introduction of more errors. In contrast, an A34/A49 Nt containing Pol I is slowed down in elongation, but enhances fidelity. Moreover A49 Ct supports the polymerase to transcribe through a nucleosomal template. Interestingly, both Pol I and Pol III are able to transcribe through nucleosomal templates *in vitro* contrary to Pol II. This property is correlated with the presence of Pol I A349/A34.5 heterodimer or with the Pol III equivalent Rpc37/Rpc53 complex, which also shares homology with TFIIE and TFIIF.

Another Pol I specific feature, compared to Pol II and III, is its relatively high sensitivity to DNA intercalating agents. The rRNA gene promoter sequences are not conserved across species and **Konstantin I. Panov** (Queen's University Belfast, United Kingdom) proposed that their structures and physical properties, such as bendability and melt ability are conserved. He further exposed that Pol I inhibitors all share a flat structural region that can disrupt DNA 3D structure, increase DNA melting temperature and thus alter polymerase recruitment to the promoter and/or initiation events.

Christoph W. Müller (European Molecular Biology Laboratory, Germany) compared Pol I and Pol II mechanisms, based on the analysis of their respective atomic structures. One striking difference is the path the DNA adopts when engaged with the RNA polymerase. While the DNA fibre remains almost straight when transcribed by Pol I, it is bent when engaged within Pol II. In Pol I, this is explained by the presence of the Pol I transcription factor Rrn7 cyclin folds which bind further upstream on the DNA compared to those of TFIIB and by the absence of TBP bound to the Pol I core promoter.

As Pol I and Pol II are quite divergent, Pol III is closer to Pol II. Indeed **Matthias K. Vorländer** (from Christoph Muller's lab, EMBL, Germany) presented 3.7 Å to 5.5 Å resolution structures obtained by cryo electron microscopy of yeast Pol III Pre Initiation Complex (PIC) comprising Pol III bound to U6 promoter DNA and TFIIB (composed of Brf1, Bdp1 and TBP). The group observed that TFIIB binds to DNA on top of the polymerase cleft, with Brf1 contacting directly the polymerase as TFIIB does in Pol II. They could also determine that TFIIB is tightly bound to DNA, forming a cage around the promoter, thus creating a stable platform capable of sustaining Pol III high initiation rate. Within the pre initiation complex, TFIIB contacts transcription factor like polymerase subunits Rpc37 and Rpc34 and stabilizes the transcription bubble.

Type 1 and type 2 Pol III promoters are peculiar in that they contain intragenic promoter elements. Type 3 Pol III promoter architecture is similar to snRNA gene promoters transcribed by Pol II. **Jerome Gouge** (The Institute of Cancer Research, United Kingdom) presented a study focused on Brf2, a transcription factor specific for these type III promoters. Very interestingly, they showed that Brf2 can be oxidised, and in turn modulates Pol III recruitment in a redox sensitive manner (**Gouge et al., 2015**). Under prolonged oxidative conditions, Brf2 impedes transcription of seleno cysteine tRNAs required for translation of detoxifying enzymes. Accumulation of reactive oxygen species then leads to cell apoptosis. Alessandro Vannini's fellow proposed that Brf2 activation in cancer cells lead to sustained detoxification and apoptosis evasion.

Seok Kooi Khoo (Institute of Molecular Biology, Taiwan) focused on the functional characterization of Rpc82/Rpc34/Rpc31 Pol III subcomplex. Rpc82 subunit, which is Pol II TFIIE paralogue, contains a structurally disordered insertion in the third Winged Helix domain, conserved in fungi and required for optimal cell growth and transcription initiation *in vitro*. Using site specific photo crosslinking analysis to explore Rpc82 function, the group showed that it interacts with both TFIIB related Brf1 protein in the PIC and DNA upstream of the transcription start site. Rpc82 also contacts Pol III Rpc31 and Rpc34 subunits on the protrusion and wall domains of the cleft.

2.2. Session 3. Regulation of transcription: activators and repressors

Aishwarya Iyer Bierhoff (German Cancer Research, Germany), from Ingrid Grummt's group, presented data on the regulation of fibrillarin (FBL), an enzyme that catalyzes methylation of both rRNA and nucleolar histone H2A. Glutamine methylation of histone H2A is exclusively present at the rDNA locus and correlates with Pol I transcription (**Tessarz et al., 2014**). The group identified FBL as a direct target of the NAD⁺ dependent deacetylase, SIRT7. They showed that acetylation and deacetylation of FBL by CBP and SIRT7 respectively, impact on H2A methylation and Pol I transcription without altering pre-rRNA methylation or processing. The study reveals that modulation of FBL acetylation and histone H2A glutamine methylation contributes to cell cycle dependent fluctuations in Pol I transcription. In interphase, SIRT7 dependent deacetylation of FBL promotes H2A methylation and high levels of Pol I transcription, whereas hyperacetylation of FBL attenuates H2A methylation during mitosis and correlates with repression of Pol I transcription.

Transcription initiation by Pol III requires the activity of TFIIB transcription factor. **Guillermo Abascal Palacios** from the group of Alessandro Vannini (The Institute of Cancer Research, United Kingdom) reported the cryo EM structure of Pol III pre initiation complex at 3.4 4.0 Å and apo Pol III at 3.1 3.4 Å resolution. These structures revealed a function of TFIIB in the rearrangement of Rpc34 and Rpc37 Pol III specific subunits to facilitate DNA opening during Pol III transcription initiation.

Magdalena Boguta (Institute of Biochemistry and Biophysics, Poland) highlighted a dual role of a second major Pol III transcription factor, TFIIC. This complex activates Pol III transcription by binding to the intragenic promoter elements of tRNA genes and allowing TFIIB recruitment. The group reported that, depending on growth conditions, TFIIC also functions as a tDNA transcription repressor. Under repressive conditions, interaction between TFIIC subunit Tfc4 and TFIIB subunits Brf1 and Bdp1 is strengthened. This leads to TFIIB sequestration away from the tDNA transcription start site (TSSs), failure in Pol III recruitment and impairment in transcription initiation.

2.3. Session 4. Regulation of transcription: elongation and termination

Richard Maraia (National Institutes of Health, MD, USA) presented a new activity of Rpc37/Rpc53 Pol III subunits during termination which occurs at an oligo(T) tract on the non template strand; oligo(rU:dA) hybrid on the template strand. The Rpc37/Rpc53 heterodimer promotes Pol III elongation in the proximal part of this tract by maintaining the RNA 3' end in the active site, ensuring processivity until sufficient instability of the (rU:dA) RNA:DNA hybrid results in transcript release (**Mishra and Maraia, 2018**).

David A. Schneider (University of Alabama, AL, USA) presented a study focused on Pol I subunit Rpa12 required for hydrolytic cleavage of the nascent rRNA within backtracked or arrested transcription complexes. The results show that Rpa12 also participates in transcription elongation. Using *in vitro* transient state kinetic analyses, they showed that Pol I lacking Rpa12 displays a dramatic defect in nucleotide addition during transcription elongation, suggesting that Rpa12 takes part directly in nucleotide addition mechanism. Authors also found that polymerases lacking Rpa12 are more stably associated with DNA template *in vitro* and are more resistant to high salt concentrations, indicating that Rpa12 influences the structure of the elongating polymerase. This new destabilization role of Rpa12 is also in agreement with data suggesting its involvement in transcription termination.

Work from **Tommy Darriere** from Olivier Gadal's group (Centre de Biologie Intégrative de Toulouse, France) demonstrated that point mutations in the two largest Pol I subunits can bypass the need for Rpa49 specific subunit in living yeast cells. Moreover, these mutations were all localized in a very specific area, near Rpa12 subunit, at the

interface between the jaw and the lobe. Authors also showed that one of the mutations, in an otherwise WT context, allows overproduction of rRNAs, leading to the formation of a putative super Pol I.

Tom Moss (Laval University, Quebec, Canada) reported a combination of ChIP seq data using Mouse Embryonic Fibroblast (MEFs) and Embryonic Stem Cells (ESCs) conditional for the transcription factors UBF, RRN3 and TAF1B. Analysis of these data suggests that UBF, in collaboration with SL1, is a key factor in establishing and maintaining rDNA repeat activity. RRN3 release from elongating transcription complex is stochastic and depends on cell type and possibly initiation rate. Furthermore, a peak of arrested Pol I is observed at the “spacer promoter” immediately upstream of the enhancer repeats and the gene body. This peak is positioned just downstream of a unique chromatin boundary consisting of CTCF and cohesin complexes. Active chromatin marks and phased nucleosomes are detected adjacent to this boundary, but not elsewhere in the rDNA repeat.

2.4. Session 5. Chromatin effect on transcription

Konstantin I. Panov (Queen's University, Belfast, United Kingdom) presented a study focused on the epigenetic regulation of rDNA chromatin in response to stress in human cells. The group discovered a new link between stress and chromatin epigenetic changes at the rDNA locus involving histone demethylase KDM4A. Upon stress, such as starvation, DNA damage or heat shock, KDM4A dissociates from rDNA. This correlates with down regulation of Pol I transcription and closing of rRNA genes as visualized by ATAC see method. Conversely, KDM4A is required for recovery after stress since upon its re localization to nucleoli, rRNA genes adopt an open conformation and rRNA synthesis resumes. Association of KDM4A with rDNA in starved refeed cells depends on PI3K/SGK1 signaling pathway but other non identified stress dependent signaling pathways are involved in the cases of other stresses.

A complementary study presented by **Ann Kristin Östlund Farrants** (Stockholm University, Sweden) highlighted the crucial role of B WICH complex (SNF2h, WSTF, NM1) in Pol I transcription. Following glucose stimulation, B WICH is recruited at rDNA locus where it is implicated in chromatin opening. Indeed, in absence of B WICH subunit WSTF, rDNA remains in a repressive chromatin state despite glucose stimulation. This prevents association of c Myc and histone deacetylase SIRT7. Furthermore dissociation from the promoter of the NuRD silencing complex component CDH4, is impaired in absence of WSTF. Therefore, upon glucose stimulation, B WICH is required to counteract the repressive poised state induced by NuRD complex.

To understand whether rRNA gene expression is differentially regulated depending on growth, **Jean Clément Mars** (Moss group, Laval University, Quebec, Canada) studied rDNA activity in mouse cell lines displaying different proliferation rates. In contrast to MEFs, fast growing ESCs have almost all their rRNA genes transcriptionally active. The authors characterized the distribution of histone modifications across the rDNA as well as the presence of a CTCF boundary adjacent to the spacer promoter (Herdman et al., 2017). Histone modifications associated with gene activity were all detected at this boundary, but not elsewhere. Different distributions of RRN3 and Pol I/RPI indicated a distinct regulation of transcription in ESCs as compared to MEFs. Moreover, ESCs displayed a lower per gene density of engaged Pol I as compared to MEFs, suggesting that in MEFs the reduced number of active genes is compensated by an increase in polymerase density.

Martina Dvorackova (Masaryk University, Czech Republic) uses *Arabidopsis thaliana* to better decipher the role of CAF 1 complex, responsible for depositing histone variant H3.1 during replication. The group showed that depleting CAF 1 subunits does not impact replication timing but results in increase in DNA damages and chromosome instability. Indeed, both telomeric and rDNA repeats are progressively lost in these mutants. In reverted plant lines telomeric and rDNA repeat number are recovered in a stochastic manner.

2.5. Session 6. Interplay between transcription, genome organization and nuclear structures

The group of **Brian McStay** (Centre for Chromosome Biology, Ireland) investigates the genomic architecture of nucleolar organizer regions (NORs) to address the conundrum on what dictates nucleolar architecture. On the short arms of acrocentric chromosomes, ribosomal gene arrays are flanked by proximal and distal sequences (relative to centromeres). The distal regions contain a large inverted repeat transcribed by Pol II. Sequencing of acrocentric chromosome distal junctions by PacBio revealed that the precise barrier between rDNA array and distal region on each acrocentric chromosome displays strong sequence identity. Recombination events occur not only in the ribosomal gene array but also in this region.

Interestingly a study presented by **Aline Marnef** (Legube group, Centre de Biologie Intégrative de Toulouse, France) showed that Pol I transcription inhibition and nucleolar cap formation can be uncoupled. They observed that induction of DSBs in nucleoli using the AsiSI restriction endonuclease affects Pol I transcription in all cell cycle phases (G1, S, G2). However, Pol I transcription inhibition upon DSB induction in G1 phase does not induce nucleolar cap formation, indicating that transcription inhibition is not sufficient for nucleolar cap formation. Nucleolar DSBs can be repaired by homologous recombination at the nucleolar periphery. Moreover, CTCF and cohesin complex are required for cap formation and recombination events.

Nutrient deprivation also leads to major nucleolar rearrangements in yeast such as massive rDNA condensation. This is caused by inhibition of Pol I and Pol III through inactivation of protein kinase TOR and loading of condensin complex on rDNA, as explained by X.F. **Steven Zheng** (Rutgers Cancer Institute of New Jersey, NJ, USA). Indeed, rapamycin treatment leads to a rapid loading of condensin complex onto rDNA. Inhibition of Pol I transcription in absence of condensin results in hyper recombination at the rDNA locus correlated with increased association of Rad52. High rDNA condensation is therefore essential to prevent deleterious recombination between rDNA units and cancer cell transformation. mTOR activation leads to nucleolar hypertrophy due to an increase in both Pol I and Pol III activities. This hypertrophy is associated with elevated growth rate and genomic instability, two major actors in tumor progression.

During his plenary lecture, **Craig Pikaard** (Howard Hughes Medical Institute at Indiana University, IN, USA) gave a retrospective account of the 20 year history of multisubunit RNA Polymerases IV and V, beginning with identification of their atypical catalytic subunits in preliminary sequence data for the first plant genome (that of *Arabidopsis thaliana*). He highlighted key discoveries made in his and other laboratories that revealed distinct roles for Pols IV and V in siRNA directed DNA methylation and transposon silencing and that identified their transcripts, subunit compositions and interacting partners, leading to current models for the RNA directed DNA methylation pathway. The biochemical activities of Pol IV and Pol V are still not well defined, such that more studies are needed to understand their mechanisms of action to the same extent as for Pols I, II and III.

2.6. Session 7. Mechanisms of gene silencing

Later on during the meeting, **Craig Pikaard** exposed his work based on the development of *in vitro* systems to study the first steps of RNA directed DNA methylation and gene silencing in plants. They recapitulated the synthesis of 24 nt siRNAs from template DNA using purified Pol IV, RNA dependent RNA polymerase 2 (RDR2) and the dicer endonuclease, DCL3. Pol IV transcribes the single stranded DNA template and terminates soon after it encounters the non template strand of double stranded DNA. The resulting termination complex enables RDR2, which needs a free RNA 3' end to function, to initiate its transcription, converting the Pol IV RNA strand into a dsRNA which is then processed by DCL3 into 24 nt siRNAs.

Todd Blevins (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, France) presented a talk about the mechanism of Pol IV silencing of transposable elements (TE) in plants. Using partial loss of function alleles of Pol IV subunits in Arabidopsis, his lab discovered that the Pol IV enzyme itself could trigger an initial wave of TE silencing without generating high levels of siRNAs. A second wave, involving amplification of the siRNAs, is then needed to complete transposable element silencing.

Gene silencing in plants involves another DNA dependent RNA polymerase, namely Pol V. Studies in the group of **Andrzej T. Wierzbicki** (University of Michigan, MI, USA) aim at understanding the role of this polymerase. Loci to be silenced need to be transcribed by Pol V, this enzyme is therefore an important decision maker in the silencing process. While transcribing, Pol V recruits chromatin remodelers such as SWI/SNF complex. Nucleosome positioning and epigenetic landscape of target genes are thus affected, enhancing their silencing. Fine tuning this mechanism is fundamental to prevent heterochromatin spreading to neighbouring genes. However, Pol V transcripts are hardly detectable. Pol V transcribed loci harbour CG methylations but this mark is not the only determinant in the recruitment of the polymerase, CHH methylation also contributes to some extent. Using a RIP seq approach, they captured and sequenced Pol V transcripts and detected transcription start sites (TSSs) all over the transcribed regions. The presence of CHG methylation around these TSSs suggests that this mark could be involved in Pol V initiation.

Apart from gene silencing mechanism, **Charlotte Montacé** (Sáez Vázquez group, Laboratoire Génome et Développement des Plantes, France) presentation dealt with the influence of iron level on rDNA organization and ribosome biogenesis in plants. Plant nucleoli contain high iron concentrations. To assess the impact of iron on ribosome biogenesis they studied nicotinamide synthase (nas) mutant plants characterized by reduced iron levels in nucleoli. In these plants, an increased number of fibrillar centres is observed but no evidence for changes in ribosome synthesis levels could be obtained. Remarkably, iron reduction led to nucleolar rearrangement with reactivation of the normally silenced NOR2, now present in the nucleolus of plant cells and supporting expression of rDNA variant 1. This reactivation may be caused by epigenetic modifications since changes in CHG and CHH methylation are observed. These data are in agreement with those showing that high iron amounts in animal cells cause rDNA hyper methylation and oxidation.

2.7. Session 8,9. OddPols involvement in development, genetic disorders, cancer and diseases

Nadine Hein and Ross Hannan (John Curtin School of Medical Research, Australia) presented studies on the development of drugs targeting Pol I to treat cancer. **Ross Hannan** presented advanced studies on CX 5461, the first Pol I inhibitor to enter clinical trials in Australia and Canada. Investigations to understand the mechanism of action of CX 5461 are crucial to reveal additional activities, which can contribute to efficacy, toxicity and mechanisms of acquired resistance. The gene encoding TOP2 α is frequently mutated in cells with acquired resistance to CX 5461. Extracts from resistant cells show a decrease in TOP2 α activity *in vitro* and TOP2 α knock down is sufficient to cause resistance to CX 5461. As CX 5461, TOP2 α inhibits PIC formation and transcription initiation but not elongation. CX 5461 induces a DNA damage response restricted to nucleoli characterized by a strong increase in DSBs at rDNA promoters. In addition to Pol I, CX 5461 also inhibits TOP2 α , which may impair the DNA Damage Repair response in nucleoli and increase rDNA instability.

In parallel, **Nadine Hein** is working with Pimera, Inc. (San Diego, CA) on the development of a second generation Pol I inhibitors that could be used in combination therapies to avoid acquired resistances. Authors showed preliminary studies on a new selective inhibitor of Pol I, PMR 116. Cell treatment with PMR 116 impairs Pol I recruitment to the rDNA in a similar fashion as CX 5461 and does not affect Pol II

transcription. PMR 116 inhibits Pol I transcription both in cancer and primary cells but these latter do not display a cytotoxic response. The main cellular response to PMR 116 is cell death by apoptosis. PMR 116 induces phosphorylation and accumulation of p53 but does not activate CHK1 or CHK2 as CX 5461. In clinical terms, PMR 116 is a promising drug since it increases survival compared to CX 5461, outperforms CX 5461 therapeutic window in Acute Myeloid Leukemia (AML) and prostate cancers and displays good pharmacological properties.

Marikki Laiho (Johns Hopkins University School of Medicine, MD, USA) presented the newest results on another Pol I inhibitor, BMH 21, a potential systemic cancer therapeutic. BMH 21 is a selective inhibitor of Pol I that impacts Pol I transcription cycle by causing transcription blocks. BMH 21 treatment induces specific degradation of Pol I subunit RPA194. This degradation requires the presence of transcribing Pol I on rDNA as shown by the requirement of UBF, TAF1C, and RRN3. The design and characterization of BMH 21 derivatives allowed to show that DNA intercalation *per se* is not the only determinant of RPA194 degradation. The ongoing studies in the Laiho group also aim at developing patient selection strategies by analyzing the oncogenic drivers or genetic alterations that upregulate Pol I transcription in cancers. A new rRNA probe detecting the 45S rRNA precursor has also been designed to study Pol I activity in cancer specimens.

Bruce A. Knutson (SUNY Upstate Medical University, NY, USA) talked about Treacher Collins Syndrome (TCS). This craniofacial disorder is characterized by facial bone malformations resulting from defects in neural crest cell migration during pharyngeal arches development. POLR1C or POLR1D genes encode subunits conserved in Pol I and Pol III (Rpac40 and Rpac19 in yeast, respectively) and are often found mutated in affected patients, as well as TCOF1, encoding a factor involved in rRNA synthesis and processing. As Treacher Collins mutations target highly conserved residues within yeast and human proteins, authors explored the molecular basis leading to the disease in *Saccharomyces cerevisiae*. Most of the TCS mutations are believed to affect dimerization of these subunits. One particular mutation (T71I) does not affect dimerization. It induces a cryo sensitive phenotype as associated with a defect in the production of the 18S and 25S rRNAs. Impaired recruitment of both Pol I and Pol III to rDNA is observed in this mutant and co IP experiments showed that Rpac19 and Rpac40 no longer interact with other Pol I or Pol III subunits. Altogether, their results show that Treacher Collins mutations affect both Pol I and Pol III machineries (Walker Kopp et al., 2017).

The presentation by **Martin Teichmann** (University of Bordeaux, France) dealt with the regulation of Pol III transcription during tumorigenesis. The group is studying the relationship between tumor promoting factors and Pol III transcription regulation during human IMR90 fibroblast transformation. This model system allows to recapitulate full tumoral transformation *in vitro*. Their data revealed that among Pol III components, only a strong increase of POLR3G and SNAPC1 expression at the mRNA levels was observed with progression of transformation. No deregulation of Pol I and Pol II components could be observed. Strikingly, several Pol III subunits and Pol III transcription factors (TFIIIB and TFIIIC) are up regulated at the protein level. This increase is accompanied by a 2 fold increase of a subset of Pol III synthesized RNAs such as 7SK, MRP or U6 snRNA. Collectively, these results indicate that overexpression of only a subset of the Pol III machinery components is sufficient to sustain transformation and tumor formation.

Shuping Zhong (University of Southern California, CA, USA) is interested in pathways leading to alcohol associated cancer development. The group reported previously that alcohol stimulates JNK1 signaling, which in turn activates Estrogen Receptor α (ER α) and results in increase in Brf1 expression and activation of Pol III transcription. In the present study, they investigate the role of Runx2 (Runt related transcription factor 2), a downstream target of the ER pathway, in Brf1 expression and Pol III gene activation in the development of breast cancer. Runx2 is overexpressed in human biopsies of breast cancer

suggesting a role in tumorigenesis. Alcohol induces Runx2 over expression in an ER positive breast cancer cell line (MCF 7) and this activation is mediated by ER α . RNAi mediated knock down of Runx2 following alcohol treatment prevents Brf1 expression and Pol III gene activation. The group showed that the anti tumor compound Tamoxifen reduces alcohol mediated increase in Brf1 expression of breast cancer cells.

Deborah L. Johnson (Baylor College of Medicine, Texas, USA) described the regulation of the key repressor of Pol III transcription, MAF1, by proteasomal degradation. MAF1 protein has a short half life and it is regulated through proteasome mediated degradation. This occurs through both ubiquitin dependent and independent pathways. mTOR induced phosphorylation of MAF1 promotes its ubiquitination by the Cullin2 RING E3 ligase and this enhances its degradation. The deubiquitination enzyme, USP10, deubiquitinates MAF1 to increase its stability. These results are consistent with the previously observed decrease in USP10 expression in liver cancers and the loss of MAF1 protein with enhanced Pol III transcription.

2.8. Session 10. Novel links with physiology and immunity

When the *MAF1* gene is knocked out in mice (*MAF1* KO mice), the resulting phenotype is quite unexpected: mice are lean and remain so even on a high fat diet. They display a reduced metabolic efficiency and have increased energy expenditure but no change in locomotor activity. **Ian Willis** (Albert Einstein College of Medicine, NY, USA) reported that in these mice, an energy sink is provided by constantly active Pol III transcription in all tested tissues leading to an energy consuming, futile RNA cycle (Willis et al., 2018). To feed the energy demand, mice exhibit high levels of lipid and protein catabolism. Metabolite profiling revealed that the *MAF1* KO impacts central metabolism in the mouse liver. They display an increased activity of two pathways linked to the TCA cycle: the urea cycle and the purine nucleotide cycle. The metabolomic data also point to increased nucleotide synthesis and turnover. These data suggest that constitutively high Pol III transcription in *MAF1* KO mice reprograms central metabolic pathways and wastes metabolic energy through a futile RNA cycle.

SINE elements such as Alu or MIR are transposable elements, the transcription of which is assumed by RNA Pol III: their left arm encompasses A and B boxes driving Pol III transcription initiation. To ensure genome stability, these sequences have been domesticated by epigenetic silencing mechanisms involving DNA and histone methylation. However, they are found expressed at higher levels when cells are exposed to stress and notably in cancer cells. **Davide Carnevali** from the group of Giorgio Dieci (University of Parma, Italy) developed a bioinformatic pipeline (Carnevali and Dieci, 2017) to identify genuine Pol III derived SINE RNAs expressed at single locus resolution and

distinguish them from those that are merely ‘passengers’ of longer Pol II transcribed genes. Using RNA seq libraries derived from normal or Acute Myeloid Leukemia (AML) affected patient cell lines, they determined whether Alu expression is deregulated in AML. The group observed a very significant increase in the expression of many Alu elements in these cancer cells whose expression pattern seems to correlate with tumor subtype, opening the possibility to use them as a molecular biomarker.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This meeting was organized with the help of Célia Plisson Chastang, Marta Kwapisz, Christophe Dez and Julio Saez Vasquez. For financial support, the organizers are grateful to the *Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Biologie Intégrative de Toulouse, Université de Toulouse, Région Occitanie*, and Promega company. The conference was organized in the context of the Euro Science Open Forum 2018. Special thanks to Christine Baillat and Manon Blanc (CBI) for financial administration; the Museum external conference manager, Josiane Beltran for her devoted implication; David Villa (CBI) for art work and “Mirabili’Art” association for giving a flavour of Toulouse culture.

References

- Carnevali, D., Dieci, G., 2017. Identification of RNA polymerase III-transcribed SINEs at single-locus resolution from RNA sequencing data. *Non-Coding RNA* 3.
- Gouge, J., Satia, K., Guthertz, N., Widya, M., Thompson, A.J., Cousin, P., Dergai, O., Hernandez, N., Vannini, A., 2015. Redox signaling by the RNA polymerase III TFIIB-related factor Brf2. *Cell* 163, 1375–1387.
- Herdman, C., Mars, J.-C., Stefanovsky, V.Y., Tremblay, M.G., Sabourin-Felix, M., Lindsay, H., Robinson, M.D., Moss, T., 2017. A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription. *PLoS Genet.* 13, e1006899.
- Mishra, S., Marañón, R.J., 2018. RNA polymerase III subunits C37/53 modulate rU:dA hybrid 3' end dynamics during transcription termination. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gky1109>.
- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., Kouzarides, T., 2014. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* 505, 564–568.
- Walker-Kopp, N., Jackobel, A.J., Pannafino, G.N., Morocho, P.A., Xu, X., Knutson, B.A., 2017. Treacher Collins syndrome mutations in *saccharomyces cerevisiae* destabilize RNA polymerase I and III complex integrity. *Hum. Mol. Genet.* 26, 4290–4300.
- Willis, I.M., Moir, R.D., Hernandez, N., 2018. Metabolic programming a lean phenotype by deregulation of RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (48), 12182–12187.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A., He, X., Niu, J., Zhou, B., Zhu, G., Ma, T., Song, J., Gao, J., Zhang, M.Q., and Zeng, J. (2019). Integrating Hi-C and FISH data for modeling of the 3D organization of chromosomes. *Nat. Commun.* *10*, 2049.
- Abranches, R., Beven, A.F., Aragón-Alcaide, L., and Shaw, P.J. (1998). Transcription sites are not correlated with chromosome territories in wheat nuclei. *J. Cell Biol.* *143*, 5–12.
- Acemel, R.D., Maeso, I., and Gómez-Skarmeta, J.L. (2017). Topologically associated domains: a successful scaffold for the evolution of gene regulation in animals. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* *6*.
- Adolph, K.W., Cheng, S.M., and Laemmli, U.K. (1977). Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. *Cell* *12*, 805–816.
- Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., and McDowell, A.W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* *308*, 32–36.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., et al. (2007). Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* *450*, 683–694.
- Alberghina, L., Smeraldi, C., Ranzi, B.M., and Porro, D. (1998). Control by nutrients of growth and cell cycle progression in budding yeast, analyzed by double-tag flow cytometry. *J. Bacteriol.* *180*, 3864–3872.
- Albert, B., Léger-Silvestre, I., Normand, C., Ostermaier, M.K., Pérez-Fernández, J., Panov, K.I., Zomerdijk, J.C.B.M., Schultz, P., and Gadal, O. (2011). RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *J. Cell Biol.* *192*, 277–293.
- Albert, B., Perez-Fernandez, J., Léger-Silvestre, I., and Gadal, O. (2012). Regulation of ribosomal RNA production by RNA polymerase I: does elongation come first? *Genet Res Int* *2012*, 276948.
- Albert, B., Colleran, C., Léger-Silvestre, I., Berger, A.B., Dez, C., Normand, C., Perez-Fernandez, J., McStay, B., and Gadal, O. (2013). Structure-function analysis of Hmo1 unveils an ancestral organization of HMG-Box factors involved in ribosomal DNA transcription from yeast to human. *Nucleic Acids Res.* *41*, 10135–10149.
- Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupard, M.A., and Nasmyth, K. (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* *105*, 459–472.
- Alipour, E., and Marko, J.F. (2012). Self-organization of domain structures by DNA-loop-extruding enzymes. *Nucleic Acids Res.* *40*, 11202–11212.
- Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C., and Aviles, F.X. (1980). The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* *288*, 675–679.
- Alomer, R.M., da Silva, E.M.L., Chen, J., Piekarz, K.M., McDonald, K., Sansam, C.G., Sansam, C.L., and Rankin, S. (2017). Esco1 and Esco2 regulate distinct cohesin functions during cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *114*, 9906–9911.
- Andrulis, E.D., Neiman, A.M., Zappulla, D.C., and Sternglanz, R. (1998). Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* *394*, 592–595.
- Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C.H., Mechtler, K., and Nasmyth, K. (2003). ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr. Biol.* *13*, 1941–1953.
- Ault, J.G., and Nicklas, R.B. (1989). Tension, microtubule rearrangements, and the proper distribution of chromosomes in mitosis. *Chromosoma* *98*, 33–39.
- Bachelier-Bassi, S., Gadal, O., Bourout, G., and Nehrbass, U. (2008). Cell cycle-dependent kinetochore localization of condensin complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Struct. Biol.* *162*, 248–259.

- Bajpai, G., Jain, I., Inamdar, M.M., Das, D., and Padinhateeri, R. (2017). Binding of DNA-bending non-histone proteins destabilizes regular 30-nm chromatin structure. *PLoS Comput. Biol.* *13*, e1005365.
- Bancaud, A., Gadal, O., and Bystricky, K. (2017). Capturing chromosome structural properties from their spatial and temporal fluctuations. In *Epigenetics and Systems Biology*, (Elsevier), pp. 239–263.
- Barbi, M., Mozziconacci, J., Victor, J.-M., Wong, H., and Lavelle, C. (2012). On the topology of chromatin fibres. *Interface Focus* *2*, 546–554.
- Bardwell, L., Cook, J.G., Inouye, C.J., and Thorner, J. (1994). Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Biol.* *166*, 363–379.
- Bates, D.L., and Thomas, J.O. (1981). Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome? *Nucleic Acids Res.* *9*, 5883–5894.
- Bausch, C., Noone, S., Henry, J.M., Gaudenz, K., Sanderson, B., Seidel, C., and Gerton, J.L. (2007). Transcription alters chromosomal locations of cohesin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *27*, 8522–8532.
- Baxter, J., Sen, N., Martínez, V.L., De Carandini, M.E.M., Schwartzman, J.B., Diffley, J.F.X., and Aragón, L. (2011). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* *331*, 1328–1332.
- Beagrie, R.A., Scialdone, A., Schueler, M., Kraemer, D.C.A., Chotalia, M., Xie, S.Q., Barbieri, M., de Santiago, I., Lavitas, L.-M., Branco, M.R., et al. (2017). Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping. *Nature* *543*, 519–524.
- Beckouet, F., Labarre-Mariotte, S., Albert, B., Imazawa, Y., Werner, M., Gadal, O., Nogi, Y., and Thuriaux, P. (2008). Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription. *Mol. Cell Biol.* *28*, 1596–1605.
- Beckouët, F., Hu, B., Roig, M.B., Sutani, T., Komata, M., Uluocak, P., Katis, V.L., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2010). An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion. *Mol. Cell* *39*, 689–699.
- Beckouët, F., Srinivasan, M., Roig, M.B., Chan, K.-L., Scheinost, J.C., Batty, P., Hu, B., Petela, N., Gligoris, T., Smith, A.C., et al. (2016). Releasing activity disengages cohesin's smc3/scc1 interface in a process blocked by acetylation. *Mol. Cell* *61*, 563–574.
- Bednar, J., Garcia-Saez, I., Boopathi, R., Cutter, A.R., Papai, G., Reymer, A., Syed, S.H., Lone, I.N., Tonchev, O., Crucifix, C., et al. (2017). Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Mol. Cell* *66*, 384–397.e8.
- Belagal, P., Normand, C., Shukla, A., Wang, R., Léger-Silvestre, I., Dez, C., Bhargava, P., and Gadal, O. (2016). Decoding the principles underlying the frequency of association with nucleoli for RNA polymerase III-transcribed genes in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* *27*, 3164–3177.
- Belaghal, H., Dekker, J., and Gibcus, J.H. (2017). Hi-C 2.0: An optimized Hi-C procedure for high-resolution genome-wide mapping of chromosome conformation. *Methods* *123*, 56–65.
- Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 333–374.
- Benedetti, F., Racko, D., Dorier, J., Burnier, Y., and Stasiak, A. (2017). Transcription-induced supercoiling explains formation of self-interacting chromatin domains in *S. pombe*. *Nucleic Acids Res.* *45*, 9850–9859.
- Bernard, P., Schmidt, C.K., Vaur, S., Dheur, S., Drogat, J., Genier, S., Ekwall, K., Uhlmann, F., and Javerzat, J.-P. (2008). Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes. *EMBO J.* *27*, 111–121.

- Bersaglieri, C., and Santoro, R. (2019). Genome Organization in and around the Nucleolus. *Cells* 8.
- Beuzer, P., Quivy, J.-P., and Almouzni, G. (2014). Establishment of a replication fork barrier following induction of DNA binding in mammalian cells. *Cell Cycle* 13, 1607–1616.
- Biggins, S. (2013). The composition, functions, and regulation of the budding yeast kinetochore. *Genetics* 194, 817–846.
- Bintu, B., Mateo, L.J., Su, J.-H., Sinnott-Armstrong, N.A., Parker, M., Kinrot, S., Yamaya, K., Boettiger, A.N., and Zhuang, X. (2018). Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science* 362.
- Blobel, G. (1985). Gene gating: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8527–8529.
- Bloom, K.S., and Carbon, J. (1982). Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes. *Cell* 29, 305–317.
- Bloom, M.S., Koshland, D., and Guacci, V. (2018). Cohesin Function in Cohesion, Condensation, and DNA Repair Is Regulated by Wpl1p via a Common Mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 208, 111–124.
- Bloomfield, V.A. (1996). DNA condensation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 334–341.
- Boettcher, B., and Barral, Y. (2013). The cell biology of open and closed mitosis. *Nucleus* 4, 160–165.
- Boettiger, A.N., Bintu, B., Moffitt, J.R., Wang, S., Believeau, B.J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Mirny, L.A., Wu, C., and Zhuang, X. (2016). Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. *Nature* 529, 418–422.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., et al. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* 3, e157.
- Bonev, B., Mendelson Cohen, N., Szabo, Q., Fritsch, L., Papadopoulos, G.L., Lubling, Y., Xu, X., Lv, X., Hugnot, J.-P., Tanay, A., et al. (2017). Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell* 171, 557–572.e24.
- Borges, V., Lehane, C., Lopez-Serra, L., Flynn, H., Skehel, M., Rolef Ben-Shahar, T., and Uhlmann, F. (2010). Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle. *Mol. Cell* 39, 677–688.
- Bose, T., Lee, K.K., Lu, S., Xu, B., Harris, B., Slaughter, B., Unruh, J., Garrett, A., McDowell, W., Box, A., et al. (2012). Cohesin proteins promote ribosomal RNA production and protein translation in yeast and human cells. *PLoS Genet.* 8, e1002749.
- Boveri, T. (1909). Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* 3, 181–268.
- Branco, M.R., and Pombo, A. (2006). Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol.* 4, e138.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M., and Broach, J.R. (1996). Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4349–4356.
- Breeden, L.L. (1997). Alpha-factor synchronization of budding yeast. *Meth. Enzymol.* 283, 332–341.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* 55, 637–643.
- Brinkley, B.R., Zinkowski, R.P., Mollon, W.L., Davis, F.M., Pisegna, M.A., Pershouse, M., and Rao, P.N. (1988). Movement and segregation of kinetochores experimentally detached from mammalian chromosomes. *Nature* 336, 251–254.
- Burgess, S.M., Kleckner, N., and Weiner, B.M. (1999). Somatic pairing of homologs in budding yeast: existence and modulation. *Genes Dev.* 13, 1627–1641.
- Burkhardt, S., Borsos, M., Szydlowska, A., Godwin, J., Williams, S.A., Cohen, P.E., Hirota, T., Saitou, M., and Tachibana-Konwalski, K. (2016). Chromosome cohesion established by REC8-cohesin in

- fetal oocytes is maintained without detectable turnover in oocytes arrested for months in mice. *Curr. Biol.* *26*, 678–685.
- Bürmann, F., Lee, B.-G., Than, T., Sinn, L., O'Reilly, F.J., Yatskevich, S., Rappsilber, J., Hu, B., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2019). A folded conformation of MukBEF and cohesin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *26*, 227–236.
- Buschbeck, M., and Hake, S.B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 299–314.
- Busslinger, G.A., Stocsits, R.R., van der Lelij, P., Axelsson, E., Tedeschi, A., Galjart, N., and Peters, J.-M. (2017). Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature* *544*, 503–507.
- Bustin, M. (1999). Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5237–5246.
- Byers, B., and Goetsch, L. (1974). Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *38*, 123–131.
- Bystricky, K., Heun, P., Gehlen, L., Langowski, J., and Gasser, S.M. (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.
- Bystricky, K., Laroche, T., van Houwe, G., Blaszczyk, M., and Gasser, S.M. (2005). Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. *J. Cell Biol.* *168*, 375–387.
- Cabal, G.G., Genovesio, A., Rodriguez-Navarro, S., Zimmer, C., Gadad, O., Lesne, A., Buc, H., Feuerbach-Fournier, F., Olivo-Marin, J.-C., Hurt, E.C., et al. (2006). SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* *441*, 770–773.
- Cai, S., Chen, C., Tan, Z.Y., Huang, Y., Shi, J., and Gan, L. (2018). Cryo-ET reveals the macromolecular reorganization of *S. pombe* mitotic chromosomes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *115*, 10977–10982.
- Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P.C., and Grewal, S.I.S. (2005). Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat. Genet.* *37*, 809–819.
- Cardozo Gizzi, A.M., Cattoni, D.I., Fiche, J.-B., Espinola, S.M., Gurgo, J., Messina, O., Houbron, C., Ogiyama, Y., Papadopoulos, G.L., Cavalli, G., et al. (2019). Microscopy-Based Chromosome Conformation Capture Enables Simultaneous Visualization of Genome Organization and Transcription in Intact Organisms. *Mol. Cell* *74*, 212–222.e5.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P.A. (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* *117*, 427–439.
- Castano, I.B., Brzoska, P.M., Sadoff, B.U., Chen, H., and Christman, M.F. (1996). Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in. *Genes Dev.* *10*, 2564–2576.
- Cattoni, D.I., Cardozo Gizzi, A.M., Georgieva, M., Di Stefano, M., Valeri, A., Chamousset, D., Houbron, C., Déjardin, S., Fiche, J.-B., González, I., et al. (2017). Single-cell absolute contact probability detection reveals chromosomes are organized by multiple low-frequency yet specific interactions. *Nat. Commun.* *8*, 1753.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Vigneron, A., Stanojcic, S., Ganier, O., Peiffer, I., Rivals, E., Puy, A., Laurent-Chabalier, S., Desprat, R., et al. (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res.* *21*, 1438–1449.

- Cayrou, C., Coulombe, P., Puy, A., Rialle, S., Kaplan, N., Segal, E., and Méchali, M. (2012). New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle* *11*, 658–667.
- Chan, K.-L., Roig, M.B., Hu, B., Beckouët, F., Metson, J., and Nasmyth, K. (2012). Cohesin's DNA exit gate is distinct from its entrance gate and is regulated by acetylation. *Cell* *150*, 961–974.
- Chan, K.-L., Gligoris, T., Upcher, W., Kato, Y., Shirahige, K., Nasmyth, K., and Beckouët, F. (2013). Pds5 promotes and protects cohesin acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, 13020–13025.
- Chao, W.C.H., Murayama, Y., Muñoz, S., Costa, A., Uhlmann, F., and Singleton, M.R. (2015). Structural Studies Reveal the Functional Modularity of the Scc2-Scc4 Cohesin Loader. *Cell Rep.* *12*, 719–725.
- Chao, W.C.H., Wade, B.O., Bouchoux, C., Jones, A.W., Purkiss, A.G., Federico, S., O'Reilly, N., Snijders, A.P., Uhlmann, F., and Singleton, M.R. (2017). Structural Basis of Eco1-Mediated Cohesin Acetylation. *Sci. Rep.* *7*, 44313.
- Chapard, C., Jones, R., van Oepen, T., Scheinost, J.C., and Nasmyth, K. (2019). Sister DNA Entrapment between Juxtaposed Smc Heads and Kleisin of the Cohesin Complex. *Mol. Cell*.
- Charbin, A., Bouchoux, C., and Uhlmann, F. (2014). Condensin aids sister chromatid decatenation by topoisomerase II. *Nucleic Acids Res.* *42*, 340–348.
- Chargaff, E. (1950). Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* *6*, 201–209.
- Chatterjee, A., Zakian, S., Hu, X.-W., and Singleton, M.R. (2013). Structural insights into the regulation of cohesion establishment by Wpl1. *EMBO J.* *32*, 677–687.
- Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 33–46.
- Chen, C., Lim, H.H., Shi, J., Tamura, S., Maeshima, K., Surana, U., and Gan, L. (2016). Budding yeast chromatin is dispersed in a crowded nucleoplasm in vivo. *Mol. Biol. Cell* *27*, 3357–3368.
- 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.
- Choi, H.J., Fukui, M., and Zhu, B.T. (2011). Role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the development of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with nocodazole. *PLoS One* *6*, e24312.
- Choudhury, M., Zaman, S., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M., and Bastia, D. (2015). Mechanism of regulation of “chromosome kissing” induced by Fob1 and its physiological significance. *Genes Dev.* *29*, 1188–1201.
- Cioci, F., Vu, L., Eliason, K., Oakes, M., Siddiqi, I.N., and Nomura, M. (2003). Silencing in yeast rDNA chromatin: reciprocal relationship in gene expression between RNA polymerase I and II. *Mol. Cell* *12*, 135–145.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* *93*, 1067–1076.
- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., Shevchenko, A., and Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol. Cell* *5*, 243–254.
- Clemente-Blanco, A., Mayán-Santos, M., Schneider, D.A., Machín, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., and Aragón, L. (2009). Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* *458*, 219–222.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., and Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase

- inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* *10*, 3081–3093.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T., and Sogo, J.M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* *57*, 753–761.
- Cornforth, M.N., Greulich-Bode, K.M., Loucas, B.D., Arsuaga, J., Vázquez, M., Sachs, R.K., Brückner, M., Molls, M., Hahnfeldt, P., Hlatky, L., et al. (2002). Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells. *J. Cell Biol.* *159*, 237–244.
- Cournac, A., Marie-Nelly, H., Marbouty, M., Koszul, R., and Mozziconacci, J. (2012). Normalization of a chromosomal contact map. *BMC Genomics* *13*, 436.
- Cournac, A., Koszul, R., and Mozziconacci, J. (2016). The 3D folding of metazoan genomes correlates with the association of similar repetitive elements. *Nucleic Acids Res.* *44*, 245–255.
- Crane, E., Bian, Q., McCord, R.P., Lajoie, B.R., Wheeler, B.S., Ralston, E.J., Uzawa, S., Dekker, J., and Meyer, B.J. (2015). Condensin-driven remodelling of X chromosome topology during dosage compensation. *Nature* *523*, 240–244.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a003889.
- Cremer, M., Grasser, F., Lanctôt, C., Müller, S., Neusser, M., Zinner, R., Solovei, I., and Cremer, T. (2008). Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods Mol. Biol.* *463*, 205–239.
- Cremer, T., Cremer, C., Baumann, H., Luedtke, E.K., Sperling, K., Teuber, V., and Zorn, C. (1982). Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum. Genet.* *60*, 46–56.
- Cremer, T., Baumann, H., Nakanishi, K., and Cremer, C. (1984). Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-uv-microbeam experiments. In *Chromosomes Today*, M.D. Bennett, A. Gropp, and U. Wolf, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 203–212.
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* *145*, 1119–1131.
- Culotti, J., and Hartwell, L.H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. 3. Seven genes controlling nuclear division. *Exp. Cell Res.* *67*, 389–401.
- Dahm, R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum. Genet.* *122*, 565–581.
- D'Ambrosio, C., Kelly, G., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008a). Condensin-dependent rDNA decatenation introduces a temporal pattern to chromosome segregation. *Curr. Biol.* *18*, 1084–1089.
- D'Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008b). Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* *22*, 2215–2227.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *319*, 1097–1113.
- Davidson, I.F., Goetz, D., Zaczek, M.P., Molodtsov, M.I., Huis In 't Veld, P.J., Weissmann, F., Litos, G., Cisneros, D.A., Ocampo-Hafalla, M., Ladurner, R., et al. (2016). Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA. *EMBO J.* *35*, 2671–2685.
- Dekker, J. (2008). Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional variation in compaction. *J. Biol. Chem.* *283*, 34532–34540.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., and Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation.

- Science 295, 1306–1311.
- DeLange, R.J., and Smith, E.L. (1971). Histones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 279–314.
- Dennis, P.B., Fumagalli, S., and Thomas, G. (1999). Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 49–54.
- Dewar, H., Tanaka, K., Nasmyth, K., and Tanaka, T.U. (2004). Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature* 428, 93–97.
- Diebold-Durand, M.-L., Lee, H., Ruiz Avila, L.B., Noh, H., Shin, H.-C., Im, H., Bock, F.P., Bürmann, F., Durand, A., Basfeld, A., et al. (2017). Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Mol. Cell* 67, 334–347.e5.
- Dieppo, G., and Stutz, F. (2010). Connecting the transcription site to the nuclear pore: a multi-tether process that regulates gene expression. *J. Cell Sci.* 123, 1989–1999.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380.
- Dorsett, D. (2019). The many roles of cohesin in drosophila gene transcription. *Trends Genet.*
- Dostie, J., Richmond, T.A., Arnaout, R.A., Selzer, R.R., Lee, W.L., Honan, T.A., Rubio, E.D., Krumm, A., Lamb, J., Nusbaum, C., et al. (2006). Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res.* 16, 1299–1309.
- Doughty, T.W., Arsenault, H.E., and Benanti, J.A. (2016). Levels of Ycg1 Limit Condensin Function during the Cell Cycle. *PLoS Genet.* 12, e1006216.
- Downs, J.A., Kosmidou, E., Morgan, A., and Jackson, S.P. (2003). Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone. *Mol. Cell* 11, 1685–1692.
- Drygin, D., Rice, W.G., and Grummt, I. (2010). The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 131–156.
- Du, Z., Zheng, H., Huang, B., Ma, R., Wu, J., Zhang, X., He, J., Xiang, Y., Wang, Q., Li, Y., et al. (2017). Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development. *Nature* 547, 232–235.
- Duan, Z., Andronescu, M., Schutz, K., McIlwain, S., Kim, Y.J., Lee, C., Shendure, J., Fields, S., Blau, C.A., and Noble, W.S. (2010). A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature* 465, 363–367.
- Earnshaw, W.C., and Laemmli, U.K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 96, 84–93.
- Earnshaw, W.C., Halligan, B., Cooke, C.A., Heck, M.M., and Liu, L.F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 100, 1706–1715.
- Eckert, C.A., Gravidahl, D.J., and Megee, P.C. (2007). The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubule-based tension. *Genes Dev.* 21, 278–291.
- Elbatsh, A.M.O., Haarhuis, J.H.I., Petela, N., Chapard, C., Fish, A., Celie, P.H., Stadnik, M., Ristic, D., Wyman, C., Medema, R.H., et al. (2016). Cohesin Releases DNA through Asymmetric ATPase-Driven Ring Opening. *Mol. Cell* 61, 575–588.
- Eltsov, M., Maclellan, K.M., Maeshima, K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J. (2008). Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 19732–19737.
- Eser, U., Chandler-Brown, D., Ay, F., Straight, A.F., Duan, Z., Noble, W.S., and Skotheim, J.M. (2017). Form and function of topologically associating genomic domains in budding yeast. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA *114*, E3061–E3070.
- Ethier, S.D., Miura, H., and Dostie, J. (2012). Discovering genome regulation with 3C and 3C-related technologies. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 401–410.
- Falk, M., Feodorova, Y., Naumova, N., Imakaev, M., Lajoie, B.R., Leonhardt, H., Joffe, B., Dekker, J., Fudenberg, G., Solovei, I., et al. (2019). Heterochromatin drives compartmentalization of inverted and conventional nuclei. *Nature*.
- Fang, K., Chen, X., Li, X., Shen, Y., Sun, J., Czajkowsky, D.M., and Shao, Z. (2018). Super-resolution Imaging of Individual Human Subchromosomal Regions in Situ Reveals Nanoscopic Building Blocks of Higher-Order Structure. *ACS Nano* *12*, 4909–4918.
- Farcas, A.-M., Uluocak, P., Helmhart, W., and Nasmyth, K. (2011). Cohesin's concatenation of sister DNAs maintains their intertwining. *Mol. Cell* *44*, 97–107.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., and Brangwynne, C.P. (2016). Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell* *165*, 1686–1697.
- Feuerbach, F., Galy, V., Trelles-Sticken, E., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Gilson, E., Olivo-Marin, J.-C., Scherthan, H., and Nehrass, U. (2002). Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat. Cell Biol.* *4*, 214–221.
- Filion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., et al. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* *143*, 212–224.
- Finch, J.T., and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *73*, 1897–1901.
- Flavahan, W.A., Drier, Y., Liao, B.B., Gillespie, S.M., Venteicher, A.S., Stemmer-Rachamimov, A.O., Suvà, M.L., and Bernstein, B.E. (2016). Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature* *529*, 110–114.
- Flemming, W. (1879). Ueber das Verhalten des Kerns bei der Zelltheilung, und über die Bedeutung mehrkerniger Zellen. *Archiv f. Pathol. Anat.* *77*, 1–29.
- Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung.
- Flyamer, I.M., Gassler, J., Imakaev, M., Brandão, H.B., Ulianov, S.V., Abdennur, N., Razin, S.V., Mirny, L.A., and Tachibana-Konwalski, K. (2017). Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. *Nature* *544*, 110–114.
- Foe, V.E., and Alberts, B.M. (1985). Reversible chromosome condensation induced in *Drosophila* embryos by anoxia: visualization of interphase nuclear organization. *J. Cell Biol.* *100*, 1623–1636.
- Franke, M., Ibrahim, D.M., Andrey, G., Schwarzer, W., Heinrich, V., Schöpflin, R., Kraft, K., Kempfer, R., Jerković, I., Chan, W.-L., et al. (2016). Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature* *538*, 265–269.
- Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000). The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J. Cell Biol.* *149*, 811–824.
- Freidkin, I., and Katcoff, D.J. (2001). Specific distribution of the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone homolog HHO1p in the chromatin. *Nucleic Acids Res.* *29*, 4043–4051.
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L.A. (2016). Formation of chromosomal domains by loop extrusion. *Cell Rep.* *15*, 2038–2049.
- Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S., and Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J. Cell Biol.* *121*, 961–976.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* *381*, 438–441.
- Furuyama, S., and Biggins, S. (2007). Centromere identity is specified by a single centromeric

- nucleosome in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 14706–14711.
- Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., Ellis, J., and Bazett-Jones, D.P. (2012). Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO Rep.* *13*, 992–996.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., and Thuriaux, P. (2002). Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.* *21*, 5498–5507.
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., and Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* *360*, 102–105.
- Gard, S., Light, W., Xiong, B., Bose, T., McNairn, A.J., Harris, B., Fleharty, B., Seidel, C., Brickner, J.H., and Gerton, J.L. (2009). Cohesinopathy mutations disrupt the subnuclear organization of chromatin. *J. Cell Biol.* *187*, 455–462.
- Gassler, J., Brandão, H.B., Imakaev, M., Flyamer, I.M., Ladstätter, S., Bickmore, W.A., Peters, J.-M., Mirny, L.A., and Tachibana, K. (2017). A mechanism of cohesin-dependent loop extrusion organizes zygotic genome architecture. *EMBO J.* *36*, 3600–3618.
- Gerlich, D., Koch, B., Dupeux, F., Peters, J.-M., and Ellenberg, J. (2006a). Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr. Biol.* *16*, 1571–1578.
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J.-M., and Ellenberg, J. (2006b). Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. *Curr. Biol.* *16*, 333–344.
- Germier, T., Kocanova, S., Walther, N., Bancaud, A., Shaban, H.A., Sellou, H., Politi, A.Z., Ellenberg, J., Gallardo, F., and Bystricky, K. (2017). Real-Time Imaging of a Single Gene Reveals Transcription-Initiated Local Confinement. *Biophys. J.* *113*, 1383–1394.
- Germier, T., Sylvain, A., Silvia, K., David, L., and Kerstin, B. (2018). Real-time imaging of specific genomic loci in eukaryotic cells using the ANCHOR DNA labelling system. *Methods* *142*, 16–23.
- Ghosh, A., and Bansal, M. (2003). A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallogr. Sect. D, Biol. Crystallogr.* *59*, 620–626.
- Gibcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M.T., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* *359*.
- Giga-Hama, Y., and Kumagai, H. (1997). Foreign Gene Expression in Fission Yeast: *Schizosaccharomyces pombe*.
- Gligoris, T.G., Scheinost, J.C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K.-L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2014). Closing the cohesin ring: structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science* *346*, 963–967.
- Glynn, E.F., Megee, P.C., Yu, H.-G., Mistrot, C., Unal, E., Koshland, D.E., DeRisi, J.L., and Gerton, J.L. (2004). Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol.* *2*, E259.
- Godde, J.S., and Widom, J. (1992). Chromatin structure of *Schizosaccharomyces pombe*. A nucleosome repeat length that is shorter than the chromatosomal DNA length. *J. Mol. Biol.* *226*, 1009–1025.
- Goloborodko, A., Marko, J.F., and Mirny, L.A. (2016b). Chromosome compaction by active loop extrusion. *Biophys. J.* *110*, 2162–2168.
- Goloborodko, A., Imakaev, M.V., Marko, J.F., and Mirny, L. (2016a). Compaction and segregation of sister chromatids via active loop extrusion. *Elife* *5*.
- Goodwin, G.H., Sanders, C., and Johns, E.W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* *38*, 14–19.
- Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H., and Gasser, S.M. (1996). The

- clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *134*, 1349–1363.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* *63*, 751–762.
- Griesenbeck, J., Tschochner, H., and Grohmann, D. (2017). Structure and function of RNA polymerases and the transcription machineries. *Subcell. Biochem.* *83*, 225–270.
- Gruber, S., Haering, C.H., and Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* *112*, 765–777.
- Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2006). Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell* *127*, 523–537.
- Grunstein, M., and Gasser, S.M. (2013). Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Guacci, V., and Koshland, D. (2012). Cohesin-independent segregation of sister chromatids in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* *23*, 729–739.
- Guacci, V., Hogan, E., and Koshland, D. (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J. Cell Biol.* *125*, 517–530.
- Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* *91*, 47–57.
- Guacci, V., Stricklin, J., Bloom, M.S., Guō, X., Bhattar, M., and Koshland, D. (2015). A novel mechanism for the establishment of sister chromatid cohesion by the ECO1 acetyltransferase. *Mol. Biol. Cell* *26*, 117–133.
- Guacci, V., Chatterjee, F., Robison, B., and Koshland, D.E. (2019). Communication between distinct subunit interfaces of the cohesin complex promotes its topological entrapment of DNA. *Elife* *8*.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., et al. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* *453*, 948–951.
- Guo, Y., Xu, Q., Canzio, D., Shou, J., Li, J., Gorkin, D.U., Jung, I., Wu, H., Zhai, Y., Tang, Y., et al. (2015). CRISPR inversion of CTCF sites alters genome topology and enhancer/promoter function. *Cell* *162*, 900–910.
- Ha, S.C., Lowenhaupt, K., Rich, A., Kim, Y.-G., and Kim, K.K. (2005). Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases. *Nature* *437*, 1183–1186.
- Haarhuis, J.H.I., van der Weide, R.H., Blomen, V.A., Yáñez-Cuna, J.O., Amendola, M., van Ruiten, M.S., Krijger, P.H.L., Teunissen, H., Medema, R.H., van Steensel, B., et al. (2017). The cohesin release factor WAPL restricts chromatin loop extension. *Cell* *169*, 693–707.e14.
- Haering, C.H., Löwe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* *9*, 773–788.
- Haering, C.H., Schoffnegger, D., Nishino, T., Helmhart, W., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2004). Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol. Cell* *15*, 951–964.
- Haering, C.H., Farcas, A.-M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* *454*, 297–301.
- Haeusler, R.A., and Engelke, D.R. (2006). Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4826–4836.
- Hall, D.B., Wade, J.T., and Struhl, K. (2006). An HMG protein, Hmo1, associates with Promoters of many ribosomal protein genes and throughout rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *26*, 3672–3679.

- Hamperl, S., Wittner, M., Babl, V., Perez-Fernandez, J., Tschochner, H., and Griesenbeck, J. (2013). Chromatin states at ribosomal DNA loci. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 405–417.
- Hanna, J.S., Kroll, E.S., Lundblad, V., and Spencer, F.A. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3144–3158.
- Hannig, K., Babl, V., Hergert, K., Maier, A., Pilsl, M., Schächner, C., Stöckl, U., Milkereit, P., Tschochner, H., Seufert, W., et al. (2019). The C-terminal region of Net1 is an activator of RNA polymerase I transcription with conserved features from yeast to human. *PLoS Genet.* 15, e1008006.
- Hansen, J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 361–392.
- Hansen, A.S., Pustova, I., Cattoglio, C., Tjian, R., and Darzacq, X. (2017). CTCF and cohesin regulate chromatin loop stability with distinct dynamics. *Elife* 6.
- Hansen, A.S., Cattoglio, C., Darzacq, X., and Tjian, R. (2018). Recent evidence that TADs and chromatin loops are dynamic structures. *Nucleus* 9, 20–32.
- Hansen, J.C., Tse, C., and Wolffe, A.P. (1998). Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37, 17637–17641.
- Harashima, H., Dismeyer, N., and Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 23, 345–356.
- Harris, B., Bose, T., Lee, K.K., Wang, F., Lu, S., Ross, R.T., Zhang, Y., French, S.L., Beyer, A.L., Slaughter, B.D., et al. (2014). Cohesion promotes nucleolar structure and function. *Mol. Biol. Cell* 25, 337–346.
- Hartman, T., Stead, K., Koshland, D., and Guacci, V. (2000). Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 151, 613–626.
- Hartwell, L.H. (1971a). Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation. *J. Mol. Biol.* 59, 183–194.
- Hartwell, L.H. (1971b). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* 69, 265–276.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629–634.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., and Reid, B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 352–359.
- Hartwell, L.H., Mortimer, R.K., Culotti, J., and Culotti, M. (1973). Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants. *Genetics* 74, 267–286.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46–51.
- Hassler, M., Shaltiel, I.A., and Haering, C.H. (2018). Towards a unified model of SMC complex function. *Curr. Biol.* 28, R1266–R1281.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C.M., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 3, e69.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583–592.
- Heidinger-Pauli, J.M., Unal, E., and Koshland, D. (2009). Distinct targets of the Eco1 acetyltransferase modulate cohesion in S phase and in response to DNA damage. *Mol. Cell* 34, 311–321.
- Heidinger-Pauli, J.M., Mert, O., Davenport, C., Guacci, V., and Koshland, D. (2010). Systematic

- reduction of cohesin differentially affects chromosome segregation, condensation, and DNA repair. *Curr. Biol.* *20*, 957–963.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* *253*, 905–909.
- Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb. Wiss. Botanik* *762–818*.
- Henderson, A.S., Warburton, D., and Atwood, K.C. (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *69*, 3394–3398.
- Hergeth, S.P., and Schneider, R. (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep.* *16*, 1439–1453.
- Heride, C., Ricoul, M., Kiêu, K., von Hase, J., Guillemot, V., Cremer, C., Dubrana, K., and Sabatier, L. (2010). Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints. *J. Cell Sci.* *123*, 4063–4075.
- Hershey, A.D., and Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* *36*, 39–56.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* *52*, 536–553.
- Hinshaw, S.M., Makrantonis, V., Kerr, A., Marston, A.L., and Harrison, S.C. (2015). Structural evidence for Scc4-dependent localization of cohesin loading. *Elife* *4*, e06057.
- Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., and Jaffé, A. (1989). Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* *171*, 1496–1505.
- Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* *120*, 601–612.
- Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* *79*, 449–458.
- Hirano, T., Kobayashi, R., and Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* *89*, 511–521.
- Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* *117*, 6435–6445.
- Hochstrasser, M., Mathog, D., Gruenbaum, Y., Saumweber, H., and Sedat, J.W. (1986). Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* *102*, 112–123.
- Horowitz, H., Thorburn, P., and Haber, J.E. (1984). Rearrangements of highly polymorphic regions near telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *4*, 2509–2517.
- Horowitz, R.A., Agard, D.A., Sedat, J.W., and Woodcock, C.L. (1994). The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J. Cell Biol.* *125*, 1–10.
- Hou, F., and Zou, H. (2005). Two human orthologues of *Eco1/Ctf7* acetyltransferases are both required for proper sister-chromatid cohesion. *Mol. Biol. Cell* *16*, 3908–3918.
- Hou, C., Li, L., Qin, Z.S., and Corces, V.G. (2012). Gene density, transcription, and insulators contribute to the partition of the *Drosophila* genome into physical domains. *Mol. Cell* *48*, 471–484.
- Howard, A., Pelc, S. R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity Suppl.* *6*, 261–273.
- Hsieh, T.-H.S., Weiner, A., Lajoie, B., Dekker, J., Friedman, N., and Rando, O.J. (2015). Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C. *Cell* *162*, 108–119.

- Hsieh, T.-H.S., Fudenberg, G., Goloborodko, A., and Rando, O.J. (2016). Micro-C XL: assaying chromosome conformation from the nucleosome to the entire genome. *Nat. Methods* *13*, 1009–1011.
- Hu, B., Itoh, T., Mishra, A., Katoh, Y., Chan, K.-L., Upcher, W., Godlee, C., Roig, M.B., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2011). ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. *Curr. Biol.* *21*, 12–24.
- Hu, B., Petela, N., Kurze, A., Chan, K.-L., Chapard, C., and Nasmyth, K. (2015). Biological chromodynamics: a general method for measuring protein occupancy across the genome by calibrating ChIP-seq. *Nucleic Acids Res.* *43*, e132.
- Huang, J., and Moazed, D. (2003). Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes Dev.* *17*, 2162–2176.
- Huber, D., Voith von Voithenberg, L., and Kaigala, G.V. (2018). Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH? *Micro and Nano Engineering* *1*, 15–24.
- Hughes, J.R., Roberts, N., McGowan, S., Hay, D., Giannoulatou, E., Lynch, M., De Gobbi, M., Taylor, S., Gibbons, R., and Higgs, D.R. (2014). Analysis of hundreds of cis-regulatory landscapes at high resolution in a single, high-throughput experiment. *Nat. Genet.* *46*, 205–212.
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., and Kobayashi, T. (2010). Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science* *327*, 693–696.
- Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C., and Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* *81*, 269–278.
- Ivanov, D., and Nasmyth, K. (2005). A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* *122*, 849–860.
- Ivanov, D., Schleiffer, A., Eisenhaber, F., Mechtler, K., Haering, C.H., and Nasmyth, K. (2002). Eco1 is a novel acetyltransferase that can acetylate proteins involved in cohesion. *Curr. Biol.* *12*, 323–328.
- Ivanov, M.P., Ladurner, R., Poser, I., Beveridge, R., Rampler, E., Hudecz, O., Novatchkova, M., Hériché, J.-K., Wutz, G., van der Lelij, P., et al. (2018). The replicative helicase MCM recruits cohesin acetyltransferase ESCO2 to mediate centromeric sister chromatid cohesion. *EMBO J.* *37*.
- Iwasaki, O., Tanizawa, H., Kim, K.-D., Yokoyama, Y., Corcoran, C.J., Tanaka, A., Skordalakes, E., Showe, L.C., and Noma, K.-I. (2015). Interaction between TBP and Condensin Drives the Organization and Faithful Segregation of Mitotic Chromosomes. *Mol. Cell* *59*, 755–767.
- Jackman, J., and O'Connor, P.M. (2001). Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr. Protoc. Cell Biol.* *Chapter 8*, Unit 8.3.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., and Cook, P.R. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* *12*, 1059–1065.
- Jackson, J.B., Pollock, J.M., and Rill, R.L. (1979). Chromatin fractionation procedure that yields nucleosomes containing near-stoichiometric amounts of high mobility group nonhistone chromosomal proteins. *Biochemistry* *18*, 3739–3748.
- Jacobs, C.W., Adams, A.E., Szaniszló, P.J., and Pringle, J.R. (1988). Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* *107*, 1409–1426.
- Jansen, A., and Verstrepen, K.J. (2011). Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *75*, 301–320.
- Jin, Q., Trelles-Sticken, E., Scherthan, H., and Loidl, J. (1998). Yeast nuclei display prominent centromere clustering that is reduced in nondividing cells and in meiotic prophase. *J. Cell Biol.* *141*, 21–29.

- Jin, Q.W., Fuchs, J., and Loidl, J. (2000). Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 11)*, 1903–1912.
- Johzuka, K., and Horiuchi, T. (2009). The cis element and factors required for condensin recruitment to chromosomes. *Mol. Cell* *34*, 26–35.
- Jost, K.L., Bertulat, B., and Cardoso, M.C. (2012). Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? *Chromosoma* *121*, 555–563.
- Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., and Maeshima, K. (2012). Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus* *3*, 404–410.
- Joyce, E.F., Williams, B.R., Xie, T., and Wu, C.-T. (2012). Identification of genes that promote or antagonize somatic homolog pairing using a high-throughput FISH-based screen. *PLoS Genet.* *8*, e1002667.
- Kakui, Y., Rabinowitz, A., Barry, D.J., and Uhlmann, F. (2017). Condensin-mediated remodeling of the mitotic chromatin landscape in fission yeast. *Nat. Genet.* *49*, 1553–1557.
- Kamau, E., Bauerle, K.T., and Grove, A. (2004). The *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group box protein HMO1 contains two functional DNA binding domains. *J. Biol. Chem.* *279*, 55234–55240.
- Kanke, M., Tahara, E., Huis In't Veld, P.J., and Nishiyama, T. (2016). Cohesin acetylation and Wapl-Pds5 oppositely regulate translocation of cohesin along DNA. *EMBO J.* *35*, 2686–2698.
- Kawasumi, R., Abe, T., Arakawa, H., Garre, M., Hirota, K., and Branzei, D. (2017). ESCO1/2's roles in chromosome structure and interphase chromatin organization. *Genes Dev.* *31*, 2136–2150.
- Ke, Y., Xu, Y., Chen, X., Feng, S., Liu, Z., Sun, Y., Yao, X., Li, F., Zhu, W., Gao, L., et al. (2017). 3D Chromatin Structures of Mature Gametes and Structural Reprogramming during Mammalian Embryogenesis. *Cell* *170*, 367–381.e20.
- Kim, S.J., Fernandez-Martinez, J., Nudelman, I., Shi, Y., Zhang, W., Raveh, B., Herricks, T., Slaughter, B.D., Hogan, J.A., Upla, P., et al. (2018). Integrative structure and functional anatomy of a nuclear pore complex. *Nature* *555*, 475–482.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M.W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* *81*, 279–288.
- Kizilyaprak, C., Spehner, D., Devys, D., and Schultz, P. (2010). In vivo chromatin organization of mouse rod photoreceptors correlates with histone modifications. *PLoS One* *5*, e11039.
- Kobayashi, T. (2011). Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol. Life Sci.* *68*, 1395–1403.
- Kobayashi, T., and Horiuchi, T. (1996). A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* *1*, 465–474.
- Kobayashi, T., Hidaka, M., Nishizawa, M., and Horiuchi, T. (1992). Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *233*, 355–362.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M., and Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* *12*, 3821–3830.
- Kobayashi, T., Horiuchi, T., Tongaonkar, P., Vu, L., and Nomura, M. (2004). SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell* *117*, 441–453.
- Kocanova, S., Kerr, E.A., Rafique, S., Boyle, S., Katz, E., Caze-Subra, S., Bickmore, W.A., and Bystricky, K. (2010). Activation of estrogen-responsive genes does not require their nuclear co-localization. *PLoS Genet.* *6*, e1000922.

- Kolovos, P., van de Werken, H.J., Kepper, N., Zuin, J., Brouwer, R.W., Kockx, C.E., Wendt, K.S., van IJcken, W.F., Grosveld, F., and Knoch, T.A. (2014). Targeted Chromatin Capture (T2C): a novel high resolution high throughput method to detect genomic interactions and regulatory elements. *Epigenetics Chromatin* 7, 10.
- de Koning, A.P.J., Gu, W., Castoe, T.A., Batzer, M.A., and Pollock, D.D. (2011). Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet.* 7, e1002384.
- van Koningsbruggen, S., Gierlinski, M., Schofield, P., Martin, D., Barton, G.J., Ariyurek, Y., den Dunnen, J.T., and Lamond, A.I. (2010). High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol. Biol. Cell* 21, 3735–3748.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868–871.
- Kornberg, R.D., and Thomas, J.O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184, 865–868.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kozubek, S., Lukášová, E., Jirsová, P., Koutná, I., Kozubek, M., Ganová, A., Bártová, E., Falk, M., and Paseková, R. (2002). 3D Structure of the human genome: order in randomness. *Chromosoma* 111, 321–331.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127, 955–967.
- Kufel, J., Dichtl, B., and Tollervey, D. (1999). Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* 5, 909–917.
- Kurze, A., Michie, K.A., Dixon, S.E., Mishra, A., Itoh, T., Khalid, S., Strmecki, L., Shirahige, K., Haering, C.H., Löwe, J., et al. (2011). A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion. *EMBO J.* 30, 364–378.
- Lafontaine, D.L.J. (2015). Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 11–19.
- Lai, W.K.M., and Pugh, B.F. (2017). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 548–562.
- Laloraya, S., Guacci, V., and Koshland, D. (2000). Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J. Cell Biol.* 151, 1047–1056.
- Landsman, D. (1996). Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*: a double mystery solved? *Trends Biochem. Sci.* 21, 287–288.
- Langan, T.J., and Chou, R.C. (2011). Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods Mol. Biol.* 761, 75–83.
- Larionov, V.L., Karpova, T.S., Kouprina, N.Y., and Jouravleva, G.A. (1985). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with impaired maintenance of centromeric plasmids. *Curr. Genet.* 10, 15–20.
- Larson, A.G., Elnatan, D., Keenen, M.M., Trnka, M.J., Johnston, J.B., Burlingame, A.L., Agard, D.A., Redding, S., and Narlikar, G.J. (2017). Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* 547, 236–240.
- Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2002). In vivo dissection of the chromosome condensation machinery: reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *J. Cell Biol.* 156, 805–815.
- Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes Dev.* 18, 76–87.

- Lazar-Stefanita, L., Scolari, V.F., Mercy, G., Muller, H., Guérin, T.M., Thierry, A., Mozziconacci, J., and Koszul, R. (2017). Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. *EMBO J.* *36*, 2684–2697.
- Lee, B.-G., Roig, M.B., Jansma, M., Petela, N., Metson, J., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2016). Crystal Structure of the Cohesin Gatekeeper Pds5 and in Complex with Kleisin Scc1. *Cell Rep.* *14*, 2108–2115.
- Léger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., and Gas, N. (1999). Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* *108*, 103–113.
- van der Lelij, P., Godthelp, B.C., van Zon, W., van Gosliga, D., Oostra, A.B., Steltenpool, J., de Groot, J., Scheper, R.J., Wolthuis, R.M., Waisfisz, Q., et al. (2009). The cellular phenotype of Roberts syndrome fibroblasts as revealed by ectopic expression of ESCO2. *PLoS One* *4*, e6936.
- Lengronne, A., and Schwob, E. (2002). The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol. Cell* *9*, 1067–1078.
- Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G.P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2004). Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* *430*, 573–578.
- Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, K.-P., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2006). Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol. Cell* *23*, 787–799.
- Leonard, J., Sen, N., Torres, R., Sutani, T., Jarmuz, A., Shirahige, K., and Aragón, L. (2015). Condensin Relocalization from Centromeres to Chromosome Arms Promotes Top2 Recruitment during Anaphase. *Cell Rep.* *13*, 2336–2344.
- Levene, P.A. (1919). THE STRUCTURE OF YEAST NUCLEIC ACID IV. AMMONIA HYDROLYSIS. *J. Bio. Chem.*
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* *326*, 289–293.
- Linskens, M.H., and Huberman, J.A. (1988). Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 4927–4935.
- Liu, L.F., Liu, C.C., and Alberts, B.M. (1980). Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* *19*, 697–707.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). Overview of the Cell Cycle and Its Control.
- Lopez-Serra, L., Lengronne, A., Borges, V., Kelly, G., and Uhlmann, F. (2013). Budding yeast Wapl controls sister chromatid cohesion maintenance and chromosome condensation. *Curr. Biol.* *23*, 64–69.
- Lorenz, A., Fuchs, J., Trelles-Sticken, E., Scherthan, H., and Loidl, J. (2002). Spatial organisation and behaviour of the parental chromosome sets in the nuclei of *Saccharomyces cerevisiae* x *S. paradoxus* hybrids. *J. Cell Sci.* *115*, 3829–3835.
- Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* *12*, 1986–1997.
- Lu, J., Kobayashi, R., and Brill, S.J. (1996). Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. *J. Biol. Chem.* *271*, 33678–33685.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.
- Lupiáñez, D.G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili,

- H., Opitz, J.M., Laxova, R., et al. (2015). Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* *161*, 1012–1025.
- Luzhin, A.V., Flyamer, I.M., Khrameeva, E.E., Ulianov, S.V., Razin, S.V., and Gavrilov, A.A. (2019). Quantitative differences in TAD border strength underly the TAD hierarchy in *Drosophila* chromosomes. *J. Cell Biochem.* *120*, 4494–4503.
- Maeshima, K., Rogge, R., Tamura, S., Joti, Y., Hikima, T., Szerlong, H., Krause, C., Herman, J., Seidel, E., DeLuca, J., et al. (2016). Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers. *EMBO J.* *35*, 1115–1132.
- Maeshima, K., Ide, S., and Babokhov, M. (2019). Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber. *Curr. Opin. Cell Biol.* *58*, 95–104.
- Maison, C., and Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 296–304.
- Mangan, H., Gailín, M.Ó., and McStay, B. (2017). Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of nucleoli. *FEBS J.* *284*, 3977–3985.
- Manuelidis, L. (1985). Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum. Genet.* *71*, 288–293.
- Marahrens, Y., and Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* *255*, 817–823.
- Marbouty, M., Le Gall, A., Cattoni, D.I., Cournac, A., Koh, A., Fiche, J.-B., Mozziconacci, J., Murray, H., Koszul, R., and Nollmann, M. (2015). Condensin- and Replication-Mediated Bacterial Chromosome Folding and Origin Condensation Revealed by Hi-C and Super-resolution Imaging. *Mol. Cell* *59*, 588–602.
- Marnef, A., and Legube, G. (2017). Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road. *Curr. Opin. Cell Biol.* *46*, 1–8.
- Marsden, M.P., and Laemmli, U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* *17*, 849–858.
- Marzluff, W.F., and Duronio, R.J. (2002). Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 692–699.
- Mazia, D. (1961). Mitosis and the physiology of cell division. In *The Cell*, (Elsevier), pp. 77–412.
- Mc Intyre, J., Muller, E.G.D., Weitzer, S., Snyderman, B.E., Davis, T.N., and Uhlmann, F. (2007). In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *26*, 3783–3793.
- McDowall, A.W., Smith, J.M., and Dubochet, J. (1986). Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *EMBO J.* *5*, 1395–1402.
- McGuinness, B.E., Hirota, T., Kudo, N.R., Peters, J.-M., and Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* *3*, e86.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., and Erickson, H.P. (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J. Cell Biol.* *142*, 1595–1604.
- Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., and Smith, M.M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *94*, 607–613.
- Merkel, P., Perez-Fernandez, J., Pils, M., Reiter, A., Williams, L., Gerber, J., Böhm, M., Deutzmann, R., Griesenbeck, J., Milkereit, P., et al. (2014). Binding of the termination factor Nsi1 to its cognate DNA site is sufficient to terminate RNA polymerase I transcription in vitro and to induce termination in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 3817–3827.
- Merz, K., Hondele, M., Goetze, H., Gmelch, K., Stoeckl, U., and Griesenbeck, J. (2008). Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with

- the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes Dev.* *22*, 1190–1204.
- Meselson, M., and Stahl, F.W. (1958). The replication of dna in escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *44*, 671–682.
- Metz, C.W. (1916). Chromosome studies on the Diptera. II. The paired association of chromosomes in the Diptera, and its significance. *J. Exp. Zool.* *21*, 213–279.
- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* *91*, 35–45.
- Miescher-Rüsch, F. (1871). Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Med.-Chem. Unters.*, 4 441–460.
- Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* *164*, 955–957.
- Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., et al. (2015). Escol Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Escol2. *Curr. Biol.* *25*, 1694–1706.
- Minnen, A., Bürmann, F., Wilhelm, L., Anchimiuk, A., Diebold-Durand, M.-L., and Gruber, S. (2016). Control of Smc Coiled Coil Architecture by the ATPase Heads Facilitates Targeting to Chromosomal ParB/parS and Release onto Flanking DNA. *Cell Rep.* *14*, 2003–2016.
- Mishra, A., Hu, B., Kurze, A., Beckouët, F., Farcas, A.-M., Dixon, S.E., Katou, Y., Khalid, S., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2010). Both interaction surfaces within cohesin's hinge domain are essential for its stable chromosomal association. *Curr. Biol.* *20*, 279–289.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., and Brown, D.T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* *408*, 877–881.
- Mizuguchi, T., Fudenberg, G., Mehta, S., Belton, J.-M., Taneja, N., Folco, H.D., FitzGerald, P., Dekker, J., Mirny, L., Barrowman, J., et al. (2014). Cohesin-dependent globules and heterochromatin shape 3D genome architecture in *S. pombe*. *Nature* *516*, 432–435.
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2006). PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol. Cell* *23*, 723–732.
- Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*.
- Mostofa, M.G., Rahman, M.A., Koike, N., Yeasmin, A.M., Islam, N., Waliullah, T.M., Hosoyamada, S., Shimobayashi, M., Kobayashi, T., Hall, M.N., et al. (2018). CLIP and cohibin separate rDNA from nucleolar proteins destined for degradation by nucleophagy. *J. Cell Biol.* *217*, 2675–2690.
- Muller, H.J. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* *22*, 299–334.
- Muller, H., Scolari, V.F., Agier, N., Piazza, A., Thierry, A., Mercy, G., Descorps-Declere, S., Lazar-Stefanita, L., Espeli, O., Llorente, B., et al. (2018). Characterizing meiotic chromosomes' structure and pairing using a designer sequence optimized for Hi-C. *Mol. Syst. Biol.* *14*, e8293.
- Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature* *505*, 367–371.
- Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell* *163*, 1628–1640.
- Murugesapillai, D., McCauley, M.J., Huo, R., Nelson Holte, M.H., Stepanyants, A., Maher, L.J., Israeloff, N.E., and Williams, M.C. (2014). DNA bridging and looping by HMO1 provides a mechanism for stabilizing nucleosome-free chromatin. *Nucleic Acids Res.* *42*, 8996–9004.
- Nagano, T., Lubling, Y., Yaffe, E., Wingett, S.W., Dean, W., Tanay, A., and Fraser, P. (2015). Single-cell Hi-C for genome-wide detection of chromatin interactions that occur simultaneously in a single cell. *Nat. Protoc.* *10*, 1986–2003.
- Nagano, T., Lubling, Y., Várnai, C., Dudley, C., Leung, W., Baran, Y., Mendelson Cohen, N., Wingett, S., Fraser, P., and Tanay, A. (2017). Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-

- cell resolution. *Nature* 547, 61–67.
- Nakanishi, M., Shimada, M., and Niida, H. (2006). Genetic instability in cancer cells by impaired cell cycle checkpoints. *Cancer Sci.* 97, 984–989.
- Nakazawa, N., Nakamura, T., Kokubu, A., Ebe, M., Nagao, K., and Yanagida, M. (2008). Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis. *J. Cell Biol.* 180, 1115–1131.
- Nasmyth, K. (2001a). A prize for proliferation. *Cell* 107, 689–701.
- Nasmyth, K. (2001b). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 35, 673–745.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 595–648.
- Naumova, N., Imakaev, M., Fudenberg, G., Zhan, Y., Lajoie, B.R., Mirny, L.A., and Dekker, J. (2013). Organization of the mitotic chromosome. *Science* 342, 948–953.
- Németh, A., Conesa, A., Santoyo-Lopez, J., Medina, I., Montaner, D., Péterfia, B., Solovei, I., Cremer, T., Dopazo, J., and Längst, G. (2010). Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet.* 6, e1000889.
- Németh, A., Perez-Fernandez, J., Merkl, P., Hamperl, S., Gerber, J., Griesenbeck, J., and Tschöchner, H. (2013). RNA polymerase I termination: Where is the end? *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 306–317.
- Neurohr, G., Naegeli, A., Titos, I., Theler, D., Greber, B., Díez, J., Gabaldón, T., Mendoza, M., and Barral, Y. (2011). A midzone-based ruler adjusts chromosome compaction to anaphase spindle length. *Science* 332, 465–468.
- Nicklas, R.B. (1989). The motor for poleward chromosome movement in anaphase is in or near the kinetochore. *J. Cell Biol.* 109, 2245–2255.
- Nightingale, K., Dimitrov, S., Reeves, R., and Wolffe, A.P. (1996). Evidence for a shared structural role for HMG1 and linker histones B4 and H1 in organizing chromatin. *EMBO J.* 15, 548–561.
- Niki, H., Jaffé, A., Imamura, R., Ogura, T., and Hiraga, S. (1991). The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* 10, 183–193.
- Niki, H., Imamura, R., Kitaoka, M., Yamanaka, K., Ogura, T., and Hiraga, S. (1992). *E. coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *EMBO J.* 11, 5101–5109.
- Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., Hihara, S., Frangakis, A.S., Imamoto, N., Ishikawa, T., et al. (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31, 1644–1653.
- Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A.A., Mechtler, K., et al. (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* 143, 737–749.
- Noble, D., Kenna, M.A., Dix, M., Skibbens, R.V., Unal, E., and Guacci, V. (2006). Intersection between the regulators of sister chromatid cohesion establishment and maintenance in budding yeast indicates a multi-step mechanism. *Cell Cycle* 5, 2528–2536.
- Nora, E.P., Lajoie, B.R., Schulz, E.G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N.L., Meisig, J., Sedat, J., et al. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* 485, 381–385.
- Nora, E.P., Goloborodko, A., Valton, A.-L., Gibcus, J.H., Uebersohn, A., Abdennur, N., Dekker, J., Mirny, L.A., and Bruneau, B.G. (2017). Targeted Degradation of CTCF Decouples Local

- Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* 169, 930–944.e22.
- Nozaki, T., Imai, R., Tanbo, M., Nagashima, R., Tamura, S., Tani, T., Joti, Y., Tomita, M., Hibino, K., Kanemaki, M.T., et al. (2017). Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging. *Mol. Cell* 67, 282–293.e7.
- Nuebler, J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Abdennur, N., and Mirny, L.A. (2018). Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E6697–E6706.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 256, 547–551.
- Nurse, P., and Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 96, 627–637.
- Nurse, P., Thuriaux, P., and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 146, 167–178.
- Ocampo-Hafalla, M., Muñoz, S., Samora, C.P., and Uhlmann, F. (2016). Evidence for cohesin sliding along budding yeast chromosomes. *Open Biol* 6.
- Ohlsson, R., Renkawitz, R., and Lobanenkov, V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* 17, 520–527.
- Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330–332.
- Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 809–814.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* 115, 109–121.
- Ou, H.D., Phan, S., Deerinck, T.J., Thor, A., Ellisman, M.H., and O’Shea, C.C. (2017). ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281–300.
- Ouyang, Z., Zheng, G., Song, J., Borek, D.M., Otwinowski, Z., Brautigam, C.A., Tomchick, D.R., Rankin, S., and Yu, H. (2013). Structure of the human cohesin inhibitor Wapl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 11355–11360.
- Paldi, F., Alver, B., Robertson, D., Schalbetter, S.A., Kerr, A., Kelly, D.A., Neale, M.J., Baxter, J., and Marston, A.L. (2019). Convergent genes shape budding yeast pericentromeres. *BioRxiv*.
- Panizza, S., Tanaka, T., Hochwagen, A., Eisenhaber, F., and Nasmyth, K. (2000). Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr. Biol.* 10, 1557–1564.
- Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603–608.
- Parker, M.W., Botchan, M.R., and Berger, J.M. (2017). Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 52, 107–144.
- Pasteur, L. (1860). Expériences relatives aux générations spontanées.
- Patterson, H.G., Landel, C.C., Landsman, D., Peterson, C.L., and Simpson, R.T. (1998). The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 7268–7276.
- Paulson, J.R., and Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817–828.
- Pawelczak, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 72–75.
- Pederson, T. (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Peltonen, K., Colis, L., Liu, H., Trivedi, R., Moubarek, M.S., Moore, H.M., Bai, B., Rudek, M.A., Bieberich, C.J., and Laiho, M. (2014). A targeting modality for destruction of RNA polymerase I

- that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* 25, 77–90.
- Petela, N.J., Gligoris, T.G., Metson, J., Lee, B.-G., Voulgaris, M., Hu, B., Kikuchi, S., Chapard, C., Chen, W., Rajendra, E., et al. (2018). Scc2 Is a Potent Activator of Cohesin's ATPase that Promotes Loading by Binding Scc1 without Pds5. *Mol. Cell* 70, 1134–1148.e7.
- Phair, R.D., and Misteli, T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604–609.
- Pope, B.D., Ryba, T., Dileep, V., Yue, F., Wu, W., Denas, O., Vera, D.L., Wang, Y., Hansen, R.S., Canfield, T.K., et al. (2014). Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* 515, 402–405.
- Porter, K.R., Claude, A., and Fullam, E.F. (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy : methods and preliminary observations. *J. Exp. Med.* 81, 233–246.
- Potapova, T.A., and Gerton, J.L. (2019). Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. *Chromosome Res.* 27, 109–127.
- Powers, T., and Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 987–1000.
- Pray, L. (2008). Discovery of DNA Double Helix: Watson and Crick | Learn Science at Scitable. *Nature Education* 1(1):100.
- Quinodoz, S.A., Ollikainen, N., Tabak, B., Palla, A., Schmidt, J.M., Detmar, E., Lai, M.M., Shishkin, A.A., Bhat, P., Takei, Y., et al. (2018). Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. *Cell* 174, 744–757.e24.
- Rabl, C. (1885). Über Zelltheilung. *Morphol. Jahrbuch* 214–330.
- Racko, D., Benedetti, F., Dorier, J., and Stasiak, A. (2018). Transcription-induced supercoiling as the driving force of chromatin loop extrusion during formation of TADs in interphase chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 46, 1648–1660.
- Raghuraman, M.K., Winzeler, E.A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D.J., Davis, R.W., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294, 115–121.
- Rahman, S., Jones, M.J.K., and Jallepalli, P.V. (2015). Cohesin recruits the Esco1 acetyltransferase genome wide to repress transcription and promote cohesion in somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 11270–11275.
- Raju, T.N. (1999). The Nobel Chronicles. 1968: Har Khorana (b 1922); Robert Holley (1922-93); Marshall Nirenberg (b 1927). *Lancet* 354, 690.
- Ramírez, F., Bhardwaj, V., Arrigoni, L., Lam, K.C., Grüning, B.A., Villaveces, J., Habermann, B., Akhtar, A., and Manke, T. (2018). High-resolution TADs reveal DNA sequences underlying genome organization in flies. *Nat. Commun.* 9, 189.
- Rankin, S., Ayad, N.G., and Kirschner, M.W. (2005). Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. *Mol. Cell* 18, 185–200.
- Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K., and Varshavsky, A. (2001). Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* 410, 955–959.
- Rao, S.S., Huang, S.-C., Brian Glenn St Hilaire, Engreitz, J.M., Perez, E.M., Kieffer-Kwon, K.-R., Sanborn, A.L., Johnstone, S.E., Bascom, G.D., Bochkov, I.D., et al. (2017). Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell*.
- Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., et al. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159, 1665–1680.
- Read, C.M., Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Driscoll, P.C., and Norman, D.G. (1993). Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res.* 21, 3427–3436.

- Reiter, A., Hamperl, S., Seitz, H., Merkl, P., Perez-Fernandez, J., Williams, L., Gerber, J., Németh, A., Léger, I., Gadai, O., et al. (2012). The Reb1-homologue Ydr026c/Nsi1 is required for efficient RNA polymerase I termination in yeast. *EMBO J.* *31*, 3480–3493.
- Rhodes, J.D.P., Haarhuis, J.H.I., Grimm, J.B., Rowland, B.D., Lavis, L.D., and Nasmyth, K.A. (2017). Cohesin Can Remain Associated with Chromosomes during DNA Replication. *Cell Rep.* *20*, 2749–2755.
- Ricci, M.A., Manzo, C., García-Parajo, M.F., Lakadamyali, M., and Cosma, M.P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell* *160*, 1145–1158.
- Rich, A., and Zhang, S. (2003). Timeline: Z-DNA: the long road to biological function. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 566–572.
- Richardson, H., Lew, D.J., Henze, M., Sugimoto, K., and Reed, S.I. (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* *6*, 2021–2034.
- Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* *423*, 145–150.
- Rine, J., and Herskowitz, I. (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *116*, 9–22.
- Rine, J., Strathern, J.N., Hicks, J.B., and Herskowitz, I. (1979). A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating-type loci. *Genetics* *93*, 877–901.
- Robellet, X., Thattikota, Y., Wang, F., Wee, T.-L., Pascariu, M., Shankar, S., Bonneil, É., Brown, C.M., and D’Amours, D. (2015). A high-sensitivity phospho-switch triggered by Cdk1 governs chromosome morphogenesis during cell division. *Genes Dev.* *29*, 426–439.
- Robinett, C.C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A., and Belmont, A.S. (1996). In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J. Cell Biol.* *135*, 1685–1700.
- Robinow, C.F., and Marak, J. (1966). A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *J. Cell Biol.* *29*, 129–151.
- Robinson, P.J.J., Fairall, L., Huynh, V.A.T., and Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 6506–6511.
- Rodley, C.D.M., Bertels, F., Jones, B., and O’Sullivan, J.M. (2009). Global identification of yeast chromosome interactions using Genome conformation capture. *Fungal Genet. Biol.* *46*, 879–886.
- Roig, M.B., Löwe, J., Chan, K.-L., Beckouët, F., Metson, J., and Nasmyth, K. (2014). Structure and function of cohesin’s Scc3/SA regulatory subunit. *FEBS Lett.* *588*, 3692–3702.
- Rolef Ben-Shahar, T., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M., and Uhlmann, F. (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* *321*, 563–566.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B.T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* *148*, 635–651.
- Rowland, B.D., Roig, M.B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouët, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., et al. (2009). Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol. Cell* *33*, 763–774.
- Rowley, M.J., and Corces, V.G. (2018). Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet.* *19*, 789–800.
- Rüthnick, D., and Schiebel, E. (2018). Duplication and nuclear envelope insertion of the yeast microtubule organizing centre, the spindle pole body. *Cells* *7*.

- Saad, H., Gallardo, F., Dalvai, M., Tanguy-le-Gac, N., Lane, D., and Bystricky, K. (2014). DNA dynamics during early double-strand break processing revealed by non-intrusive imaging of living cells. *PLoS Genet.* *10*, e1004187.
- Sabari, B.R., Dall'Agnesse, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., et al. (2018). Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* *361*.
- Saitoh, N., Goldberg, I.G., Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J. Cell Biol.* *127*, 303–318.
- Saka, Y., Sutani, T., Yamashita, Y., Saitoh, S., Takeuchi, M., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (1994). Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J.* *13*, 4938–4952.
- Samejima, K., Booth, D.G., Ogawa, H., Paulson, J.R., Xie, L., Watson, C.A., Platani, M., Kanemaki, M.T., and Earnshaw, W.C. (2018). Functional analysis after rapid degradation of condensins and 3D-EM reveals chromatin volume is uncoupled from chromosome architecture in mitosis. *J. Cell Sci.* *131*.
- Sanborn, A.L., Rao, S.S.P., Huang, S.-C., Durand, N.C., Huntley, M.H., Jewett, A.I., Bochkov, I.D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., et al. (2015). Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *112*, E6456-65.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* *103*, 411–422.
- Sati, S., and Cavalli, G. (2017). Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma* *126*, 33–44.
- Schaaf, C.A., Misulovin, Z., Gause, M., Koenig, A., and Dorsett, D. (2013). The Drosophila enhancer of split gene complex: architecture and coordinate regulation by notch, cohesin, and polycomb group proteins. *G3 (Bethesda)* *3*, 1785–1794.
- Schalbetter, S.A., Goloborodko, A., Fudenberg, G., Belton, J.-M., Miles, C., Yu, M., Dekker, J., Mirny, L., and Baxter, J. (2017). SMC complexes differentially compact mitotic chromosomes according to genomic context. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1071–1080.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* *436*, 138–141.
- Schardin, M., Cremer, T., Hager, H.D., and Lang, M. (1985). Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum. Genet.* *71*, 281–287.
- Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K., and Eisenhaber, F. (2003). Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol. Cell* *11*, 571–575.
- Schlissel, M.S., and Brown, D.D. (1984). The transcriptional regulation of Xenopus 5s RNA genes in chromatin: the roles of active stable transcription complexes and histone H1. *Cell* *37*, 903–913.
- Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* *103*, 253–262.
- Schneider, M., Hellerschmied, D., Schubert, T., Amlacher, S., Vinayachandran, V., Reja, R., Pugh, B.F., Clausen, T., and Köhler, A. (2015). The Nuclear Pore-Associated TREX-2 Complex Employs Mediator to Regulate Gene Expression. *Cell* *162*, 1016–1028.
- Schwarzacher, H.G., and Wachtler, F. (1991). The functional significance of nucleolar structures. *Ann Genet* *34*, 151–60.
- Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, G., Loe-Mie, Y., Fonseca, N.A., Huber, W., Haering, C., Mirny, L., et al. (2017). Two independent modes of chromatin

- organization revealed by cohesin removal. *Nature* 551, 51–56.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.-P.Z., and Widom, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* 442, 772–778.
- Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A., and Cavalli, G. (2012). Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell* 148, 458–472.
- Shampay, J., Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310, 154–157.
- Shen, D., and Skibbens, R.V. (2017). Chl1 DNA helicase and Scc2 function in chromosome condensation through cohesin deposition. *PLoS One* 12, e0188739.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844–847.
- Shore, D., and Nasmyth, K. (1987). Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51, 721–732.
- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., and Deshaies, R.J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97, 233–244.
- Shou, W., Sakamoto, K.M., Keener, J., Morimoto, K.W., Traverso, E.E., Azzam, R., Hoppe, G.J., Feldman, R.M., DeModena, J., Moazed, D., et al. (2001). Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol. Cell* 8, 45–55.
- Shou, W., Azzam, R., Chen, S.L., Huddleston, M.J., Baskerville, C., Charbonneau, H., Annan, R.S., Carr, S.A., and Deshaies, R.J. (2002). Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex. *B.M.C. Mol. Biol.* 3, 3.
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B., and de Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat. Genet.* 38, 1348–1354.
- Simpson, R.T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17, 5524–5531.
- Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2004). The real “kingdoms” of eukaryotes. *Curr. Biol.* 14, R693-6.
- Skibbens, R.V. (2004). Chl1p, a DNA helicase-like protein in budding yeast, functions in sister-chromatid cohesion. *Genetics* 166, 33–42.
- Skibbens, R.V., Corson, L.B., Koshland, D., and Hieter, P. (1999). Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev.* 13, 307–319.
- Spector, D.L., and Lamond, A.I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* 9, 3273–3297.
- Speranzini, V., Pilotto, S., Sixma, T.K., and Mattevi, A. (2016). Touch, act and go: landing and operating on nucleosomes. *EMBO J.* 35, 376–388.
- Sperling, K., and Lüdtker, E.K. (1981). Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian muntjac. *Chromosoma* 83, 541–553.
- Srinivasan, M., Scheinost, J.C., Petela, N.J., Gligoris, T.G., Wissler, M., Ogushi, S., Collier, J.E., Voulgaris, M., Kurze, A., Chan, K.-L., et al. (2018). The Cohesin Ring Uses Its Hinge to Organize DNA Using Non-topological as well as Topological Mechanisms. *Cell* 173, 1508–1519.e18.
- Srinivasan, M., Petela, N.J., Scheinost, J.C., Collier, J., Voulgaris, M., Brunet-Roig, M., Beckouët, F.,

- Hu, B., and Nasmyth, K.A. (2019). Scc2 counteracts a Wapl-independent mechanism that releases cohesin from chromosomes during G1 but is unnecessary during S phase for establishing cohesion. *BioRxiv*.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Bazett-Jones, D.P., Crane-Robinson, C., and Moss, T. (2001). DNA looping in the RNA polymerase I enhancerosome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3241–3247.
- Stevens, N.M. (1907). The chromosomes of *Drosophila ampelophila*. *Proceedings of the Seventh International Zoological Congress The University Press, Boston* 380–381.
- Stevens, T.J., Lando, D., Basu, S., Atkinson, L.P., Cao, Y., Lee, S.F., Leeb, M., Wohlfahrt, K.J., Boucher, W., O’Shaughnessy-Kirwan, A., et al. (2017). 3D structures of individual mammalian genomes studied by single-cell Hi-C. *Nature* *544*, 59–64.
- St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, E., Sauv e, V., Ratsima, H., and D’Amours, D. (2009). Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol. Cell* *34*, 416–426.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41–45.
- Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D.V., Darzacq, X., and Karpen, G.H. (2017). Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* *547*, 241–245.
- Strunnikov, A.V., Larionov, V.L., and Koshland, D. (1993). SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J. Cell Biol.* *123*, 1635–1648.
- Strunnikov, A.V., Hogan, E., and Koshland, D. (1995). SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev.* *9*, 587–599.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* *6*, 185–197.
- Sullivan, M., and Uhlmann, F. (2003). A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nat. Cell Biol.* *5*, 249–254.
- Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V.L., and Uhlmann, F. (2004). Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell* *117*, 471–482.
- Sutani, T., Kawaguchi, T., Kanno, R., Itoh, T., and Shirahige, K. (2009). Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr. Biol.* *19*, 492–497.
- Swift, H. (1950). The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *36*, 643–654.
- Szabo, Q., Jost, D., Chang, J.-M., Cattoni, D.I., Papadopoulos, G.L., Bonev, B., Sexton, T., Gurgo, J., Jacquier, C., Nollmann, M., et al. (2018). TADs are 3D structural units of higher-order chromosome organization in *Drosophila*. *Sci. Adv.* *4*, eaar8082.
- Szabo, Q., Bantignies, F., and Cavalli, G. (2019). Principles of genome folding into topologically associating domains. *Sci. Adv.* *5*, eaaw1668.
- Taddei, A., and Gasser, S.M. (2012). Structure and function in the budding yeast nucleus. *Genetics* *192*, 107–129.
- Taddei, A., Van Houwe, G., Hediger, F., Kalck, V., Cubizolles, F., Schober, H., and Gasser, S.M. (2006). Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* *441*, 774–778.

- Tanaka, T., Cosma, M.P., Wirth, K., and Nasmyth, K. (1999). Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell* 98, 847–858.
- Tang, L. (2019). Liquid phase separation. *Nat. Methods* 16, 18.
- Tanizawa, H., Kim, K.-D., Iwasaki, O., and Noma, K.-I. (2017). Architectural alterations of the fission yeast genome during the cell cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 965–976.
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., and Michnick, S.W. (2008). An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* 320, 1465–1470.
- Tedeschi, A., Wutz, G., Huet, S., Jaritz, M., Wuensche, A., Schirghuber, E., Davidson, I.F., Tang, W., Cisneros, D.A., Bhaskara, V., et al. (2013). Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation. *Nature* 501, 564–568.
- Terakawa, T., Bisht, S., Eeftens, J.M., Dekker, C., Haering, C.H., and Greene, E.C. (2017). The condensin complex is a mechanochemical motor that translocates along DNA. *Science* 358, 672–676.
- 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.
- Therizols, P., Duong, T., Dujon, B., Zimmer, C., and Fabre, E. (2010). Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2025–2030.
- Thiry, M., and Lafontaine, D.L.J. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15, 194–199.
- Thomas, J.O., and Travers, A.A. (2001). HMG1 and 2, and related “architectural” DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 167–174.
- Tolhuis, B., Palstra, R.J., Splinter, E., Grosveld, F., and de Laat, W. (2002). Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell* 10, 1453–1465.
- Tóth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A., and Nasmyth, K. (1999). Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev.* 13, 320–333.
- Travers, A.A. (2003). Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep.* 4, 131–136.
- Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell* 28, 1–13.
- Tsang, C.K., and Zheng, X.F.S. (2007). TOR-in(g) the nucleus. *Cell Cycle* 6, 25–29.
- Tsang, C.K., Bertram, P.G., Ai, W., Drenan, R., and Zheng, X.F.S. (2003). Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR. *EMBO J.* 22, 6045–6056.
- Uchida, M., Sun, Y., McDermott, G., Knoechel, C., Le Gros, M.A., Parkinson, D., Drubin, D.G., and Larabell, C.A. (2011). Quantitative analysis of yeast internal architecture using soft X-ray tomography. *Yeast* 28, 227–236.
- Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol.* 8, 1095–1101.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37–42.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375–386.
- Ulianov, S.V., Khrameeva, E.E., Gavrillov, A.A., Flyamer, I.M., Kos, P., Mikhaleva, E.A., Penin, A.A.,

- Logacheva, M.D., Imakaev, M.V., Chertovich, A., et al. (2016). Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome Res.* *26*, 70–84.
- Unal, E., Heidinger-Pauli, J.M., and Koshland, D. (2007). DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* *317*, 245–248.
- Unal, E., Heidinger-Pauli, J.M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S.P., and Koshland, D.E. (2008). A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* *321*, 566–569.
- Uusküla-Reimand, L., Hou, H., Samavarchi-Tehrani, P., Rudan, M.V., Liang, M., Medina-Rivera, A., Mohammed, H., Schmidt, D., Schwalie, P., Young, E.J., et al. (2016). Topoisomerase II beta interacts with cohesin and CTCF at topological domain borders. *Genome Biol.* *17*, 182.
- Van Bortle, K., Nichols, M.H., Li, L., Ong, C.-T., Takenaka, N., Qin, Z.S., and Corces, V.G. (2014). Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome Biol.* *15*, R82.
- Varshavsky, A. (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.* *20*, 1298–1345.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J., and Walter, J.C. (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* *17*, 1894–1908.
- Verma, R., Annan, R.S., Huddleston, M.J., Carr, S.A., Reynard, G., and Deshaies, R.J. (1997). Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science* *278*, 455–460.
- Vian, L., Pękowska, A., Rao, S.S.P., Kieffer-Kwon, K.-R., Jung, S., Baranello, L., Huang, S.-C., El Khattabi, L., Dose, M., Pruett, N., et al. (2018). The energetics and physiological impact of cohesin extrusion. *Cell* *173*, 1165–1178.e20.
- Virchow, R.L.K. (1859). *Cellular Pathology*.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* *103*, 399–410.
- Walmsley, R.W., Chan, C.S., Tye, B.K., and Petes, T.D. (1984). Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* *310*, 157–160.
- Wang, B.-D., Yong-Gonzalez, V., and Strunnikov, A.V. (2004). Cdc14p/FEAR pathway controls segregation of nucleolus in *S. cerevisiae* by facilitating condensin targeting to rDNA chromatin in anaphase. *Cell Cycle* *3*, 960–967.
- Wang, D., Mansisidor, A., Prabhakar, G., and Hochwagen, A. (2016). Condensin and Hmo1 Mediate a Starvation-Induced Transcriptional Position Effect within the Ribosomal DNA Array. *Cell Rep.* *14*, 1010–1017.
- Wang, S.W., Norbury, C., Harris, A.L., and Toda, T. (1999). Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 6), 927–937.
- Wang, X., Hughes, A.C., Brandão, H.B., Walker, B., Lierz, C., Cochran, J.C., Oakley, M.G., Kruse, A.C., and Rudner, D.Z. (2018). In Vivo Evidence for ATPase-Dependent DNA Translocation by the *Bacillus subtilis* SMC Condensin Complex. *Mol. Cell* *71*, 841–847.e5.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 437–440.
- Waterborg, J.H. (2000). Steady-state levels of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 13007–13011.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose

- nucleic acid. *Nature* *171*, 737–738.
- Weber, S.A., Gerton, J.L., Polancic, J.E., DeRisi, J.L., Koshland, D., and Megee, P.C. (2004). The kinetochore is an enhancer of pericentric cohesin binding. *PLoS Biol.* *2*, E260.
- Wei, T., Najmi, S.M., Liu, H., Peltonen, K., Kucerova, A., Schneider, D.A., and Laiho, M. (2018). Small-Molecule Targeting of RNA Polymerase I Activates a Conserved Transcription Elongation Checkpoint. *Cell Rep.* *23*, 404–414.
- Weitao, T., Budd, M., Hoopes, L.L.M., and Campbell, J.L. (2003). Dna2 helicase/nuclease causes replicative fork stalling and double-strand breaks in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *278*, 22513–22522.
- Wells, J.N., Gligoris, T.G., Nasmyth, K.A., and Marsh, J.A. (2017). Evolution of condensin and cohesin complexes driven by replacement of Kite by Hawk proteins. *Curr. Biol.* *27*, R17–R18.
- Widom, J. (2001). Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics. *Q Rev Biophys* *34*, 269–324.
- Wilkins, B.J., Rall, N.A., Ostwal, Y., Kruitwagen, T., Hiragami-Hamada, K., Winkler, M., Barral, Y., Fischle, W., and Neumann, H. (2014). A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis. *Science* *343*, 77–80.
- Wilson, R.W., and Bloomfield, V.A. (1979). Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. a light-scattering study. *Biochemistry* *18*, 2192–2196.
- Winey, M., Mamay, C.L., O’Toole, E.T., Mastronarde, D.N., Giddings, T.H., McDonald, K.L., and McIntosh, J.R. (1995). Three-dimensional ultrastructural analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle. *J. Cell Biol.* *129*, 1601–1615.
- Wise, D.A. (1999). Cytokinesis in cells undergoing mitosis without genome replication. *Cell Biol. Int.* *23*, 813–816.
- de Wit, E., Vos, E.S.M., Holwerda, S.J.B., Valdes-Quezada, C., Verstegen, M.J.A.M., Teunissen, H., Splinter, E., Wijchers, P.J., Krijger, P.H.L., and de Laat, W. (2015). CTCF binding polarity determines chromatin looping. *Mol. Cell* *60*, 676–684.
- Wittenberg, C., Sugimoto, K., and Reed, S.I. (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell* *62*, 225–237.
- Wittner, M., Hamperl, S., Stöckl, U., Seufert, W., Tschochner, H., Milkereit, P., and Griesenbeck, J. (2011). Establishment and maintenance of alternative chromatin states at a multicopy gene locus. *Cell* *145*, 543–554.
- Wood, B.R. (2016). The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. *Chem. Soc. Rev.* *45*, 1980–1998.
- Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1990). Mitotic chromatin condensation in vitro using somatic cell extracts and nuclei with variable levels of endogenous topoisomerase II. *J. Cell Biol.* *111*, 2839–2850.
- Woodcock, C.L., Grigoryev, S.A., Horowitz, R.A., and Whitaker, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 9021–9025.
- Woodcock, C.L., Skoultchi, A.I., and Fan, Y. (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.* *14*, 17–25.
- Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D.A., Stocsits, R.R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M.J., et al. (2017). Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *EMBO J.* *36*, 3573–3599.
- Xiong, B., Lu, S., and Gerton, J.L. (2010). Hos1 is a lysine deacetylase for the Smc3 subunit of cohesin.

- Curr. Biol. 20, 1660–1665.
- Yang, C.H., Lambie, E.J., Hardin, J., Craft, J., and Snyder, M. (1989). Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. *Chromosoma* 98, 123–8.
- Yeong, F.M., Hombauer, H., Wendt, K.S., Hirota, T., Mudrak, I., Mechtler, K., Loregger, T., Marchler-Bauer, A., Tanaka, K., Peters, J.-M., et al. (2003). Identification of a subunit of a novel Kleisin-beta/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. *Curr. Biol.* 13, 2058–2064.
- Yu, H. (2007). Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol. Cell* 27, 3–16.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M.C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 18, 4463–4470.
- Zhan, Y., Mariani, L., Barozzi, I., Schulz, E.G., Blüthgen, N., Stadler, M., Tiana, G., and Giorgetti, L. (2017). Reciprocal insulation analysis of Hi-C data shows that TADs represent a functionally but not structurally privileged scale in the hierarchical folding of chromosomes. *Genome Res.* 27, 479–490.
- Zhang, J., Shi, X., Li, Y., Kim, B.-J., Jia, J., Huang, Z., Yang, T., Fu, X., Jung, S.Y., Wang, Y., et al. (2008a). Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol. Cell* 31, 143–151.
- Zhang, N., Kuznetsov, S.G., Sharan, S.K., Li, K., Rao, P.H., and Pati, D. (2008b). A handcuff model for the cohesin complex. *J. Cell Biol.* 183, 1019–1031.
- Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjölander, M., Göndör, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Sandhu, K.S., Singh, U., et al. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat. Genet.* 38, 1341–1347.
- Zou, L., Mitchell, J., and Stillman, B. (1997). CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol. Cell Biol.* 17, 553–563.

RESUME

La cohésine est un complexe protéique conservé dans l'évolution composé d'un anneau capable d'embrasser l'ADN et de protéines auxiliaires régulant son interaction avec la chromatine. D'une part, la cohésine confère la cohésion des chromatides sœurs nécessaire à leur ségrégation, d'autre part elle établit et maintient des boucles de chromatine. Ces boucles sont requises pour la formation de domaines topologiques, l'expression génique et la stabilité du génome. Cependant les mécanismes régissant leur formation ne sont pas entièrement élucidés. Selon le modèle d'extrusion de boucles, la cohésine capturerait des boucles de petites tailles et les élargirait en extrudant l'ADN à travers son anneau. Dans ce modèle, la taille des boucles dépendrait à la fois du temps de résidence des cohésines sur l'ADN et de leur processivité. Étudier la régulation des cohésines est donc fondamental pour comprendre la biologie des chromosomes. Dans cette étude nous avons montré que les bras des chromosomes mitotiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae* étaient organisés sous forme de boucles de chromatine dépendantes des cohésines. Nous avons étudié le rôle des sous-unités régulatrices des cohésines, Pds5, Wpl1 et Eco1 dans la formation de ces boucles. Nos données montrent que Pds5 inhibe leur expansion, *via* Wpl1 et Eco1. Comme décrit chez les mammifères, Wpl1 les abolit en dissociant les cohésines des chromosomes. En revanche, nos résultats suggèrent qu'Eco1 entraverait la translocation des cohésines sur l'ADN, nécessaire pour l'agrandissement des boucles. Nous avons ensuite analysé le rôle de ces protéines dans l'organisation de l'ADN ribosomique (ADNr), séquence enrichie en cohésines, hautement transcrite et isolée du reste du génome. Pds5 semble avoir un rôle central dans l'organisation de cette séquence, qui ne dépendrait pas de Wpl1 ou d'Eco1. Afin d'analyser de manière fine les réorganisations spatiales de l'ADNr, nous avons développé une analyse d'image dédiée permettant de sonder l'organisation de cette fibre en trois dimensions. Nous avons révélé une structure sous-jacente de l'ADNr composée d'une succession de domaines organisés spatialement par les cohésines. Cette étude ouvre des perspectives vers une meilleure compréhension de la régulation des cohésines dans l'organisation du génome.

ABSTRACT

Cohesin is an evolutionary-conserved complex composed of a ring capable of DNA entrapment and of auxiliary proteins regulating its association with chromatin. On the one hand, cohesin confers sister chromatid cohesion required for their proper segregation and on the other hand it establishes and maintains chromatin looping. Chromatin loops are crucial for assembly of topological domains, gene expression and genome stability. However, mechanisms driving their establishment remain to be elucidated. According to loop extrusion model, cohesin would capture small loops and enlarge them by extruding DNA throughout its ring. This model predicts that loop size would depend on both cohesin residence time on DNA and on its processivity. Deciphering cohesin regulation is thus fundamental to understand chromosome biology. In this study, we showed that mitotic chromosome arms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* are organised in cohesin-dependent chromatin loops. We studied the role of cohesin regulatory subunits Pds5, Wpl1 and Eco1 on loop establishment. Our data show that Pds5 inhibits loop expansion *via* Wpl1 and Eco1. As previously described in mammals, Wpl1 counteracts loop expansion by dissociating cohesin from DNA. Our results suggest that Eco1 would inhibit cohesin translocation on DNA, required for loop expansion. We then studied how these proteins contribute to the organisation of the ribosomal DNA array (rDNA), a cohesin-rich, highly transcribed sequence segregated away from the rest of the genome. Our data point toward a central role for Pds5 in organising this genomic region, independently of Wpl1 and Eco1. To study in detail rDNA spatial organisation, we developed a dedicated image analysis to assess its organisation in three dimensions. We have unveiled an underlying organisation for rDNA, made by a succession of small domains spatially organised by cohesin. This study opens large perspectives towards a better understanding of cohesin regulation in genome organisation.

MOTS-CLEFS

Organisation du génome, cohésine, ADN ribosomique, cycle cellulaire,
Saccharomyces cerevisiae