

# Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1773

## THÈSE

pour le

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Mention Sciences, Technologie, Santé**

**Option Génétique**

**Présentée et soutenue publiquement le 9 décembre 2010**

*Par Amélie FEYTOUT*

*Née le 31 décembre 1984 à Bergerac*

### **Régulation dynamique de l'association des cohésines aux chromosomes, établissement et maintien de la cohésion des chromatides sœurs**

#### **Membres du Jury**

M. Bertrand DAIGNAN-FORNIER	Directeur de Recherche CNRS	Président
Mme Sylvie TOURNIER	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
M. Etienne SCHWOB	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
M. Benoît ARCANGIOLI	Directeur de Recherche Institut Pasteur	Examineur
M. Jean-Paul JAVERZAT	Directeur de Recherche CNRS	Directeur de thèse



## Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury : Madame Sylvie Tournier et Messieurs Etienne Schwob et Benoît Arcangioli pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que Monsieur Bertrand Daignan-Fornier pour avoir présidé ce jury de thèse.

Je souhaite remercier Jean-Paul Javerzat pour m'avoir accueillie au laboratoire et pour avoir dirigé cette thèse dans la continuité de mon stage de master 2. Tout au long de cette aventure, tu m'as toujours accordé de ton temps. Que ce soit pour aller manger du riz à l'autre bout du monde, pour démonter les machines du labo, ou encore pour digérer des sphéroplastiques, certains souvenirs resteront mémorables. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité, ton aide et tes conseils.

Je remercie tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés et en particulier tout le premier étage avec qui j'ai pris plaisir à travailler au cours de ces quatre années passées. Merci pour votre bonne humeur et pour la bonne ambiance qu'il règne dans le labo.

Merci à Sabine pour ton dynamisme, ta bonne humeur, ton franc-parler et ton oreille attentive. Une mention spéciale à tes anecdotes toujours captivantes.

Merci à Sonia pour tes conseils et ta gentillesse.

Merci à Stéphanie pour l'ambiance que tu as apportée et ta spontanéité. Avec toi, la bonne humeur est garantie.

Merci à Sylvie pour ton aide et ta gentillesse à toute épreuve. Merci également pour avoir partagé ta culture des voyages. Bon vent pour la retraite, je suis sûre que tu sauras en profiter.

Côté *podos*, merci à Martine pour ton organisation sans faille, ta bienveillance et surtout pour ton épaulement toujours là en cas de besoin.

Merci également à Corinne, Sven, Mathieu, Fred et Annick.

Merci à tous les étudiants, passés ou présents que j'ai eu le plaisir de côtoyer. Je tiens à remercier tout spécialement Julie et Laurent pour avoir initialement facilité mon intégration dans la vie au laboratoire. Merci ensuite à Laura, Damien, Raimon et Sandra pour les moments que nous avons passés ensemble. Merci à Asen pour ses discussions éclectiques, précieuses pendant ma rédaction.

Enfin, un grand merci à ma famille pour leur soutien et notamment pour leur support ces derniers mois. Merci à mes amis pour les soirées resto, jeux, ciné, ou à refaire le monde. Merci à Jojo, Marie, Julien, Fabien, Myriam, Laura & Bertrand, pour tous ces bons moments.



---

**SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
I. LA MITOSE ET SA REGULATION .....	4
II. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES COHESINES .....	7
A. <i>Ségrégation des chromosomes</i> .....	7
1) Identifier les chromatides sœurs .....	7
2) Géométrie du kinétochore .....	7
B. <i>Régulation de la transcription</i> .....	8
C. <i>Réparation de l'ADN</i> .....	10
D. <i>Fonction dans l'organisation du centrosome</i> .....	11
III. LA COHESION DES CHROMATIDES SŒURS.....	11
A. <i>Le complexe cohésine et les modèles de cohésion</i> .....	12
B. <i>Le cycle de la cohésion</i> .....	14
1) Chargement pré-réplicatif.....	15
2) Établissement de la cohésion.....	17
3) Maintien de la cohésion.....	25
4) Perte de la cohésion.....	27
IV. TRAVAUX A L'ORIGINE DU PROJET DE THESE : RELATION ENTRE DYNAMIQUE DES COHESINES ET ETABLISSEMENT DE LA COHESION .....	30
<b>CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>32</b>
I. MATERIEL BIOLOGIQUE .....	32
II. METHODES.....	32
A. <i>Méthodes de culture</i> .....	32
1) Milieux de culture pour <i>S. pombe</i> .....	32
2) Conditions de culture pour <i>S. pombe</i> .....	33
B. <i>Méthodes d'analyses génétiques</i> .....	35
1) Croisements.....	35
2) Analyse de spores en vrac .....	35
3) Analyse de tétrades.....	35
4) Obtention de diploïdes.....	35
5) Test en goutte .....	36
C. <i>Mesure du contenu en ADN des cellules</i> .....	36
D. <i>Analyse des protéines associées à la chromatine</i> .....	37
1) Analyse de la fluorescence de Rec8-GFP.....	37
2) Immunofluorescence sur étalements de chromatine .....	37
3) Immunoprécipitation de chromatine (ChIP).....	39
E. <i>Analyse des protéines de <i>S. pombe</i></i> .....	42
F. <i>Techniques d'analyse cytologique</i> .....	45
1) Coloration de l'ADN au DAPI.....	45
2) Coloration des <i>septa</i> au calcofluor .....	45



	2
3) Montage des lames .....	45
4) Microscopie .....	45
<b>CHAPITRE II : CRIBLE GENETIQUE DE FACTEURS REGULANT LA DYNAMIQUE DES COHESINES .....</b>	<b>47</b>
I. ANALYSE GENETIQUE DES MUTANTS SUPPRESSEURS DE MIS4-367.....	47
A. Ségrégation monogénique du phénotype supprimé.....	48
B. Test de liaison .....	48
C. Test de dominance / récessivité.....	48
II. IDENTIFICATION DES GENES PAR CLONAGE POSITIONNEL.....	50
A. Analyse génétique dans un contexte peu recombinant.....	50
B. Analyse génétique en contexte recombinant.....	50
III. IDENTIFICATION DES LOCI SUPPRESSEURS.....	51
IV. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE .....	53
V. POURQUOI LE CRIBLE GENETIQUE N'A-T-IL PAS IDENTIFIE LE GENE WPL1 ? .....	55
VI. EFFET DES MUTATIONS SUPPRESSEUR SUR LA DYNAMIQUE DES COHESINES.....	56
VII. ÉTUDE DE LA CDK PEF1 .....	58
DISCUSSION .....	60
<b>CHAPITRE III: THE ACETYLATION OF PSM3 ON CONSERVED LYSINE RESIDUES IS DISPENSABLE FOR SISTER-CHROMATID COHESION IN FISSION YEAST BUT CONTRIBUTES TO ANTAGONIZE WAPL DOWNSTREAM THE ESO1 ACETYL-TRANSFERASE .....</b>	<b>63</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	64
<b>INTRODUCTION</b> .....	65
<b>RESULTS</b> .....	68
<i>Cohesin bound in the stable mode is not evenly distributed along post-replicative chromosomes.....</i>	68
<i>Eso1 is dispensable for stable cohesin binding to post replicative chromatin and sister-chromatid cohesion when the wpl1 gene is deleted .....</i>	69
<i>Psm3 acetylation is not essential but contributes to Eso1 function.....</i>	71
<i>Preventing Psm3 acetylation reduces the amount of cohesin bound in the stable mode.....</i>	72
<i>Acetyl-mimicking forms of Psm3 cannot bypass Eso1 function to generate the stable cohesin fraction .....</i>	74
<i>Psm3 acetylation renders cohesin less sensitive to Wapl-dependent removal.....</i>	75
<b>DISCUSSION</b> .....	75
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	79
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	81
<b>REFERENCES</b> .....	82
<b>CHAPITRE IV : PDS5 EST UN REGULATEUR NEGATIF ET POSITIF DE L'ASSOCIATION DES COHESINES AUX CHROMOSOMES ET DE LA COHESION. ....</b>	<b>87</b>
INTRODUCTION .....	87
A. Interaction entre Pds5, Wapl et les cohésines.....	87
1) Localisation chromosomique.....	87
2) Interactions physiques entre Pds5 et les cohésines.....	88

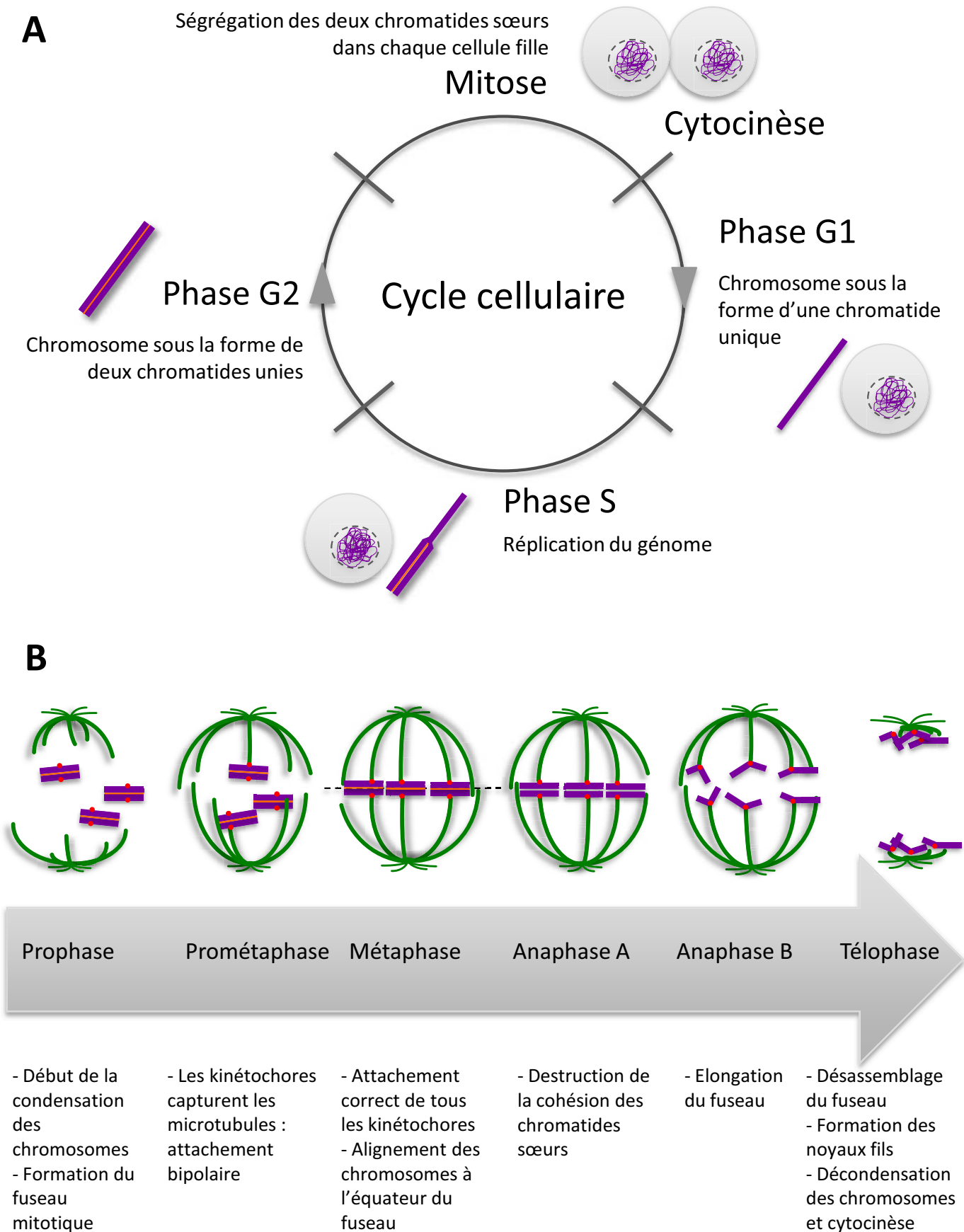




3) Interactions physiques entre Wapl et Pds5 .....	89
B. <i>Fonction de Pds5 dans l'établissement et/ou le maintien de la cohésion des chromatides sœurs</i> .....	90
C. <i>Fonction du module Wapl-Pds5 dans la régulation de l'association des cohésines à la chromatine</i> .....	91
D. <i>Fonction de Pds5 dans l'établissement de la cohésion</i> .....	93
RESULTATS.....	95
A. <i>Pds5 et Wapl coopèrent pour réguler l'interaction des cohésines à la chromatine</i> .....	95
B. <i>Pds5 est nécessaire à la formation et/ou au maintien de la fraction stable de cohésines sur les chromosomes</i> .....	96
1) <i>Pds5 est nécessaire au maintien des cohésines sur les chromosomes en phase G2</i> .....	96
1) <i>Pds5 est nécessaire au maintien des cohésines aux régions péri-centromériques</i> .....	98
C. <i>Pds5 co-localise avec la fraction stable de cohésines</i> .....	98
D. <i>Wapl et la fraction stable de cohésines occupent des sites chromosomiques distincts</i> .....	99
E. <i>Eso1 agit via Pds5</i> .....	99
1) <i>La cinétique de dissociation des cohésines en fond <math>\Delta pds5</math> est indépendante d'Eso1</i> .....	100
2) <i>La protéine Psm3 n'est pas acétylée en l'absence de Pds5</i> .....	100
DISCUSSION .....	102
<b>CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>112</b>







**Figure 1. Représentation schématique du cycle cellulaire et des étapes de la mitose**

**A.** Le cycle cellulaire végétatif.

**B.** Les étapes de la mitose.

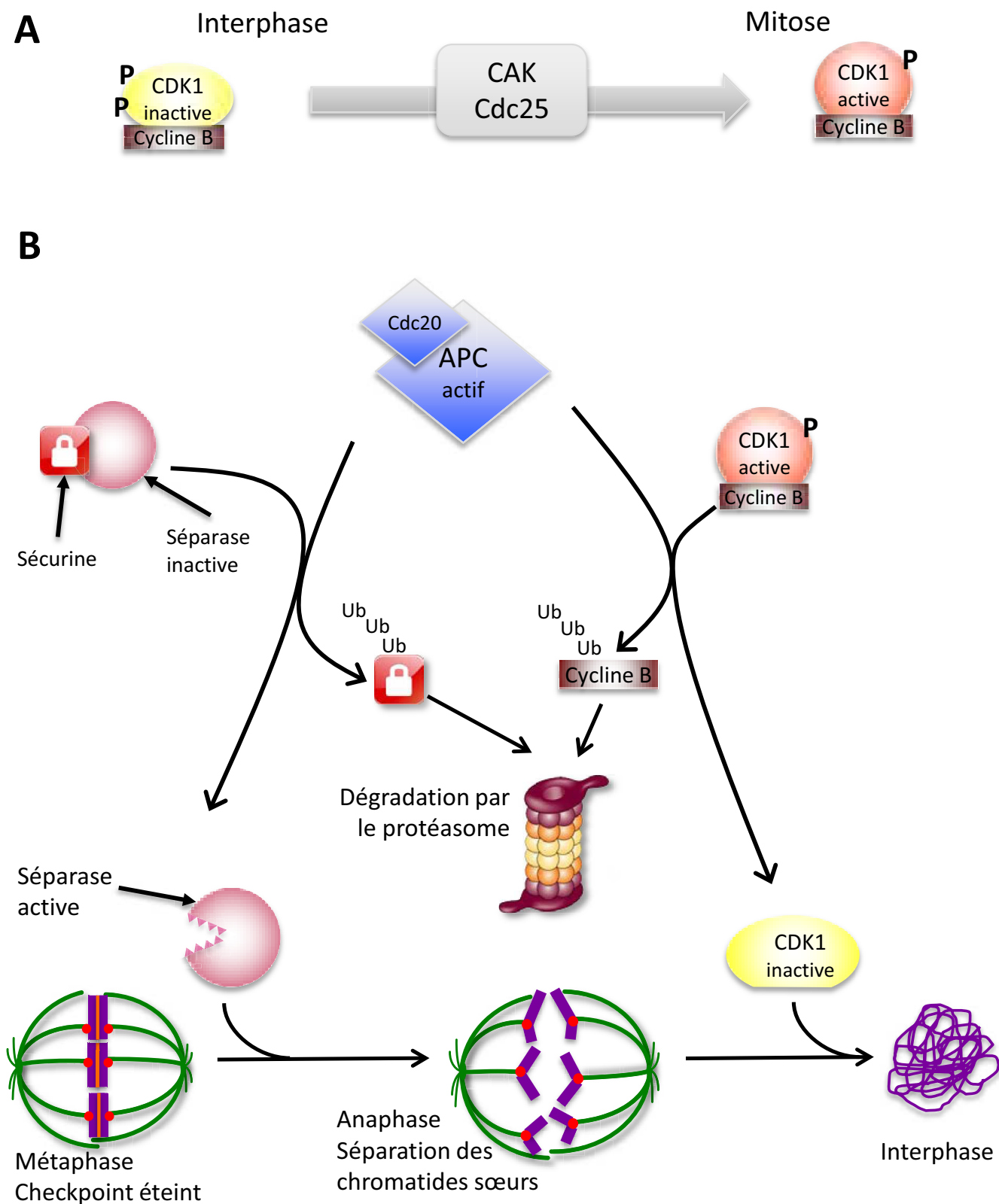
## Introduction

Les complexes cohésines sont des complexes protéiques en forme d'anneau dont la composition est conservée de la levure à l'Homme. Cet anneau est formé d'au moins quatre sous-unités essentielles : deux protéines SMC (Smc1 et Smc3), repliées sur elles mêmes au niveau de leurs longs domaines coiled-coil et interagissant au niveau de leurs régions charnières et de leurs têtes globulaires ; la kleisine Scc1 et la protéine Scc3 qui s'associent au niveau des têtes globulaires des SMC. La fonction la plus connue des cohésines est de maintenir associées les chromatides sœurs depuis leur création lors de la réplication et jusqu'à leur séparation en anaphase. Les cohésines jouent également un rôle dans la réparation des dommages à l'ADN et plus récemment, elles ont été impliquées dans le contrôle de l'expression génique. Les paragraphes suivants récapitulent les connaissances dans ces domaines.

### *I. La mitose et sa régulation*

Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est divisé en quatre phases distinctes : G1, S, G2 et M (Fig. 1A). Durant deux de ces phases, la phase S et la phase M, les cellules exécutent les deux événements fondamentaux du cycle cellulaire : la réplication du matériel génétique (phase S, Synthèse) et sa répartition égale entre les deux cellules filles (phase M, Mitose). Les deux autres phases du cycle (G1 et G2) représentent des intervalles (Gap). Durant la phase G1, les chromosomes sont sous la forme d'une seule chromatide (1C). Elle précède la phase S, au cours de laquelle l'ADN nucléaire est répliqué. À l'issue de la phase S, l'ensemble du génome a été dupliqué et les chromosomes sont formés de deux chromatides maintenues ensemble (2C). La phase G2 est suivie par la phase M, durant laquelle le noyau puis le cytoplasme de la cellule mère se divisent (karyo- et cyto-cinèse) pour donner naissance à deux cellules filles. Chacune peut alors entreprendre un nouveau cycle cellulaire. Collectivement, les phases G1, S et G2 constituent l'interphase caractérisée par un accroissement du volume cellulaire et la duplication du génome et qui se distingue de fait de la mitose, phase de division cellulaire.

La mitose est le processus par lequel la transmission fidèle du patrimoine génétique est assurée. Les chromosomes sont répartis également entre les cellules filles, dont le patrimoine génétique est ainsi identique à celui de la cellule mère. La mitose est divisée en plusieurs étapes : prophase, prométaphase, anaphase et télophase (Fig. 1B). La mitose débute avec la prophase, où les fibres de chromatine interphasiques condensent. Les chromosomes apparaissent alors sous la forme de deux chromatides sœurs parfaitement individualisées et maintenues associées l'une à l'autre par un lien appelé cohésion des chromatides sœurs. À ce stade, le réseau interphasique de microtubules s'est dépolymérisé pour laisser place à des microtubules émis par les centrosomes



**Figure 2. Régulation de l'entrée et la sortie de mitose**

**A.** L'activation du MPF, composé d'une kinase cycline dépendante (CDK) et d'une cycline provoque l'entrée en mitose. L'activation du MPF est régulée par les activités de CAK (kinase) et Cdc25 (phosphatase). Les 'P' représentent les phosphorylations.

**B.** La sortie de mitose nécessite l'inactivation du MPF. La bi-orientation des chromosomes inactive le checkpoint, levant alors l'inhibition d'APC<sup>Cdc20</sup>, qui déclenche la protéolyse de la cycline et de la securine. La séparase libérée détruit la cohésion : c'est l'anaphase. Les 'Ub' représentent les résidus ubiquitine.

et qui vont progressivement s'organiser en fuseau bipolaire. Le désassemblage de l'enveloppe nucléaire marque la fin de la prophase et l'entrée en prométaphase. Cependant, chez certains eucaryotes tels que les levures et champignons, la membrane nucléaire ne se désassemble pas et le fuseau mitotique est interne au noyau.

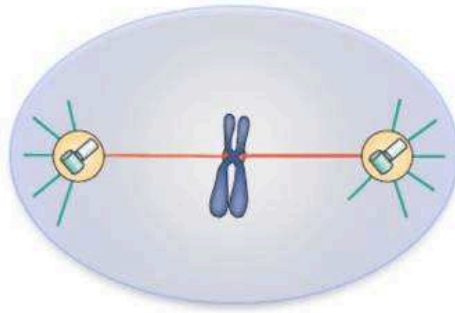
Une structure protéique appelée kinétochore et dont la fonction est d'attacher les chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique est assemblée au niveau des centromères. Chaque chromatide sœur porte ainsi un kinétochore frère. Lors de la prométaphase, les kinétochores frères capturent les extrémités positives de microtubules provenant de pôles opposés du fuseau ce qui conduit à un attachement bilatéral des chromosomes au fuseau mitotique. Il s'ensuit une série de mouvements oscillatoires des chromosomes, puis les forces en jeu s'équilibrent, et les chromosomes s'alignent selon l'axe équatorial du fuseau mitotique : c'est la métaphase. Chaque kinétochore est alors relié à un pôle du fuseau mitotique (Fig. 1B). À ce stade, les chromosomes sont l'objet de deux forces antagonistes : la cohésion des chromatides sœurs et la traction exercée par les microtubules.

La perte de cohésion est un événement irréversible qui déclenche l'anaphase (Uhlmann et al, 2000). Les chromatides sœurs se séparent et migrent activement vers les pôles opposés du fuseau (anaphase A). Lors de l'anaphase B, le fuseau mitotique s'allonge, augmentant encore la distance entre les deux nouveaux lots de chromosomes. Suit la télophase, avec le désassemblage du fuseau mitotique, la décondensation des chromosomes et la formation des enveloppes nucléaires qui achève la production des nouveaux noyaux. Enfin la cytokinèse clive le cytoplasme et sépare les deux cellules filles.

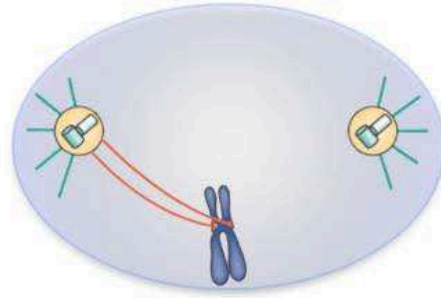
L'entrée, la progression et la sortie de mitose sont fortement régulées. L'activation du complexe Cdk1-cycline B appelé aussi MPF (Mitosis Promoting Factor) permet l'entrée en mitose. Le modèle général de régulation de l'activité CDK-cycline repose sur les variations périodiques des niveaux de cycline par des cycles de transcription, transport et dégradation, ainsi que sur la régulation du niveau de phosphorylation de la CDK par les activités opposées de la kinase Wee1 et de la phosphatase Cdc25. L'activation du MPF est produite par phosphorylation activatrice du résidu thréonine 161 par la CAK (CDK-activating kinase) et déphosphorylation des résidus inhibiteurs tyrosine 15 et thréonine 14 par Cdc25 (pour revue (Lindqvist et al, 2009)) (Fig. 2A). Le MPF ainsi activé initie les étapes précoces de la mitose (condensation des chromosomes, formation du fuseau).

L'anaphase, ultime étape de la mitose, est contrôlée par un complexe protéique appelé APC/C (Anaphase Promoting Complex / Cyclosome). L'APC/C est lui-même associé à un cofacteur activateur : Cdc20. Un système de contrôle, le checkpoint mitotique (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) inhibe l'entrée en anaphase tant que tous les chromosomes ne sont

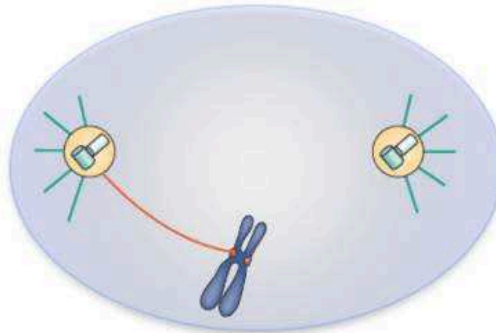
Attachement  
amphitélrique



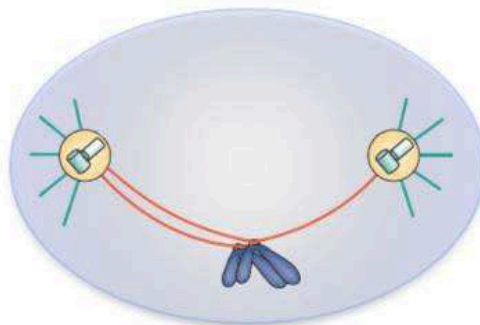
Attachement  
syntélrique



Attachement  
monotélrique



Attachement  
mératélique



**Figure 3. Représentation schématique des différents types d'attachement des chromosomes aux microtubules en métaphase**  
(Adapté de Holland and Cleveland, 2009)



pas correctement attachés au fuseau. Le SAC inclut plusieurs protéines, dont Mad1, Mad2, Mad3, Bub1, Bub3 et Mps1 et inhibe l'APC/C, donc l'entrée en anaphase en contrôlant Cdc20. Le SAC est maintenu activé par la présence de kinétochores non attachés ainsi que par l'absence de tension entre les kinétochores frères. En effet, un seul kinétochore libre de microtubule suffit à activer le SAC (attachement monotélique, Fig. 3) (Rieder et al, 1995) en recrutant massivement les protéines du checkpoint mitotique au kinétochore. Par ailleurs, le SAC doit être déclenché lors des attachements illicites comme l'attachement de deux kinétochores frères aux microtubules provenant d'un seul pôle du fuseau (attachement syntélique, Fig. 3). Le signal pris en compte par le SAC semble être l'absence de tension, ou une tension faible, exercée au niveau des kinétochores lors de ces attachements illicites. L'absence de tension augmente l'instabilité dynamique des microtubules et déstabilise les attachements entre microtubules et kinétochores. De plus, lors d'une absence de tension, la kinase Aurora B phosphoryle ses substrats, provoquant le détachement des microtubules des kinétochores.

Lorsqu'une paire de chromatides sœur est attachée de façon correcte (attachement amphitélique, Fig. 3), les microtubules exercent une tension qui tend à séparer les centromères. La cohésion des chromatides s'oppose à cette force. Il en résulte une tension qui étire les kinétochores et qui a pour effet de diminuer l'instabilité dynamique des microtubules et de stabiliser les attachements. Un modèle propose que la mise sous-tension des kinétochores provoque leur étirement, ce qui aurait pour effet de séparer physiquement la kinase Aurora B (localisée dans la zone chromatiniennne située sous les kinétochores) de ses substrats (protéines du kinétochore). Il en résulterait leur déphosphorylation et la stabilisation de l'attachement (pour revue (Nezi & Musacchio, 2009)). Le recrutement des protéines du SAC au niveau d'un kinétochore cesse dès qu'il s'associe de façon stable avec les microtubules du fuseau. Ainsi, lorsque l'attachement amphitélique de tous les chromosomes est achevé, le SAC n'est plus actif, l'inhibition de l'APC/C est levée et l'anaphase est déclenchée.

L'inactivation du MPF induit la sortie de mitose (décondensation des chromosomes, dépolymérisation des microtubules) (Potapova et al, 2006). Lorsque tous les chromosomes sont bi-orientés, l'activateur Cdc20 de l'APC/C est libéré. L'APC/C agit comme une ubiquitine ligase et induit la polyubiquitinylation de la cycline B, provoquant sa protéolyse par le protéasome (pour revue (Musacchio & Salmon, 2007)). Le MPF est inactivé par la dégradation de la cycline B. Par ailleurs, la séparase est nécessaire au clivage des complexes cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs ensemble. L'activation de la séparase est très régulée : elle est maintenue inactive une grande partie du cycle cellulaire par son association à la sécurine (chaperonne inhibitrice (Uhlmann et al, 2000)) ainsi que par la phosphorylation inhibitrice de la sérine 1126 par la CDK1 (Stemmann et al, 2001). L'inactivation du MPF conduit à la perte de la



phosphorylation inhibitrice de la séparase (Stemmann et al, 2001) et dans le même temps, l'APC/C induit la dégradation de la sécurine. Cette combinaison permet l'activation de la séparase, qui clive la sous-unité kleisine des complexes cohésine, ce qui induit la dissociation des complexes cohésines de la chromatine et permet la disjonction des chromatides sœurs (Fig. 2B).

## ***II. Fonctions biologiques des cohésines***

### **A. Ségrégation des chromosomes**

#### **1) Identifier les chromatides sœurs**

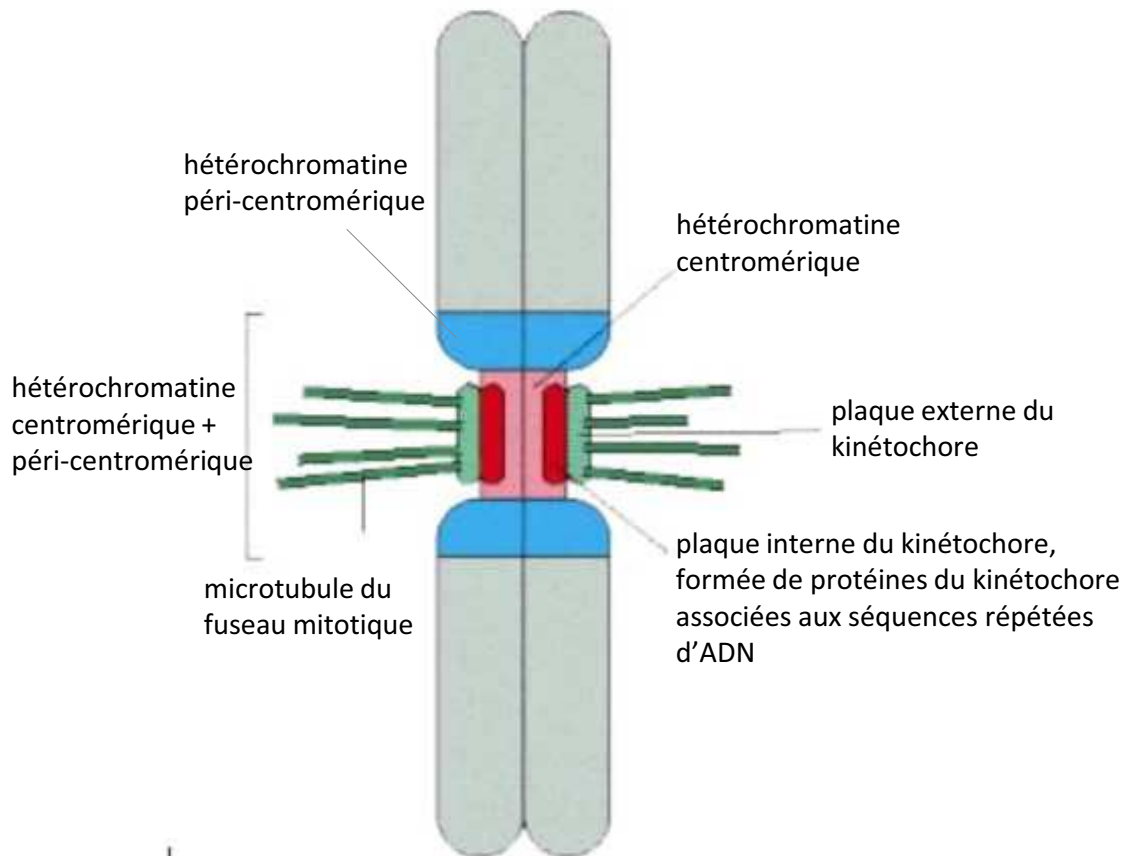
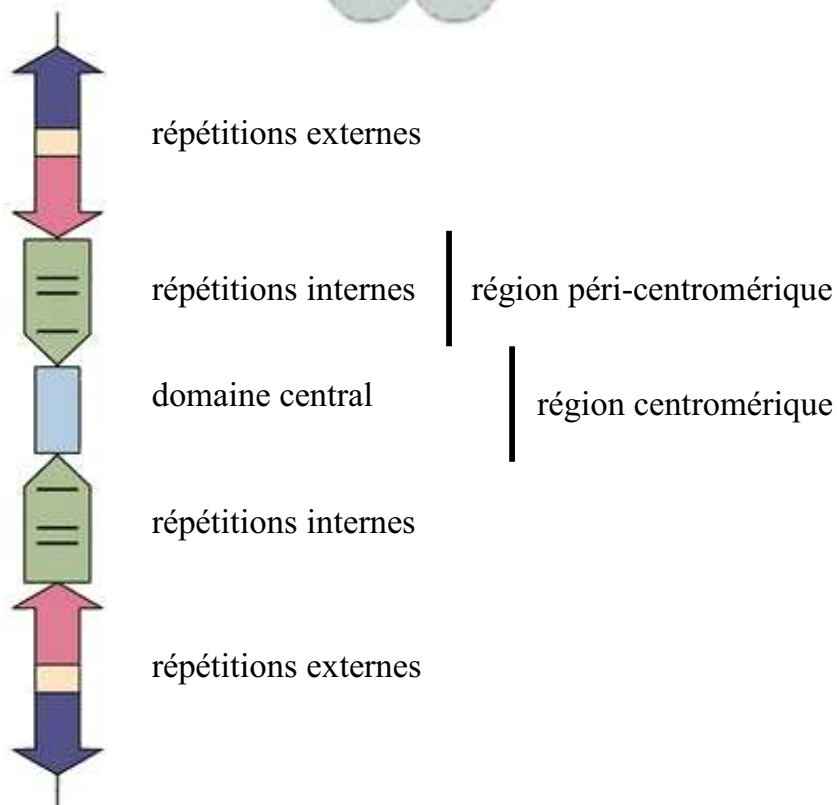
Chez les organismes eucaryotes, toute l'information génétique encodée dans un lot de chromosomes est dupliquée à chaque cycle cellulaire et doit être distribuée fidèlement à chaque cellule fille.

La réplication et la ségrégation du génome sont séparées temporellement. Les chromatides sœurs issues de la réplication doivent donc conserver leur identité de "sœurs" jusqu'à leur séparation. La cohésion assure cette fonction en les maintenant associées depuis leur formation lors de la réplication et jusqu'à leur séparation lors de la mitose. Ce lien est crucial à la ségrégation correcte des chromatides sœurs dans chaque cellule fille. En l'absence de cohésion, la cellule est incapable d'identifier les chromatides sœurs, qui ségrégent alors de façon anormale. Ainsi, des défauts de cohésion peuvent conduire à des ségrégations anormales de chromosomes, génératrices d'aneuploïdie qui peuvent provoquer la mort cellulaire, ou des processus oncogènes, des développements anormaux ou encore des stérilités, avortements spontanés ou trisomies lorsque la lignée germinale est concernée.

#### **2) Géométrie du kinétochore**

##### a/ Promouvoir l'attachement amphitélique en mitose

En mitose, la configuration correcte, qui persiste est celle où les kinétochores frères sont attachés aux microtubules provenant de pôles opposés. La capture des chromosomes est un processus stochastique et plusieurs configurations illégitimes sont observées pendant les phases précoces de la métaphase. Les kinétochores frères peuvent être connectés à un seul pôle (Fig. 3, attachement mono-orienté syntélique) ou un des kinétochores peut être libre de microtubules (Fig. 3, attachement monotélique), ce qui ne permet pas de produire de tension entre les kinétochores frères. La kinase Aurora B déstabilise constamment les interactions kinétochores –

**A****B**

#### Figure 4. Organisation schématique des régions centromériques

**A.** Schéma d'un chromosome dans son ensemble. Les séquences répétées d'ADN riches en AT sont indiquées en rouge. En microscopie électronique, le kinétochore présente une structure tri-lamellaire. Le faisceau de microtubules s'attache au kinétochore en phase M du cycle cellulaire.

**B.** Représentation schématique d'un centromère de *Schizosaccharomyces pombe*.

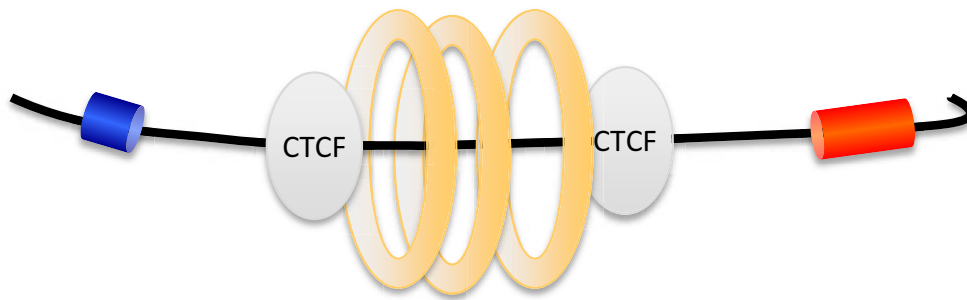
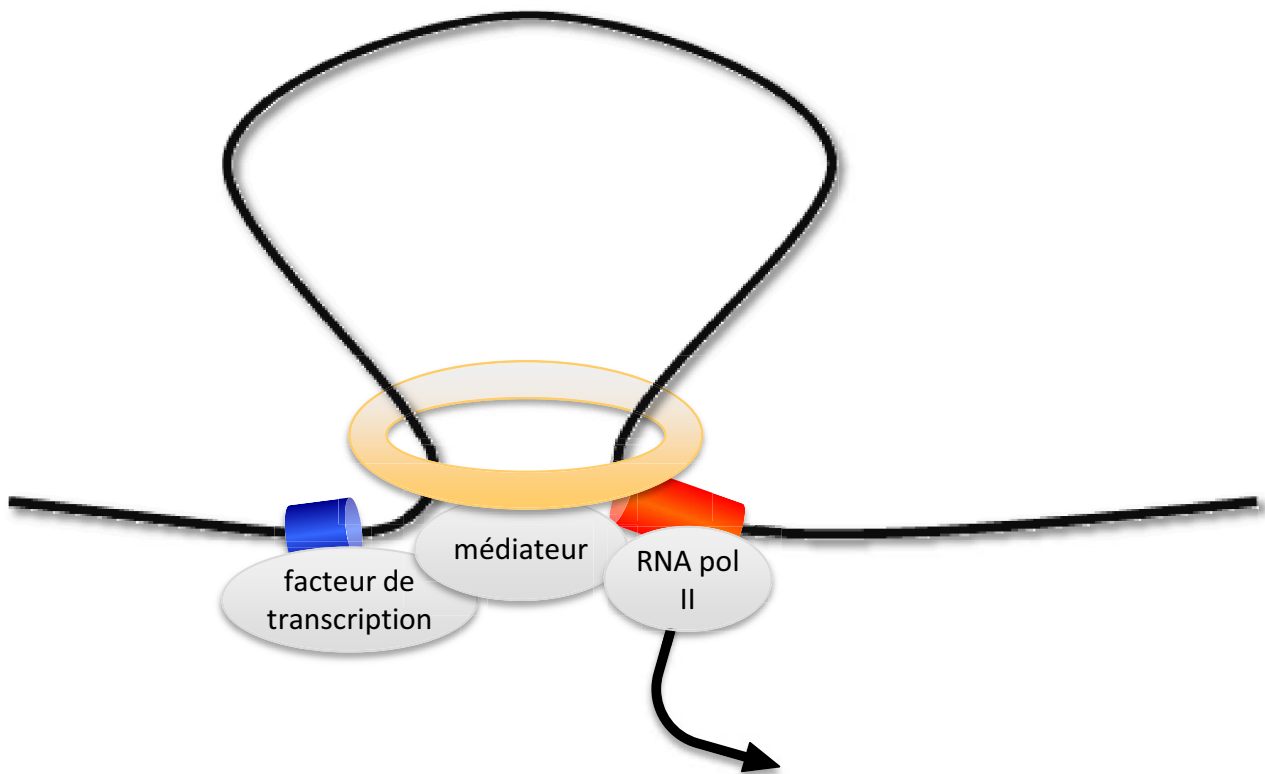
microtubules qui ne génèrent pas de tension entre les kinétochores frères. Les kinétochores libérés sont détectés par le checkpoint mitotique. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la tension produite par l'attachement amphitélisque est probablement la source de la stabilité de cette configuration. C'est la cohésion qui, en résistant aux forces de traction des microtubules, permet de générer une tension qui stabilise les attachements corrects. Le contrôle de l'attachement correct des chromosomes est donc *in fine* dépendent de la cohésion des chromatides sœurs.

#### b/ Promouvoir l'attachement syntélisque en méiose

En première division de méiose (MI) la configuration correcte est un attachement mono-orienté syntélisque, de façon à promouvoir la ségrégation réductionnelle caractéristique de la MI. Il a été clairement montré chez *S. pombe* que ce changement dans le mode d'attachement des kinétochores est une conséquence directe du mode de cohésion. Les centromères de *S. pombe*, comme ceux des métazoaires, sont composés de deux domaines : un domaine central au niveau duquel les kinétochores s'assemblent et un domaine hétérochromatique péri-centromérique (Fig. 4). Un seul kinétochore peut attacher plusieurs microtubules. L'analyse des cohésines chez *S. pombe* a permis de mettre en place un modèle de régulation de la géométrie des kinétochores par les cohésines. Les cohésines mitotiques contenant Rad21 localisent préférentiellement aux régions péri-centromériques (Bernard et al, 2001b; Nonaka et al, 2002; Tomonaga et al, 2000) tandis que les cohésines méiotiques contenant Rec8 se localisent additionnellement au domaine central (Watanabe et al, 2001). Crucialement, la destruction de Rec8 spécifiquement au niveau du domaine central conduit à une division équationnelle et non réductionnelle en méiose I (Sakuno et al, 2009). Réciproquement, un lien artificiel au domaine central permet de restaurer la mono-orientation des kinétochores (Sakuno et al, 2009). Ces données sont en faveur d'un modèle où l'établissement de la cohésion au domaine central va co-orienter les deux kinétochores frères en méiose I, de façon à promouvoir l'attachement bipolaire tandis qu'en l'absence de cette cohésion, les kinétochores frères auraient tendance à s'ouvrir pour adopter une configuration dos-à-dos, favorisant l'attachement bilatéral. En conclusion, l'association des cohésines aux domaines péri-centromériques est corrélée à un attachement bilatéral amphitélisque, tandis que l'association additionnelle des cohésines au domaine central produit un attachement mono-orienté syntélisque.

### **B. Régulation de la transcription**

Le complexe cohésine, découvert pour son rôle dans la cohésion des chromatides sœurs, joue aussi un rôle dans l'expression génique et le développement des organismes, de la levure à

**A****B**

### Figure 5. Fonctions biologiques des cohésines

**A.** Fonction dans l'insulation de la transcription. CTCF est une protéine se fixant à l'ADN jouant le rôle de d'élément de barrière. CTCF bloque l'interaction entre les enhancers (en bleu) et les promoteurs (en rouge), limitant alors l'activité des enhancers à certains domaines chromosomiques. Indépendamment de leur rôle dans la cohésion des chromatides sœurs, les cohésines sont recrutées par CTCF et participent à sa fonction.

**B.** Fonction dans la régulation de la transcription. Les facteurs de transcription fixés aux éléments enhancers peuvent être situés à une grande distance du promoteur basal sur auquel le complexe initiateur de transcription est associé. Cette interaction est facilitée par la formation d'une boucle dans la molécule d'ADN, rapprochant alors l'enhancer et le promoteur. C'est par l'intermédiaire des complexes médiateurs que les facteurs de transcription peuvent interagir avec et activer la machinerie de transcription. Les complexes cohésines ont récemment été impliqués dans la formation ou la stabilisation de cette boucle.

l'Homme. Chez la plupart des organismes, les cohésines s'associent aux chromosomes dès la télophase. Les chromosomes sont donc largement recouverts de cohésines pendant toute l'interphase du cycle cellulaire. Le rôle des cohésines dans la régulation de la transcription a été découvert chez la drosophile et est resté longtemps le seul exemple de cette fonction (Rollins et al, 1999). Dans la drosophile, les cohésines sont nécessaires au développement des yeux et des ailes, à l'identité des segments et la maturation des axones des neurones (pour revue (Dorsett, 2009)). Plus récemment, des mutations dans les gènes codant pour des cohésines ont été reliées à de nombreux déficits développementaux humains, tels qu'une croissance lente, un retard mental, une dysmorphie faciale, l'autisme, des défauts structuraux d'organes observés dans le syndrome de Cornelia de Lange. Des cas sévères de ce syndrome humain ne semblent pas être accompagnés de défauts dans la cohésion des chromatides sœurs et les auteurs suggèrent que la fonction des cohésines dans la régulation de l'expression génétique est dissociable de leur fonction dans la ségrégation des chromosomes (Rollins et al, 2004).

Plus récemment, un lien moléculaire a été mis en évidence entre les cohésines et l'isolateur transcriptionnel CTCF (CCCTC-binding factor). La fixation de CTCF sur ses séquences cibles bloque l'interaction entre l'activateur (enhancer) et le promoteur, limitant ainsi l'activité des enhancers à certains domaines fonctionnels. Au delà de cet effet sur les enhancers, CTCF peut aussi jouer le rôle de barrière en empêchant la propagation de structures hétérochromatiques. Dans les cellules de vertébrés, les cohésines se localisent aux régions hétérochromatiques occupées par l'isolateur et régulateur de transcription CTCF (Fig. 5A) (Parelho et al, 2008; Rubio et al, 2008; Wendt et al, 2008). Lorsque les cohésines sont déplétées par siRNA, des défauts d'isolation transcriptionnelle apparaissent, ce qui indique un lien fonctionnel entre l'isolation et les cohésines (Parelho et al, 2008; Wendt et al, 2008).

Indépendamment de leur localisation aux sites occupés par CTCF, les cohésines occupent des sites enhancers et des promoteurs auxquels sont associés les complexes médiateurs (Kagey et al, 2010). Les médiateurs permettent l'interaction entre les enhancers et la machinerie de transcription, pouvant être éloignés les uns des autres. Les régions co-occupées par les médiateurs et les cohésines sont associées à l'ARN polymérase II, ce qui n'est pas le cas pour les sites cohésines co-occupées avec CTCF (Kagey et al, 2010). Les médiateurs interagissent physiquement avec les cohésines ainsi qu'avec NIPBL, un membre du complexe de chargement des cohésines (Kagey et al, 2010). De façon remarquable, une boucle d'ADN est spécifiquement observée entre les enhancers et les promoteurs co-occupés par les médiateurs et les cohésines. Les auteurs proposent un modèle dans lequel les cohésines associées aux médiateurs, pourraient faciliter la formation ou la stabilisation des boucles d'ADN, qui favoriseraient l'interaction entre les enhancers et les promoteurs pour l'activation de l'expression génique (Fig. 5B).





Chez *S. cerevisiae*, les protéines Smc ont été impliquées dans la fonction de barrière de silencing (Donze et al, 1999). Les cohésines semblent délimiter à la fois l'euchromatine active et l'hétérochromatine silencieuse. La relation entre les cohésines et le *silencing* semble réciproque : des cellules mutées pour certains facteurs de *silencing* montrent des défauts de cohésion tandis que la transcription peut contrôler le déplacement ou la relocalisation des cohésines (Bausch et al, 2007; Chang et al, 2005; Lengronne et al, 2004). Chez *S. pombe*, les cohésines sont impliquées dans la terminaison de la transcription en phase G2, peut-être en bloquant la progression de l'ARN polymérase II (Gullerova & Proudfoot, 2008).

### C. Réparation de l'ADN

Les cellules subissent constamment des dommages à l'ADN provoqués par des sources endogènes (espèces réactives de l'oxygène) ou exogènes (rayonnements, agents mutagènes). En fonction de la nature du dommage, les cellules activent différents mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi que des points de contrôle (checkpoints) ralentissant la progression du cycle cellulaire jusqu'à ce que l'intégrité du génome ait été restaurée. Les cohésines sont impliquées dans certains de ces processus, et notamment dans la réparation des cassures double brin de l'ADN et les checkpoints de phase S et G2.

La réparation efficace des cassures double-brin par recombinaison homologue nécessite les cohésines (études chez la levure (Sjogren & Nasmyth, 2001) et les vertébrés (Atienza et al, 2005; Schmitz et al, 2007; Sonoda et al, 2001)). Une fois l'ADN répliqué, les cassures double-brin de l'ADN sont préférentiellement réparées par recombinaison homologue. Ce mécanisme utilise la molécule d'ADN génétiquement identique (la chromatide sœur intacte) pour réparer efficacement l'ADN et s'assurer de la conservation de l'information de séquence originelle. Il a été proposé que les cohésines facilitent la réparation par recombinaison en maintenant à proximité la chromatide cassée avec sa sœur intacte (Strom et al, 2004) qui sert de matrice à la réparation, et probablement en stabilisant physiquement les régions fragmentées du chromosome. Les mécanismes moléculaires faisant intervenir les cohésines dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN seront abordés en détail par la suite.

Les cohésines sont également impliquées dans la régulation des checkpoints de dommage à l'ADN. En effet, la phosphorylation des résidus S957 et S966 de Smc1 (Kim et al, 2002b; Yazdi et al, 2002) et S1083 de Smc3 (Luo et al, 2008) par la kinase ATM est induite en réponse à un dommage à l'ADN. Ces modifications, ainsi que la phosphorylation constitutive du résidu S1067 de Smc3 (Luo et al, 2008) sont requises pour la fonction du checkpoint de phase S. La surexpression d'un variant non phosphorylable de Smc1 conduit ainsi à la progression de la synthèse d'ADN alors même que la réparation n'a pas été effectuée. Récemment, il a été montré



que les cohésines sont aussi impliquées dans le checkpoint de phase G2 induit par des dommages à l'ADN. Les cohésines sont alors requises pour l'activation de la kinase Chk2, probablement à travers le recrutement d'une protéine médiatrice 53BP1 au site du dommage à l'ADN (Watrin & Peters, 2009). Les auteurs proposent que l'accumulation des cohésines aux sites de cassures serait non seulement nécessaire à la réparation, mais faciliterait aussi le recrutement de protéines du checkpoint, qui activeraient le checkpoint de phase S et de phase G2.

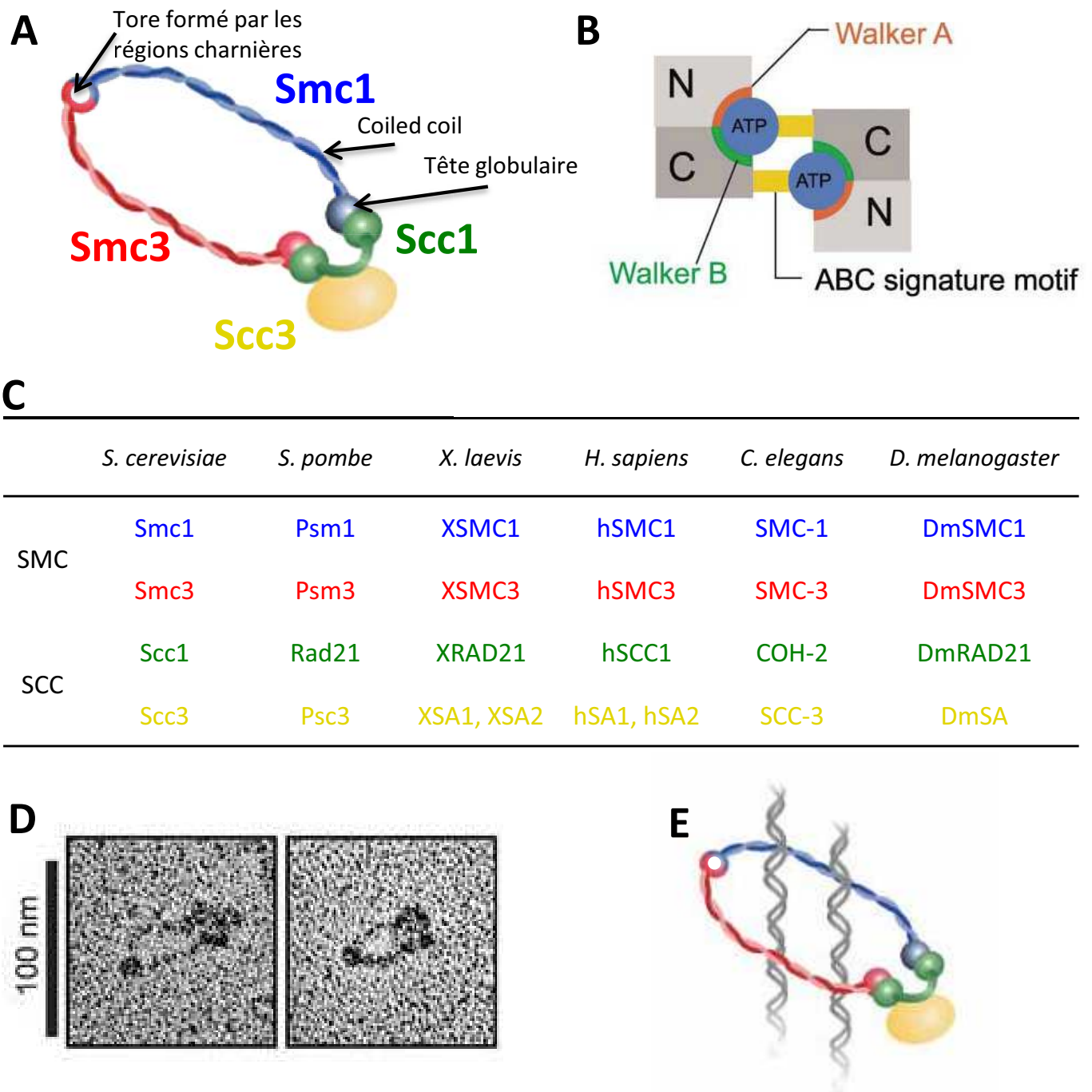
#### **D. Fonction dans l'organisation du centrosome**

De récentes études révèlent que les sous-unités du complexe cohésine (Smc1, Smc3, Rad21, SA1 et SA2) sont aussi localisées aux centrosomes (Gregson et al, 2001; Guan et al, 2008; Hoque & Ishikawa, 2001; Kong et al, 2009; Warren et al, 2000), qui organisent le fuseau mitotique bipolaire. La déplétion des cohésines est associée à l'apparition d'une mitose multipolaire où l'intégrité des pôles du fuseau est compromise. De façon étonnante, ces défauts ne semblent pas une conséquence indirecte d'une perte de cohésion qui pourrait déstabiliser le fuseau mitotique et les centrosomes. Une déplétion préférentielle de la fraction de Rad21 associée aux centrosomes affecte leur intégrité, *a priori* sans altération visible de la structure des chromosomes. (Beauchene et al, 2010).

### **III. La cohésion des chromatides sœurs**

Début 1990, la nature biochimique de la cohésion entre les chromatides sœurs de cellules mitotiques est encore inconnue. La réplication de l'ADN produit des chromatides sœurs intercaténées qui sont résolues en anaphase par la topoisomérase II. Ce n'est pourtant pas cette seule intercaténation de molécules d'ADN qui maintient les chromatides sœurs ensemble en phases G2 et M, car la cohésion entre des minichromosomes circulaires peut être maintenue en l'absence de caténation en métaphase (Guacci et al, 1994; Koshland & Hartwell, 1987).

Afin d'identifier les protéines requises à la cohésion des chromatides sœurs, il a été isolé des mutants perdant des chromosomes à une fréquence importante, et capables de séparer les chromatides sœurs en l'absence de l'APC/C (Michaelis et al, 1997; Toth et al, 1999). Ces travaux ont abouti à la découverte d'une première classe de molécules, qui composent le complexe cohésine : Smc1, Smc3, Scc1 et Scc3 (SMC pour Structural Maintenance of Chromosome et SCC pour Sister Chromatid Cohesion, Fig. 6A) (Michaelis et al, 1997; Toth et al, 1999). Une deuxième classe de molécules est nécessaire au recrutement des cohésines à la chromatine : il s'agit du complexe de chargement des cohésines Scc2/Scc4 (Ciosk et al, 2000; Michaelis et al, 1997). La protéine Eco1 (Establishment of Cohesion) appartient à une troisième classe de molécules essentielle à la cohésion des chromatides sœurs (Skibbens et al, 1999; Toth



**Figure 6. Le complexe cohésine**

**A.** Le complexe cohésine forme un anneau protéique composé de quatre sous-unités conservées. (Adapté de Haering and Nasmyth, 2003)

**B.** La formation de coiled-coils intramoléculaires rassemble le N et C terminal globulaire de chaque protéine Smc pour former un demi-domaine ATPase de type ABC. La dimérisation des têtes des Smc est dépendante de la fixation d'ATP par les motifs Walker A et Walker B d'une protéine Smc ainsi que par le motif ABC de l'autre protéine Smc. Cette dimérisation produit une ATPase fonctionnelle. (D'après Arumugam et al., 2003)

**C.** Homologues des quatre sous-unités du complexe cohésine dans différents organismes modèles.

**D.** Des images obtenues en microscopie électronique montrent que l'hétérodimère Smc1-Smc3 peut prendre la forme d'un anneau. (D'après Anderson et al., 2002)

**E.** Illustration du modèle d'encerclage topologique de l'ADN dans l'anneau de cohésine. (D'après Haering and Nasmyth, 2003)

et al, 1999). Eco1 n'est pas un membre du complexe cohésine et n'est pas requise au recrutement des cohésines à la chromatine. En revanche, Eco1 interagit génétiquement avec la machinerie de réplication (Skibbens et al, 1999) et les mutants conditionnels d'*ECO1* présentent un phénotype de "cohésines sans cohésion". Les cellules séparent précocement les chromatides sœurs bien que les chromatides soient recouvertes de cohésines (Lengronne et al, 2006; Milutinovich et al, 2007; Noble et al, 2006; Skibbens et al, 1999; Toth et al, 1999). La seule présence des cohésines sur la chromatine ne suffit donc pas à assurer la cohésion des chromatides sœurs. Ce résultat a fondamentalement modifié la manière d'envisager la cohésion des chromatides sœurs. Par ailleurs, des expériences de microscopie électronique ont révélé que le complexe cohésine forme un anneau (Fig. 6D) (Haering et al, 2002). Cette découverte ainsi que des données biochimiques ont amené les auteurs à proposer le modèle de l'encerclement topologique des deux molécules d'ADN sœurs par l'anneau de cohésine (Fig. 6E) (Gruber et al, 2003; Nasmyth & Haering, 2005).

Grâce à ces travaux et ceux qui ont suivi, il a été découvert que la cohésion des chromatides sœurs nécessite les activités coordonnées du complexe cohésine, essentiel à la création et au maintien de la cohésion ; d'un complexe permettant le chargement des cohésines sur les chromosomes et d'un grand nombre de facteurs liés à la réplication, nécessaires à la création de la cohésion. Dans l'ensemble, les mécanismes de cohésion des chromatides sœurs sont conservés mais il existe des variantes suivant les organismes. La fonction de ces différentes classes de molécules est détaillée ci-après.

### **A. Le complexe cohésine et les modèles de cohésion**

Le complexe cohésine est conservé de la levure à l'Homme. Il consiste en au moins quatre sous-unités formant un anneau protéique : Smc1, Smc3, Scc1 et Scc3 (Fig. 6).

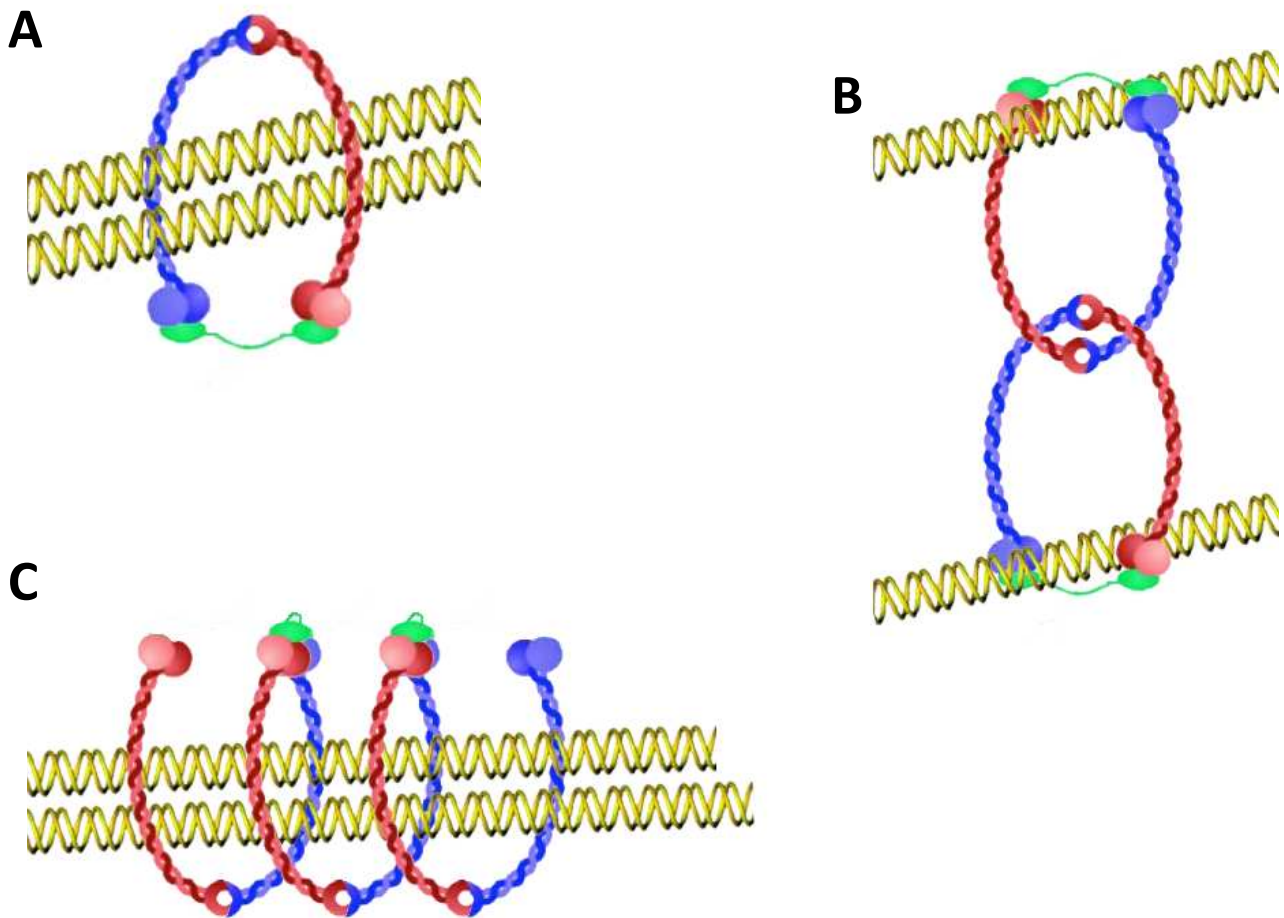
Les sous-unités Smc1 et Smc3 appartiennent à la famille des SMC (Structural Maintenance of Chromosome), retrouvée dans tous les organismes de la bactérie à l'Homme. Les protéines SMC de bactérie (MukB) sont impliquées dans la ségrégation des chromosomes et la maintenance de la stabilité du génome (pour revue (Graumann & Knust, 2009)). Chez les eucaryotes, Smc2 et Smc4 sont membres du complexe condensine, indispensable à l'organisation mitotique des chromosomes tandis que Smc5 et Smc6 sont impliquées dans la réparation des cassures de l'ADN (pour revue, (Losada & Hirano, 2005)). Toutes les protéines SMC forment un dimère, soit un homodimère pour les SMC bactériennes, soit un hétérodimère pour les cohésines ou encore pour les condensines. Les protéines SMC ont cinq domaines : deux régions globulaires N et C terminales séparées par un long segment coiled-coil (45 nm) au centre duquel se trouve une région charnière. La résolution d'une partie de la structure cristallographique d'une protéine



SMC de bactérie, ainsi que l'étude de Smc1 et Smc3 par microscopie électronique, a montré que les protéines SMC (dont Smc1 et Smc3) se replient sur elles-mêmes le long de leurs régions coiled-coil, amenant à proximité les domaines N et C terminaux (Haering et al, 2002). Ceci unit le domaine N-terminal de type Walker A (site de fixation à l'ATP) au domaine C-terminal de type Walker B pour former un demi-domaine ATPase de type ABC (ATP-binding cassette, le site de liaison du nucléotide) ; l'autre demi-domaine étant apporté par la seconde protéine SMC (Fig. 6B). Les régions charnières des deux protéines SMC se dimérisent pour former une structure en V avec les ATPases à l'apex de chaque bras et une structure dimérique en forme de tore à sa base. Des images en microscopie électronique (Fig. 6D) montrent que cet hétérodimère peut prendre la forme d'un anneau (Haering et al, 2002). Les dimères de SMC forment un anneau fermé par l'association réciproque de leurs domaines ATPase. Cette dimérisation des domaines ABC des deux protéines SMC nécessite la fixation de deux molécules d'ATP.

Il a été montré que Scc1 interagit avec la tête globulaire de Smc3 par son extrémité N-terminale, tandis que la partie C-terminale s'associe avec la tête globulaire de Smc1 de manière ATP dépendante (Gruber et al, 2003; Haering et al, 2002). Les auteurs proposent que ces interactions permettraient à la kleisine Scc1 (du grec fermeture) de relier les deux domaines globulaires pour former un anneau tripartite. Toutefois, des études mettant à profit la technique de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) ont récemment suggéré que la partie C-terminale de Scc1 pouvait être positionnée à égale distance des têtes de Smc1 et de Smc3 (Mc Intyre et al, 2007). Indépendamment de son interaction avec les SMC, Scc1 interagit par sa région C-terminale à Scc3 (Haering et al, 2002; Mc Intyre et al, 2007). La structure ainsi que la fonction de cette dernière sous-unité sont peu connues bien que Scc3 soit essentielle à la cohésion et à la viabilité cellulaire. Scc3 contient des répétitions HEAT, définissant probablement des motifs d'interaction protéine-protéine.

Il a été proposé que la cohésion pourrait résulter de l'encerclement topologique des deux chromatides sœurs (Gruber et al, 2003; Nasmyth & Haering, 2005). En effet, le diamètre interne de l'anneau de cohésine qui avoisine les 35 nm est en théorie suffisant pour emprisonner deux fibres de chromatine d'environ 10 nm chacune. En outre, il existe plusieurs arguments expérimentaux qui appuient fortement cette conception de la cohésion. (1) L'association des cohésines à la chromatine résiste à de très fortes concentrations salines alors que la simple digestion de l'ADN par une nucléase suffit à libérer les cohésines (Ciosk et al, 2000). (2) À l'anaphase, le clivage de la sous-unité Scc1 par la séparase entraîne l'ouverture de l'anneau de cohésine, la dissociation des cohésines des chromosomes et l'élimination de la cohésion (Gruber et al, 2003; Oliveira et al, 2010; Uhlmann et al, 2000; Weitzer et al, 2003). (3) L'ouverture de l'anneau de cohésine par la création de sites de coupure ectopiques au niveau du domaine coiled-



**Figure 7. Trois modèles d'interaction des complexes cohésines avec les deux molécules d'ADN**

**A.** Dans le modèle "embrace", les complexes cohésines encerclent les deux brins d'ADN.

**B.** Le modèle "snap" propose quant à lui que chaque complexe cohésine peut s'associer à un des deux brins d'ADN. L'attachement résulte de l'oligomérisation des complexes cohésine.

**C.** Dans le modèle "bracelet", l'oligomérisation des complexes cohésines pourrait former des filaments, utilisés dans de multiples configurations pour promouvoir l'attachement. Un mécanisme possible est illustré.

(Schémas adaptés de Gruber et al., 2006)



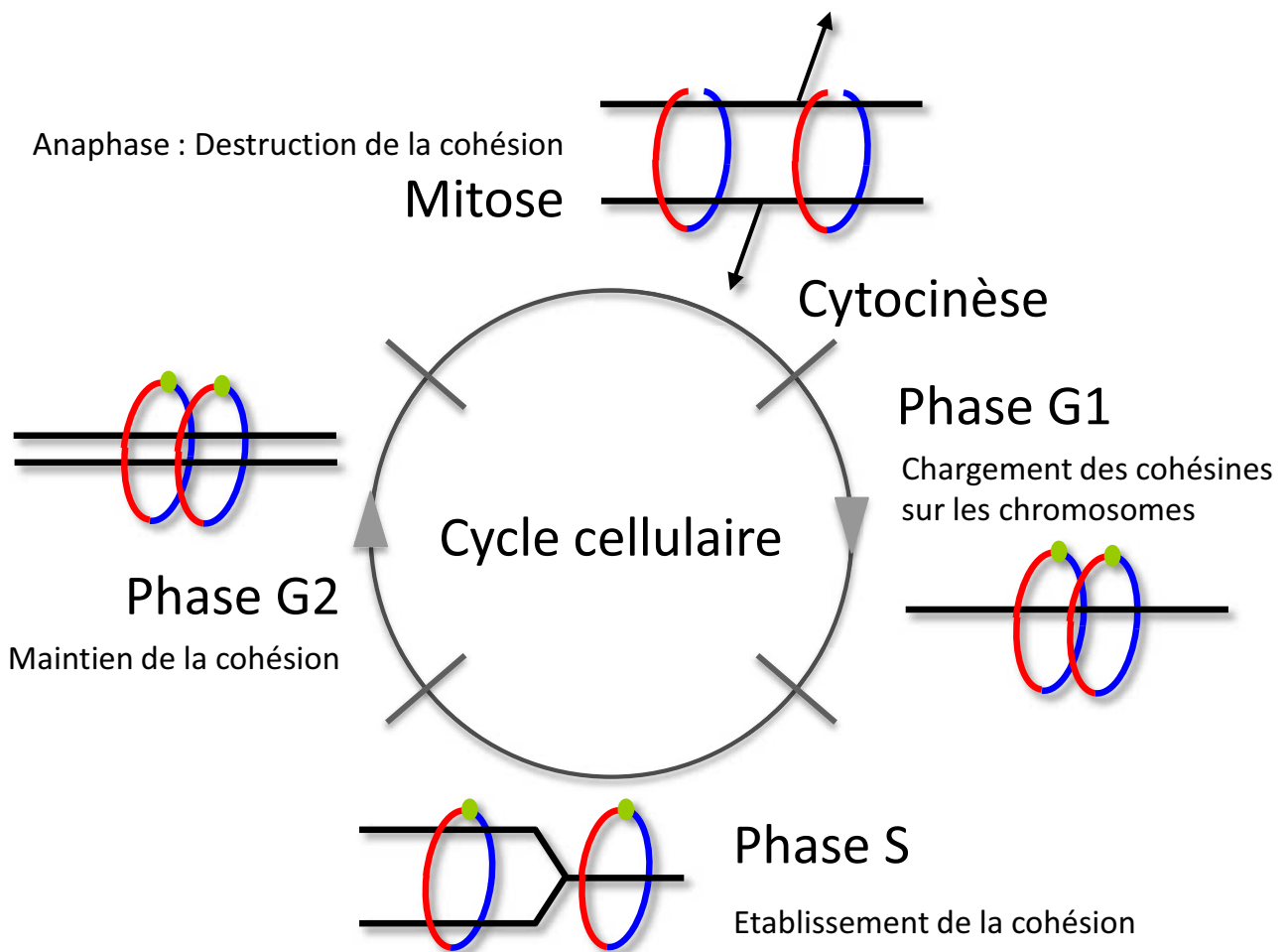
coil de la sous-unité Smc3 suffit à dissocier les cohésines de la chromatine et à éliminer la cohésion (expériences *in vitro* (Gruber et al, 2003; Ivanov & Nasmyth, 2007) et *in vivo* (Gruber et al, 2003; Uhlmann et al, 2000)). (4) L'interaction entre les cohésines et un minichromosome circulaire est rompue par simple clivage de l'anneau de cohésine ou de l'ADN (Ivanov & Nasmyth, 2005), ce qui indique que l'association entre les cohésines et la chromatine est topologique. (5) Enfin, deux minichromosomes circulaires frères sont piégés dans un anneau de cohésine. L'équipe de Kim Nasmyth a pour cela utilisé des pontages en des sites spécifiques pour créer des anneaux de cohésine covalamment fermés (Haering et al, 2008). Les minichromosomes répliqués dans la levure sont traités par l'agent pontant. Cette procédure produit des structures dimériques ADN-cohésines qui sont résistantes à la dénaturation protéique mais rompues par le clivage de l'anneau protéique. Les anneaux de cohésines enserrant donc les minichromosomes circulaires frères, suggérant qu'il en est de même pour les chromatides sœurs d'un chromosome naturel.

Ensemble, ces données montrent que l'interaction entre les cohésines et la chromatine est vraisemblablement de type topologique, ce qui est en accord avec l'idée selon laquelle la cohésion des chromatides sœurs serait réalisée *via* leur encerclement par les anneaux de cohésine. Le complexe cohésine maintiendrait ainsi les deux chromatides sœurs ensemble, dans le même anneau (Fig. 6E).

Le modèle de l'anneau unique est étayé par des données biochimiques solides mais n'exclue toutefois pas que d'autres configurations co-existent. Plusieurs modèles d'interaction entre les cohésines et avec la chromatine ont été proposés sur la base de la découverte de dimères dans des molécules non cohésines de la famille SMC (Fig. 7) (pour revue (Huang et al, 2005)). Il a par exemple été postulé que la cohésion pouvait être effectuée par l'interaction de deux anneaux distincts, l'un ayant encerclé une chromatide et l'autre sa sœur. En effet, il a été montré par des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules humaines, qu'une version étiquetée de Rad21 co-précipite la protéine Rad21 endogène (Zhang et al, 2008b).

## **B. Le cycle de la cohésion**

La cohésion des chromatides sœurs est établie en phase S, lors de la réplication de l'ADN, puis elle est maintenue en phase G2 et ce jusqu'à l'anaphase, où elle est détruite, permettant à la cellule de ségréger les chromatides sœurs dans chaque cellule fille (Fig. 8). Les différentes étapes sont décrites ci-après.



### Figure 8. Le cycle de la cohésion

Le chargement des cohésines sur les chromosomes non répliqués s'effectue de la télophase à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire, suivant les organismes. Durant un cycle cellulaire normal, l'établissement de la cohésion a lieu seulement en phase S, par une réaction couplée à la réplication. La cohésion entre les deux chromatide sœurs doit être maintenue tout au long de la phase G2 et est finalement détruite en mitose pour permettre la ségrégation des chromosomes.

## 1) Chargement pré-répliatif

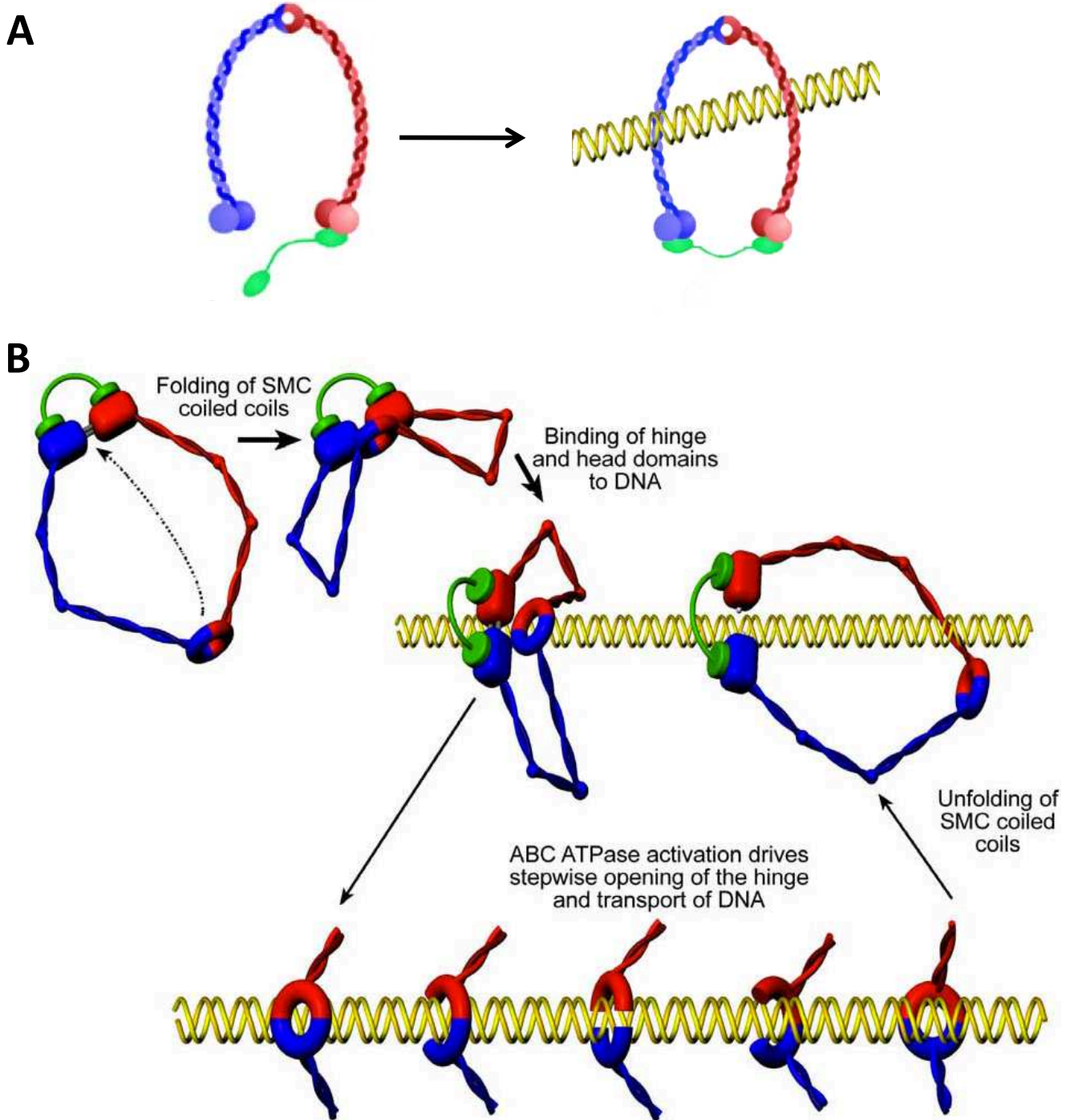
Le chargement pré-répliatif des anneaux de cohésines sur la chromatine est un pré-requis indispensable à l'établissement de la cohésion au cours de la phase S. Chez les vertébrés, le chargement pré-répliatif intervient en télophase. En revanche, chez *S. cerevisiae*, il a lieu en phase G1.

### 1/ Hydrolyse d'ATP

Le chargement des cohésines sur la chromatine nécessite l'hydrolyse d'ATP par les molécules SMC. En effet, dans un mutant de Smc1 incapable d'hydrolyser l'ATP, les complexes cohésines ne sont pas chargés sur les chromosomes en phase G1 (Arumugam et al, 2003; Weitzer et al, 2003). Le mécanisme général des transporteurs de type ABC n'est pas élucidé, mais de solides données structurales et biochimiques supportent un modèle où la fixation de l'ATP et son hydrolyse serait couplée à un changement conformationnel du transporteur. Par analogie, l'hydrolyse de l'ATP par les têtes globulaires des SMC permettrait l'ouverture transitoire de l'anneau de cohésines permettant l'entrée de la fibre chromatinienne et donc le chargement du complexe cohésine. Il a été proposé que la position "ouverte" du complexe cohésine (structure en V), permettrait l'entrée de l'ADN dans l'anneau et serait conférée par la rupture transitoire de la liaison Scc1-Smc lors de l'hydrolyse de l'ATP (Fig. 9A). Ce modèle a été rejeté par des expériences menées dans la levure *S. cerevisiae* (Gruber et al, 2006). Les auteurs ont montré que la fusion du domaine C-terminal de Smc3 avec le domaine N-terminal de Scc1, combinée à l'association des domaines C-terminaux de Scc1 et Smc1 est viable et permet l'association des cohésines à la chromatine (Gruber et al, 2006). À l'inverse, lorsque les régions charnières de Smc1 et Smc3 sont remplacées par d'autres domaines d'interaction protéine – protéine, les anneaux formés ne sont pas associés à la chromatine, suggérant que le site d'entrée de l'ADN dans l'anneau correspondrait aux régions charnières de l'hétérodimère Smc1/Smc3 (Gruber et al, 2006). Les auteurs proposent un modèle dans lequel l'hydrolyse de l'ATP au niveau des têtes globulaires des SMC induirait l'ouverture d'un tore formé par les régions charnières à l'autre extrémité des deux molécules SMC (Fig. 9B).

### 2/ Complexe de chargement

Le chargement des cohésines sur la chromatine nécessite également l'intervention du complexe de chargement des cohésines Scc2/Scc4 (Ciosk et al, 2000). La séquence primaire de Scc2 est très conservée, à l'inverse de Scc4, bien moins conservée (Bernard et al, 2006; Seitan et al, 2006; Watrin et al, 2006). On ne connaît pas le mécanisme d'action de Scc2 et Scc4 mais dans les mutants correspondants, le complexe cohésine est normalement formé mais n'est pas



### Figure 9. Modèle du chargement de l'anneau sur la chromatine en G1

**A.** Modèle d'entrée de l'ADN dans l'anneau de cohésine au niveau des têtes globulaires des protéines SMC. La rupture transitoire de la liaison entre Scc1/3 et les protéines Smc permettrait de faire pénétrer l'ADN à l'intérieur de l'anneau. (Adapté de Gruber et al., 2006)

**B.** Modèle du transport de l'ADN au travers des charnières des protéines Smc. Le repliement des SMC pourrait permettre l'interaction de leurs régions charnières avec leurs têtes globulaires. Lors d'un contact avec l'ADN, la liaison ou l'hydrolyse de l'ATP génère un changement conformationnel transmis aux domaines charnières par les coiled-coils, la double hélice d'ADN, ou directement entre les têtes et les régions charnières. L'entrée de l'ADN dans le canal central de la charnière à demi ouverte pourrait induire un détachement transitoire du reste de l'interface des domaines charnière. La fermeture des charnières après le passage de la double hélice d'ADN pourrait finalement encercler l'ADN dans l'anneau de cohésine. (D'après Gruber et al., 2006)

associé aux chromosomes en fin de phase G1 et en conséquence la cohésion ne peut être établie à l'issue de la phase S (Ciosk et al, 2000).

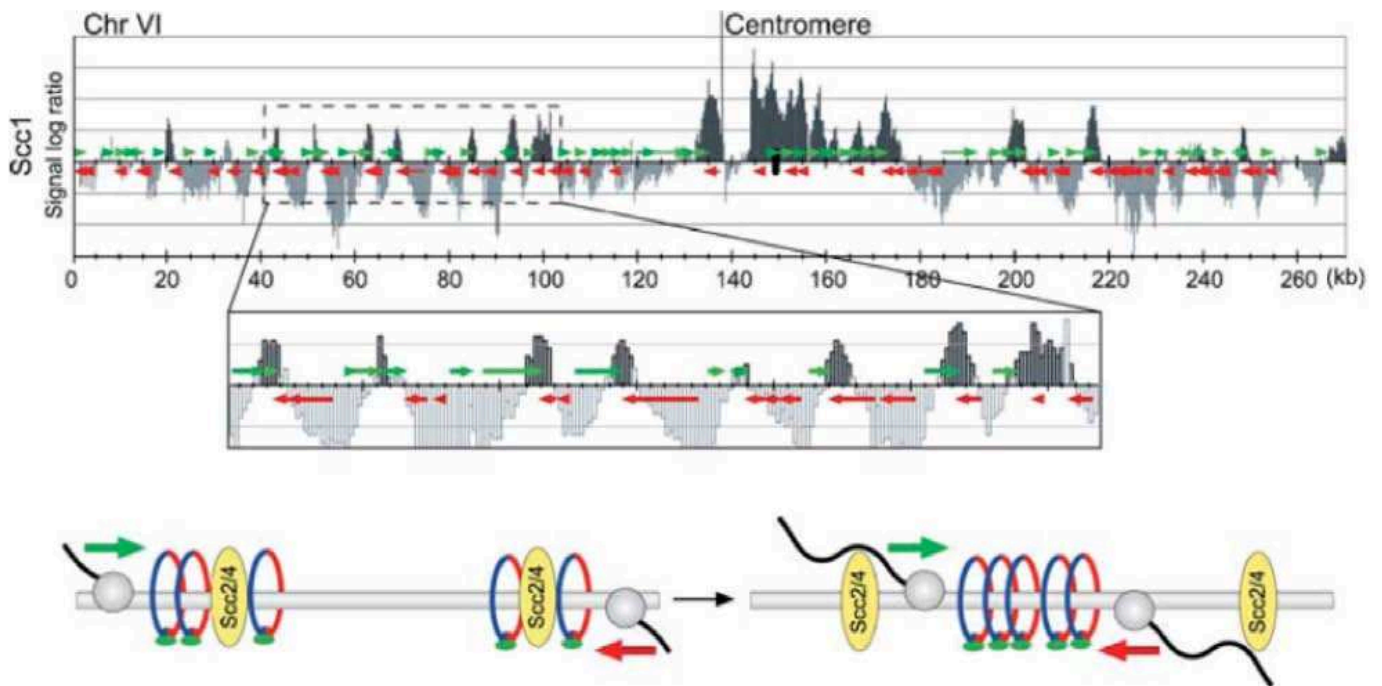
La localisation des complexes de chargement est distincte d'un organisme à l'autre. Chez *S. cerevisiae*, Scc2 et Scc4 sont localisées aux télomères, aux centromères et en des sites discrets le long des bras de chromosomes. La localisation chromosomique des complexes de chargement chez *S. cerevisiae* a été corrélée à des zones de forte activité transcriptionnelle (Lengronne et al, 2004). Cependant, cette observation n'a pas été reproduite dans une autre étude utilisant un mode d'étiquetage de la protéine distinct (Kogut et al, 2009). La corrélation entre les sites de forte activité transcriptionnelle et les sites d'association des complexes de chargement a également été observée dans la levure *S. pombe* (Schmidt et al, 2009). Chez la drosophile, le facteur de chargement Nipped-B (Scc2) s'associe préférentiellement aux régions transcrites et coïncide ainsi aux sites occupés par l'ARN polymérase II (Misulovin et al, 2007). Les auteurs suggèrent que la transcription pourrait faciliter l'association des complexes de chargement, peut-être en fournissant un niveau de décompaction de la chromatine adéquat. Enfin, des études réalisées chez le xénope montrent que dans cet organisme l'association de SCC2 nécessite initialement la présence des complexes pré-répliatifs aux origines de réplication (Takahashi et al, 2004).

On ne connaît pas le mécanisme par lequel les complexes de chargement promeuvent l'association des cohésines à la chromatine. On peut imaginer que ces complexes jouent le rôle de chaperonnes pour faciliter l'entrée de l'ADN dans l'anneau. Ces protéines pourraient aussi faciliter l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à l'association des cohésines à la chromatine. On peut encore émettre l'hypothèse que ces complexes pourraient attirer les complexes cohésines vers la chromatine.

### 3/ Localisation des complexes cohésine

Les cohésines ne sont pas distribuées de façon homogène sur les chromosomes. Les cohésines sont préférentiellement localisées dans les régions péri-centromériques et à plus faible densité sur les bras de chromosome. L'abondance du complexe de chargement aux centromères pourrait être responsable de l'association importante des cohésines dans cette région mais généralement, les sites occupés par le complexe de chargement sont distincts des sites occupés par les cohésines (Ciosk et al, 2000; Lengronne et al, 2004). Il a été proposé chez *S. cerevisiae* que les cohésines sont initialement localisées aux sites occupés par les complexes de chargement puis déplacées par l'activité transcriptionnelle pour s'accumuler dans les zones intergéniques de paires de gènes convergents (Fig. 10) (Lengronne et al, 2004).

Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, les CARs, (Cohesin-Associated Region) sont distribuées en moyenne tous les 15 kb (Glynn et al, 2004; Lengronne et al, 2004). Les CARs ne partagent pas de séquence spécifique, mais ont pourtant tendance à être situées dans les régions



**Figure 10. Localisation préférentielle des cohésines aux sites de transcription convergente**

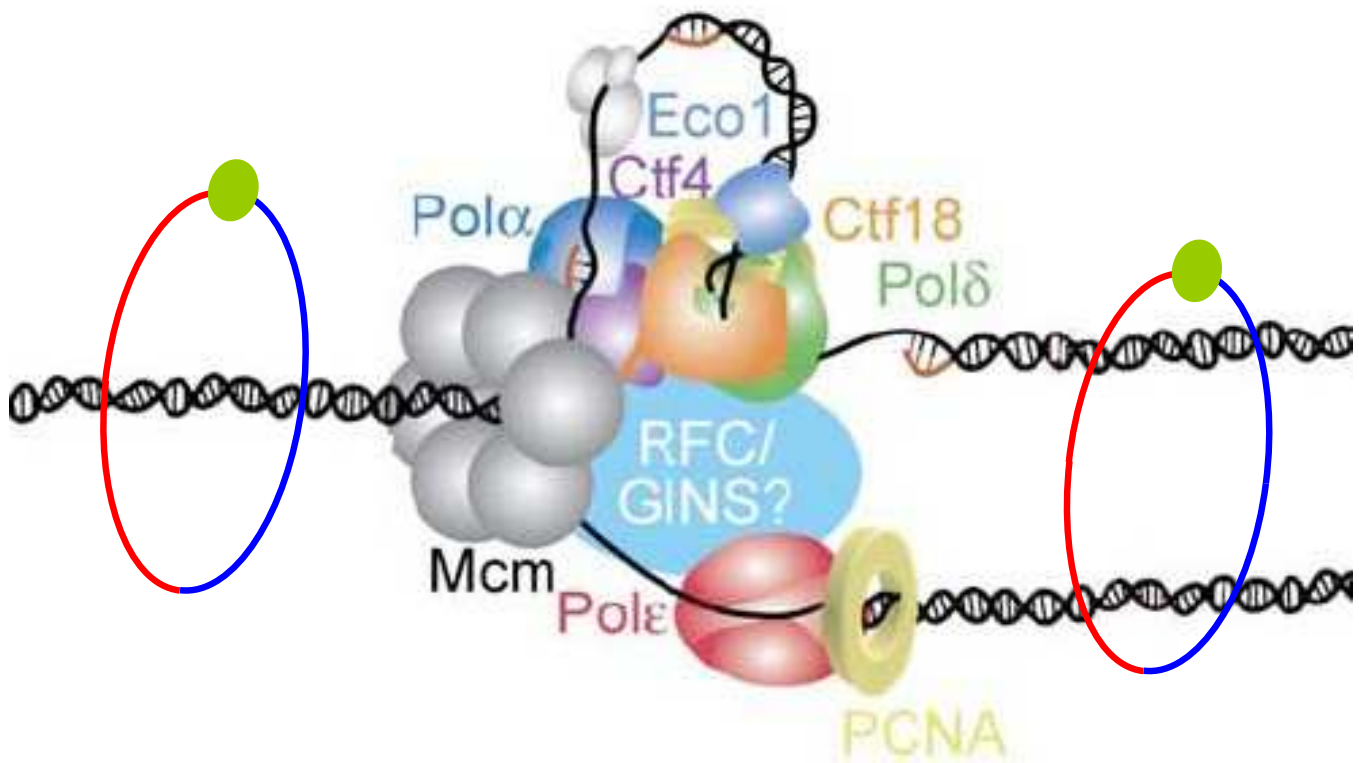
L'image montre la distribution des cohésines le long du chromosome IV de *S. cerevisiae* obtenue par immunoprécipitation de chromatine (*via* Scc1) et hybridation d'un microarray pan-génomique. Les complexes cohésines sont concentrés aux centromères et sont enrichis aux zones de convergence transcriptionnelle le long des bras des chromosomes. Les cohésines pourraient être déplacées de leur site de chargement (Scc2/4) par le mouvement de la machinerie de transcription. Les cadres ouverts de lecture sont représentés par des flèches vertes et rouges. (D'après Kim Nasmyth and Christian H. Haering, 2005)

intergéniques, ce qui n'est toutefois pas exclusif. Comme mentionné précédemment, les cohésines chez *S. cerevisiae* sont localisées principalement au niveau des régions intergéniques de gènes convergents (Fig. 10) (Glynn et al, 2004; Lengronne et al, 2004). À l'inverse, les cohésines s'associent préférentiellement aux régions de transcription actives chez la drosophile (Misulovin et al, 2007). En conclusion, il semble que la transcription dicte, ou modifie la localisation des cohésines.

Des facteurs additionnels contribuent au chargement ou à la rétention des cohésines en des régions particulières du génome, et notamment des marques sur la chromatine. Chez *S. pombe* l'homologue Swi6 de HP1 (Hétérochromatin Protein 1) est un composant essentiel de l'hétérochromatine localisé aux domaines hétérochromatiques (répétitions centromériques, *loci* silencieux du mating-type et télomères). Les cohésines mitotiques sont fortement enrichies aux régions hétérochromatiques, et cet enrichissement est dépendant de Swi6 (Bernard et al, 2001b; Nonaka et al, 2002). Le mécanisme par lequel Swi6 provoque un enrichissement en cohésines est inconnu. Il a cependant été montré que Swi6 interagit en double hybride avec la sous-unité Psc3 des cohésines, suggérant que Swi6 pourrait recruter directement les cohésines (Nonaka et al, 2002). Dans la levure *S. cerevisiae*, l'histone deacétylase Sir2 est nécessaire à l'association des cohésines à la région du type sexuel (*mating-type*) (Chang et al, 2005) tandis que le variant centromérique Cse4 de l'histone H3 et d'autres protéines du kinétochore sont requis pour l'enrichissement péri-centromérique des cohésines (Eckert et al, 2007). Dans l'espèce humaine, l'association des cohésines aux chromosomes est influencée par la méthylation de l'ADN {Choi, 2010 #454}, ainsi que par des facteurs de remodelage de la chromatine (Hakimi et al, 2002).

## 2) Établissement de la cohésion

Le chargement des cohésines à la chromatine n'est pas restreint à la phase G1. En effet, les cohésines peuvent être recrutées sur les chromosomes en phase G2, mais sont alors incapables d'établir un lien physique entre les chromatides sœurs (Lengronne et al, 2006; Uhlmann & Nasmyth, 1998). Le recrutement des cohésines est donc nécessaire mais pas suffisant à l'établissement de la cohésion, indiquant qu'il existe une étape en plus du chargement qui est indispensable pour que les cohésines puissent réaliser un lien physique entre les chromatides sœurs. L'établissement de la cohésion au cours d'un cycle cellulaire non perturbé est normalement restreint à la phase S. La cohésion peut être cependant créée *de novo* lors de cassures double-brin de l'ADN. Ces deux cas de figure sont décrits ci-après.



**Figure 11. L'établissement de la cohésion à la fourche de réplication**

À l'origine de la fourche, l'hélicase Mcm ouvre le double brin d'ADN. Le facteur Ctf4 contrôle l'interaction entre l'hélicase et la primase (ADN polymérase  $\alpha$ ). La protéine PCNA (facteur de processivité des ADN polymérases) est chargée sur l'ADN par le complexe RFC, ou alternativement par RFC<sup>Ctf18</sup>. Il a été proposé que PCNA puisse recruter Eco1 aux fourches de réplication. Dans le modèle du passage de la fourche de réplication au travers des anneaux de cohésines préalablement associés à la chromatine, chaque composant de la machinerie de réplication doit passer à l'intérieur des cohésines. La dimension totale et l'arrangement du réplisome sont encore inconnus. (D'après Lengronne et al., 2006)



### a/ Réplication

Lors de l'entrée en phase S, le complexe pré-répliatif (pré-RC) assemblé aux origines de réplication (Diffley et al, 1995; Rowles et al, 1999) et composé de d'ORC 1-6 (Bell & Stillman, 1992; Rabitsch et al, 2001), de Cdc6, Cdt1 (Gillespie et al, 2001) et de l'hélicase MCM2-7, est converti en un complexe d'initiation de la réplication. Ce complexe d'initiation promeut l'ouverture et le déroulement de l'ADN ainsi que l'association de multiples ADN polymérase (Diffley et al, 1995). Le facteur d'initiation et d'élongation Cdc45 et GINS (Go, Ichi, Nii, and San) sont des cofacteurs de Mcm2-7 (Moyer et al, 2006). Des facteurs accessoires s'assemblent à ce complexe afin de former le complexe de progression du réplisome (RPC) (Gambus et al, 2006). Lorsque le double brin d'ADN est ouvert, la synthèse d'ADN est initiée par l'ADN polymérase  $\alpha$  et les brins précoce (*leading*) et tardif (*lagging*) sont synthétisés séparément par les ADN polymérase  $\epsilon$  et  $\delta$  respectivement (Nick McElhinny et al, 2008) (Fig. 11). Les fragments d'ADN-ARN du brin tardif (fragments d'Okazaki) sont transformés en un brin continu d'ADN sous l'action combinée des nucléases Fen1 (flap endonuclease 1) et Dna2 ainsi que de l'ADN polymérase  $\delta$ . L'ADN ligase I fait la liaison entre les fragments d'ADN obtenus (pour revue (Balakrishnan et al, 2010)).

Le facteur PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ou *sliding clamp* est le facteur de processivité de l'ADN polymérase dans les cellules eucaryotes. La processivité est assurée par l'encerclement de l'ADN par PCNA, créant ainsi un lien topologique avec l'ADN. Le facteur de chargement ou *clamp loader* RFC (Replication factor C) charge PCNA sur l'ADN par un mécanisme dépendant de l'ATP. Le complexe RFC est un hétéropentamère composé des sous-unités Rfc1-5. Il existe des complexes alternatifs de RFC dans lesquels la sous-unité Rfc1 est substituée à des sous-unités Rfc1 alternatives (pour revue, (Majka & Burgers, 2004)). Le complexe RFC<sup>Rad24</sup> est par exemple requis pour le checkpoint de dommage à l'ADN. Le complexe RFC<sup>Ctf18</sup> existe sous formes : une configuration à cinq sous-unités et une à sept sous-unités, contenant alors spécifiquement Ctf8 et Dcc1 (Mayer et al, 2001).

### b/ Facteurs du réplisome nécessaires à l'établissement de la cohésion

Chez *S. cerevisiae*, de nombreux facteurs liés à la machinerie de réplication ont été impliqués dans l'établissement de la cohésion. Parmi eux, seule la protéine Eco1 est essentielle à la création de la cohésion. Les facteurs non-essentiels impliqués dans la cohésion ont été divisés en deux groupes par analyse d'épistasie chez *S. cerevisiae* (Xu et al, 2007).

Le premier groupe inclut les sous-unités du complexe alternatif RFC<sup>Ctf18</sup> (Ctf18, Ctf8 et Dcc1) (Hanna et al, 2001; Mayer et al, 2001). En l'absence de Ctf18 la quantité de PCNA diminue au voisinage des fourches de réplication (Lengronne et al, 2006). Des défauts de



cohésion sont produits dans les mutants des sous-unités du RFC<sup>Ctf18</sup> ou de la protéine PCNA elle-même. Un autre membre de ce groupe d'épistasie, Mrc1 (mediator of replication checkpoint 1) est un composant du RPC (Xu et al, 2004).

Le second groupe d'épistasie contient plusieurs membres du complexe de progression du réplisome (RPC) : Ctf4, Tof1 et Csm3 (Hanna et al, 2001; Mayer et al, 2004; Xu et al, 2004). Ces trois protéines sont conservées et semblent jouer le même rôle chez les vertébrés (Errico et al, 2009). Elles pourraient, par une voie parallèle, recruter Eco1 aux fourches de réplication indépendamment du PCNA. Un autre membre de ce groupe d'épistasie, l'hélicase Chl1 (Petronczki et al, 2004), stimule l'endonucléase Fen1, une enzyme clef dans la maturation des fragments d'Okazaki.

Les gènes de chacun des deux groupes peuvent être délétés sans perte de viabilité, mais l'inactivation simultanée de facteurs des deux groupes montre un effet additif sur la fréquence de perte de cohésion et peuvent compromettre la viabilité des souches (Xu et al, 2007). Les facteurs de ces deux groupes sont nécessaires à l'établissement de la cohésion en phase S mais pas au maintien de la cohésion une fois établie (Petronczki et al, 2004).

Ces données suggèrent l'existence d'un couplage entre réplication de l'ADN et établissement de la cohésion des chromatides sœurs. Il a été proposé que les cohésines puissent être transitoirement ouvertes puis refermées après le passage de la fourche de réplication. Alternativement, la cohésion pourrait être établie par passage de la fourche de réplication au travers des anneaux de cohésines préalablement positionnés sur la chromatine non répliquée. Ceci éviterait une nouvelle étape de transport actif de l'ADN dans l'anneau, et permettrait d'assurer que ce sont bien deux chromatides sœurs qui sont encerclées par l'anneau de cohésine. Mais la fourche de réplication peut-elle réellement passer à travers l'anneau de cohésine afin de laisser les produits de réplication enfermés à l'intérieur ? Si tel est le cas, alors l'organisation spatiale du réplisome doit probablement être cruciale pour garantir son passage au travers des cohésines sans compromettre l'intégrité des anneaux. Ces facteurs non essentiels pourraient ainsi coordonner le passage de la fourche au travers de l'anneau, et notamment vis-à-vis du fragment protubérant d'Okazaki (Lengronne et al, 2006). Bien qu'incomplètes, ces données conduisent néanmoins à la notion que la cohésion est faite lors d'une réaction couplée à la progression de la fourche de réplication.

#### c/ Eco1 est essentielle à l'établissement de la cohésion

Il a été montré que le gène *ECO1* de *S. cerevisiae* (*eso1* chez *S. pombe* ; (Tanaka et al, 2000)) joue un rôle central dans l'établissement de la cohésion (Skibbens et al, 1999; Toth et al, 1999). Eco1 est une protéine essentielle à la viabilité cellulaire, conservée de la levure à



l'Homme et dont la fonction est exclusivement requise pendant la phase S. Dans des cellules mutantes *eco1* (allèle thermosensible), le complexe cohésine se forme normalement à 36°C, s'associe aux chromosomes, mais la cohésion n'est pas établie à l'issue de la réplication (Skibbens et al, 1999). En revanche, une fois la cohésion établie, cette protéine n'est pas nécessaire ni au maintien de la cohésion en phase G2, ni en phase M (Toth et al, 1999).

La protéine Eco1 se lie à plusieurs sous-unités du complexe de réplication RFC comme Ctf18, Rfc1, Rad24, Elg1 et Rfc2-5 (Kenna & Skibbens, 2003; Skibbens, 2004). Des données indiquent qu'au cours de la phase S, la protéine Eco1 est présente au niveau des fourches de réplication (Lengronne et al, 2006). Le facteur Ctf4 recrute Ctf18, qui à son tour permet le recrutement de PCNA. Il a été montré que Eco1 interagit avec PCNA et que cette interaction est nécessaire au recrutement normal d'Eco1 sur la chromatine, ainsi qu'à l'établissement de la cohésion (Moldovan et al, 2006; Skibbens et al, 1999). Ces données étayent l'idée qu'il existe un lien fonctionnel entre la réplication de l'ADN et l'établissement de la cohésion.

La protéine Eco1 code une acétyl-transférase, suggérant qu'Eco1 agit *via* l'acétylation de protéines cibles. Les substrats de l'acétyltransférase Eco1 ont d'abord été recherchés par une approche *in vitro* (Ivanov et al, 2002) et ce n'est que très récemment que le premier substrat physiologique d'Eco1 a été découvert. La sous-unité Smc3 du complexe cohésine est ainsi acétylée sur les résidus lysines 105 et 106 chez l'Homme, ainsi qu'aux résidus correspondants K112 et K113 chez *S. cerevisiae* (Ben-Shahar et al, 2008; Unal et al, 2008; Zhang et al, 2008a). Chez *S. cerevisiae*, un variant de Smc3 dont la lysine 113 est substituée par un résidu asparagine (qui ressemble à une lysine acétylée) a été identifié lors d'un crible génétique sélectionnant des mutants capables de supprimer la thermosensibilité d'une souche *eco1<sup>ts</sup>* (Unal et al, 2008). De façon remarquable, les mutants mimant l'état acétylé de Smc3 peuvent maintenir la viabilité des souches en l'absence d'Eco1 (Ben-Shahar et al, 2008; Unal et al, 2008). À l'inverse, des mutants dans lesquels les deux lysines 112 et 113 de Smc3 sont remplacées par des résidus non acétylables, ne sont pas viables (Ben-Shahar et al, 2008; Unal et al, 2008). L'acétylation de ces deux résidus lysine de Smc3 par Eco1 est donc un événement essentiel à la cohésion des chromatides sœurs.

Parmi les mutants suppresseurs d'*eco1<sup>ts</sup>* figure le gène *RAD61*, codant une protéine similaire à la protéine Wapl (Ben-Shahar et al, 2008; Rowland et al, 2009). Alors que le gène *ECO1* est essentiel à la viabilité cellulaire, la souche délétée pour les gènes *RAD61* et *ECO1* est viable. Néanmoins, la cohésion des chromatides sœurs est compromise dans cette souche (Ben-Shahar et al, 2008; Rowland et al, 2009). De même un mutant de Smc3 non acétylable est viable si *RAD61* est délété mais pas dans un contexte sauvage (Ben-Shahar et al, 2008; Rowland et al, 2009; Unal et al, 2008). Ces données indiquent que l'acétylation de Smc3 n'est plus nécessaire



lorsque la protéine Wapl est absente, reproduisant ainsi les données obtenues lorsque la fonction d'Eco1 est compromise. Ceci suggère qu'Eco1 et Wapl ont des activités antagonistes. Autrement dit, Eco1 promeut la cohésion des chromatides sœurs, tandis que Wapl s'opposerait à cette réaction.

Chez les mammifères, un travail récent montre que l'acétylation de SMC3 est requise pour la progression normale des fourches de réplication. Le ralentissement dans la progression des fourches lorsque Smc3 n'est pas acétylée peut être compensé par la déplétion de WAPL, ce qui suggère que l'acétylation de SMC3 contrecarre l'activité de WAPL (Terret et al, 2009). Les auteurs envisagent que l'acétylation de SMC3 pourrait elle aussi faciliter le couplage entre la réplication et l'établissement de la cohésion au niveau de la fourche de réplication. Par ailleurs dans les cellules humaines, la déplétion d'ESCO2 induit la séparation prématurée des chromatides et ce phénotype est supprimée par la déplétion de WAPL, suggérant également qu'ESCO2 pourrait contrecarrer l'activité de WAPL (Gandhi et al, 2006).

#### d/ L'association des cohésines à la chromatine est dynamique

Parallèlement à ces travaux, des observations ont révélé que l'établissement de la cohésion s'accompagne d'un changement dans le mode d'interaction des cohésines avec la chromatine. Une étude sur des cellules de mammifères met à profit la technique d'iFRAP (inverse Fluorescence Recovery After Photobleaching) pour analyser la mobilité des cohésines sur la chromatine (Gerlich et al, 2006). Les auteurs ont photo-inactivé la GFP associée à la cohésine SCC1-GFP ou SA1-GFP cellulaire, excepté pour une petite région nucléaire et ont suivi la redistribution de la fluorescence. En phase G1, une partie de la fluorescence de la région non éteinte diminue drastiquement immédiatement après la photo-inactivation des régions adjacentes, ce qui correspond à la diffusion libre de la population de cohésines non liée à la chromatine. La cinétique de redistribution des cohésines de la fraction associée à la chromatine permet quant à elle de déterminer un temps de résidence qui est d'environ  $24 \pm 5$  min. Après 150 minutes, la quasi-totalité de la fraction chromatinienne a été renouvelée (Gerlich et al, 2006). La déplétion de WAPL par siRNA augmente le temps de résidence des cohésines sur la chromatine. La dissociation des cohésines de la chromatine est donc stimulée par WAPL (Kueng et al, 2006).

En phase G2 et par cette même approche, les auteurs ont montré qu'une fraction des cohésines associées à la chromatine ne se dissociait toujours pas après 150 min, ce qui montre que la stabilité de l'association à la chromatine a été considérablement augmentée. Il est intéressant de noter que deux modes d'interaction à la chromatine coexistent en phase G2. Une fraction des cohésines s'échange avec un temps de résidence comparable à celui de la phase G1 tandis qu'une seconde fraction est associée de manière beaucoup plus stable, avec un temps de





résidence de  $6,3 \pm 3,7$  heures (Gerlich et al, 2006). En phase G2, un tiers des cohésines seraient ainsi associées à la chromatine pendant au moins six heures, ce qui semble être suffisant pour maintenir une fraction conséquente d'interactions stables entre les deux chromatides sœurs jusqu'à l'anaphase. Il est intéressant de noter que l'échange des cohésines se fait par diffusion après complète dissociation de la chromatine plutôt que par glissement latéral le long de la fibre, ce qui aurait restreint la relocalisation des cohésines à des territoires chromosomiques adjacents (Gerlich et al, 2006).

Crucialement, les auteurs ont observé que la fraction de cohésine stablement associée à la chromatine apparaît alors que les cellules progressent à travers la phase S. La cohésion des chromatides sœurs étant réalisée au même moment, cette corrélation suggère que le changement dans la dynamique des cohésines pourrait être la conséquence de la création de la cohésion.

Par une autre approche, des travaux menés au laboratoire sur la levure *S. pombe* ont conduit à des interprétations similaires. Suite à la découverte de l'orthologue de Scc4 (Bernard et al, 2006), s'est posée la question de la réversibilité du processus de chargement. À cette époque, un modèle simple proposait que les anneaux de cohésines seraient chargés de façon irréversible sur les chromosomes non répliqués et que l'établissement de la cohésion serait ensuite fait de façon passive, *via* le passage du réplisome au travers des anneaux de cohésines. Si les cohésines sont effectivement associées de manière stable à la chromatine dès leur chargement, alors elles devraient rester associées après inactivation du complexe de chargement. L'utilisation de mutants thermosensibles de *ssl3* et *mis4* a permis de poser cette question. L'expérience consistait à arrêter les cellules en phase G1 du cycle cellulaire à température permissive de façon à permettre le chargement des cohésines puis de transférer les cellules toujours bloquées en phase G1 à température non permissive pour inactiver le complexe de chargement. De façon remarquable, il a été observé que les cohésines se dissociaient totalement suite à l'inactivation du complexe de chargement. Le maintien de l'association des cohésines à la chromatine est donc dépendant du complexe de chargement. Deux hypothèses pouvaient expliquer cette observation : (1) le complexe de chargement est physiquement nécessaire au maintien des cohésines sur la chromatine, *via* par exemple son association aux cohésines ; (2) les cohésines sont continuellement dissociées de la chromatine, soit car elles sont intrinsèquement instables, ou parce qu'il existe une activité de dissociation, contrecarrant la fonction du complexe de chargement. Dans l'hypothèse où le complexe de chargement est nécessaire au maintien des cohésines sur les chromosomes, on s'attend à ce que les complexes de chargement et les complexes cohésines co-localisent. Ceci a été testé par des étalements de chromatine et confirmé par immunoprécipitation de chromatine (Schmidt et al, 2009) : les complexes de chargement et



les complexes cohésines sont retrouvés en des sites distincts, rendant peu crédible l'hypothèse d'un ancrage des cohésines par le complexe de chargement. De plus, la réaction de dissociation est au moins en partie dépendante du gène *wpl1*, codant l'homologue du gène WAPL de mammifères. Il semblerait donc que chez *S. pombe* comme chez les mammifères, l'association des cohésines aux chromosomes de G1 soit labile, la fraction associée résultant d'un équilibre entre la réaction de chargement, et celle de dissociation.

De façon remarquable, l'inactivation du complexe de chargement dans des cellules post-répliquatives (en phase G2) produit un résultat final différent de celui obtenu en phase G1. Une partie des cohésines se dissocie de la chromatine mais contrairement à la situation de G1, une fraction reste associée de façon stable et durable aux chromosomes. De plus, la stabilisation de l'association cohésine - chromatine observée en phase G2 est en partie affectée dans un mutant du facteur d'établissement de la cohésion (le mutant thermosensible *eso1-H17*), indiquant que la fonction d'Eso1 est de stabiliser l'association des cohésines aux chromosomes répliqués (Bernard et al, 2008).

L'ensemble de ces observations suggère que l'établissement de la cohésion est dépendant d'un grand nombre de facteurs associés au réplisome. L'analyse des cohésines avant et après l'établissement de la cohésion révèle que celles-ci sont modifiées par l'acétylation de la sous-unité Smc3, qui semble responsable du changement de mode d'interaction des cohésines avec les chromosomes au cours de la réplication. Ces observations étayent un modèle dans lequel la stabilisation des cohésines corrèle avec la réaction d'établissement de la cohésion ; la fonction de l'acétyltransférase pourrait être de promouvoir la stabilisation de l'association cohésine - chromatine en contrecarrant l'action de Wapl. Ce changement induirait la transition vers un mode où les cohésines sont associées de façon stable aux chromosomes répliqués. Le couplage de ce mécanisme au réplisome permettrait de piéger les chromatides sœurs tant qu'elles sont à proximité l'une de l'autre par un complexe cohésine stable (qui ne se dissocie plus des chromosomes). Ce modèle de travail a guidé l'essentiel des travaux menés lors de ma thèse.

#### e/ Réparation des cassures double-brin en G2

L'implication des cohésines dans la réparation de l'ADN a été découverte chez *S. pombe* alors que la fonction de Scc1 / Rad21 dans la cohésion était inconnue. Les auteurs ont observé que la mutation *rad21-45* (Rad21, pour Radiation-sensitive) rend les cellules sensibles aux radiations et sont défectueuses dans le processus de réparation de l'ADN (Birkenbihl & Subramani, 1992). Dans cette levure, l'efficacité de réparation de l'ADN est multipliée par dix lors du passage de la phase G1 à la phase G2, ce qui suggère qu'une réplication complète, c'est-



à-dire la formation des chromatides sœurs, est importante pour la réparation. La preuve formelle de la nécessité de la cohésion de phase S pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN a été présentée chez *S. cerevisiae*. Lorsque ces levures subissent la réplication en absence de complexe cohésine fonctionnel, la réparation des cassures double-brin en phase G2 est sévèrement compromise et la réintroduction des cohésines dans des cellules post-réplcatives ne corrige pas ce défaut (Sjogren & Nasmyth, 2001). La cohésion des chromatides sœurs est donc requise pour la réparation de l'ADN. Les SMC bactériens ont également des fonctions dans la réparation de l'ADN (Graumann & Knust, 2009) ; cette fonction semble donc conservée au cours de l'évolution. Des études sur des cellules aviaires DT-40 déplétées pour SCC1 (Sonoda et al, 2001), sur des lignées de cellules cancéreuses de patients humains où la fonction de SCC1 est compromise (Atienza et al, 2005) et sur des cellules HeLa après inhibition de l'expression de *SCC1* par RNAi (Schmitz et al, 2007) montrent que les cohésines sont importantes chez les métazoaires pour la réparation de l'ADN.

Des cellules humaines endommagées largement au laser forment localement une haute densité de cassures double-brin et les cohésines sont détectées au site du dommage (Kim et al, 2002a). Il a par la suite été confirmé que les cohésines sont recrutées spécifiquement au site de cassure dans des cellules de levure et humaines (Potts et al, 2006; Strom et al, 2004; Unal et al, 2004). Ces observations suggèrent que le complexe cohésine pourrait être impliqué activement dans le processus de réparation. L'inactivation du facteur de chargement des cohésines en phase G2 n'a pas d'incidence sur la cohésion dans un cycle cellulaire non perturbé. En revanche, le complexe de chargement est nécessaire en phase G2 lors d'une cassure double-brin de l'ADN pour localiser les cohésines au site du dommage et à sa réparation. (Strom et al, 2004; Unal et al, 2004). Ceci montre que même si la cohésion créée en phase S est fonctionnelle, les cohésines doivent être recrutées au site de cassure pour la réparation. De manière remarquable, la cohésion générée en réponse à l'induction de cassures double-brin en phase G2 peut se substituer à la cohésion qui avait été créée lors de phase S (Strom et al, 2004). Ces données indiquent que les cohésines recrutées lors d'une cassure double-brin de l'ADN génèrent de la cohésion dans l'ensemble du génome et ce en phase G2, donc après l'établissement de la cohésion en phase S.

Ces données indiquent que la cohésion générée en réponse à une cassure double-brin de l'ADN est fonctionnelle (dans le sens où elle maintient associées les chromatides sœurs). Ce type de cohésion ne nécessite pas de synthèse d'ADN. La délétion de *rad52* (requis à l'invasion de brin pendant la recombinaison homologue) n'empêche pas la génération de cohésion en réponse à une cassure double-brin d'ADN (Strom et al, 2007; Unal et al, 2007). De plus, la cohésion est établie dans tout le génome en réponse à une seule cassure double-brin, appuyant le fait que la cohésion peut être générée indépendamment d'une synthèse d'ADN et donc de la présence de



fourches de réplication (Strom et al, 2007; Strom et al, 2004; Unal et al, 2007). Elle ne peut cependant pas créer de cohésion *de novo* si celle-ci n'avait pas été initialement établie lors de la phase S, vraisemblablement car les chromatides sœurs se sont séparées par diffusion (Nasmyth & Haering, 2009). Cette observation conduit à l'idée que la réplication est vraisemblablement le seul instant où les deux chromatides sont suffisamment proches l'une de l'autre pour que la réaction d'établissement de la cohésion puisse se réaliser.

Comment et quel signal est transmis de la cassure double-brin aux cohésines pour permettre la génération de cohésion après la réplication ? Il a récemment été décrit qu'Eco1 et la phosphorylation de Scc1 par la kinase Chk1 sont nécessaires à cette néo-cohésion (Heidinger-Pauli et al, 2008). L'acétylation par Eco1 de deux résidus critiques de Scc1 (K84 et K210) nécessite la phosphorylation de Scc1 par Chk1 (Heidinger-Pauli et al, 2009). Lorsque ces deux résidus sont remplacés par des résidus non acétylables, la cohésion induite par un dommage à l'ADN ne peut être réalisée. Réciproquement, si ces résidus sont remplacés par des résidus mimant l'état acétylé, la cohésion peut être générée en phase G2, et ce même en l'absence de cassure double-brin de l'ADN ou d'activité de l'acétyltransférase Eco1. De manière cohérente, la surexpression d'*ECO1* dans des cellules post-réplcatives ou l'inactivation de Rad61 (Wapl) crée une néo-cohésion indépendamment de la présence de cassures double-brin de l'ADN. .

Comme pour l'établissement de la cohésion de phase S, il semble que l'acétylation des cohésines par Eco1 contrecarre Rad61/Wapl chez *S. cerevisiae* (Heidinger-Pauli et al, 2009).

### 3) Maintien de la cohésion

Les chromatides sœurs restent unies depuis l'établissement de la cohésion en phase S jusqu'à leur séparation en mitose. Le maintien de la cohésion en phase G2 ne dépend ni des facteurs de chargements, ni des facteurs d'établissement. Il dépend en revanche de l'intégrité du complexe cohésine (Ciosk et al, 2000; Toth et al, 1999). Le fait que les ovocytes de vertébrés restent bloqués en prophase de première division de méiose pendant plusieurs dizaines d'années avant l'ovulation illustre l'extrême stabilité de la cohésion pendant cette période du cycle cellulaire.

Dans la levure *S. cerevisiae*, Pds5 est essentielle à la viabilité cellulaire et a été identifiée au cours d'un crible sélectionnant des mutants à forte létalité en phase G2/M (Hartman et al, 2000). Des homologues ont été identifiés chez *S. pombe* (Tanaka et al, 2001), la drosophile (Dorsett et al, 2005) et chez les vertébrés où deux isoformes A et B coexistent (Losada et al, 2005; Sumara et al, 2000). Contrairement à *S. cerevisiae*, Pds5 n'est pas essentielle chez *S. pombe*, mais les cellules perdent leur capacité à proliférer lors d'un arrêt prolongé en G2 (Tanaka





et al, 2001). Les premiers travaux chez *S. cerevisiae* suggéraient que Pds5 fonctionnait comme un composant structural du complexe cohésine. De façon similaire aux autres sous-unités cohésine, Pds5 est nécessaire au maintien de la cohésion dans les cellules post-répliquatives (Hartman et al, 2000; Panizza et al, 2000). Le cycle d'association de Pds5 à la chromatine reproduit également celui des cohésines : Pds5 s'associe à la chromatine dès la phase S de façon Scc1 dépendante ; des analyses par immunoprécipitation de chromatine révèlent que Pds5 s'associe à la chromatine aux mêmes sites que Scc1 ; et enfin Pds5 se dissocie en anaphase (coïncidant avec le clivage de Scc1) (Hartman et al, 2000; Losada & Hirano, 2005; Panizza et al, 2000; Sumara et al, 2000; Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). Pds5 contient des motifs de répétitions de type HEAT, probablement impliquées dans des interactions protéine - protéine. La protéine Pds5 semble avoir des fonctions antagonistes sur l'association des cohésines à la chromatine. Pds5 est impliquée dans le maintien de la cohésion en interphase chez *S. cerevisiae* (Hartman et al, 2000; Panizza et al, 2000), *S. pombe* (Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002) ainsi que chez les vertébrés (Losada et al, 2005). Ceci a été particulièrement bien documenté chez *S. pombe*. En l'absence de Pds5, les chromatides sœurs sont associées en phase exponentielle de croissance mais se séparent progressivement au cours d'un arrêt en phase G2. Les cellules subissent alors une ségrégation catastrophique de leurs chromosomes lors de la réentrée dans le cycle cellulaire, causant ainsi la perte de viabilité cellulaire (Tanaka et al, 2001). Chez *S. pombe* Pds5 est donc non-essentielle à l'établissement de la cohésion (tout du moins à court terme) mais est clairement requise à son maintien. En l'absence de Pds5 chez *S. cerevisiae*, la quantité de Scc1 associée à la chromatine est diminuée (Panizza et al, 2000; Sutani et al, 2009). D'autre part, Pds5 facilite la dissociation des cohésines en mitose chez les vertébrés (Losada et al, 2005; Shintomi & Hirano, 2009). Par ailleurs, l'interaction de Pds5 avec le complexe cohésine est sensible à de fortes concentrations salines (Losada et al, 2005; Sumara et al, 2000) alors que ce n'est pas le cas pour les interactions entre les sous-unités du complexe cohésine. Pds5 présente ainsi des propriétés distinctes des autres sous-unités du complexe cohésines. Collectivement, ces données suggèrent que Pds5 est une sous-unité régulatrice facultative du complexe cohésine.

Plus récemment, Sororin (du latin sœur) a été impliquée dans la cohésion des chromatides sœurs. Cette protéine a été identifiée sur la base d'un crible sélectionnant les substrats de l'APC/C chez les vertébrés (Rankin et al, 2005). Sororin est un régulateur positif et essentiel de la cohésion des chromatides sœurs. Cette protéine est requise pour la cohésion des chromatides sœurs en mitose bien qu'elle soit délocalisée de la chromatine à la transition G2/M (Diaz-Martinez et al, 2007; Rankin et al, 2005). Sororin n'est pas nécessaire à l'association des cohésines à la chromatine mais est essentielle à la cohésion en phase G2 (Schmitz et al, 2007) et



pourrait être nécessaire à l'établissement ou au maintien de la cohésion des chromatides sœurs. Aucun orthologue n'a été identifié sur la base d'homologie de séquence en dehors des vertébrés.

#### 4) Perte de la cohésion

En mitose, l'élimination de la cohésion provoque la ségrégation des chromosomes. Chez la levure, cette élimination est réalisée en une seule étape, à la transition métaphase – anaphase. Chez les métazoaires, ce processus se fait en deux étapes. La première étape est réalisée dès l'entrée en mitose (Prophase Dissolution Pathway, PDP) et dissocie des chromosomes la majeure partie des cohésines. Ne persistent que les cohésines des régions centromériques et au niveau de quelques sites sur les bras de chromosomes (Waizenegger et al, 2000). Ces cohésines sont cruciales pour maintenir la cohésion pendant les étapes précoces de la mitose, de façon à permettre l'attachement bilatéral des chromosomes au fuseau. La seconde étape est réalisée lors de la transition métaphase – anaphase, où les cohésines sont clivées pour déclencher l'anaphase (Hauf et al, 2001; Nakajima et al, 2007; Uhlmann et al, 2000). Ces deux processus impliquent des mécanismes différents ainsi qu'une régulation temporelle distincte, étant donné que le PDP n'implique pas le clivage par la séparase (Sumara et al, 2000)

##### a/ Le Prophase Dissolution Pathway (PDP)

Le PDP n'est pas un événement essentiel de la ségrégation mitotique des chromosomes et est peu ou pas visible dans les mitoses de levures. Néanmoins, il a été proposé que la dissociation des cohésines des bras de chromosomes facilite leur déconcaténation par la topoisomérase II en prométaphase et métaphase et ainsi contribue à la synchronie de la disjonction en anaphase. Une autre fonction potentielle du PDP est indiquée par l'observation que le pool considérable de cohésines libéré par le PDP n'est pas clivé par la séparase lors de la transition métaphase - anaphase (Waizenegger et al, 2000). Une grande partie de ce pool se réassocie aux chromosomes dès la télophase.

Le mécanisme permettant de dissocier une grande partie des cohésines des chromosomes en prophase n'est pas bien connu. Il existe vraisemblablement deux voies. L'une implique deux protéines kinases Aurora B et Polo-like kinase (Gimenez-Abian et al, 2004; Losada et al, 2002; Sumara et al, 2002), qui peuvent phosphoryler les sous-unités cohésines SCC1 et SA2 (Scc3) *in vitro* (Losada et al, 2002; Sumara et al, 2002) et dans des extraits d'œuf de xénope (Sumara et al, 2002). Dans ces extraits, l'association des cohésines à la chromatine est inversement corrélée avec le niveau de phosphorylation de SA2 (Scc3) (Sumara et al, 2002). On ne connaît pas le



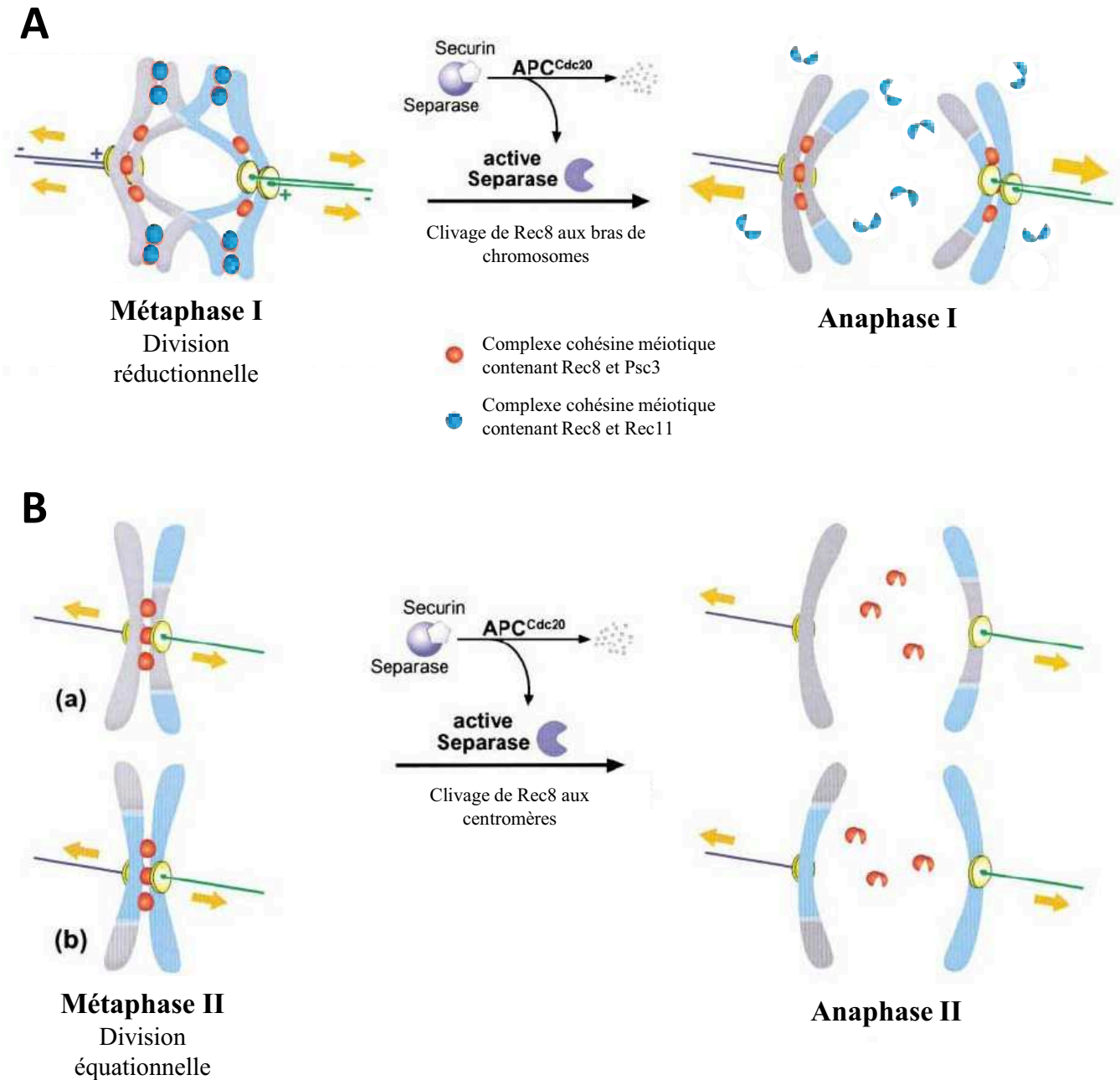
mécanisme par lequel une telle phosphorylation provoque la dissociation des complexes cohésines des chromosomes.

La seconde voie nécessite Wapl et Pds5 et c'est en fait la voie principale car elle est nécessaire à la dissociation de la majeure partie des cohésines de prophase. Suite à la déplétion de WAPL ou PDS5A dans des cultures cellulaires de mammifères, une grande partie des cohésines reste associée aux bras de chromosomes en prophase (Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006; Shintomi & Hirano, 2009). La première voie, impliquant les kinases Aurora B et Polo-like kinase aurait alors un rôle modeste relativement à la voie Pds5/Wapl (Shintomi & Hirano, 2009).

Quel est le mécanisme qui empêche le PDP d'enlever les cohésines des centromères ? Il a été montré que des homologues de Mei-S332 de *Drosophila* (classe des shugoshin, japonais pour protecteur) ont un rôle important dans ce processus. Sgo1 / Mei-S332 est associée aux centromères aussi bien dans les cellules mitotiques que dans les cellules méiotiques (chez la levure (Kitajima et al, 2004; Rabitsch et al, 2004) chez la drosophile (Kerrebrock et al, 1992) et chez l'Homme (McGuinness et al, 2005)). De façon remarquable, la déplétion de SGO1 par RNAi sur des cellules HeLa provoque une perte de la cohésion des chromatides sœurs une fois que les chromosomes se sont alignés sur la plaque équatoriale, mais avant que l'anaphase n'ait été initiée par la voie de l'APC/C et la séparase (McGuinness et al, 2005). Dans ces conditions, les cohésines sont absentes des centromères, les chromosomes sont alors sous la forme de chromatides uniques et quittent la plaque équatoriale. Cette situation est largement restaurée par l'expression d'un variant non phosphorylable de SA2, ce qui suggère que Sgo1 est nécessaire pour protéger les cohésines centromériques de la dissociation qui se produit suite à la phosphorylation de SA2 par Polo-like kinase (Hauf et al, 2005; Sumara et al, 2002).

### La transition métaphase - anaphase

La transition métaphase - anaphase est irréversible. De nombreux travaux chez la levure ont montré que la cohésion est éliminée par le clivage de la sous-unité Scc1 du complexe cohésine par une endopeptidase appelée séparase (Esp1 chez *S. cerevisiae* et Cut1 chez *S. pombe*) (Funabiki et al, 1996; Tomonaga et al, 2000; Uhlmann et al, 1999; Uhlmann et al, 2000). Comme mentionné précédemment, la séparase est inhibée par son association avec une protéine chaperonne, la sécurine (Pds1 chez *S. cerevisiae*, Cut2 chez *S. pombe*) et ce jusqu'à la transition métaphase - anaphase. Lorsque tous les chromosomes sont attachés de façon bilatérale au fuseau mitotique, l'APC/C ubiquityle la sécurine ce qui induit sa dégradation par le protéasome (Cohen-Fix et al, 1996; Funabiki et al, 1996). La séparase ainsi activée clive la sous-unité Scc1 du complexe cohésine en deux sites (Nasmyth & Haering, 2005). Le déclenchement de la séparation des chromatides sœurs en anaphase par le clivage de la sous-unité Scc1 est un processus



### Figure 12. Ségrégation des chromosomes et clivage de Rec8 en méiose

Chez *S. pombe*, deux complexes cohésines co-habitent en méiose : l'un comprend Rec8 et Rec11 et s'associe aux bras des chromosomes, le second comprend Rec8 et Scc3 et s'associe aux centromères (domaine central ainsi que régions péri-centromériques).

**A. Méiose I.** Les paires de chromosomes homologues (bivalents) sont connectées par leur chiasmata et l'attachement des kinétochores frères au fuseau méiotique est mono-orienté. La ségrégation réductionnelle des chromosomes est déclenchée par le clivage de Rec8 par la séparase le long des bras de chromosomes. La protéine Sgo1 protège les cohésines présentes aux centromères du clivage par la séparase.

**B. Méiose II.** Les cohésines centromériques permettent l'attachement bi-orienté amphitélisque des kinétochores frères lors de la méiose II. La ségrégation équationnelle des chromatides sœurs est déclenchée par le clivage par la séparase des cohésines centromériques déprotégées. Cette division est similaire à la mitose où les chromatides sœurs sont ségrégées vers les pôles opposés de la cellule. Le résultat de ces deux divisions méiotiques est la génération de chromosomes recombinants et la diminution de la ploïdie.

(Adapté de Petronczki et al., 2003)

conservé de la levure à l'Homme. Ce clivage est nécessaire et suffisant pour éliminer les cohésines sur toute la longueur des chromosomes (Hauf et al, 2001; Oliveira et al, 2010; Uhlmann et al, 1999) et provoquer la séparation des chromatides sœurs (Sullivan et al, 2004; Uhlmann et al, 2000). Chez *S. cerevisiae* ainsi que chez la drosophile, le clivage artificiel des cohésines en métaphase est suffisant pour produire la disjonction des chromosomes (Oliveira et al, 2010; Weitzer et al, 2003). Cette expérience démontre également que les cohésines ne sont pas un moyen parmi d'autres pour maintenir les chromatides sœurs associées, ce sont bien les complexes cohésines seuls qui sont capables de résister à la tension exercée par le fuseau avant l'anaphase.

En méiose, la cohésion est éliminée entre les bras de chromosomes lors de la première division méiotique mais persiste aux centromères, pour n'y être éliminée qu'en anaphase de seconde division méiotique (Fig. 12). Un niveau supérieur de complexité est ainsi nécessaire par rapport à la mitose. La composition du complexe cohésine est partiellement modifiée lors de la méiose. Ainsi chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la cohésine mitotique Scc1 est remplacée par la cohésine spécifique de la méiose, Rec8 (Klein et al, 1999). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, deux cohésines sont exprimées spécifiquement en méiose : la kleisine Rec8 qui remplace Rad21 et un variant de Scc3 appelé Rec11. Au moins deux complexes cohésines distincts coexistent : l'un comprend Rec11 et s'associe aux bras de chromosomes; le second comprend Scc3 et s'associe aux centromères (Fig. 12) (Kitajima et al, 2003).

Lors de la transition métaphase I / anaphase I, la protéine Rec8 est clivée et disparaît des bras de chromosomes ce qui permet de libérer l'entrave des chiasmata et la ségrégation réductionnelle des chromosomes homologues. Mais dans le même temps, Rec8 persiste aux centromères et assure la cohésion des chromatides jusqu'à la métaphase de la seconde division méiotique (Buonomo et al, 2000; Watanabe & Nurse, 1999). Shugoshin recrute la phosphatase PP2A aux centromères et contrecarre la phosphorylation des complexes cohésines qui facilite leur dissociation (Kitajima et al, 2006; Riedel et al, 2006). Dans un mutant de Rec8 non phosphorylable, la disjonction des chromatides sœurs est altérée, alors qu'elles se séparent précocement avec un variant mimant l'état phosphorylé (Ishiguro et al, 2010; Katis et al, 2010). L'équilibre entre la phosphorylation de Rec8 et sa déphosphorylation par Sgo1 - PP2A régule donc la perte séquentielle de cohésion en méiose.

La seconde division de méiose est similaire à une mitose, où les chromatides sœurs ségrégent vers les pôles opposés de la cellule (division équationnelle). La rétention des cohésines aux centromères permet l'attachement bilatéral amphitélique des kinétochores frères. Il a été





proposé que ce mode d'attachement ne permette pas la protection par Sgo1 (Vaur et al, 2005). La séparase clive alors les cohésines centromériques et les chromatides sœurs ségrégent de manière équationnelle.

#### ***IV. Travaux à l'origine du projet de thèse : relation entre dynamique des cohésines et établissement de la cohésion***

Les paragraphes suivants présentent les questions posées en les replaçant dans le contexte des connaissances au début et au cours de mon travail de thèse.

À mon arrivée au laboratoire, les données expérimentales révélant l'aspect dynamique de l'interaction des cohésines avec les chromosomes étaient récentes et/ou en cours d'acquisition. La fonction de Wapl dans ce processus n'était pas encore connue mais elle faisait partie des hypothèses envisagées pour rendre compte des observations. De fait, un crible génétique avait été initié pour rechercher le ou les facteurs susceptibles de réguler la dynamique des cohésines. Il s'agissait de rechercher des mutants suppresseurs de la thermosensibilité de mutants du complexe de chargement. Ce crible devait en théorie identifier tout régulateur négatif de la réaction de chargement et/ou tout facteur impliqué dans un mécanisme actif de dissociation des cohésines. Ce projet m'a été confié à mon arrivée au laboratoire en tant que projet personnel « exploratoire », partant de l'analyse génétique à l'identification des gènes pour *in fine*, essayer de comprendre leur fonction et leur implication éventuelle dans la dynamique des cohésines. Les résultats sont présentés dans le chapitre II.

Dans le même temps, j'ai participé au projet majeur du laboratoire consistant à comprendre la relation entre dynamique des cohésines et établissement de la cohésion. Un événement important a été la découverte chez la levure et dans l'espèce humaine que Smc3 est un substrat de l'acétyltransférase Eco1/ESCO1 et que cette modification est importante pour créer la cohésion. Nous avons cherché à comprendre si la modification de la dynamique des cohésines observée lors de l'établissement de la cohésion pouvait être reliée mécaniquement à cet événement d'acétylation. Cette partie de mon travail de thèse est présentée sous la forme d'un manuscrit qui sera prochainement soumis à publication (Chapitre III).

Les données publiées chez *S. pombe* indiquent clairement que Pds5 est requise pour le maintien de la cohésion, ce qui suggère la possibilité que Pds5 soit nécessaire à la formation de la population de cohésines stablement associées aux chromosomes répliqués. Paradoxalement, la délétion de *pds5*, comme celle de *wpl1*, permet la survie en l'absence d'Eso1, alors que la simple



---

délétion d'*esol* est létale. Ces observations suggèrent que Pds5 pourrait avoir plusieurs fonctions dont certaines en interaction avec Wapl. Les résultats présentés dans le chapitre IV abordent ces questions et proposent un modèle permettant de rendre compte des fonctions *a priori* antagonistes de Pds5.

Les connaissances nouvelles apportées par cette étude et les perspectives qui en découlent sont discutées dans la conclusion générale.



## Chapitre I : Matériels et méthodes

### I. Matériel biologique

*Schizosaccharomyces pombe* est une levure ascomycète homothallique isolée par P. Linder en 1890 à partir d'une bière africaine à base d'une céréale cultivée principalement dans les zones sèches, le millet. La cellule est de forme cylindrique et sa taille est d'environ 3 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre pour 7 à 15  $\mu\text{m}$  de longueur selon la période de cycle cellulaire. Le génome haploïde comprend 14 Mpb d'ADN réparties en trois chromosomes. Le cycle biologique est haplodiplobiontique avec une phase haploïde dominante. Les cellules haploïdes se multiplient par division mitotique (cycle asexué). Le cycle cellulaire haploïde est typiquement eucaryotique, constitué par la succession de quatre phases : G1, S, G2 et M. Néanmoins, le cycle cellulaire de *S. pombe* présente quelques particularités : la phase G1 est extrêmement brève, alors que la phase G2 est longue. Les phases G1 et S ont lieu pendant la télophase. Lorsque les deux cellules filles se séparent, elles sont déjà en G2. En outre, en condition de croissance exponentielle, 80% des cellules sont en phase G2 et environ 15% en mitose.

En condition de carence nutritionnelle, deux cellules haploïdes de types sexuels opposés ( $h^+$  et  $h^-$ ) vont conjuguer : les cellules fusionnent par leur extrémité et la caryogamie est réalisée. La méiose est immédiatement enclenchée, puis elle est suivie par la sporulation qui génère un asque contenant quatre spores haploïdes. En conditions nutritives favorables, les spores germent et le cycle cellulaire haploïde recommence. Si le zygote issu de la conjugaison de deux cellules haploïdes est placé en conditions nutritives adéquates avant qu'il n'ait entrepris la méiose, alors un cycle cellulaire diploïde s'établit.

La liste des souches utilisées et leurs génotypes sont consignés dans la Table 1.

### II. Méthodes

#### A. Méthodes de culture

##### 1) Milieux de culture pour *S. pombe*

La composition des différents milieux utilisés est donnée dans la Table 2 (Moreno et al, 1991). Les milieux solides sont obtenus par addition d'agar à raison de 20 g/L. La stérilisation des différents milieux est réalisée par autoclavage 30 minutes à 110°C. Le milieu de culture YES+A est défini comme le milieu complet et le milieu EMM<sub>2</sub> comme synthétique. Le milieu EMM<sub>2</sub>-N a été utilisé pour permettre la conjugaison entre deux souches de signes sexuels

## **Table 1 : Liste des souches utilisées de *S. pombe***

Chapitre II : Crible génétique de facteurs régulant la dynamique des cohésines

Souches supprimées issues de :

2796 :  $h^- leu1 mis4-367 rec8-GFP-kan^R$

Figure 2 et Table 1 :

2612 :  $h^+ leu1 mis4-3HA-LEU2$

2928 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{UV2} rec8-GFP-kan^R$

2899 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{UV2} rec8-GFP-kan^R$

2929 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{02} rec8-GFP-kan^R$

2901 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{02} rec8-GFP-kan^R$

2903 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{03} rec8-GFP-kan^R$

2902 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{03} rec8-GFP-kan^R$

2905 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{08} rec8-GFP-kan^R$

2904 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{08} rec8-GFP-kan^R$

2906 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{09} rec8-GFP-kan^R$

2907 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{09} rec8-GFP-kan^R$

2909 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{010} rec8-GFP-kan^R$

2908 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{010} rec8-GFP-kan^R$

2935 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{011} rec8-GFP-kan^R$

2910 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{011} rec8-GFP-kan^R$

2911 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{012} rec8-GFP-kan^R$

2912 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{012} rec8-GFP-kan^R$

2913 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{013} rec8-GFP-kan^R$

2914 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{013} rec8-GFP-kan^R$

2918 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{UV11} rec8-GFP-kan^R$

2929 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{UV11} rec8-GFP-kan^R$

2922 :  $h^+ leu1 mis4-367 sup^{UV15cs} rec8-GFP-kan^R$

2923 :  $h^- leu1 mis4-367 sup^{UV15cs} rec8-GFP-kan^R$

Figure 3 :

961 :  $h^+/h^- leu1 ura4 ade6-210/216$

2889 :  $h^+ ura4 ade6-210 mis4-367$

2890 :  $h^- ura4 ade6-216 mis4-367$

2991 :  $h^+ ade6-210 mis4-367 sup^{UV2}$

2970 :  $h^- leu1 ade6-216 mis4-367 sup^{UV2} rec8-GFP-Kan^R$

opposés, et donc l'entrée en méiose. Sa composition est celle de l'EMM<sub>2</sub> à l'exception du NH<sub>4</sub>Cl qui n'est pas ajouté pour supprimer la source d'azote. Le milieu YES-Ade n'est pas supplémenté en adénine. L'adénine qu'il contient provient de l'extrait de levure mais sa quantité est limitante. Sur ce milieu, les souches mutantes *ade6-210* et *ade6-216* développent des colonies de couleur rouge et rose, respectivement. Deux milieux de cultures ont été utilisés pour allonger la durée de la phase G1 des cellules. Pour cela, la source d'azote est remplacée par 20mM d'isoleucine pour la confection de milieux solides et par 20 mM de L-leucine pour les cultures liquides. Sauf indication contraire, le milieu de culture EMM<sub>2</sub> a été utilisé pour les cultures liquides.

## 2) Conditions de culture pour *S. pombe*

Les cellules sont striées sur une boîte de Pétri contenant le milieu solide approprié. Les boîtes sont incubées jusqu'à l'apparition des colonies.

En milieu liquide, la phase exponentielle de croissance se situe entre  $10^6$  et  $2 \times 10^7$  cellules/mL (Moreno et al, 1991). Les densités cellulaires ont été estimées par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma. Les cellules sont cultivées en phase exponentielle de croissance à 25°C dans des fioles d'Erlenmeyer d'une capacité au moins cinq fois supérieure au volume de milieu utilisé et sous agitation constante d'environ 200 rpm afin d'assurer une aération homogène du milieu.

Deux méthodes ont été utilisées pour induire un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire : la surexpression de la partie C-terminale de la protéine Res1 et la carence azotée pour induire l'expression de Rec8-GFP.

### *a/ Arrêt en phase G1 par carence azotée*

Les souches *rec8-GFP* sont cultivées en milieu YES+A à 25°C jusqu'à saturation (environ  $1 \times 10^8$  cellules/mL). Environ  $1 \times 10^8$  cellules sont prélevées et lavées trois fois dans du milieu EMM<sub>2</sub>-N par centrifugation (1 minute à 1300g), le surnageant est éliminé et les cellules remises en suspension. Cette étape a pour but d'éliminer toute source d'azote provenant du milieu complet. Les cellules sont alors inoculées dans du milieu EMM<sub>2</sub>-N à une densité cellulaire de  $1 \times 10^7$  cellules/mL à 20°C afin de les arrêter en phase G1. L'efficacité de l'arrêt est appréciable après environ 20 heures d'incubation à 20°C par l'observation des *foci* de fluorescence Rec8-GFP.

### *b/ Arrêt en phase G1 par surexpression de Res1-Cter*

Les cellules sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire par surexpression de la partie C-terminale de Res1 (qui contient le domaine de liaison à Cdc10), sous le contrôle du promoteur inductible *nmt1*. Le complexe Res1-Cdc10 est un facteur de transcription qui déclenche la

2992 :  $h^+$  *ade6-210 mis4-367 sup*<sup>02</sup>  
 2971 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>02</sup> *rec8-GFP-Kan*<sup>R</sup>  
 2940 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>03</sup>  
 2941 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>03</sup> *rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 2942 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>08</sup>  
 2943 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>08</sup> *rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 2956 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>09</sup>  
 2957 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>09</sup> *rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 2944 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>010</sup>  
 2945 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>010</sup> *rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 2993 :  $h^+$  *ade6-210 mis4-367 sup*<sup>011</sup>  
 2972 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>011</sup> *rec8-GFP-Kan*<sup>R</sup>  
 2939 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>012</sup>  
 2938 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>012</sup> *rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 2946 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>013</sup>  
 2947 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>013</sup> *rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 2974 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>UV11</sup>  
 2973 :  $h^-$  *leu1 ade6-216 mis4-367 sup*<sup>UV11</sup> *rec8-GFP-Kan*<sup>R</sup>  
 2990 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>UV15cs</sup>  
 2989 :  $h^-$  *leu1 ade6-210 mis4-367 sup*<sup>UV15cs</sup> *rec8-GFP-Kan*<sup>R</sup>

Figures 4 à 6 :

Souches supprimées homothalliques :

3251 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV2 swi5-39 rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 3252 :  $h^{90}$  *mis4-367 sup012 swi5-39 rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 3253 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV11 swi5-39 rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 3260 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV15<sup>cs</sup> swi5-39 rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 3640 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV11 swi5-39 rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 3641 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV11 swi5-39 rec8-GFP-kan*<sup>R</sup>  
 3845 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV15<sup>cs</sup> swi5-39*  
 3846 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV15<sup>cs</sup> swi5-39*  
 3847 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV15<sup>cs</sup> swi5-39*  
 3848 :  $h^{90}$  *mis4-367 supUV15<sup>cs</sup> swi5-39*

Souches supprimées hétérothalliques :

3254 :  $h^+$  *mis4-367 sup*<sup>UV2</sup> *swi5-39*



synthèse des protéines nécessaire à l'entrée en phase S. La surexpression de Res1 tronquée titre Cdc10 et inactive la fonction du complexe Res1-Cdc10 (Ayte et al, 1995). Les cellules, ne pouvant plus rentrer en phase S sont donc bloquées en phase G1 (Ayte et al, 1995; Bernard et al, 2008). Les souches *nmt-res1Cter* sont cultivées en EMM<sub>2</sub> à 25°C en présence de thiamine (20 µM) afin de réprimer l'expression du promoteur *nmt1*. Les cellules sont prélevées et lavées trois fois dans du milieu EMM<sub>2</sub> par centrifugation (1 minute à 1300g), le surnageant est éliminé et les cellules remises en suspension. Cette étape a pour but d'éliminer la thiamine provenant du milieu. Les cellules sont alors remises en suspension à une densité de  $2 \times 10^5$  cellules/mL dans du milieu de culture dépourvu de thiamine à 25°C. L'arrêt des cellules en phase G1 est effectif après sept générations. Après 24 heures de culture à 25°C, les cellules ont effectué six générations et les fioles d'Erlenmeyer sont transférées à 20°C. De cette manière, la dernière génération avant l'arrêt des cellules est prolongée pendant les 24 heures qui suivent. À ce stade, les cellules sont uniformément arrêtées à une densité de  $2,5 \times 10^7$  cellules/mL et les cellules se sont allongées. La progression vers l'arrêt en phase G1 est suivie en mesurant la proportion de cellules présentant un septum (coloration des septa au calcofluor et des noyaux au DAPI). Les cellules arrêtées en G1 sont mononuclées et sans septum. L'arrêt est confirmé *a posteriori* par l'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux.

*c/ Arrêt en phase S par traitement à l'hydroxyurée*

Les cellules sont cultivées en phase exponentielle de croissance à 25°C et en milieu complet au moment où 20mM d'hydroxyurée sont ajoutés à la culture. Les cellules en phase exponentielle de croissance étant majoritairement en phase G2, il faut un temps de génération pour arrêter les cellules avec cette drogue. Les cellules sont ainsi incubées 4 heures supplémentaires avant d'être récoltées. L'arrêt est confirmé *a posteriori* par l'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux.

*d/ Arrêt en phase G2 par l'inactivation de Cdc25*

La méthode utilisée pour arrêter les cellules en fin de phase G2 est l'inactivation de Cdc25 (utilisation de l'allèle thermosensible *cdc25-22*). La protéine Cdc25 est une phosphatase qui contrôle l'entrée et la progression en mitose, en enlevant les résidus phosphate inhibiteurs de sa cible Cdk1. Les cellules de *S. pombe* en phase exponentielle sont majoritairement en phase G2 (80% de la population (Carlson et al, 1999)). Le passage à température restrictive pour l'allèle *cdc25-22* permet d'empêcher l'entrée en mitose et induit un arrêt ferme. Les cellules sont cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu de culture EMM<sub>2</sub> à 25°C. Les cellules ayant atteint une densité de  $2 \times 10^6$  cellules/mL sont transférées dans un bain-marie à 36,5°C sous une agitation de 200 rpm. L'arrêt en phase G2 se traduit pas une chute du pourcentage de cellules

3255 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>UV2</sup> swi5-39 rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3256 :  $h^+$  *mis4-367 sup<sup>012</sup> swi5-39*

3257 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>012</sup> swi5-39*

3642 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>UV11</sup> swi5-39 rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3756 :  $h^+$  *mis4-367 sup<sup>UV11</sup> swi5-39*

3894 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>UV15cs</sup> swi5-39*

3313 :  $h^+$  *mis4-367 sup<sup>UV15cs</sup> swi5-39*

3893 :  $h^+$  *mis4-367 sup<sup>UV15cs</sup> swi5-39*

Souches contenant les marqueurs chromosomiques :

3346 :  $h^-$  *ura1-171 his6-365 mis4-367 swi5-39*

3294 :  $h^+$  *ade4-31 lys1 mis4-367 swi5-39*

3224 :  $h^+$  *his3-237 mis4-367 swi5-39*

3295 :  $h^-$  *ade8-106 leu3-135 mis4-367 swi5-39*

3376 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 swi5-39*

3314 :  $h^-$  *ura4 ade6-210 ade5-36 mis4-367 swi5-39*

Figures 7 à 9:

• Chromosome I

3589 :  $h^+$  *mis4-367 ssl3-EGFP-kan<sup>R</sup>*

3904 :  $h^+$  *mis4-367 haspin::kan<sup>R</sup>*

2745 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 psm3-GFP-ura4+*

3648 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 pas1::ura4<sup>+</sup>*

3445 :  $h^+$  *leu1 ade6- ura4 mis4-367 rec12-D15::ura4<sup>+</sup>*

2953 :  $h^+$  *leu1 mis4-367 psc3-EGFP-LEU2*

• chromosome II

2963 :  $h^-$  *mis4-367 wpl::kan<sup>R</sup> rec8-GFP-Kan<sup>R</sup>*

3988 :  $h^-$  *leu1 ade6-210 mis4-367 clr6-HA-kan<sup>R</sup>*

4085 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 rad3::ura4<sup>+</sup>*

4084 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 swi1::ura4<sup>+</sup>*

4083 :  $h^-$  *mis4-367 sgo1-GFP-kan<sup>R</sup>*

3116 :  $h^-$  *ura4 cut3-GFP-ura4<sup>+</sup>*

3364 :  $h^-$  *leu1 mcm2-HA-leu1<sup>+</sup>*

3991 :  $h^+$  *ura4 mis4-367 mad1::ura4<sup>+</sup>*

3989 :  $h^+$  *ura4 mis4-367 hht2-GFP-ura4<sup>+</sup>*

3224 :  $h^+$  *his3-237 mis4-367 swi5-39*

présentant un septum (typiquement 0% après 2 heures à 36,5°C) et 100% de cellules mononucléées.

## **B. Méthodes d'analyses génétiques**

### **1) Croisements**

Les croisements se font par mélange de deux souches de signe sexuel opposé ( $h^+$  et  $h^-$ ) sur milieu synthétique dépourvu de source d'azote (EMM<sub>2</sub>-N). Dans ces conditions, les souches arrêtent leur croissance en phase G1 du cycle cellulaire et conjuguent pour former un diploïde. La méiose suit immédiatement pour donner un asque à quatre spores ordonnées.

Après 48 heures, la présence des spores peut être vérifiée par observation microscopique ou révélée par coloration des spores à la vapeur d'iode (coloration noire due à la présence d'amidon).

### **2) Analyse de spores en vrac**

Les cellules végétatives n'ayant pas conjugué sont détruites par digestion enzymatique pendant quelques heures à 25°C ou 32°C dans une solution de glusulase 0,5% (v/v). La densité des spores est estimée par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma. Les spores sont ensuite étalées à l'aide de billes de verre sur milieu solide adéquat à une densité calculée de 300 spores par boîte.

### **3) Analyse de tétrades**

Les tétrades peuvent être disséquées lorsque les asques sont formés mais leur paroi non rompue, ce qui correspond à un croisement d'environ 48 heures à 25°C ou 32°C. Les asques sont alors isolés avec un micromanipulateur, puis incubés quatre heures à 25°C ou 32°C afin que la paroi se rompe. Les quatre spores issues de chaque asque sont semées à une distance respective de 6 mm à l'aide du micromanipulateur, puis incubées à 25°C ou 32°C, jusqu'à l'apparition des colonies.

### **4) Obtention de diploïdes**

Pour isoler une souche diploïde, les deux souches de signe sexuel opposé sont mélangées sur milieu solide carencé en azote, puis le mélange est transféré sur milieu riche 18 à 20 heures après le mélange des souches. À ce stade, les diploïdes sont formés mais la méiose n'a pas

- chromosome III

3376 :  $h^+$  *ura4 ade6-210 mis4-367 swi5-39*

2669 :  $h^-$  *leu1 ura4 ade6-216 mis4-367 sds21::kan<sup>R</sup>*

3130 :  $h^-$  *leu1 ura4 ade6-210 mis4-367 cds1::ura4<sup>+</sup>rad21-3HA-Kan<sup>R</sup>*

3596 :  $h^-$  *leu1 ura4 mis4-367 spc7-GFP-kan<sup>R</sup>*

3444 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 cdc21-GFP-ura4<sup>+</sup>*

3442 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 mad3::ura4<sup>+</sup>*

#### Tables 2 et 3 :

2 :  $h^-$

3226 :  $h^+$  *ura4 mis4-367 sup<sup>UV2</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2841 :  $h^-$  *leu1 mis4-367 sup<sup>012</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3642 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>UV11</sup> swi5-39 rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3423 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>UV15cs</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

#### Figure 13 :

##### Souches *mis4<sup>+</sup>* :

2 :  $h^-$

3060 :  $h^-$  *wpl::kan<sup>R</sup>*

3613 :  $h^-$  *ura4 sup<sup>UV2</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3616 :  $h^-$  *ura4 sup<sup>012</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3617 :  $h^+$  *ura4 sup<sup>UV11</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3619 :  $h^-$  *ura4 sup<sup>UV15cs</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

##### Souches *mis4-367* :

2729 :  $h^-$  *mis4-367*

3225 :  $h^+$  *mis4-367 sup<sup>UV2</sup>*

3259 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>UV11</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3411 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>012</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

3423 :  $h^-$  *mis4-367 sup<sup>UV15cs</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

#### Figure 14 :

2 :  $h^-$

2729 :  $h^-$  *mis4-367*

3474 :  $h^-$  *mis4-367 wpl::kan<sup>R</sup>*

encore débuté. Le passage en milieu riche inhibe l'entrée en méiose ; les cellules diploïdes retournent vers le cycle végétatif et peuvent ainsi être maintenues.

Il est cependant nécessaire de disposer d'un moyen de sélection des souches diploïdes. Pour cela, les souches haploïdes portent les mutations *ade6-210* et *ade6-216*, deux allèles différents du locus *ade6*. Les souches haploïdes *ade6-210* et *ade6-216* sont auxotrophes pour l'adénine. En revanche, le diploïde *ade6-210/ade6-216* est de phénotype [Ade<sup>+</sup>] par complémentation intragénique. Ce système permet de sélectionner positivement les souches diploïdes [Ade<sup>+</sup>], par étalement du mélange sur milieu synthétique dépourvu d'adénine.

Les souches diploïdes sont ensuite maintenues sur milieu complet (YES-A) qui est naturellement limitant en adénine. Sur ce milieu, les souches haploïdes *ade6-210* et *ade6-216* forment des colonies colorées (rouge et rose, respectivement), tandis que les cellules diploïdes, [Ade<sup>+</sup>], forment des colonies blanches. Ce milieu permet simultanément de réprimer le cycle méiotique (milieu riche) et de s'assurer que les colonies sont diploïdes (blanches).

Le transfert de cellules diploïdes sur milieu synthétique dépourvu de source d'azote (EMM<sub>2</sub>-N) induit la méiose et la formation de tétrades.

## 5) Test en goutte

Les cellules prélevées sur milieu solide sont cultivées en milieu liquide à 25°C pendant 24h. La densité cellulaire est mesurée avec une cellule de Thoma, puis 1 mL de suspension cellulaire à 6x10<sup>5</sup> cellules/mL est préparé en H<sub>2</sub>O stérile. Des dilutions sériées au 1/6<sup>e</sup> sont réalisées avec de l'eau dans une plaque de microtitration et environ 5 µL de chaque dilution (soit ~3000 cellules pour la goutte la plus dense) sont déposés en goutte sur milieu solide adéquat et incubés aux températures appropriées.

### C. Mesure du contenu en ADN des cellules

#### *a/ Fixation des cellules à l'éthanol*

L'éthanol est un fixateur précipitant. Le principe de la fixation à l'éthanol est de réduire la solubilité des molécules par exemple par la rupture des interactions hydrophobes soutenant la structure tertiaire des protéines. Un échantillon de 5x10<sup>7</sup> cellules en culture liquide est prélevé et lavé dans de l'eau stérile par centrifugation (1 minute à 1300g). Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 1mL d'éthanol 70% froid (-20°C). Les cellules ainsi fixées sont conservées à 4°C.

#### *b/ Marquage de l'ADN*

Un volume de 100 µL de cellules fixées (soit 5x10<sup>6</sup> cellules) est réhydraté dans 300 µL d'une solution de Na-Citrate 50mM. Les cellules sont centrifugées (1 minute à 1300g) et le

Figures 15 et 16 :

2733 :  $h^-$  *rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2731 :  $h^-$  *mis4-367 rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2908 :  $h^-$  *leu1 mis4-367 sup<sup>010</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2919 :  $h^-$  *leu1 mis4-367 sup<sup>UV11</sup> rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

Figure 17 :

2733 :  $h^-$  *rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2731 :  $h^-$  *mis4-367 rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2963 :  $h^+$  *wpl::kan<sup>R</sup> rec8-GFP-Kan<sup>R</sup>*

2963 :  $h^-$  *mis4-367 wpl::kan<sup>R</sup> rec8-GFP-Kan<sup>R</sup>*

Figure 18 :

2733 :  $h^-$  *rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2731 :  $h^-$  *mis4-367 rec8-GFP-kan<sup>R</sup>*

2840 :  $h^-$  *leu1 mis4-367 rec8-GFP-kan<sup>R</sup> sup<sup>011</sup>*

2936 :  $h^-$  *leu1 rec8-GFP-kan<sup>R</sup> sup<sup>011</sup>*

Figure 19 :

2760 :  $h^-$  *ura4<sup>+</sup>-pREP2res1*

3330 :  $h^-$  *ura4<sup>+</sup>-pREP2res1 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

3784 :  $h^-$  *ura4<sup>+</sup>-pREP2res1 rad21-9PK-kan<sup>R</sup> pas1::ura4<sup>+</sup>*

3788 :  $h^-$  *ura4<sup>+</sup>-pREP2res1 rad21-9PK-kan<sup>R</sup> pef1::ura4<sup>+</sup>*

Figure 20 :

3203 :  $h^-$  *mis4-367 cdc25-22*

3333 :  $h^-$  *mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

3864 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup> pas1::ura4<sup>+</sup>*

3872 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup> pef1::ura4<sup>+</sup>*

Figure 21 :

2 :  $h^-$

2729 :  $h^-$  *mis4-367*

3638 :  $h^-$  *leu1 ura4 pef1::ura4<sup>+</sup>*

3651 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 pef1::ura4<sup>+</sup>*

3362 :  $h^-$  *leu1 eso1-GFP-LEU2*

surnageant est éliminé. Les cellules sont remises en suspension dans 500µL d'une solution de Na-Citrate 50mM à 0,1 mg/mL de RNase A et incubées deux heures à 37°C.

Marquage des acides nucléiques à l'iodure de propidium : À un volume de cellules traitées à la RNase A est ajouté un volume d'une solution de Na-Citrate 50mM à 4 µg/mL d'iodure de propidium.

Marquage des acides nucléiques au SYTOX® green : À un volume de cellules traitées à la RNase A est ajouté un volume d'une solution de Na-Citrate 50mM à 2 µM de SYTOX® green.

#### *c/ Cytométrie en flux*

Les cellules marquées sont soumises à une sonication pendant 15 secondes à 20 m/sec à l'aide d'une sonde afin de séparer les doublets de cellules avant de procéder à l'analyse. Les cytomètres utilisés sont un BD FACSCanto II 6 couleurs, un Partec FloMax® ainsi qu'un Accuri C6.

## **D. Analyse des protéines associées à la chromatine**

### **1) Analyse de la fluorescence de Rec8-GFP**

Les cellules arrêtées en phase G1 par carence azotée sont fixées par l'ajout de formaldéhyde dans le milieu de culture. Le formaldéhyde va créer des liaisons covalentes entre les molécules et créer ainsi des pontages protéine-protéine et ADN-protéine. Le formaldéhyde est utilisé une concentration finale de 4% dans la culture cellulaire. Le volume adéquat de fixateur est ajouté à la culture pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées par centrifugation (1 minute 1300g) deux fois avec 10 mL de PBS glacé (136,9 mM NaCl ; 2,68 mM KCl ; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,2). Les cellules sont finalement remises en suspension dans 500 µL de PBS et sont conservés à 4°C jusqu'à la coloration de l'ADN et le montage des lames. L'observation et la quantification des signaux de fluorescence sont décrits dans la section Microscopie.

### **2) Immunofluorescence sur étalements de chromatine**

#### *a/ Préparation de sphéroplastes*

Les cultures sont réalisées de façon à ce que la densité cellulaire n'excède pas 5x10<sup>6</sup> cellules/mL. Les cultures sont arrêtées par ajout d'azide de sodium (1mM final) et refroidissement à 0°C. Un volume de culture correspondant à 5x10<sup>7</sup> cellules est centrifugé 1 minute à 1300g à 4°C, puis le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est lavé avec 10 mL d'eau stérile glacée. Après centrifugation (1 minute à 1300g à 4°C), le culot cellulaire est remis

3892 :  $h^- leu1 ura4 eso1-GFP-LEU2 pef1::ura4^+$   
3247 :  $h^- leu1 mis4-EGFP-LEU2$   
5335 :  $h^- leu1 ura4 mis4-EGFP-LEU2 pef1::ura4^+$   
3297 :  $h^- ura4 pds5-GFP-kan^R$   
5310 :  $h^- ura4 pds5-GFP-kan^R pef1::ura4^+$   
4579 :  $h^- ura4 wpl-13myc-hyg^R psc3-HA-kan^R$   
5312 :  $h^- ura4 wpl-13myc-hyg^R pef1::ura4^+$   
5314 :  $h^- ura4 psc3-HA-kan^R pef1::ura4^+$

Figure 22 :

2 :  $h^-$   
2711 :  $h^- mis4-367$   
3638 :  $h^- leu1 ura4 pef1::ura4^+$   
3651 :  $h^- ura4 mis4-367 pef1::ura4^+$

Figure 23 :

2 :  $h^-$   
2711 :  $h^- mis4-367$   
3637 :  $h^- ura4 pas1::ura4^+$   
3638 :  $h^- leu1 ura4 pef1::ura4^+$   
3648 :  $h^- ura4 mis4-367 pas1::ura4^+$   
3651 :  $h^- ura4 mis4-367 pef1::ura4^+$



en suspension dans 900  $\mu\text{L}$  d'une solution de sorbitol 1,2 M glacée. Les cellules sont centrifugées (10 secondes à 1300g à 4°C) et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 300  $\mu\text{L}$  d'une solution d'enzyme lytique (6,67 mg/ml d'enzymes (enzymes lytiques de *Trichoderma harzianum*, Sigma) en SP2 : sorbitol 1,2M ; Tri-sodium citrate 50mM ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50mM ; pH 5,6). Les cellules sont incubées à 30°C afin de digérer la paroi cellulaire. La progression de la digestion enzymatique est suivie par observation de la lyse des cellules au SDS (2 $\mu\text{l}$  de suspension cellulaire + 0,5 $\mu\text{l}$  SDS 10%) à l'aide d'un microscope. Lorsque la totalité (> 95%) des cellules peut se lyser au SDS, la digestion enzymatique est arrêtée par l'ajout de 3 $\mu\text{l}$  d'une solution de Tris-HCl 1M pH 7,5 et refroidissement à 0°C.

#### *b/ Lavages des sphéroplastes*

Les sphéroplastes sont déposés sur 1 mL d'une solution de saccharose glacé (sucrose 15% w/v ; sorbitol 1,2M ; Tris-HCl 10 mM ; pH 7,5) et sont centrifugés 4 minutes à 500g à 4°C. Le surnageant est éliminé et les sphéroplastes sont lavés par resuspension et centrifugation (4 minutes à 500g à 4°C) dans deux solutions successives. Le premier lavage consiste en 1 mL d'une solution de sorbitol/Tris glacé (sorbitol 1,2M ; Tris-HCl 10 mM ; pH 7,5). Le second lavage en 1 mL d'une solution de Sorbitol/MES glacé (0,1M MES hydrate ; 1mM EDTA ; 0,5mM  $\text{MgCl}_2$  ; 1M sorbitol ; pH 6,4). Les sphéroplastes sont finalement remis en suspension dans 600  $\mu\text{L}$  de Sorbitol/MES glacé.

#### *c/ Étalements de chromatine*

Sur une lame de verre sont déposés 20  $\mu\text{L}$  de la suspension de sphéroplastes, puis successivement 40  $\mu\text{L}$  d'une solution de fixateur (4% paraformaldehyde ; 3,4% saccharose), 80  $\mu\text{L}$  d'une solution de détergent (1% Lipsol), et enfin 80  $\mu\text{L}$  d'une solution de fixateur. L'ensemble est étalé sur la lame de verre en utilisant une pipette Pasteur. À ce stade, le détergent va rompre les membranes plasmiques et nucléaires, tandis que le fixateur va créer des liaisons covalentes entre les molécules et créer ainsi des pontages protéine-protéine et ADN-protéine. La chromatine adhère au verre mais pas les protéines nucléosolubles et les débris cellulaires. Les lames sont mises à sécher une nuit complète. Elles peuvent éventuellement être conservées plusieurs jours à température ambiante et plusieurs mois à -20°C.

#### *d/ Révélation des protéines*

Les lames sont lavées quatre fois successivement pendant 15 minutes en PBS (136,9 mM NaCl ; 2,68 mM KCl ; 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; pH 7,2) sous agitation. Cette étape élimine les protéines solubles et les débris cellulaires. L'excès de PBS est éliminé et 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de Blocking Buffer (BB : 0.5% gélatine ; 0.5% BSA en PBS) est ajouté, puis recouvert délicatement par une lamelle couvre-objet de la taille de la lame. L'ensemble est placé dans une chambre humide à 26°C pendant 30 minutes. La lamelle est ensuite délicatement ôtée

Chapitre IV : Pds5 est un régulateur négatif et positif de l'association des cohésines aux chromosomes et de la cohésion

Figure 1 :

2760 :  $h^- \text{ura4}^+ \text{-pREP2res1}$

3324 :  $h^- \text{mis4-367 ura4}^+ \text{-pREP2res1 wpl::kan}^R \text{ rad21-9PK-kan}^R$

3328 :  $h^- \text{mis4-367 ura4}^+ \text{-pREP2res1 rad21-9PK-kan}^R$

3357 :  $h^- \text{mis4-367 ura4}^+ \text{-pREP2res1 pds5::ura4}^+ \text{rad21-9PK-kan}^R$

3413 :  $h^- \text{mis4-367 ura4}^+ \text{-pREP2res1 pds5::ura4}^+ \text{wpl::kan}^R \text{ rad21-9PK-kan}^R$

Figure 2 :

2760 :  $h^- \text{ura4}^+ \text{-pREP2res1}$

3330 :  $h^- \text{ura4}^+ \text{-pREP2res1 rad21-9PK-kan}^R$

3332 :  $h^- \text{ura4}^+ \text{-pREP2res1 wpl::kan}^R \text{ rad21-9PK-kan}^R$

3379 :  $h^- \text{ura4}^+ \text{-pREP2res1 pds5::ura4}^+ \text{rad21-9PK-kan}^R$

3412 :  $h^- \text{ura4}^+ \text{-pREP2res1 pds5::ura4}^+ \text{wpl::kan}^R \text{ rad21-9PK-kan}^R$

Figure 3 :

3203 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22}$

3333 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan}^R$

3378 :  $h^- \text{ura4 mis4-367 cdc25-22 pds5::ura4}^+ \text{rad21-9PK-kan}^R$

Figure 4 :

3203 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22}$

3333 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan}^R$

3378 :  $h^- \text{ura4 mis4-367 cdc25-22 pds5::ura4}^+ \text{rad21-9PK-kan}^R$

3355 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22 wpl::kan rad21-9PK-kan}^R$

3385 :  $h^- \text{ura4 mis4-367 cdc25-22 pds5::ura4}^+ \text{wpl::kan}^R \text{ rad21-9PK-kan}^R$

Figure 5 :

3203 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22}$

3333 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan}^R$

3378 :  $h^- \text{ura4 mis4-367 cdc25-22 pds5::ura4}^+ \text{rad21-9PK-kan}^R$

Figure 6 :

3203 :  $h^- \text{mis4-367 cdc25-22}$

et 100  $\mu$ L de la dilution d'anticorps sont immédiatement ajoutés (anticorps anti-PK : monoclonal de souris (ABD serotec clone SV5-Pk1 / 1mg/mL) : D500 en BB ; anticorps anti-myc : monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology clone 9E10 / 0,2mg/mL) : D200 en BB ; anticorps anti-GFP : polyclonal de lapin (Invitrogen fraction A11122 / 2mg/mL) : D800 en BB). Une nouvelle lamelle est délicatement déposée et l'ensemble est incubé pendant 3 heures à 26°C dans une chambre humide. La lamelle est délicatement ôtée et les lames sont lavées trois fois successivement pendant 10 minutes en PBS sous agitation. Une nouvelle étape de blocage est réalisée avec 100  $\mu$ L de BB pendant 10 minutes à 26°C. La lamelle est ensuite délicatement ôtée et 100  $\mu$ L de la dilution d'anticorps est immédiatement ajoutée (anticorps anti-souris FITC (Sigma F2883) D400 en BB ; anticorps anti-souris CY3 (Sigma C2181) D400 en BB ; anticorps anti-lapin FITC (Sigma F0382) D400 en BB). Une nouvelle lamelle est déposée, et l'ensemble est incubé pendant 2 heures à 26°C dans une chambre humide, puis la nuit à 4°C.

#### *e/ Montage des lames*

La chambre humide est préalablement placée une heure à 26°C à la suite de quoi les lames (avec lamelles) sont recouvertes de PBS. Ces étapes ont pour but de rendre moins visqueux le BB. Les lamelles sont enlevées, et les lames sont lavées trois fois en PBS avec agitation pendant 10 minutes. L'excès de PBS est drainé, puis 50 $\mu$ L de milieu de montage (2/3 solution de BB (v/v) ; 1/3 Vectashield (Vector Laboratories, v/v) ; 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L DAPI) sont déposées sur la lame. Une lamelle est délicatement posée sur la lame, puis scellée à l'aide de vernis.

### **3) Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)**

#### *a/ Fixation des cellules au formaldéhyde*

Il s'agit de créer des liaisons covalentes entre les molécules et créer ainsi des pontages protéine-protéine et ADN-protéine. Les cultures sont fixées par l'addition de formaldéhyde (2,54% final). Le temps de fixation est adapté en fonction de la température de la culture à fixer (25°C ou 36,5°C).

Fixation de culture réalisée à 25°C : Le volume adéquat de fixateur est ajouté à la culture, sous agitation constante à 200 rpm pendant 25 minutes à 25°C. La culture est alors transférée dans la glace avant de procéder à l'étape de lavage.

Fixation de culture réalisée à 36,5°C : Le volume adéquat de fixateur est ajouté à la culture, sous agitation constante à 200 rpm pendant 10 minutes à 36,5°C. La culture est alors transférée à température ambiante pendant 15 minutes supplémentaires, puis est transférée dans la glace avant de procéder à l'étape de lavage.

4818 :  $h^-$  *mis4-367 cdc25-22 pds5-GFP-kan<sup>R</sup> rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

4481 :  $h^-$  *mis4-367 cdc25-22 pds5-GFP-kan<sup>R</sup> wpl-13myc-hyg<sup>R</sup>*

Figure 7 :

3203 :  $h^-$  *mis4-367 cdc25-22*

3333 :  $h^-$  *mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

3726 :  $h^+$  *ura4 mis4-367 cdc25-22 wpl::hyg<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

3378 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 cdc25-22 pds5::ura4<sup>+</sup> rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

4513 :  $h^-$  *ura4 mis4-367 cdc25-22 pds5::ura4<sup>+</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

4514 :  $h^+$  *ura4 mis4-367 cdc25-22 pds5::ura4<sup>+</sup> wpl::hyg<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

Figure 8 :

3678 :  $h^-$  *ura4 psm3-GFP-nat<sup>R</sup>*

3912 :  $h^-$  *ura4 wpl::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> psm3-GFP-nat<sup>R</sup>*

3645 :  $h^-$  *ura4 wpl::hyg<sup>R</sup> psm3-GFP-nat<sup>R</sup>*

3676 :  $h^-$  *ura4 pds5::ura4<sup>+</sup> psm3-GFP-nat<sup>R</sup>*

Dans les deux cas, les cellules sont lavées quatre fois avec 30 mL de PBS glacé (136,9 mM NaCl ; 2,68 mM KCl ; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,2). Le PBS est totalement éliminé et les culots cellulaires sont conservés à -80°C.

#### *b/ Lyse des cellules*

Toutes les manipulations sont réalisées à 0°C (dans la glace). À chaque culot cellulaire décongelé sont ajoutés 125 µL de tampon de lyse préparés extemporanément et pré-refroidis à 0°C (50 mM hepes-KOH ; 140 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1% Triton X-100 (v/v) ; 0,1% sodium deoxycholate (w/v) ; 1 mM PMSF (Phénylmethylsulfonylfluoride) et une tablette d'inhibiteur de protéases est incluse pour 10 mL de tampon (Protease inhibitors « Complete EDTA free » Roche)). Enfin, 500 µL de billes de verre (SIGMA G-8772 425-600 µm) pré-refroidies à 0°C sont ajoutées.

Les cellules sont cassées par trois sessions de 20 secondes à 6,5 m/s à l'aide d'un cryofastprep (MPBio). Les tubes sont ensuite percés à la base et déposés dans un autre tube. Le tout est centrifugé à 1500g pendant 2 minutes à 4°C afin de récupérer le lysat cellulaire, auquel est finalement ajouté 325 µL de tampon de lyse.

#### *c/ Fragmentation de la chromatine et clarification*

Les lysats cellulaires sont soumis à une sonication dans un bain d'eau à 0°C pendant sept cycles de 30 secondes à 20 KHz (Bioruptor, Diagenode). Dans ces conditions, la chromatine est cassée en fragments d'environ 1000 pb. Les lysats sont centrifugés à 10 000g pendant 5 minutes à 4°C afin d'éliminer la majorité des particules insolubles. Le surnageant contenant la chromatine fragmentée est récolté.

#### *d/ Préparation des billes couplées aux anticorps*

25µL de billes magnétiques (Ademtech, billes couplées avec la protéine A) sont utilisées par échantillon. Pour chaque volume de billes est ajouté 9 volumes de solution de blocage (Ademtech) et l'ensemble est incubé 15 minutes sous agitation. Le surnageant est ensuite éliminé par aimantation des billes. Cinq volumes de tampon d'IP (0,4 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v)) sont ajoutés sur les billes ainsi que 3,5 µL d'anticorps anti-PK (Serotec, monoclonal de souris MCA1360 à 1 mg/mL). L'ensemble est incubé une heure sur une roue à température ambiante.

#### *e/ Immunoprécipitation*

Un volume d'extrait (50µl) est conservé dans la glace. Il servira de référence (extrait total). Un volume de 350 µL d'extrait est utilisé pour l'immunoprécipitation (IP). À ce volume d'extrait sont ajoutés 550 µL de tampon d'IP ainsi que 128,5 µL du mélange billes magnétiques - anticorps. Les échantillons sont incubés sur une roue à 4°C pendant une nuit.

---

## Table 2 Composition des différents milieux de culture utilisés pour la croissance de *S. pombe*

---

### Milieu complet de culture Yes+Ade

0,5% d'extrait de levure (w/v)  
 3% glucose (w/v)  
 150 mg/L d'adénine  
 100 mg/L d'uracile, de leucine et d'histidine

### Milieu synthétique de culture EMM<sub>2</sub>

3 g/L de potassium hydrogen phthalate  
 5,55 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O  
 5 g/L NH<sub>4</sub>Cl  
 2 % (w/v) glucose  
 150 mg/L d'adénine  
 100mg/L d'uracile, de leucine, d'histidine  
 20 mL/L de la solution de sels  
 1 mL/L de la solution de vitamines  
 0,1 mL/L de la solution de minéraux

---

<u>Solution de sels 50X :</u>	<u>Solution de vitamines 1 000X</u>	<u>Solution de minéraux 10 000X</u>
52,5 g/L MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1 g/L d'acide pantothénique	5 g/L d'acide borique
0,735 g/L CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	10 g/L d'acide nicotinique	4 g/L MnSO <sub>4</sub>
50 g/L KCl	10 g/L de <i>myo</i> -inositol	4 g/L ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O
2 g/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mg/L de biotine	2 g/L FeCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O
		0,4 g/L d'acide molybdique
		1 g/L de KI
		0,4 g/L CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O
		10 g/L d'acide citrique

---

*f/ Lavages des complexes immuns*

Les échantillons subissent cinq lavages, chaque solution de lavage (300µL) est incubée avec les échantillons pendant 10 minutes sur une roue à température ambiante. Le premier lavage est réalisé en 20 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 2 mM d'EDTA ; 1% Triton X-100 ; 0,1% SDS. Le second lavage avec une solution 20 mM Tris-HCl ; 500 mM NaCl ; 2 mM d'EDTA ; 1% Triton X-100 et 0,1% SDS. Le troisième lavage en 10 mM Tris-HCl ; 1 mM d'EDTA ; 1% sodium déoxycholate ; 1% Igepal et 25 mM de LiCl. Les deux derniers lavages sont réalisés avec 300 µL de TE (10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA) sans étape d'incubation.

*g/Dissociation des complexes immuns*

A chaque culot de billes sont ajoutés 290 µL de tampon TES (50 mM Tris-HCl ; 10 mM EDTA ; 0,5% SDS). De même pour les extraits totaux, 255 µL de tampon TES sont ajoutés. Le lysat est ensuite soumis à une digestion à la protéinase K. Pour cela, 10 µL de protéinase K 10 mg/mL (Boehringer Mannheim) sont ajoutés aux extraits (totaux et IPs) qui sont alors incubés pendant 2 heures à 37°C. Après la digestion à la protéinase K, les échantillons sont incubés à 65°C sur la nuit afin d'éliminer les pontages.

*h/Purification de l'ADN*

La purification d'ADN a été réalisée par une extraction au phénol / chloroforme. La première étape consiste à ajouter 350 µL de phénol / chloroforme / isoamylalcool 25:24:1 aux échantillons. Le tout est agité avec un vortex, puis centrifugé pendant 15 minutes à 10 000g à température ambiante. À l'issue de la centrifugation, 270 µL de la phase aqueuse sont prélevés, auxquels sont ajoutés 270 µL de chloroforme / isoamylalcool 24:1. Après vortex et centrifugation (10 minutes à 10 000g température ambiante), 180 µL de la phase aqueuse sont récoltés. Pour précipiter l'ADN, 20 µL d'une solution de NaCl 5 M et 400 µL d'éthanol absolu froid sont ajoutés. Le tout est mélangé avec un vortex et centrifugé à 10 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé. L'excès de sel est éliminé par lavage du précipité d'ADN avec 500 µL d'éthanol à 70% froid. Le tout est mélangé avec un vortex et centrifugé à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. L'éthanol est éliminé et le culot d'ADN séché à 65°C pendant 15 minutes environ. L'ADN est ensuite mis en solution dans 200 µL de TE pour les ADN totaux et 100µL de TE pour les ADN immunoprécipités.

*i/ Détermination du pourcentage d'ADN cible immunoprécipité*

La PCR en temps réel repose sur l'utilisation de l'agent Sybr Green I qui fluoresce à 520 nm après son intégration dans un ADN double brin. La fluorescence est proportionnelle à la concentration d'ADN double brin et est détectée par le thermocycleur MX3000P real time PCR (Stratagene), reliée à un ordinateur. Les réactions PCR sont réalisées en utilisant 2 µL d'ADN matrice dans un volume total de 20 µL. Le milieu de réaction est composé des amorces (0,2 µM)





et du « mix SYBR » (Abgene), contenant tous les réactifs nécessaires. La séquence du couple d'amorce utilisé pour les régions péri-centromériques (*imr*) est la suivante :

5' TTTTGGACAGAATGGATGGA 3'

5' GCGGAGTAAGGCTAATCACG 3'

Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées en condition d'amplification linéaire. Le protocole préconisé par Stratagene est une PCR à 2 températures où l'hybridation des amorces et l'élongation se font à 60°C. Le programme se compose d'une étape de dénaturation de l'ADN pendant 10 minutes à 95°C. Ensuite, l'amplification se déroule sur 35 cycles de 15 secondes à 95°C suivies de 1 minute à 60°C. Une gamme de dilutions sériées d'ADN génomique (50ng/μL à 5x10<sup>-4</sup>ng/μL) est utilisée pour obtenir une courbe étalon et ainsi calibrer la quantification. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes d'atteindre le seuil de détection de fluorescence, la concentration en molécules d'ADN peut être corrélée à l'intensité de fluorescence. Le nombre de cycles nécessaires pour arriver au seuil de détection est inversement proportionnel au nombre initial de copies d'ADN. L'ADN est ainsi quantifié dans l'IP et le total et le pourcentage d'ADN immunoprécipité est obtenu par le rapport :  
(nombre de copies dans l'IP) / [(nombre de copies dans le total) x facteur de dilution (20)]

## **E. Analyse des protéines de *S. pombe***

### *a/Préparation d'extraits totaux en condition native*

La culture est centrifugée à 1300g pendant deux minutes, puis le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire (5x10<sup>8</sup> cellules) est lavé une fois avec 10 mL de PBS froid. Après centrifugation (2 minutes à 1300g), le culot est remis en suspension dans une solution de PBS-PMSF (1 mM PMSF en PBS). Le surnageant est éliminé après centrifugation et les culots cellulaires sont congelés à -80°C.

Le culot préalablement décongelé dans la glace est remis en suspension dans 125 μL de tampon de lyse additionné d'inhibiteurs de protéases et phosphatases (50 mM Hepes ; 100 mM KCl ; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,25% Triton-X100 ; 1 mM DTT ; 10 mM sodium butyrate ; 10% glycérol et pour les inhibiteurs : 1 mM PMSF ; 1 mM Na vanadate ; 20 mM beta-glycerophosphate, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma P8215)). Par la suite, 500 μL de billes de verre (SIGMA G-8772 425-600 μm) pré-refroidies à 4°C sont ajoutés à la suspension cellulaire. Les cellules sont cassées à l'aide d'un cryofastprep (MPBio) pendant deux fois 20 secondes à 6,5 m/s. Les tubes sont ensuite percés à la base et déposés dans un autre tube. Le tout est centrifugé à 2000g pendant 1 minute à 4°C afin de récupérer le lysat cellulaire, auquel est ajouté 250 μL de tampon de lyse. Le lysat est clarifié trois fois (centrifugation 10 minutes à 10 000g à 4°C) puis conservé dans la glace.



Les extraits cellulaires totaux sont prêts à subir l'immunoprécipitation. Une électrophorèse peut aussi être directement réalisée à partir de ces extraits.

*b/ Immunoprécipitation à partir d'extraits protéiques totaux*

La méthode d'immunoprécipitation repose sur la propriété magnétique des billes microMACS couplées aux protéines A. Les protéines A ont la particularité de se fixer sur les fragments Fc des immunoglobulines avec plus ou moins d'affinité suivant l'origine spécifique de l'anticorps.

À partir de l'extrait préparé comme décrit ci-dessus, une fraction est mise de côté et constitue l'extrait total (I pour input). Le reste du lysat subit l'immunoprécipitation. Un volume de 50 µL de billes magnétiques préalablement équilibrées dans le tampon de lyse est ajouté à ce lysat, ainsi que 2 µg d'anticorps anti-GFP (A11122, Invitrogen). Le tout est incubé une heure dans la glace à l'abri de la lumière. Le lysat est déposé sur une colonne microMACS placée sur un portoir magnétique. Les billes magnétiques sont retenues dans la colonne ainsi que les complexes immuns associés. La fraction non retenue par la colonne est mise de côté (Fraction FT pour Flow Trough). La colonne est lavée cinq fois avec 200 µL de tampon de lavage glacé (50 mM Hepes ; 100 mM KCl ; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,25% TritonX-100 ; 1 mM DTT ; 10 mM sodium butyrate et 10% glycérol). Enfin, 20 µL (volume mort de la colonne) de tampon d'élution (Laemmli) préalablement chauffé à 95°C sont déposés sur la colonne. Après 5 minutes d'incubation, 50 µL de Laemmli sont de nouveau déposés. La fraction éluée, qui constitue la fraction immunoprécipitée (IP) est récoltée (50 µL).

*c/ Electrophorèse des protéines*

Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). L'électrophorèse est réalisée avec un appareil « Miniprotean II » commercialisé par la société BIO-RAD. Le gel de polyacrylamide en plaque mince (épaisseur 1,5 mm) est composé d'un gel de séparation homogène contenant 6% de polyacrylamide (w/v) au sommet duquel est coulé un gel de concentration de 1 à 2 cm de haut contenant 5% de polyacrylamide (w/v). La composition des gels est décrite dans le manuel « molecular cloning » (Sambrook, Fritsch et Maniatis).

Les échantillons protéiques sont déposés dans les puits. L'électrophorèse est réalisée dans du tampon TGS (25 mM tris ; 250 mM glycine ; 0,1% SDS) à 180 volts.

*d/ Transfert des protéines sur membrane*

Le transfert des protéines du gel sur une membrane a été réalisé par transfert électrique semi sec. La membrane de nitrocellulose (Amersham) a été immergée quelques secondes dans du tampon de transfert (39 mM glycine ; 48 mM tris ; 20% ethanol (v/v) ; 3,7% SDS). Sur le pôle positif (cathode) de l'appareil de transfert (Amersham Hoefer 77TE), la membrane humide



est déposée sur trois papiers Wattman préalablement imbibés de tampon de transfert. Le gel contenant les protéines à transférer, puis quatre papiers Wattman également imbibés sont successivement déposés sur la membrane. Le courant appliqué entre la cathode et l'anode est de 0,8 mA par cm<sup>2</sup> de gel, soit environ 40 mA pendant une heure. La membrane peut alors être traitée pour un immunoblot.

*e/ Immunoblot*

Immédiatement après le transfert des protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose, celle-ci a été incubée dans du TBST (20 mM tris ; 137 mM NaCl ; 0,1% tween-20) additionné de 5% lait (w/v lait écrémé) pendant 15 minutes avec agitation douce.

La membrane est incubée une heure à température ambiante dans du TBST 5% lait additionné de l'anticorps primaire. Les différents anticorps sont listés ci-dessous :

- anti-GFP (Roche clones 7.1 et 13.1 / 0,4mg/μL) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> ;
- anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> (200μg/μL, anticorps obtenus par immunisation de lapins avec le peptide RTIGLKK<sup>106Ac</sup>DEYSL, puis immuno-déplété contre le peptide non acétylé et enfin purifié par affinité contre le peptide acétylé – La caractérisation de cet anticorps est présentée dans le chapitre III) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> ;
- anti-HA (Covance clone 16B12 / 1mg/mL) dilué au 1/2000<sup>ème</sup> ;
- anti-myc (Santa-Cruz Biotechnology clone 9E10 / 200μg/mL) dilué au 1/2000<sup>ème</sup> ;
- anti-Psm1 (obtenu par immunisation de lapins avec un peptide recombinant comprenant les 630 résidus N-terminaux, les anticorps ont été ensuite purifiés par affinité contre la protéine recombinante) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> ;
- anti-Psm3 (400μg/mL, anticorps obtenu par immunisation de lapins avec un peptide recombinant comprenant les 631 résidus N-terminaux, puis les anticorps ont été purifiés par affinité contre la protéine recombinante) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> ;
- anti-Rad21 (900μg/mL, anticorps obtenus par immunisation de lapins avec une protéine recombinante correspondant aux 413 résidus C-terminaux, puis les anticorps ont été purifiés par affinité contre la protéine recombinante) dilué au 1/2000<sup>ème</sup>).

La membrane a été ensuite lavée à température ambiante pendant 30 minutes dans trois bains de TBST. La membrane est ensuite incubée pendant une heure à température ambiante dans du TBST 5% lait contenant l'anticorps secondaire (anti-souris couplé à la peroxydase (Sigma A7282) dilué au 1/10000<sup>ème</sup> ; anti-lapin couplé à la peroxydase (NA9340) dilué au 1/10000<sup>ème</sup>). Enfin, la membrane a été lavée comme précédemment pendant 30 minutes dans trois bains de TBST. La membrane a été traitée avec les réactifs du kit ECL<sup>+</sup> (Amersham) et révélée comme préconisé par le fournisseur.



---

## **F. Techniques d'analyse cytologique**

### **1) Coloration de l'ADN au DAPI**

Le DAPI (4', 6'-diamino-2 phénylindole dihydrochloride) est un colorant de l'ADN qui se fixe préférentiellement dans le petit sillon de la double hélice. La suspension cellulaire est centrifugée et le culot est remis en suspension dans 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de DAPI à 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS. Après quelques minutes d'incubation à l'abri de la lumière, les cellules sont brièvement centrifugées, remises en suspension dans du PBS, et prélevées pour le montage.

### **2) Coloration des *septa* au calcofluor**

Le calcofluor est un fluorochrome possédant une affinité importante pour la chitine nouvellement synthétisée des parois des levures. La coloration des *septa* a été effectuée à partir de cellules fixées à l'éthanol 70%. Un volume correspondant à  $5 \times 10^6$  cellules est réhydraté dans 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Les cellules sont centrifugées (1 minute à 1300g), et le surnageant est éliminé. Les cellules sont lavées dans 200  $\mu\text{L}$  de PBS par centrifugation (1 minute à 1300g). Le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de DAPI 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et Calcofluor 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS. Les cellules sont incubées cinq minutes à température ambiante avant de procéder au montage.

### **3) Montage des lames**

Les lamelles sont lavées avec un détergent et rincées à l'eau distillée. Une solution de poly-L lysine (1 mg/mL dans de l'eau) est déposée sur les lamelles afin de permettre l'adhésion des cellules. La solution est laissée quelques secondes puis retirée par aspiration. Les lamelles sont soigneusement essuyées avec du papier absorbant. Les cellules sont délicatement étalées sur la lamelle. Après séchage à température ambiante, la lamelle est posée délicatement (côté cellules) sur une goutte de milieu de montage (Vectashield, Vector Laboratories) préalablement déposée sur une lame. La lamelle est fixée sur la lame avec deux pointes de vernis.

### **4) Microscopie**

Le microscope utilisé est un microscope à fluorescence (Leica DMRXA), muni d'une caméra CCD reliée à un ordinateur. L'observation est faite avec un objectif 100X ou 63X sous immersion. Les signaux de fluorescence sont quantifiés en utilisant le logiciel Metamorph. La





manipulation des images pour la construction des figures a été réalisée avec le logiciel Adobe Photoshop.

*a/ Obtention et quantification des signaux de fluorescence de Rec8-GFP*

Huit sections de 0,4  $\mu\text{m}$  d'incrément sont acquises et converties en une unique image à deux dimensions par la projection de l'intensité maximale. L'intensité des *foci* de fluorescence de Rec8-GFP a été mesurée sur une surface carrée (4x4 pixels) contenant le noyau. Le bruit de fond du signal de fluorescence est évalué en plaçant la surface carrée hors de la région nucléaire et la valeur est soustraite pour chaque noyau. L'intensité de fluorescence est mesurée pour 50 à 100 noyaux par échantillon. La moyenne est calculée ainsi que l'intervalle de confiance calculé avec  $\alpha = 0,05$ .

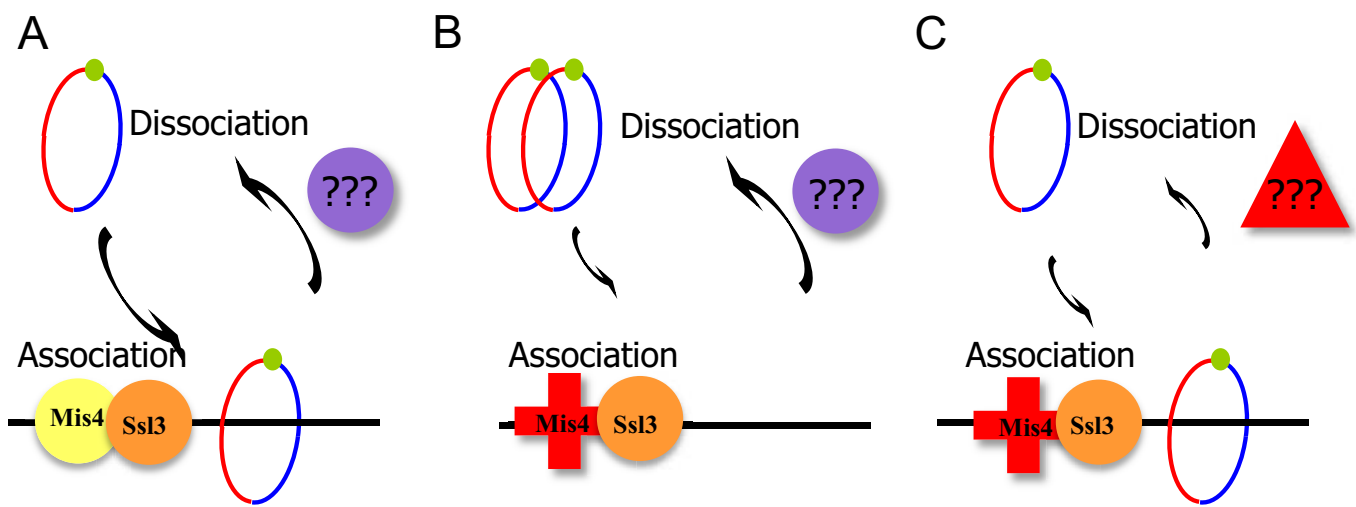
*b/ Quantification des signaux de fluorescence des étalements de chromatine*

L'intensité des signaux de fluorescence a été mesurée sur une surface carrée (50x50 pixels) contenant le noyau. Le bruit de fond du signal de fluorescence est mesuré en déplaçant la surface carrée dans une zone immédiatement adjacente et dépourvue de noyau. Le signal correspondant au bruit de fond est soustrait pour chaque noyau. Comme précédemment, l'intensité de fluorescence est mesurée pour 50 à 100 noyaux par échantillon. La moyenne est calculée ainsi que l'intervalle de confiance calculé avec  $\alpha = 0,05$ .

Pour comparer les résultats d'expériences indépendantes, les données ont été normalisées en prenant comme référence la souche contrôle *cdc25-22 mis4-367 rad21-9PK*, présente dans tous les jeux de données. La valeur moyenne de fluorescence dans la souche de référence au temps initial est fixée à 40 (valeur moyenne de toutes les expériences) et toutes les données ont été normalisées par rapport à cette valeur. Les données présentées sont la moyenne d'au moins deux réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.







### Figure 1. Principe du crible génétique

Dans les conditions normales en phase G1 du cycle cellulaire (A), la fraction de cohésines liées à la chromatine résulte d'un équilibre entre les activités d'association et de dissociation. C'est également le cas pour le mutant *mis4-367* à température permissive (25°C). Dans un mutant du complexe de chargement (B), l'activité d'association des cohésines à la chromatine est réduite et l'équilibre association/dissociation est rompu : les cohésines sont dissociées de la chromatine. C'est le cas pour le mutant *mis4-367* à température restrictive (37°C). Dans ce contexte, l'inactivation par mutation de l'activité de dissociation (C) devrait compenser la faible activité de chargement. Si ce modèle est exact, l'activité de dissociation devrait être identifiée par un crible génétique consistant à rechercher des mutations capables de restaurer la croissance de la souche *mis4-367* à 37°C.

## Chapitre II : Crible génétique de facteurs régulant la dynamique des cohésines

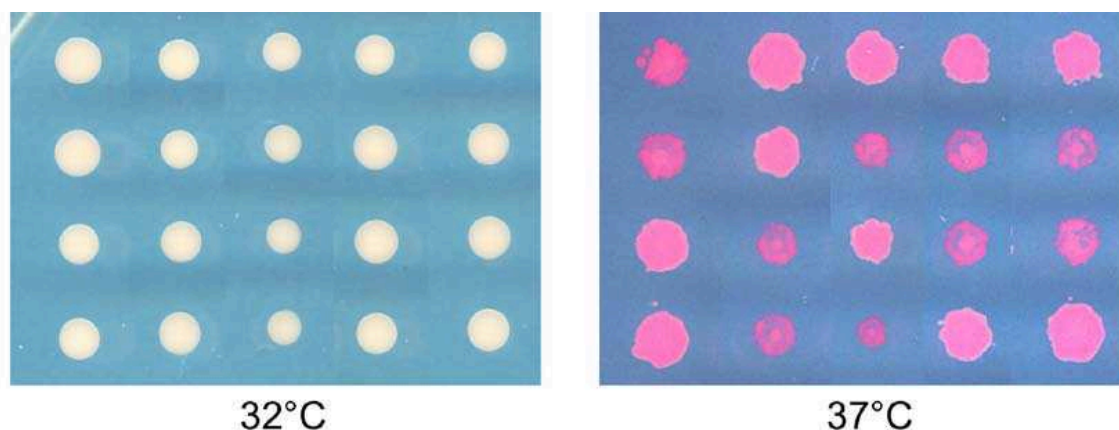
Chez *S. pombe* ainsi que chez les mammifères, le mode d'association des cohésines à la chromatine est variable en fonction notamment de la situation des cellules dans le cycle cellulaire. Chez les mammifères en phase G1, l'intégralité de la population de cohésine s'associe et se dissocie de la chromatine avec un temps de résidence estimé entre 10 et 25 minutes (Gerlich et al, 2006; Kueng et al, 2006). De manière similaire chez *S. pombe*, les cohésines se dissocient totalement de la chromatine suite à l'inactivation du complexe de chargement des cohésines en phase G1 (Bernard et al, 2008). À l'époque où ces observations ont été faites, une hypothèse proposait que la dissociation des cohésines en phase G1 soit liée à l'existence d'un mécanisme actif. Un crible génétique a été entrepris afin de découvrir ce ou ces facteurs et de manière plus générale, tous les facteurs impliqués dans la régulation de l'équilibre entre l'association et la dissociation des cohésines de la chromatine.

Le crible génétique consiste en la recherche de mutations supprimant le caractère thermosensible conféré par l'allèle *mis4-367*. Le principe est présenté dans la Figure 1. À température restrictive, la fonction de chargement des cohésines est compromise et les cohésines sont dissociées de la chromatine (Fig. 1B). Une altération de l'activité déstabilisatrice devrait restaurer un équilibre entre ces deux forces et le niveau de cohésines associées à la chromatine pourrait être suffisant pour permettre à la souche *mis4-367* de croître à température restrictive (Fig. 1C). Des mutants suppresseurs ont donc été sélectionnés par un crible direct de croissance de la souche *mis4-367* à température restrictive.

Au cours de cette étude, l'implication de Wapl dans la dissociation des cohésines a été publiée (Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006). Nous avons cependant poursuivi l'analyse des mutants suppresseurs jusqu'à l'identification des gènes correspondant. De manière surprenante, les quatre gènes identifiés sont impliqués dans des processus biologiques *a priori* distincts de la ségrégation des chromosomes. Néanmoins, les mutations suppresseurs induisent toutes un allongement de la durée de la phase G1. Des analyses complémentaires suggèrent que le signal de carence azotée est une composante de l'effet suppresseur, mais celui-ci pourrait également s'exercer *via* une altération de la dynamique des cohésines.

### I. Analyse génétique des mutants suppresseurs de *mis4-367*

À mon arrivée au laboratoire, une collection de mutant suppresseurs avait été constituée, soit après mutagenèse aux UV (ces mutants sont notés *sup<sup>UV</sup>*), soit sans mutagenèse, en



**Figure 2. Ségrégation monogénique du caractère supprimeur**

Les tétrades issues du croisement *mis4-367 sup<sup>012</sup> x mis4-367* ont été disséquées et les colonies sur milieu complet contenant un colorant vital (phloxine B) à 37°C (température restrictive). Le phénotype thermosensible se traduit à 37°C par la présence de colonies rouge foncé sur phloxine. Toutes les tétrades ont deux descendants thermosensibles et deux non thermosensibles. Ceci nous permet de conclure que le phénotype supprimeur de la souche *sup<sup>012</sup>* est dû à une seule mutation.

	Groupe 1			Groupe 3	Groupe 2						Groupe 4
h <sup>+</sup> /h <sup>-</sup>	<i>sup<sup>UV2</sup></i>	<i>sup<sup>02</sup></i>	<i>sup<sup>011</sup></i>	<i>sup<sup>UV11</sup></i>	<i>sup<sup>013</sup></i>	<i>sup<sup>010</sup></i>	<i>sup<sup>08</sup></i>	<i>sup<sup>09</sup></i>	<i>sup<sup>03</sup></i>	<i>sup<sup>012</sup></i>	<i>sup<sup>UV15</sup></i>
<i>sup<sup>UV2</sup></i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sup<sup>02</sup></i>		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sup<sup>011</sup></i>			-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>sup<sup>UV11</sup></i>				-	+	+	-	+	+	+	+
<i>sup<sup>013</sup></i>					-	-	-	-	-	-	+
<i>sup<sup>010</sup></i>						-	-	-	-	-	+
<i>sup<sup>08</sup></i>							-	-	-	-	-
<i>sup<sup>09</sup></i>								-	-	-	+
<i>sup<sup>03</sup></i>									-	-	+
<i>sup<sup>012</sup></i>										-	+
<i>sup<sup>UV15</sup></i>											-

**Table 1 : Les mutations supprimeurs de *mis4-367* définissent quatre groupes de liaison**

Chaque mutant (de génotype *sup<sup>-</sup> mis4-367*) a été croisé avec les dix autres et par lui-même comme contrôle. L'apparition de recombinants thermosensibles dans la descendance (+) indique que les deux gènes sont distincts. Par exemple, *sup<sup>UV15cs</sup>* donne des descendants thermosensibles dans tous les croisements : il forme donc un groupe de liaison à lui seul. Les mutations supprimeurs de *mis4-367* définissent quatre groupes de liaison.

sélectionnant les mutants spontanés émergeant sur milieu solide à 37°C. Onze mutants supprimés pour le phénotype thermosensible de *mis4-367* avaient été identifiés, dont un présente un phénotype de cryosensibilité (pas de croissance à 17°C). Il avait été montré également par analyse génétique que ces mutants ne sont pas des révertants de la mutation *mis4-367* mais bien des supprimeurs extragéniques. Mon travail a tout d'abord consisté à réaliser l'analyse génétique et l'identification des gènes concernés pour ensuite poser la question de leur implication dans la régulation de la dynamique des cohésines.

### A. Ségrégation monogénique du phénotype supprimé

Pour déterminer si le phénotype supprimé est dû à une seule mutation, les souches mutantes supprimées ont été croisées avec la souche *mis4-367*. Un exemple représentatif des résultats est présenté dans la Figure 2. Les onze mutants ont été analysés et ont tous montré une ségrégation monogénique du phénotype supprimé. Dans la souche *sup<sup>UV15cs</sup>*, le phénotype cryosensible co-ségrège avec le phénotype supprimé, indiquant que les deux phénotypes sont la conséquence d'une seule mutation.

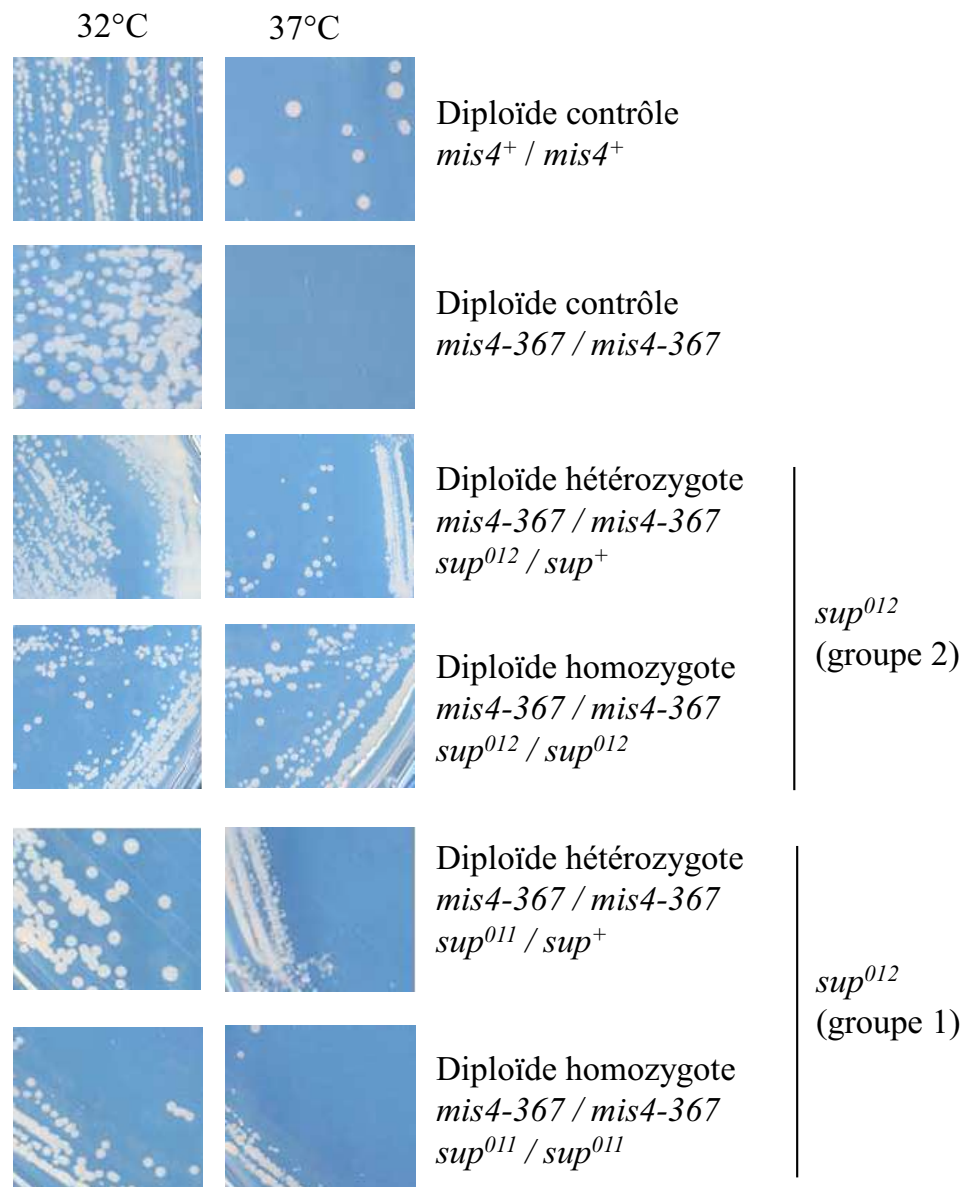
### B. Test de liaison

Cette analyse permet d'estimer le nombre de gènes identifié par le crible. Les souches mutantes supprimées ont été croisées entre elles. L'apparition de descendants thermosensibles indique la présence de deux supprimeurs distincts (la fréquence attendue est de 1/4 si les deux supprimeurs sont génétiquement indépendants et inférieure à 1/4 s'ils sont liés). En revanche, l'absence de descendants thermosensibles indique soit que les deux gènes supprimeurs sont très liés génétiquement mais distincts, soit que les deux mutations touchent le même gène (les deux supprimeurs sont allèles).

La Table 1 rassemble les résultats de cette analyse. Les mutants *sup<sup>UV2</sup>*, *sup<sup>02</sup>* et *sup<sup>011</sup>* génèrent des descendants thermosensibles lorsqu'ils sont croisés avec tous les autres mutants, mais pas entre eux : ils forment le groupe 1. Le groupe 2 est quant à lui défini par 6 mutants : *sup<sup>013</sup>*, *sup<sup>010</sup>*, *sup<sup>08</sup>*, *sup<sup>09</sup>*, *sup<sup>03</sup>* et *sup<sup>012</sup>*. Le mutant *sup<sup>UV15cs</sup>* donne des recombinants thermosensibles avec tous les autres mutants: il forme donc un groupe à lui seul, le groupe 4. De la même manière, *sup<sup>UV11</sup>* forme seul le groupe 3.

### C. Test de dominance / récessivité

Il s'agit de mettre en présence dans la même cellule, l'allèle mutant et l'allèle sauvage d'un gène donné. Pour cela, les souches diploïdes suivantes ont été construites :



**Figure 3 : Les allèles suppresseurs de *mis4-367* sont dominants**

Les colonies diploïdes isolées ont été striées à 32°C et 37°C, pour tester leur phénotype thermosensible. Les souches diploïdes homozygotes servent de contrôle. Les diploïdes *sup<sup>012</sup>* (groupe 2) et *sup<sup>011</sup>* (groupe 1) forment de nouvelles colonies à 37°C à l'état hétérozygote. Les allèles *sup<sup>012</sup>* et *sup<sup>011</sup>* semblent donc être dominants sur l'allèle sauvage.



- diploïde contrôle homozygote pour la mutation *mis4-367* (sauvage au locus suppresseur) :  $h+/h- ade6-210/ade6-216 mis4-367/mis4-367 sup^+/sup^+$ ). Son phénotype est thermosensible.
- diploïde contrôle, homozygote pour *mis4-367* et pour l'allèle mutant du suppresseur ( $h+/h- ade6-210/ade6-216 mis4-367/mis4-367 sup^-/sup^-$ ) de phénotype non thermosensible.
- diploïde homozygote pour *mis4-367* et hétérozygote au locus suppresseur ( $h+/h- ade6-210/ade6-216 mis4-367/mis4-367 sup^-/sup^+$ ). Si le phénotype est non thermosensible, alors l'allèle muté est dominant par rapport à l'allèle sauvage. Si le phénotype est thermosensible, l'allèle muté est récessif.

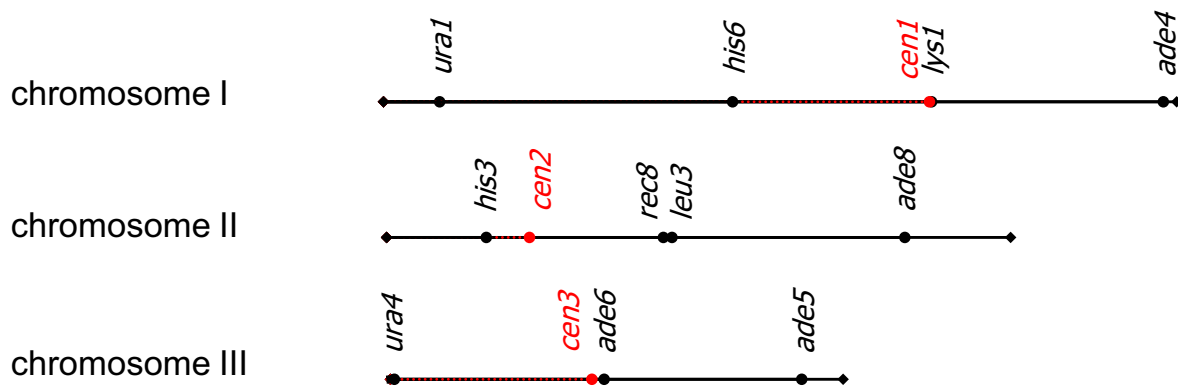
Les diploïdes homozygotes au locus suppresseur  $sup^{UV2}/sup^{UV2} sup^{UV11}/sup^{UV11}$  n'ont pas pu être obtenus (groupe 1 et 3), et le diploïde homozygote au locus  $sup^{UV15cs}$  n'a pas pu être maintenu (groupe 4). La raison n'est pas connue mais il a été observé que les mutants affectant la ségrégation des chromosomes peuvent être extrêmement instables à l'état diploïde (Bernard et al, 1998).

Le phénotype thermosensible a été testé à partir d'une colonie diploïde isolée et striée à 32°C (température permissive contrôle) et 37°C (température restrictive pour le diploïde *mis4-367*). Un exemple des résultats obtenus est présenté dans la Figure 3. Les membres du groupe 2 peuvent former des colonies à l'état homozygote au locus suppresseur à 37°C. À l'état hétérozygote, ils ont une croissance comparable à celle du diploïde homozygote. Les allèles  $sup^{03}$ ,  $sup^{08}$ ,  $sup^{09}$ ,  $sup^{010}$ ,  $sup^{012}$  et  $sup^{013}$  seraient donc dominants par rapport à l'allèle sauvage. De la même manière, les diploïdes du groupe 1 peuvent croître à l'état homozygote et hétérozygote à 37°C. Les mutations  $sup^{02}$  et  $sup^{011}$  semblent donc être dominantes sur l'allèle sauvage.

En résumé, tous les allèles testés du groupe 1 et du groupe 2 seraient dominants. Pour les groupes 3 et 4, l'instabilité des souches diploïdes ne nous a pas permis d'effectuer l'analyse.

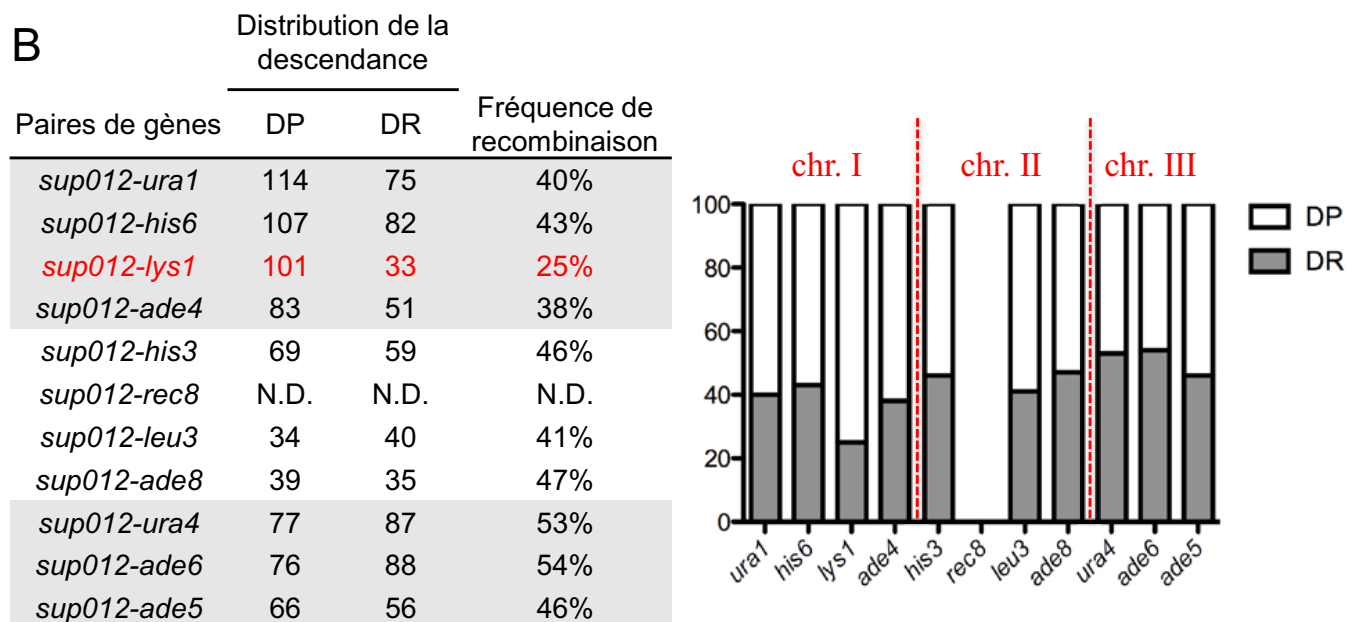
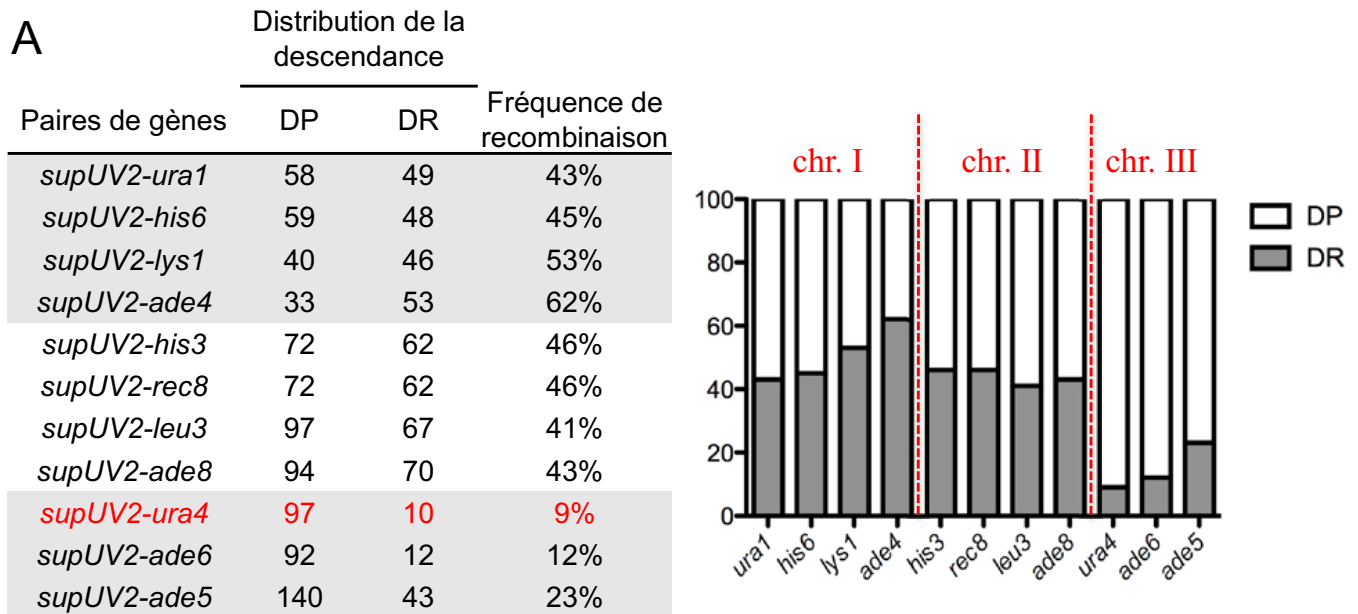
Il est fréquent d'observer des événements de conversion génique dans les souches diploïdes de *S. pombe*. Un tel événement conduit à la perte de l'hétérozygotie au locus affecté. Il est donc possible que les mutants *a priori* dominants soient en fait des diploïdes devenus homozygotes pour la mutation suppresseur. Il est donc important de vérifier *a posteriori* que les souches diploïdes contiennent effectivement les allèles souhaités. Pour ce faire, les colonies diploïdes formées à 37°C ont été prélevées et transférées sur un milieu de sporulation. Les tétrades obtenues ont été disséquées afin de suivre la ségrégation du locus suppresseur. La majorité des tétrades n'étaient pas complètes. Néanmoins, nous avons pu observer la ségrégation du suppresseur dans la descendance pour tous les diploïdes (données non montrées) ce qui permet d'affirmer que les allèles mutants des groupes 1 et 2 sont des suppresseurs dominants.





**Figure 4. Position relative des différents marqueurs utilisés pour la cartographie génétique des mutants suppresseurs en fond *swi5-39***

La position des centromères est indiquée en rouge.

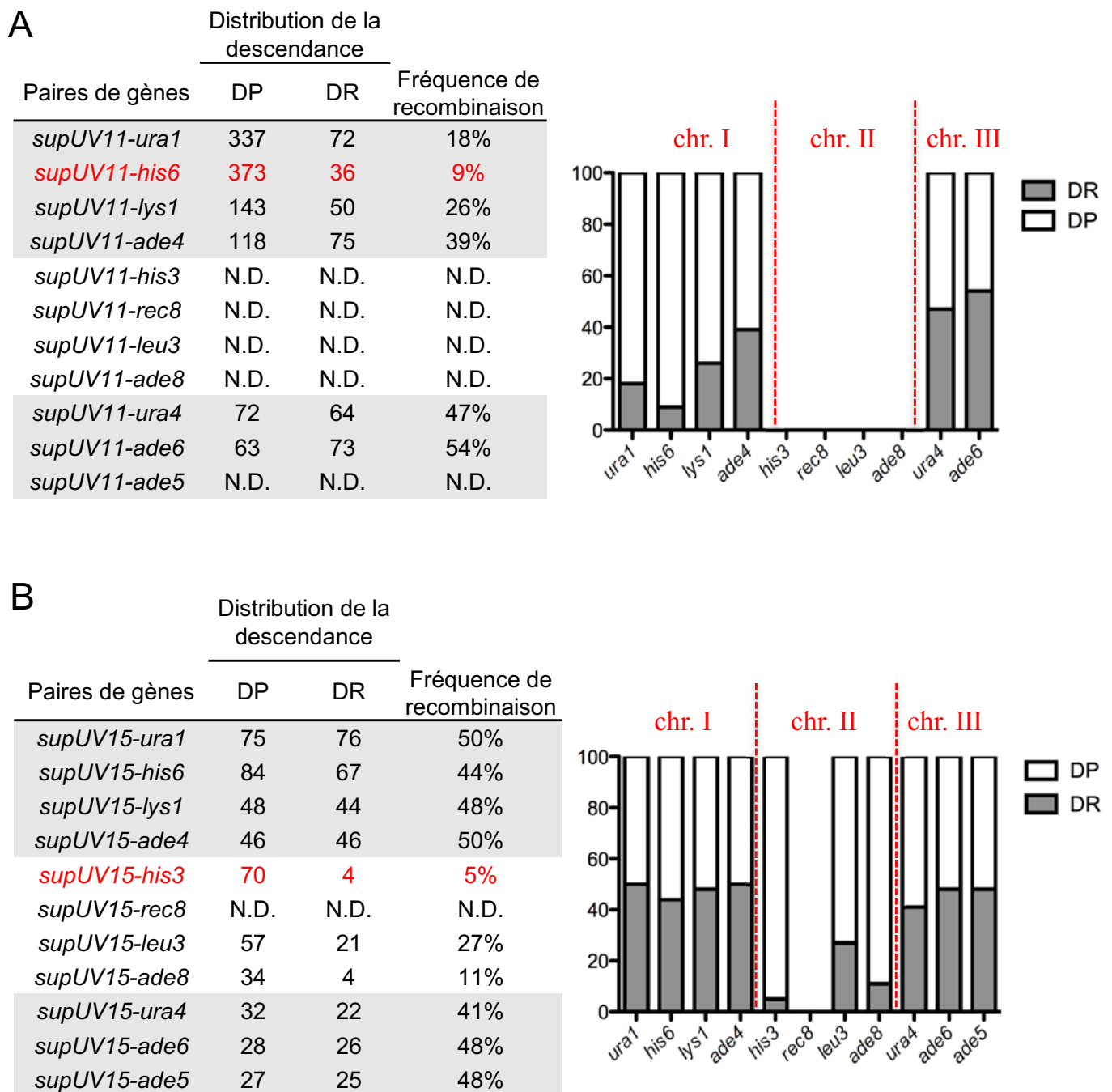


**Figure 5. Positionnement des mutations suppresseurs sur les chromosomes**

Les fréquences de recombinaison sont déterminées à partir de croisements homozygotes pour *swi5* dans lesquelles la fréquence de recombinaison est réduite d'un facteur dix en moyenne (Schmidt, 1993). L'analyse de spores en vrac permet de comptabiliser les descendants de type parentaux (DP) et les descendants recombinés (DR).

**A.** Le gène *sup<sup>UV2</sup>* est lié aux marqueurs du chromosome III.

**B.** Le gène *sup<sup>012</sup>* est lié au marqueur *lys1* (chromosome I).

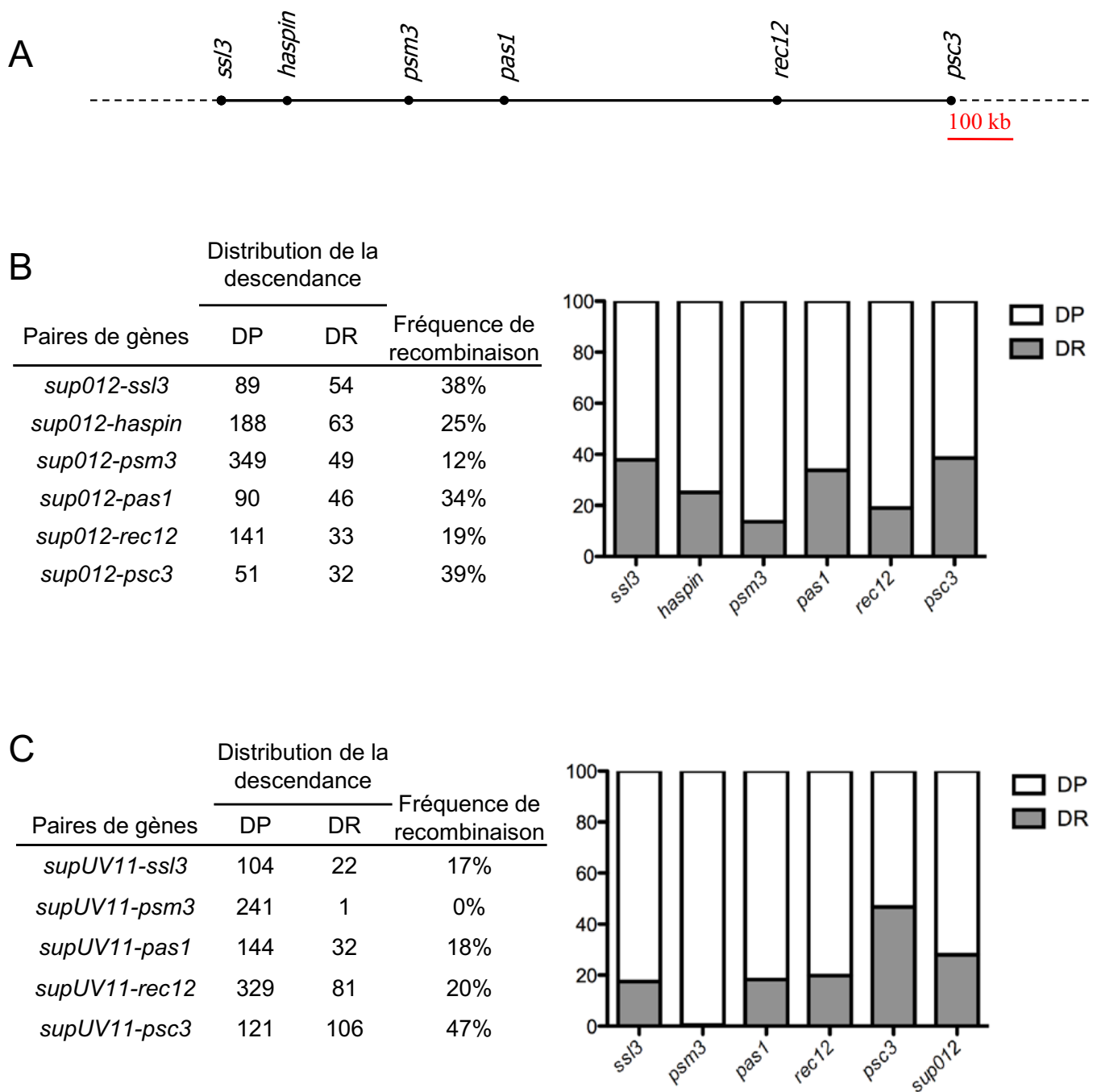


### Figure 6. Positionnement des mutations suppresseurs sur les chromosomes

Les fréquences de recombinaison sont déterminées à partir de croisements homozygotes pour *swi5<sup>-</sup>* dans lesquelles la fréquence de recombinaison est réduite d'un facteur dix en moyenne (Schmidt, 1993). L'analyse de spores en vrac permet de comptabiliser les descendants de type parentaux (DP) et les descendants recombinés (DR).

**A.** Le gène *sup<sup>UV11</sup>* est lié aux marqueurs du chromosome I.

**B.** Le gène *sup<sup>UV15</sup>* est lié aux marqueurs du chromosome II.



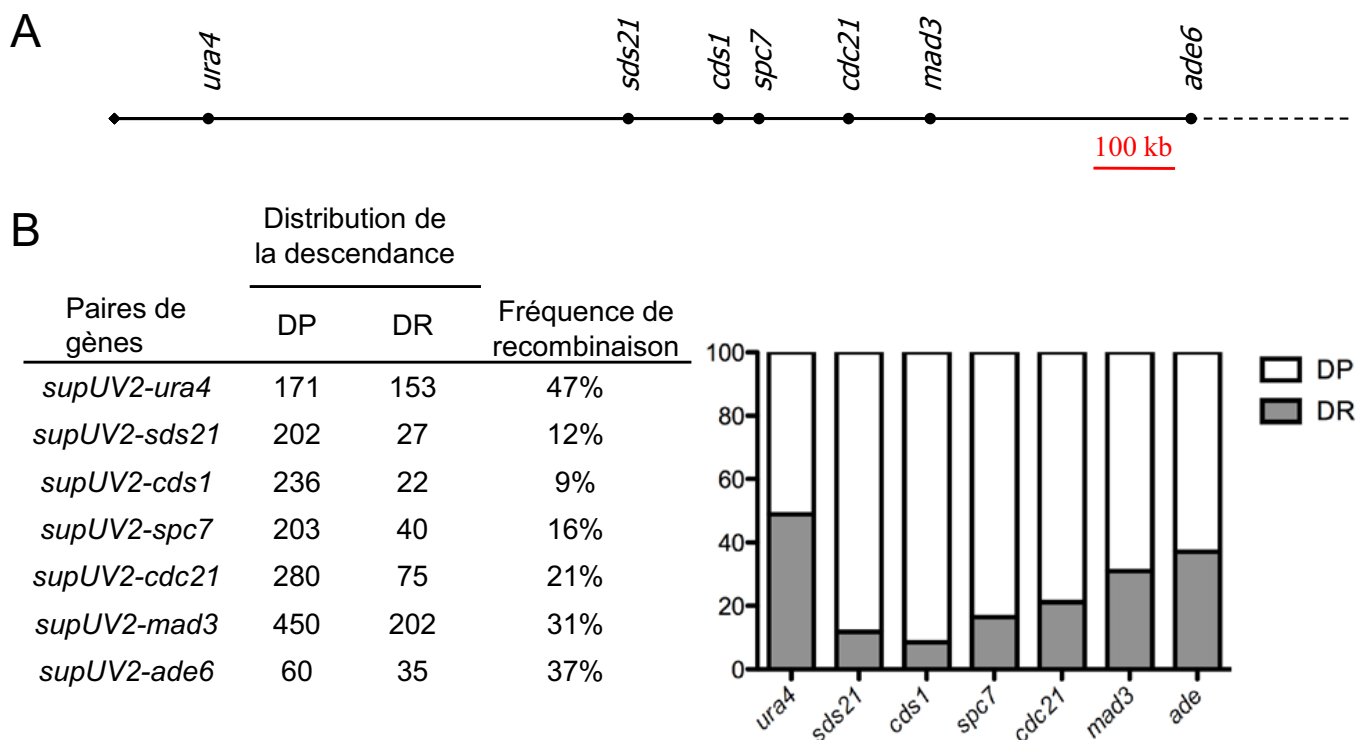
### Figure 7. Positionnement des mutations suppresseurs sur le chromosome I

L'analyse de spores en vrac permet de comptabiliser les descendants de type parentaux (DP) et les descendants recombinés (DR).

A. Schéma de la position relative des différents marqueurs utilisés sur le chromosome I.

B. Le gène *sup<sup>012</sup>* est lié aux gènes *psm3* et *rec12*.

C. Le gène *sup<sup>UV11</sup>* est fortement lié au gène *psm3*.

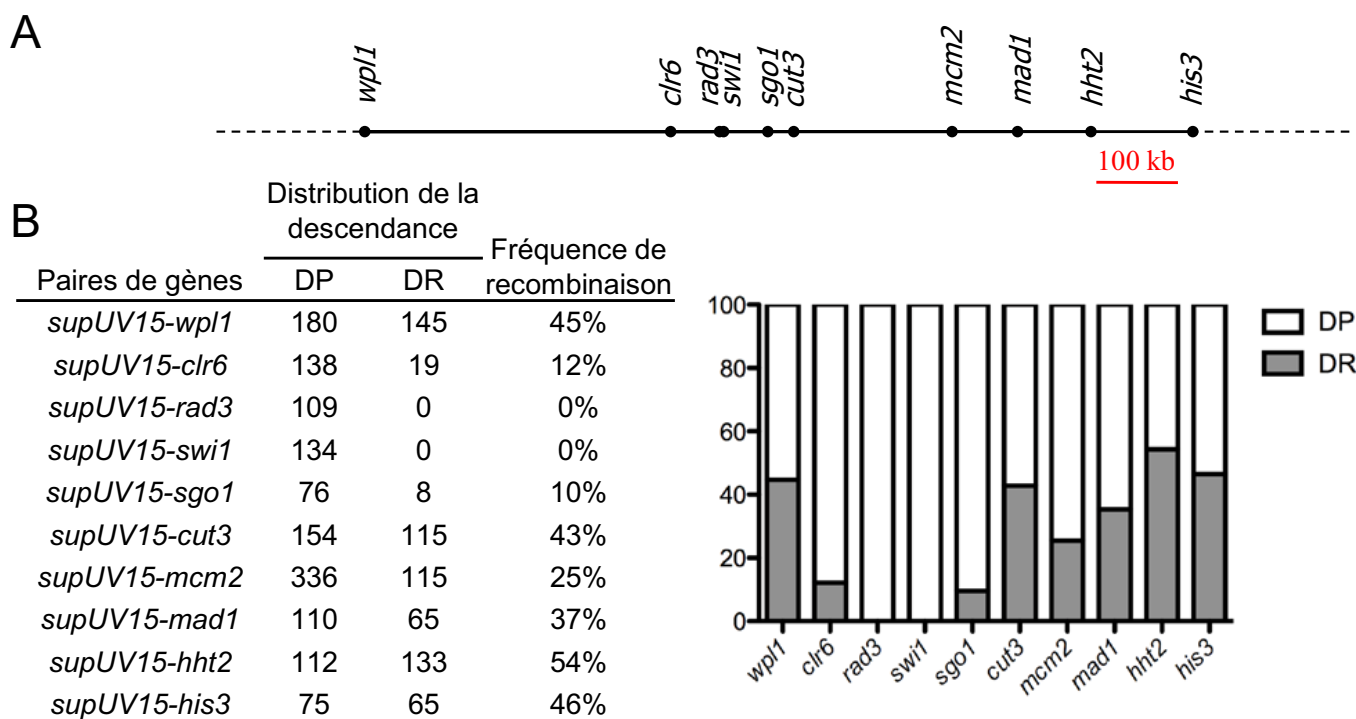


**Figure 8. Positionnement de *sup<sup>UV2</sup>* sur le chromosome III**

L'analyse de spores en vrac permet de comptabiliser les descendants de type parentaux (DP) et les descendants recombinés (DR).

**A.** Schéma de la position relative des différents marqueurs utilisés sur le chromosome III.

**B.** Le gène *sup<sup>UV2</sup>* est lié au gène *cds1*.



**Figure 9. Positionnement de *sup<sup>UV15es</sup>* sur le chromosome II**

L'analyse de spores en vrac permet de comptabiliser les descendants de type parentaux (DP) et les descendants recombinés (DR).

**A.** Schéma de la position relative des différents marqueurs utilisés sur le chromosome II.

**B.** Le gène *sup<sup>UV15es</sup>* est lié aux gènes *rad3* et *swi1*.

## ***II. Identification des gènes par clonage positionnel***

L'identification des gènes d'intérêt chez *S. pombe* est généralement réalisée par complémentation fonctionnelle du phénotype mutant après transformation par une banque d'ADN génomique. Dans le cas présent, il s'agirait d'un crible négatif (restauration de la thermosensibilité) et de plus, les mutants sont dominants. Nous avons donc entrepris l'identification des gènes par clonage positionnel.

### **A. Analyse génétique dans un contexte peu recombinant**

Afin d'identifier rapidement le bras de chromosome sur lequel sont localisées chacune des mutations, nous avons utilisé la méthode de *long-range mapping* développée par Schmidt (1993). Le principe est d'utiliser un contexte génétique *swi5* mutant, réduisant la fréquence de recombinaison d'un facteur quatre à seize suivant les régions chromosomiques (Schmidt, 1993). Ce fond génétique permet ainsi d'observer une liaison entre les marqueurs *ura1* et *ade4*, situés pourtant aux extrémités opposées du chromosome I. La mutation *swi5* a initialement été isolée dans un crible sélectionnant des mutants altérant la fréquence de conversion au locus du type sexuel (Gutz & Schmidt, 1985).

La première étape est d'introduire la mutation *swi5-39* dans toutes les souches servant à la cartographie, car cette mutation est récessive. La présence de la mutation *swi5-39* se manifeste par une coloration marbrée des colonies  $h^{90}$  lorsqu'elles sont répliquées sur milieu de sporulation et exposées à des vapeurs d'iode. Des souches homothalliques ont ainsi été construites pour introduire la mutation *swi5-39* :  $h^{90} swi5-39 mis4-367 sup^-$ . Celles-ci ont été ensuite croisées dans un fond génétique *swi5-39* pour isoler les souches hétérothalliques utilisées pour la cartographie. La position relative des marqueurs utilisés est indiquée dans la Figure 4.

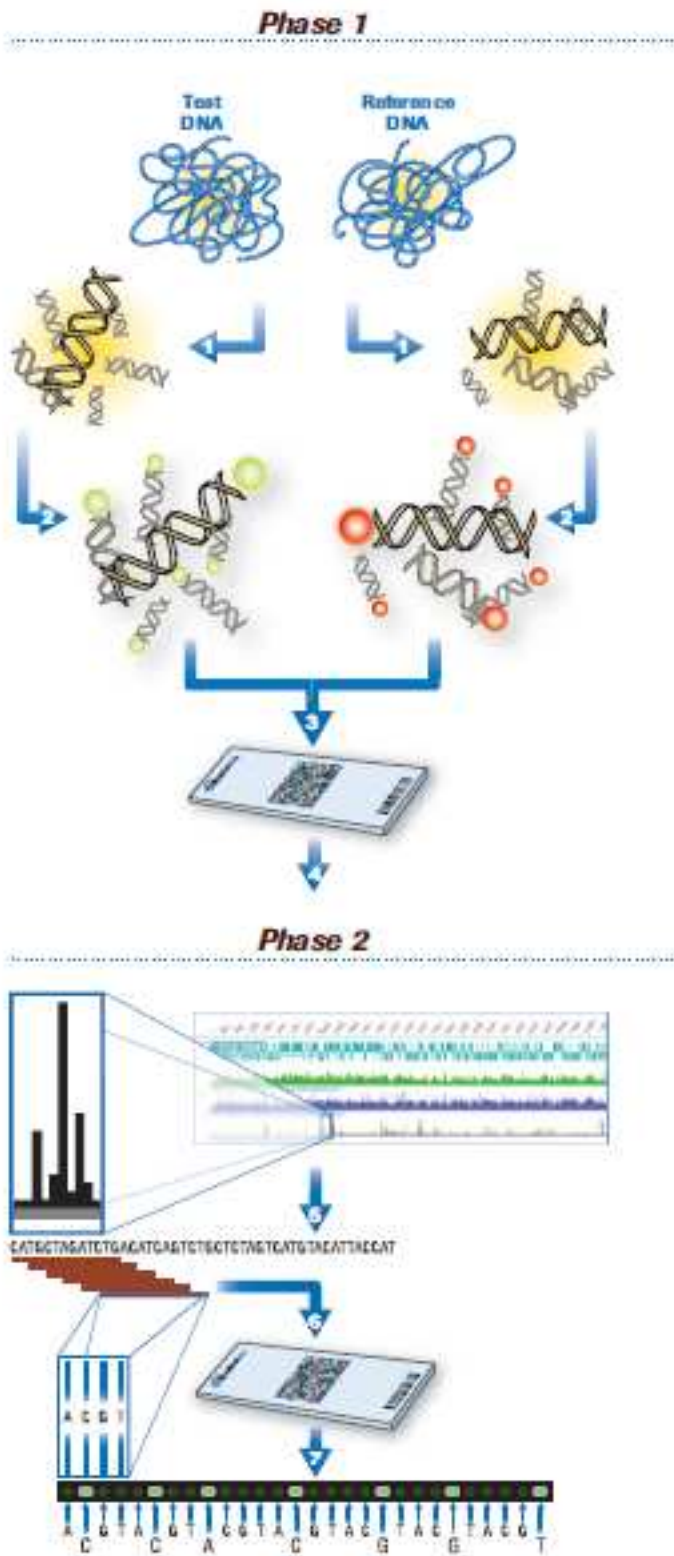
Les Figures 5 et 6 présentent les résultats obtenus pour les quatre *loci* suppresseurs. Il apparaît que  $sup^{UV2}$  est fortement lié au marqueur *ura4* sur le bras gauche du chromosome III (Fig. 5A). L'allèle  $sup^{012}$  est lié au marqueur du chromosome I *lys1* (Fig. 5B). Le locus  $sup^{UV11}$  est fortement lié au marqueur *his6* du bras gauche du chromosome I (Fig. 6A), tandis que  $sup^{UV15cs}$  est lié à *his3* sur le bras gauche du chromosome II (Fig. 6B).

### **B. Analyse génétique en contexte recombinant**

Nous avons poursuivi par une analyse plus fine de la position des mutations en contexte *swi5*<sup>+</sup>. Les souches disponibles au laboratoire ont été utilisées comme marqueurs de position. Les Figures 7 à 9 présentent les résultats obtenus. Les gènes  $sup^{012}$  et  $sup^{UV11}$  sont tous deux liés à *psm3* (12% et 0% de recombinaison respectivement, Fig. 7). Le gène  $sup^{UV2}$  est lié aux gènes *cds1* et *sds21* (9% et 12% de recombinaison respectivement, Fig. 8). Le gène  $sup^{UV15}$  est quant à







**Figure 10. Protocole de CGS (Comparative Genome Sequencing) de Roche-Nimblegen**  
Phase 1 : Hybridation génomique comparative (CGH)

1. Fragmentation de l'échantillon : Les ADNs de la souche de référence et de la souche à tester sont clivés en fragments de petite taille moléculaire.
2. Marquage des échantillons : L'échantillon de référence est marqué avec le fluorochrome Cy5, l'échantillon test avec le fluorochrome Cy3.
3. Hybridation : Les échantillons test et de référence sont hybridés à une puce couvrant la totalité de l'ADN non répété d'une région chromosomique.
4. Analyse des données : Le rapport d'hybridation référence / test est exprimé en fonction de la position génomique afin d'identifier des SNPs candidats.

Phase 2 : Séquençage

5. Puce de séquençage : Les zones candidates sont représentées sur une puce afin de tester chaque base, ce test est réalisé sur chacun des deux brins.
6. Hybridation : L'ADN de la souche test est hybridée à la puce de séquençage.
7. Analyse des données : Les séquences résultantes sont comparées à la séquence de référence et les SNPs sont triés en synonymes, non synonymes, et non codants.

souche	gènes candidats
<i>sup<sup>UV2</sup></i>	<i>pef1</i> (III), <i>oca2</i> (III)
<i>sup<sup>012</sup></i>	<i>mip1</i> (I), <i>swi6</i> (I), <i>swc2</i> (II)
<i>sup<sup>UV11</sup></i>	SPAC10F6.13c (I)
<i>sup<sup>UV15</sup></i>	<i>tor2</i> (II), <i>swc2</i> (II)

**Table 2. Gènes candidats identifiés après l'étape d'hybridation génomique comparative (CGH)**

Le chromosome est indiqué entre parenthèse. Le gène *swc2* est détecté dans l'analyse du mutant *sup<sup>012</sup>* qui a été cartographié sur le chromosome I, ce qui suggère que c'est un faux-positif.

Souche	Chromosome	Base de référence	Base dans mutant	Position génique	Localisation	Type de mutation	AA d'origine	AA muté	Position protéique	Locus	Produit
<i>sup<sup>UV2</sup></i>	III	A	G	443	intragénique	Non synonyme	N	S	146	SPCC16C4.11	CDK Pef1
<i>sup<sup>012</sup></i>	I	G	C	1201	intragénique	Non synonyme	R	G	401	SPAC57A7.11	WD repeatprotein Mip1
<i>sup<sup>UV11</sup></i>	I	G	A	755	intragénique	Non synonyme	S	L	252	SPAC10F6.13c	Aspartate-aminotransferase
<i>sup<sup>UV15</sup></i>	II	A	C	6426	intragénique	Non synonyme	H	Q	2142	SPBC216.07c	phosphatidylinositol kinase Tor2

**Table 3. SNP identifiés par séquençage des SNPs candidats sur puce ADN**

L'ADN génomique d'une souche mutante a été hybridée à une puce ADN représentant les SNPs candidats. Les défauts d'appariement de l'ADN de la souche mutante sur la puce ont été détectés aux positions indiquées et ont permis l'identification d'un SNP unique dans chaque souche mutante.

lui fortement lié aux à la paire de gènes *rad3* et *swi1* (0% de recombinaison, Fig. 9). En conclusion, cette méthode a permis de restreindre la position des *loci* suppresseurs à une fenêtre de 100 à 300 kb environ.

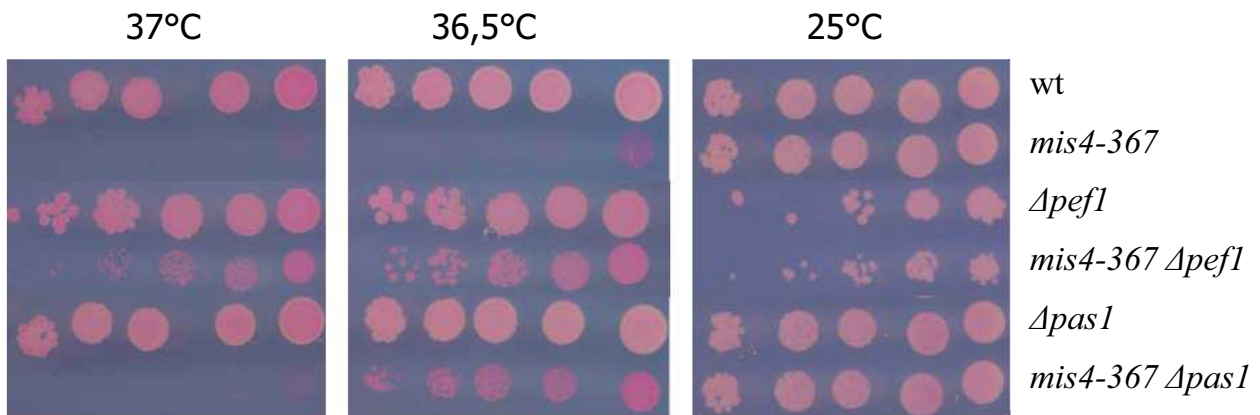
### III. Identification des *loci* suppresseurs

L'identification des gènes codant pour les suppresseurs a été finalisée par Comparative Genome Sequencing réalisé par la société Roche-Nimblegen. Le principe est d'identifier les différences entre les régions génomiques par hybridation compétitive. L'ADN génomique de la souche sauvage de référence et celui de la souche mutante sont marqués chacun avec un fluorochrome différent et co-hybridés sur une puce ADN de 1,3 Mb (Fig.10) (Gresham et al, 2006). Les trois chromosomes de *S. pombe* ont une taille de 5,5 Mb (chromosome I), 4,5 Mb (chromosome II) et 2,5 Mb (chromosome III). Une puce unique permet ainsi d'analyser une grande région génomique d'un chromosome en une seule hybridation.

La première étape exploite le fait que l'hybridation à de petits oligonucléotides est sensible quantitativement au nombre et à la position des mauvais appariements. Des différences au niveau de la séquence sont détectées en comparant les intensités d'hybridation à la puce. Ces variations dans l'intensité d'hybridation sont statistiquement détectables si un nucléotide modifié se trouve dans les 15 bases centrales de la sonde. Pour cela, les sondes ont une longueur de 29 à 32 pb et un chevauchement tel que les sondes sont décalées de 7-8 bases, sur chacun des brins. Cette première étape a permis de sélectionner des SNPs candidats pour chaque mutant (Table 2).

La seconde étape (Fig. 10) analyse uniquement les régions génomiques candidates. Elle utilise une puce dont les sondes de 29-30 pb de long sont conçues de telle manière que chaque SNP candidat est analysé par 8 sondes : 4 sur chaque brin et une pour chaque variant de base (A, T, G, C) au centre de la sonde. Cette deuxième étape a identifié un SNP unique pour chaque souche mutante (Table 3). Nous avons confirmé chacun de ces résultats par séquençage du produit d'une PCR réalisée sur l'ADN génomique de la souche mutante. L'identité des quatre gènes a ainsi pu être déterminée. Ils semblent tous impliqués dans la progression du cycle cellulaire et plus particulièrement en phase G1 dans le sensing et/ou la réponse aux conditions nutritionnelles.

Le suppresseur du groupe 1 analysé (*sup*<sup>UV2</sup>) contient une mutation dans le gène *pef1*. Ce gène code une CDK (cyclin-dépendent kinase) de type Pho85/PhoA et dont la cycline associée est Pas1 (Tanaka & Okayama, 2000). Contrairement à *S. cerevisiae*, Pef1 n'est pas impliquée dans le métabolisme du phosphate (Tanaka & Okayama, 2000). Nous avons vérifié par PCR génomique et séquençage que les deux autres membres du groupe 1 contiennent également une mutation dans le gène *pef1*. Pour *sup*<sup>UV2</sup> et *sup*<sup>011</sup> la mutation A443G (N146S) est localisée dans



**Figure 11. La délétion de *pas1* supprime partiellement la thermosensibilité du mutant *mis4-367***

Les souches indiquées ont été cultivées à température permissive puis leur thermosensibilité a été évaluée par test en goutte. La souche *mis4-367* a un phénotype de thermosensibilité croissant avec la température, et ne forme pas de nouvelles colonies à 37°C. Les souches sauvages,  $\Delta pef1$  et  $\Delta pas1$  ne sont pas affectées par la température. La délétion de *pas1* permet de restaurer partiellement la viabilité cellulaire de la souche *mis4-367* à 36,5°C. La souche *mis4-367* $\Delta pef1$  est incluse à titre de comparaison.

le site catalytique et pour le suppresseur *sup*<sup>02</sup> la mutation identifiée est G487T (G162W). Afin de savoir si une mutation perte de fonction pouvait rendre compte de l'effet suppresseur, nous avons introduit les allèles nuls de *pef1* ou *pas1* en fond *mis4-367*. La délétion de *pef1* supprime la thermosensibilité de *mis4-367*. De même, la délétion du gène de la cycline *pas1* phénocopie largement celle de *pef1* à 36,5°C (Fig. 11). La délétion de *pas1* ne supprime pas le phénotype thermosensible de *mis4-367* à 37°C, ce qui suggère que Pas1 pourrait ne pas être l'unique cycline associée à Pef1.

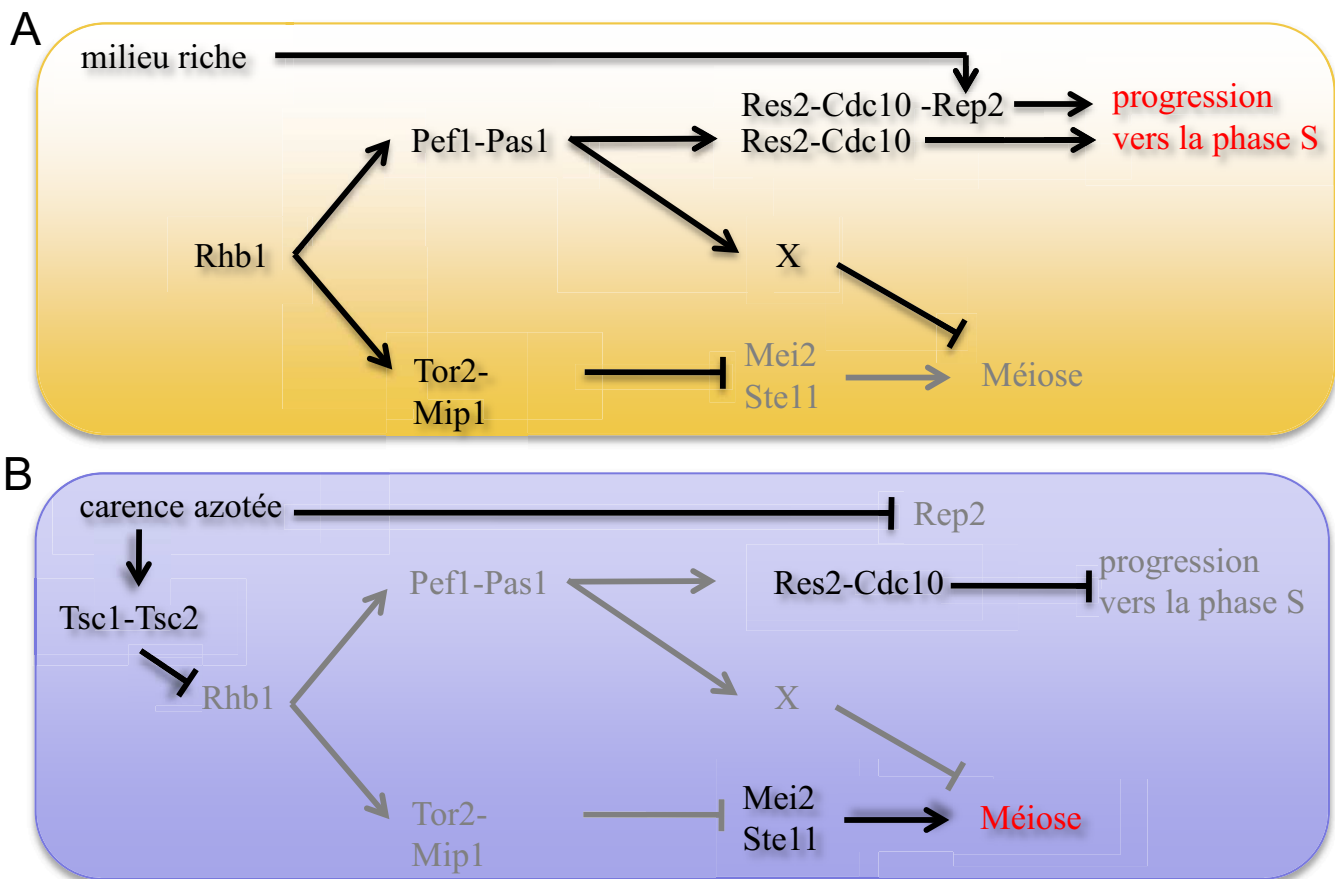
Le suppresseur du groupe 3 est muté dans la séquence codante SPAC10F6.13c. La délétion de SPAC10F6.13c est viable (Kim et al, 2010). Le produit de ce gène non caractérisé chez *S. pombe* est une protéine présentant une forte similarité avec les aspartate aminotransférases, et contient un domaine aminotransférase. La mutation non synonyme identifiée (S252L) est située dans une région très conservée. L'orthologue chez *S. cerevisiae* est AAT2, une aspartate aminotransférase impliquée dans le métabolisme de l'azote (Verleur et al, 1997).

Le suppresseur du groupe 4 est muté dans le gène *tor2*, codant une phosphatidylinositol-kinase-related kinase essentielle à la viabilité cellulaire. La mutation non synonyme identifiée (H2142Q) est située dans le domaine kinase. La protéine Tor2 présente des similarités avec les protéines TOR (Target of rapamycin) de mammifères et elle est membre du complexe TORC1 chez *S. pombe*.

Le suppresseur du groupe 2 analysé (*sup*<sup>012</sup>) contient une mutation dans le gène *mip1* qui est essentiel à la viabilité cellulaire. Il code une protéine prédite comme étant capable de lier la guanine. La mutation non synonyme R401G dans *sup*<sup>012</sup> est située dans une région très conservée de la protéine. La protéine Mip1 est un composant du complexe TORC1 (qui comprend chez *S. pombe* Tor2, Mip1 et Wat1/Pop3 (Hartmuth & Petersen, 2009; Matsuo et al, 2007)) et dont l'homologue humain est RAPTOR.

Les connaissances actuelles concernant les quatre gènes identifiés par le crible les impliquent dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. SPAC10F6.13c est impliqué dans le métabolisme de l'azote tandis que les trois autres (Mip1, Tor2 et Pef1) interviennent dans le contrôle de l'entrée en phase S du cycle cellulaire en réponse à la disponibilité en azote.

En milieu de culture riche, Mip1, Tor2 et Pef1 stimulent la prolifération cellulaire et/ou inhibent l'induction méiotique (Fig. 12A). La GTPase Rhb1 appartenant à la famille Rheb active le complexe Tor2-Mip1 (Urano et al, 2005). Tor2-Mip1 forme alors un complexe inhibiteur avec Mei2 et avec Ste11 (Shinozaki-Yabana et al, 2000), deux gènes clés dans l'induction des gènes méiotiques. Le couple Pef1-Pas1 contribue à la régulation négative des gènes de la



**Figure 12. Lien entre la disponibilité en nutriments et la progression dans le cycle cellulaire**

**A.** En milieu de culture riche, les complexes Pef1-Pas1 d'une part et Tor2-Mip1 d'autre part sont activés. Tor2-Mip1 forme un complexe inhibiteur avec Ste11 (facteur de transcription de gènes essentiels à la conjugaison) et Mei2 (RNA-binding protéine, régulateur essentiel de la méiose et cible de Pat1) : la méiose n'est pas induite. Pef1-Pas active Res2-Cdc10 (complexe activateur de transcription) qui, en complexe avec Rep2 promeut la transcription de gènes essentiels à la phase S. Dans ces conditions, les cellules prolifèrent dans le cycle mitotique.

**B.** En milieu de culture carencé en azote, le complexe Tsc1-Tsc2 inhibe la fonction activatrice de Rhb1. Les complexes Pef1-Pas1 et Tor2-Mip1 ne sont pas actifs. Rep2 est inhibée par la carence azotée et en son absence, Res2-Cdc10 est inactif et entre en compétition avec le complexe activateur de transcription Res1-Cdc10. Par conséquent, Res2-Cdc10 est dans ces conditions un puissant inhibiteur de l'avancée dans le cycle cellulaire. Par ailleurs, l'inhibition de Mei2 et Ste11 exercée par Tor2-Mip1 est levée et les cellules progressent vers le cycle méiotique.

différenciation sexuelle par une voie encore inconnue (Tanaka & Okayama, 2000). Dans le même temps, Pef1-Pas1 favorise la progression dans le cycle végétatif, en stimulant le co-activateur de transcription Res2-Cdc10 (Tanaka & Okayama, 2000). Chez *S. pombe*, deux complexes activateurs de transcription sont essentiels au passage du *start* du cycle cellulaire. Il s'agit Res1-Cdc10 et de Res2-Cdc10, qui se fixent tous deux aux séquences MCB (*MluI* cell cycle box) présentes dans les promoteurs de gènes requis pour la progression en phase S (Caligiuri & Beach, 1993; Miyamoto et al, 1994; Zhu et al, 1994). Rep2 est le co-activateur de Res2-Cdc10 dans le cycle mitotique et est actif en milieu riche : les gènes requis à l'entrée en phase S sont donc transcrits (Chu et al, 2009; Nakashima et al, 1995).

En milieu carencé en azote, le complexe Tsc1/Tsc2 inhibe la fonction de Rhb1 (Urano et al, 2005; van Slegtenhorst et al, 2005). Par conséquent, Tor2-Mip1 n'inhibe plus les protéines Ste11 et Mei2 : l'expression des gènes requis pour l'entrée en méiose est induite. Par ailleurs, Pef1-Pas1 est inhibé (van Slegtenhorst et al, 2005) et Rep2 est réprimée (Chu et al, 2009; Nakashima et al, 1995). De ce fait, le complexe Res2-Cdc10 est inactif mais occupe et séquestre les sites de fixation (les séquences MCB) de Res1-Cdc10 (Nakashima et al, 1995). Ces deux complexes sont en compétition l'un avec l'autre et l'expression des gènes requis à l'entrée en phase S est altérée, en conséquence de quoi la transition G1/S est ralentie (Fig. 12A).

Les gènes *tor2* et *mip1* sont essentiels à la viabilité cellulaire. Dans les mutants perte de fonction (mutants conditionnels), les cellules ne prolifèrent plus et s'engagent dans la différenciation sexuelle, reproduisant ainsi la réponse à la carence azotée quelles que soient les conditions nutritionnelles (Alvarez & Moreno, 2006; Matsuo et al, 2007; Weisman et al, 2007). Les allèles suppresseurs identifiés par le crible génétique ne sont pas donc pas des nuls de fonction. Ils sont cependant dominants sur leur allèle sauvage vis-à-vis du phénotype suppresseur. Il peut s'agir de mutations gain de fonction mais pas nécessairement. Il peut aussi s'agir de mutations perte de fonction, auquel cas le phénotype dominant serait due à une haplo-insuffisance.

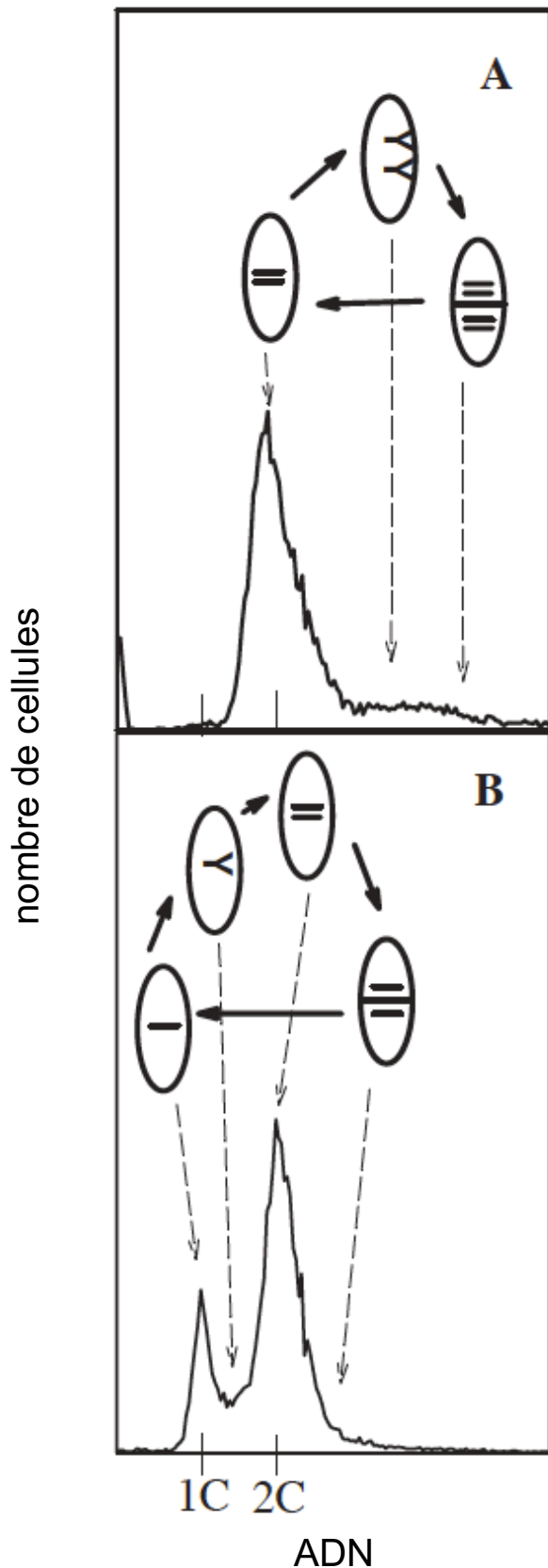
Les souches délétées pour *pef1* ou *pas1* continuent de proliférer, mais la transition G1/S est ralentie (Tanaka & Okayama, 2000; van Slegtenhorst et al, 2005). La délétion des gènes *pef1* ou *pas1* confère un effet suppresseur de la thermosensibilité de la souche *mis4-367*. Deux des allèles suppresseurs sont altérés dans le site catalytique et sont donc vraisemblablement des mutations perte de fonction. L'effet dominant est donc certainement dû à une haplo-insuffisance.

#### ***IV. Analyse du cycle cellulaire***

Nous avons observé que le temps nécessaire à un doublement de la population est allongé dans les souches portant les mutations suppresseurs. Ceci peut être causé par une létalité



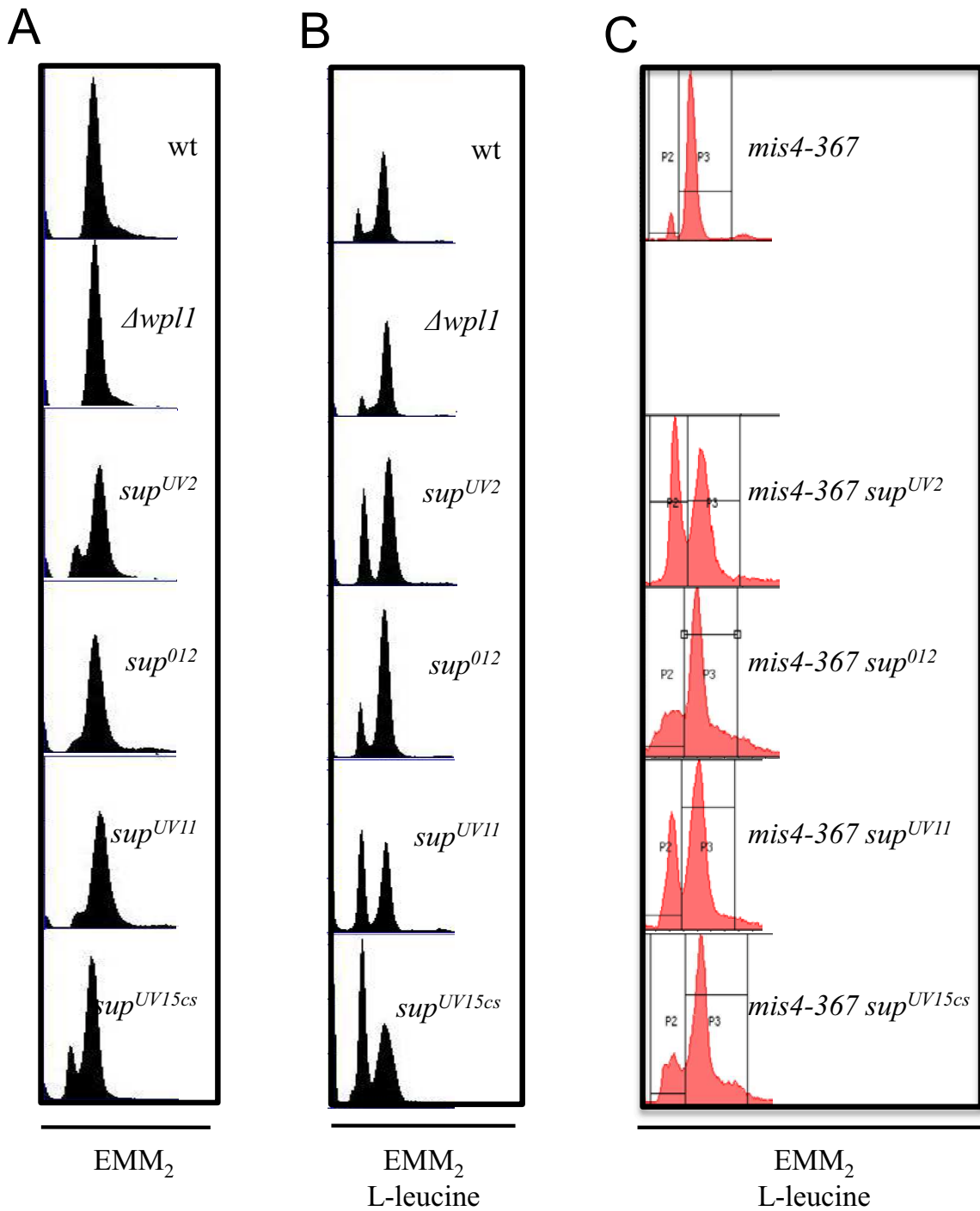




**Figure 13. Représentation schématique d'un histogramme de la quantité d'ADN par cellule obtenu par cytométrie en flux**

Les ovales représentent les cellules dans lesquelles chaque ligne intérieure représente une unité d'ADN 1C et la forme Y indique le processus de réplication. Les flèches indiquent l'endroit dans l'histogramme où chaque type de cellules est présent. (D'après Carlson et al. 1999)

**A.** Cellules avec une phase G1 courte et dans lesquelles la cytokinèse a lieu après la phase S.  
**B.** Cellules avec une phase G1 longue et dans lesquelles la cytokinèse a lieu avant la phase S.



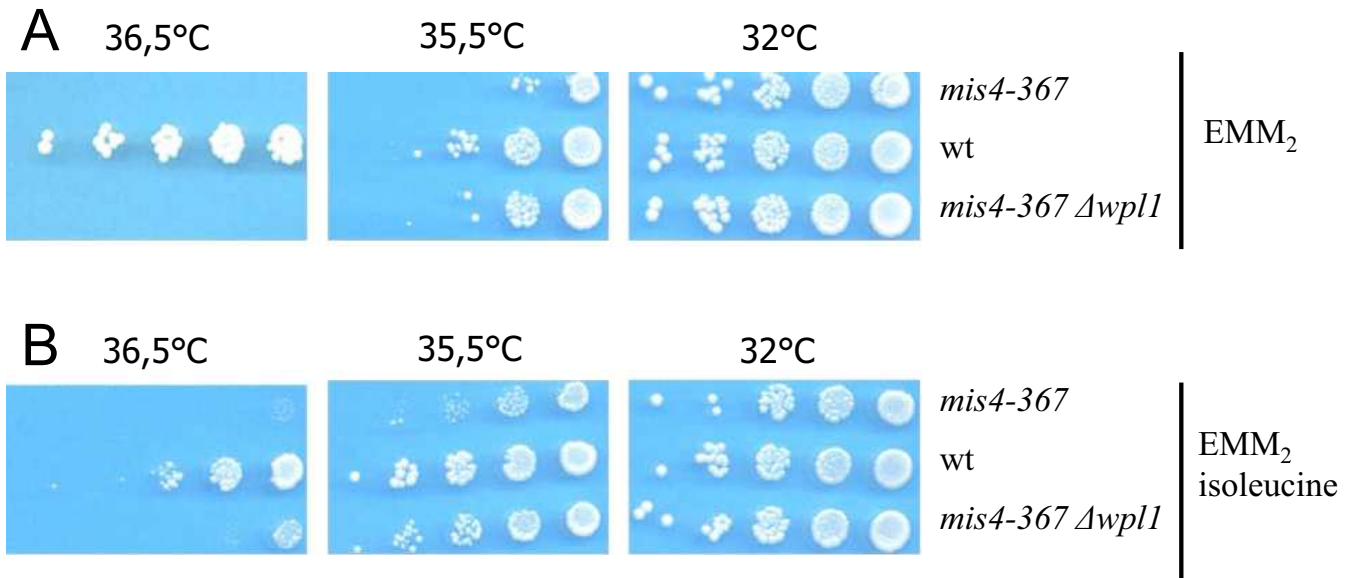
**Figure 14. La durée de la phase G1 est allongée dans les mutants suppresseurs de *mis4-367***

Les cellules ont été cultivées à 25°C en EMM<sub>2</sub> (A) ou dans un milieu dans lequel la source d'azote NH<sub>4</sub>CL est remplacée par 20mM L-Leucine (B, C) afin d'augmenter la durée de la phase G1 (Carlson, 1999). Le contenu en ADN des cellules a été déterminé par cytométrie en flux.

importante des cellules. La viabilité, mesurée par la capacité des cellules à former des colonies après étalement d'un nombre déterminé de cellules, n'est cependant pas significativement compromise dans les souches mutantes (données non montrées). Une seconde possibilité est un allongement de la durée d'une phase du cycle cellulaire.

La distribution d'une population de cellules entre les différentes phases du cycle cellulaire peut être déterminée par l'analyse du contenu en ADN de cellules individuelles par cytométrie en flux. La proportion de cellules avec un contenu ADN donné reflète le temps passé dans la phase du cycle correspondant à ce contenu en ADN. Classiquement, un histogramme ADN d'une population de cellules cyclantes de *S. pombe* contient un pic majeur d'ADN 2C ainsi qu'un épaulement s'étendant vers le 4C. Dans ces conditions, les cellules en phase G1 et G2 sont regroupées dans la population 2C car la séparation des deux cellules filles intervient à la frontière S/G2. De ce fait, les cellules en phase S augmentent leur contenu en ADN de 2C à 4C avant la séparation des cellules filles (Fig. 13A). Dans certaines conditions où la phase G1 est suffisamment longue, la séparation des cellules filles a lieu au cours de la phase G1 et l'histogramme contient deux pics distincts : 1C et 2C. Les cellules 1C sont en fin de phase G1, après la séparation des cellules filles, et les cellules 2C sont en G2/M ou en début de phase G1. La phase S est alors représentée par le col entre les pics 1C et 2C (Fig. 13B).

L'analyse en cytométrie de flux des mutants suppresseurs est présentée dans la Figure 14. Dans un contexte génétique sauvage (*mis4*<sup>+</sup>) une population de cellules avec un contenu en ADN de 1C est clairement visible pour les mutants *sup*<sup>UV2</sup> et *sup*<sup>UV15</sup> (Fig.14A). Un épaulement à 1C est également visible pour les souches *sup*<sup>012</sup> et *sup*<sup>UV11</sup> ce qui suggère que la phase G1 pourrait être allongée. Ceci a été confirmé en utilisant des conditions de culture pour lesquelles la phase G1 est allongée. Nous avons choisi d'utiliser un milieu dans lequel la source d'azote NH<sub>4</sub>Cl était remplacée par de la leucine ou de l'isoleucine. Lorsque les cellules utilisent le NH<sub>4</sub>Cl comme principale source d'azote, la phase G1 représente 4% de la durée totale du cycle cellulaire soit 10 minutes pour un cycle d'une durée totale de 4 heures à 25°C. En revanche, lorsque les cellules utilisent la leucine comme principale source d'azote, la phase G1 représente 17% de la durée totale du cycle cellulaire soit 45 minutes pour un cycle d'une durée totale de 4h30 à 25°C (Carlson et al, 1999). Dans le cas de l'utilisation de l'isoleucine, la durée de la phase G1 est encore augmentée : elle représente 27% de la durée totale du cycle cellulaire, soit 1h30 pour un cycle d'une durée totale de 5h30 à 25°C (Carlson et al, 1999). L'analyse en cytométrie de flux montre qu'en effet, ces conditions de cultures permettent d'observer une population de cellules ayant un contenu en ADN de 1C dans la souche sauvage et cette population est plus abondante dans toutes les souches mutantes (Fig. 14B). L'allongement de la durée de la phase G1 dans les souches mutantes est également visible en contexte *mis4-367* (Fig. 14C).



**Figure 15. La thermosensibilité de la souche *mis4-367* est partiellement supprimée en milieu minimum isoleucine**

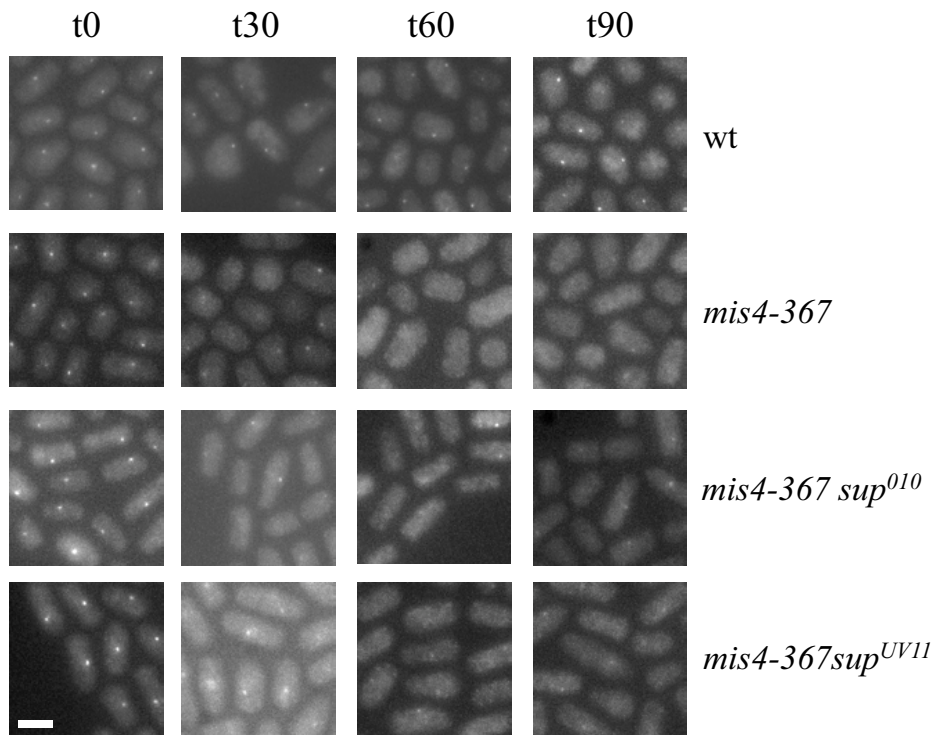
Les souches indiquées ont été cultivées à température permissive puis leur croissance a été évaluée par test en goutte. La souche *mis4-367* a un phénotype de thermosensibilité croissant avec la température, et ne forme pas de colonies à 36,5°C. Le test en goutte a été réalisé sur un milieu synthétique (EMM<sub>2</sub>) (A) ainsi que sur un milieu dans lequel la source d'azote NH<sub>4</sub>Cl est remplacée par 20 mM d'isoleucine afin d'augmenter la durée de la phase G1 (EMM<sub>2</sub> isoleucine) (B) (Carlson, 1999). La souche sauvage n'est pas affectée par la composition du milieu. La croissance de la souche *mis4-367* est partiellement améliorée sur un milieu où la durée de la phase G1 est augmentée. La délétion de *wpl1* a un léger effet additif sur la croissance de *mis4-367* dans ces conditions.

En conclusion, la durée de la phase G1 est augmentée dans les quatre souches mutantes. Comme le suggérait l'identité des gènes, tous les gènes identifiés participent à la régulation de la progression du cycle cellulaire. L'augmentation de la durée de la phase G1 suggère une perte partielle de fonction des mutants suppresseurs. Les protéines correspondantes sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire en réponse à la disponibilité en azote. On peut alors se demander si le simple fait d'utiliser une source d'azote « pauvre » allongeant la durée de la phase G1 reproduirait les effets des mutants suppresseurs. La souche *mis4-367* est capable de former des colonies sur milieu isoleucine à 35,5°C, tandis que sa croissance est abolie sur milieu NH<sub>4</sub>Cl à cette même température (Fig. 15). Il semble donc que la disponibilité en nutriments et/ou l'allongement de la durée de la phase G1 du cycle cellulaire ait un effet suppresseur. Contrairement aux mutants suppresseurs, l'effet obtenu en modifiant la source d'azote ne permet cependant pas de restaurer la croissance de *mis4-367* à 36,5°C. La réponse à la disponibilité en nutriments et/ou l'allongement de la durée de la phase G1 n'est peut-être qu'une composante de l'effet suppresseur.

### ***V. Pourquoi le crible génétique n'a-t-il pas identifié le gène *wpl1* ?***

Au cours de cette étude, l'implication de Wapl dans la dissociation des cohésines a été publiée (Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006). La déplétion de WAPL dans des cellules de mammifères augmente le temps de résidence des cohésines sur la chromatine en G1 (Kueng et al, 2006). De façon similaire chez *S. pombe*, nous avons observé que la délétion de *wpl1* ralentit la cinétique de dissociation des cohésines après inactivation de Mis4 en phase G1 du cycle cellulaire (Bernard et al, 2008). Nous avons donc cherché à savoir si la délétion de *wpl1* pouvait supprimer le phénotype thermosensible de *mis4-367*. Effectivement la souche *mis4-367 Δwpl1* a une croissance supérieure à celle de la souche *mis4-367* à 35,5°C mais ne permet pas la croissance à 36,5°C (Fig. 15A). La délétion du gène *wpl1* a donc un effet suppresseur mais qui n'aurait pas permis son identification par le crible qui a été réalisé à 36,5°C.

Le faible effet suppresseur de *Δwpl1* suggère que l'activité de dissociation n'a peut-être pas beaucoup d'impact dans un cycle cellulaire normal compte tenu de la brièveté de la phase G1. Le crible étant basé sur la restauration de la croissance à 36,5°C, il aurait sélectionné les mutations permettant de restaurer l'activité de chargement plutôt que celles affectant une activité de dissociation. Allonger la durée de la phase G1 en utilisant un milieu de culture partiellement carencé (Carlson et al, 1999; Fantes & Nurse, 1977) pourrait alors rendre la viabilité des cellules dépendante d'une perte de l'activité de dissociation. Dans ces conditions, la délétion de *wpl1* pourrait supprimer la thermosensibilité de *mis4-367*. C'est effectivement le cas, la souche *mis4-367 Δwpl1* est capable de former des colonies à 36,5°C lorsque la source d'azote est l'isoleucine



**Figure 16. Micrographies des *foci* Rec8-GFP dans les mutants suppresseurs après inactivation de Mis4**

Les souches sauvage, *mis4-367* et *mis4-367* supprimées ont été arrêtées en G1 par carence azotée à 25°C afin d'induire l'apparition de Rec8 aux centromères (t0) puis transférées à température restrictive pour inactiver la protéine Mis4. Dans la souche sauvage, le signal GFP persiste dans toutes les cellules après transfert à 37°C. Pour la souche *mis4-367*, la fraction de cellules marquées diminue rapidement au cours du temps. Pour les doubles mutants *mis4-367 sup<sup>010</sup>* et *mis4-367 sup<sup>UV11</sup>*, la proportion des cellules avec un signal diminue également en fonction du temps, mais de façon moins marquée. Les données quantitatives sont présentées dans la Figure 17. Barre = 5µm

(Fig. 15B). L'effet est modeste mais suggère que la délétion de *wpl1* et la disponibilité en nutriments et/ou l'allongement de la durée de la phase G1 ont un effet additif.

En conclusion, les supprimeurs de *mis4-367* régulent la prolifération cellulaire en fonction de la source d'azote et allongent la durée de la phase G1, ce qui en soit permet de supprimer partiellement la thermosensibilité d'une souche *mis4-367*. Mais l'effet suppresseur des mutants sélectionnés par le crible semble supérieur à celui conféré par l'utilisation d'un milieu « pauvre » en azote. Il est donc possible que les supprimeurs puissent agir simultanément sur une autre voie, pouvant impliquer la régulation de l'association des cohésines à la chromatine.

## **VI. Effet des mutations suppresseur sur la dynamique des cohésines**

Afin de savoir si une composante de l'effet suppresseur concerne le chargement et/ou la dissociation des cohésines de la chromatine, nous avons utilisé un essai utilisant la cohésine méiotique Rec8 (Bernard et al, 2008). Dans le cycle méiotique, la cohésine Rad21 est remplacée par Rec8, une cohésine spécifique de la méiose (Watanabe & Nurse, 1999). La protéine Rec8 n'est pas exprimée pendant le cycle végétatif. Son expression est induite par la carence azotée, avant les étapes de fusion des cellules de signe sexuel opposé. À ce stade, Rec8 est localisée uniquement au niveau des centromères (Bernard et al, 2001a). Ce phénomène ne nécessite pas la présence du partenaire de signe sexuel opposé. Ainsi, lorsqu'une culture est transférée d'un milieu riche à un milieu dépourvu d'azote, les cellules s'arrêtent en phase G1 du cycle cellulaire avec Rec8 présente au niveau des centromères. Dans cette situation, l'inactivation de *mis4-367* a le même effet que vis-à-vis de Rad21 dans le cycle végétatif : Rec8 se dissocie de la chromatine après passage à 37°C, ce qui montre que l'équilibre dynamique existe aussi pour la cohésine Rec8 (Bernard et al, 2008).

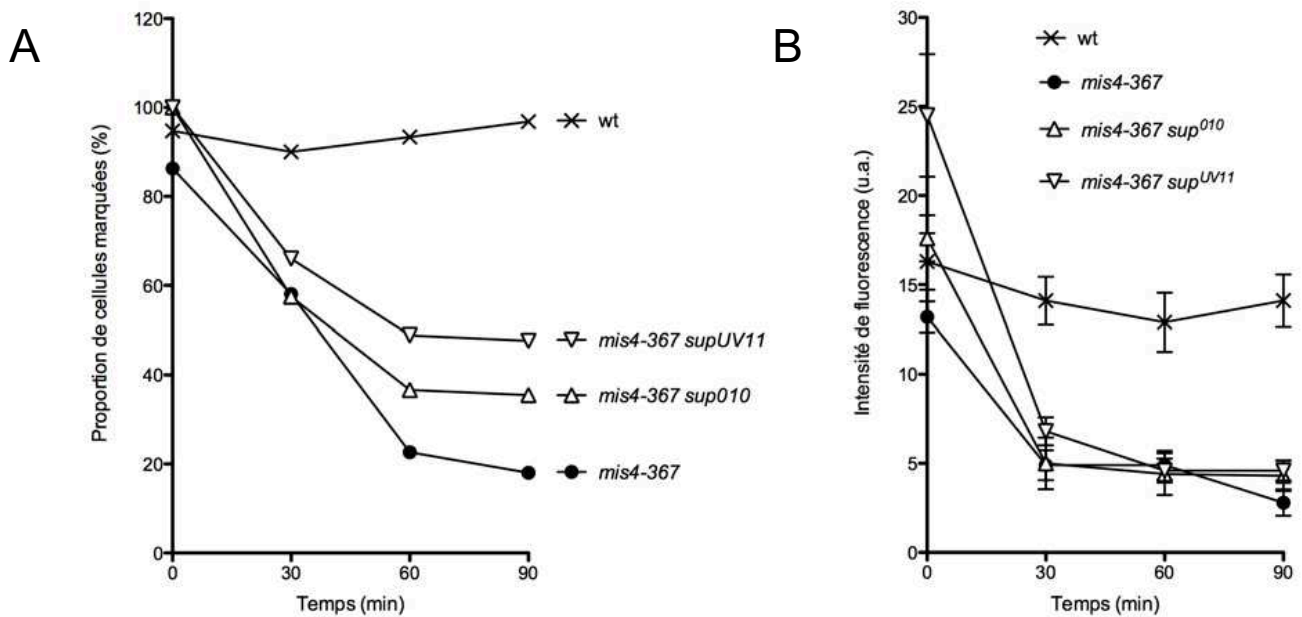
### **1. Analyse des souches mutantes supprimées**

Nous avons initié l'analyse du comportement de Rec8 dans deux des souches mutantes supprimées. Les cellules ont été cultivées à 25°C en milieu riche (YES+Ade) puis transférées en milieu dépourvu de source d'azote (EMM<sub>2</sub>-N) et incubées pendant 24 heures à 25°C. Un échantillon a été prélevé à cette étape ( $t_0$ ). Le reste des cultures a été transféré à 37°C et des échantillons ont été prélevés 30, 60 et 90 minutes après transfert. La fluorescence de Rec8-GFP a été observée et mesurée par immunofluorescence.

Les images de la Figure 16 montrent un exemple de cette analyse. Un spot unique de fluorescence Rec8-GFP est présent dans chaque noyau au temps  $t_0$  et ce dans au moins 85% des cellules (Fig. 17A). Un seul signal est observé car les trois centromères sont regroupés à proximité du *spindle pole body* (l'équivalent du centrosome chez la levure). Dans la souche





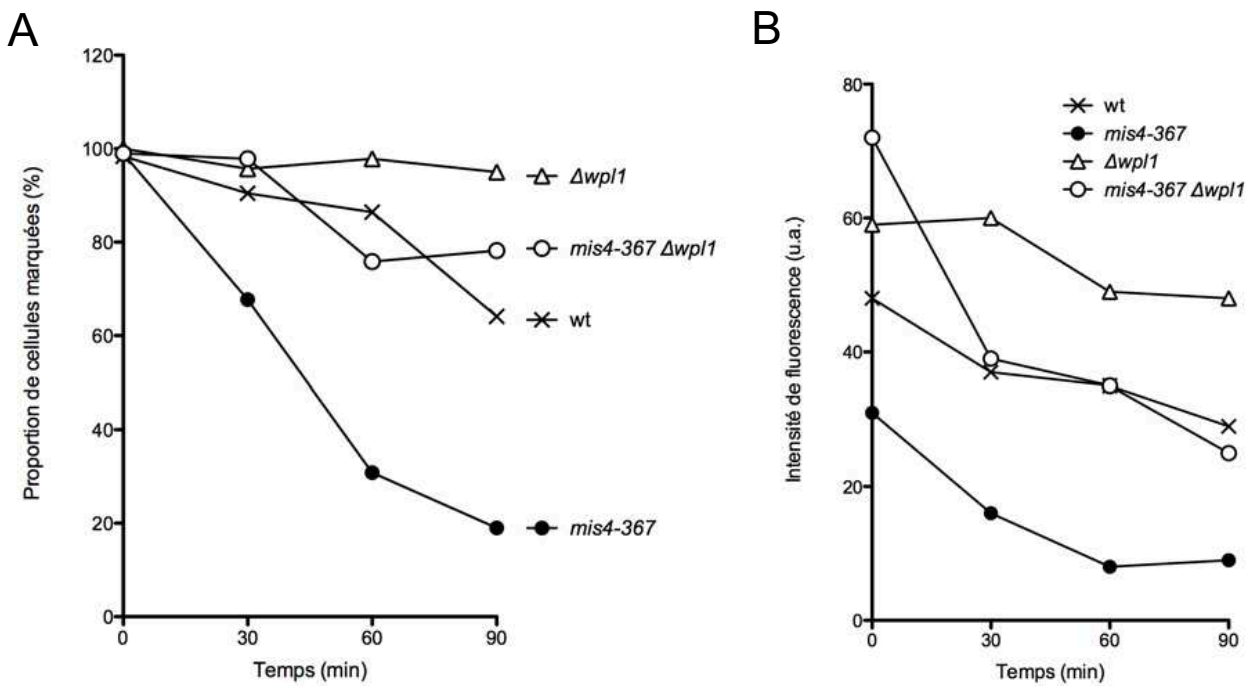


**Figure 17. Analyse de la décroissance de fluorescence Rec8-GFP dans deux souches mutantes supprimées**

Les cellules *rec8-GFP* sont arrêtées en G1 par carence azotée à 25°C afin d'induire l'accumulation de Rec8-GFP aux centromères, puis sont transférées à température restrictive pour *mis4-367* pendant 90 minutes.

**A.** Proportion de cellules présentant un signal Rec8-GFP après passage à 37°C. Au moins 75 cellules ont été analysées à chaque point. Pour la souche sauvage, la proportion de cellules marquées reste constante au cours du temps. Pour la souche *mis4-367*, le pourcentage de cellules marquées diminue rapidement au cours du temps ainsi que pour les doubles mutants *mis4-367 sup<sup>010</sup>* et *mis4-367 sup<sup>UV11</sup>*.

**B.** Mesure de l'intensité de fluorescence des signaux Rec8-GFP. L'intensité des signaux Rec8-GFP a été mesurée et le bruit de fond nucléaire retranché pour chaque valeur. Au moins 80 cellules ont été analysées pour chaque point. Les résultats sont normalisés par rapport au t0 de la souche sauvage. La barre d'erreur représente l'intervalle de confiance de la moyenne ( $\alpha=0,05$ ). Les résultats sont commentés dans le texte.



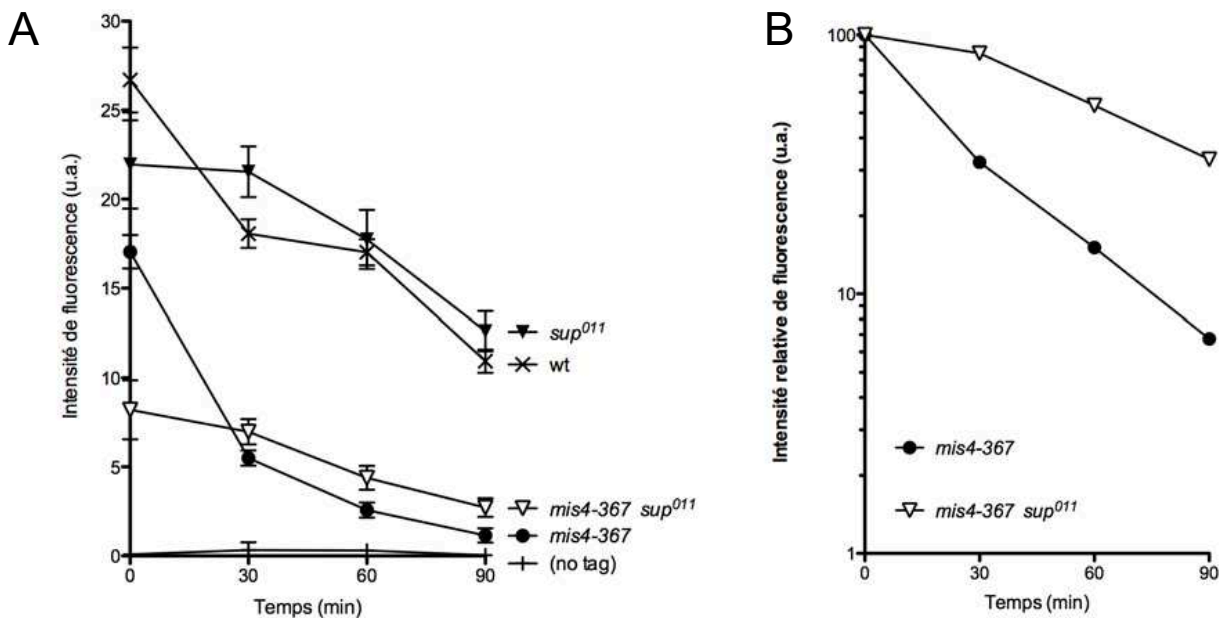
**Figure 18. Analyse de la décroissance de fluorescence Rec8-GFP en l'absence de Wapl**

L'expérience a été réalisée comme décrit dans la figure 17.

**A.** Proportion de cellules présentant un signal Rec8-GFP après passage à 37°C. Pour la souche *mis4-367*, le pourcentage de cellules marquées diminue rapidement au cours du temps. La délétion de *wpl1* supprime cette diminution.

**B.** Mesure de l'intensité de fluorescence des signaux Rec8-GFP.

L'intensité de fluorescence diminue dans le mutant *mis4-367*. En l'absence de Wapl, l'intensité de fluorescence est restaurée à un niveau sauvage.



**Figure 19. Analyse de la décroissance de fluorescence Rec8-GFP dans une souche *sup011***

L'expérience a été réalisée comme décrit dans la figure 17.

**A.** Mesure de l'intensité de fluorescence des signaux Rec8-GFP.

L'intensité de fluorescence diminue dans le mutant *mis4-367*. Dans une souche *sup011*, l'intensité de fluorescence est diminuée au temps initial.

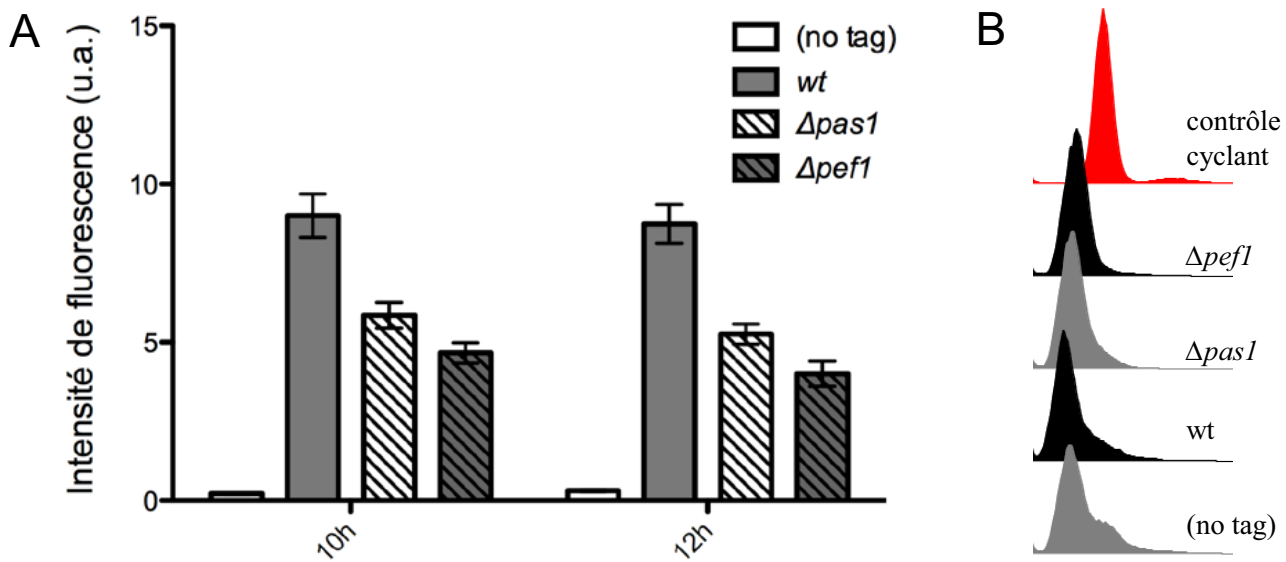
**B.** Normalisation de la cinétique de dissociation obtenue en (A). Chaque jeu de données a été normalisé par rapport à sa valeur au temps 0 (arbitrairement fixée à 100). La cinétique de dissociation des cohésines est fortement ralentie dans la souche *sup011*.

sauvage, le pourcentage de cellules marquées reste constant au cours du temps. En revanche, celui-ci diminue rapidement dans la souche *mis4-367*. Dans les souches *mis4-367* contenant les supresseurs, la fraction de cellules marquées diminue également au cours du temps. L'état final est cependant différent dans les souches supprimées : environ 35% et 48% pour les souches *mis4-367 sup<sup>010</sup>* (groupe 2, *mip1*) et *mis4-367 sup<sup>UV11</sup>* (groupe 3, SPAC10F6.13c) respectivement tandis que 18% seulement des cellules *mis4-367* sont marquées à la fin de la cinétique (Fig. 17A). La proportion finale de cellules marquées est donc augmentée dans les souches mutantes supprimées.

Nous avons mesuré l'intensité moyenne de fluorescence des signaux Rec8-GFP (Fig. 17B). À  $t_0$ , l'intensité des signaux Rec8-GFP dans la souche *mis4-367* représente 80% de l'intensité mesurée dans la souche sauvage et cette valeur chute à 30% en 30 minutes. Pour le supresseur *sup<sup>010</sup>* (groupe 2, *mip1*) ainsi que pour le supresseur *sup<sup>UV11</sup>* (groupe 3, SPAC10F6.13c), l'intensité initiale des signaux est supérieure à celle de la souche *mis4-367*, ce qui suggère une activité accrue de chargement ou une baisse de celle de dissociation. L'intensité des signaux de fluorescence diminue ensuite rapidement jusqu'au niveau de la souche *mis4-367* dès 30 minutes dans les souches portant les mutations supresseurs. Cette donnée suggère que le temps de demi-vie de Rec8 sur la chromatine (temps pour lequel la moitié des cohésines s'est dissociée de la chromatine) n'est pas allongé en contexte supresseur et serait même diminué légèrement. Pour les temps 60 et 90 minutes, la souche *mis4-367* et les souches mutantes supprimées sont au même niveau, entre 20 et 30% de l'intensité initiale du sauvage à  $t_0$ . En conclusion, les souches mutantes supprimées ont un comportement proche mais cependant différent de la souche *mis4-367* après transfert à 37°C. L'essai Rec8-GFP suggère que la cinétique de dissociation des cohésines n'est pas ralentie dans ces mutants, qui ne seraient donc pas affectés dans une activité de dissociation. De ce fait, le mécanisme de suppression ne passerait pas par l'altération de l'activité déstabilisatrice des cohésines. En revanche à  $t_0$ , les souches mutantes supprimées ont une intensité moyenne de fluorescence supérieure à celle de la souche *mis4-367*. Cette observation suggère que les mutations *sup<sup>010</sup>* et *sup<sup>UV11</sup>* auraient pour effet de stimuler l'activité de chargement des cohésines.

## 2. Analyse d'une souche délétée pour le gène *wpl1*

L'effet de la délétion de *wpl1* vis-à-vis de la dissociation de Rec8 de la chromatine a été analysé comme précédemment. La dissociation de la cohésine Rec8 dans la souche *mis4-367  $\Delta$ wpl1* est très semblable à celle obtenue dans la souche sauvage. La délétion de *wpl1* supprime de façon quasiment parfaite la disparition de Rec8 lorsque Mis4 est inactivée (Fig. 18). Il est à noter que l'intensité des signaux Rec8 à  $t_0$  en l'absence de Wapl est supérieure à celle de la souche sauvage, ce qui est en accord avec la perte d'une activité de dissociation. En revanche, il

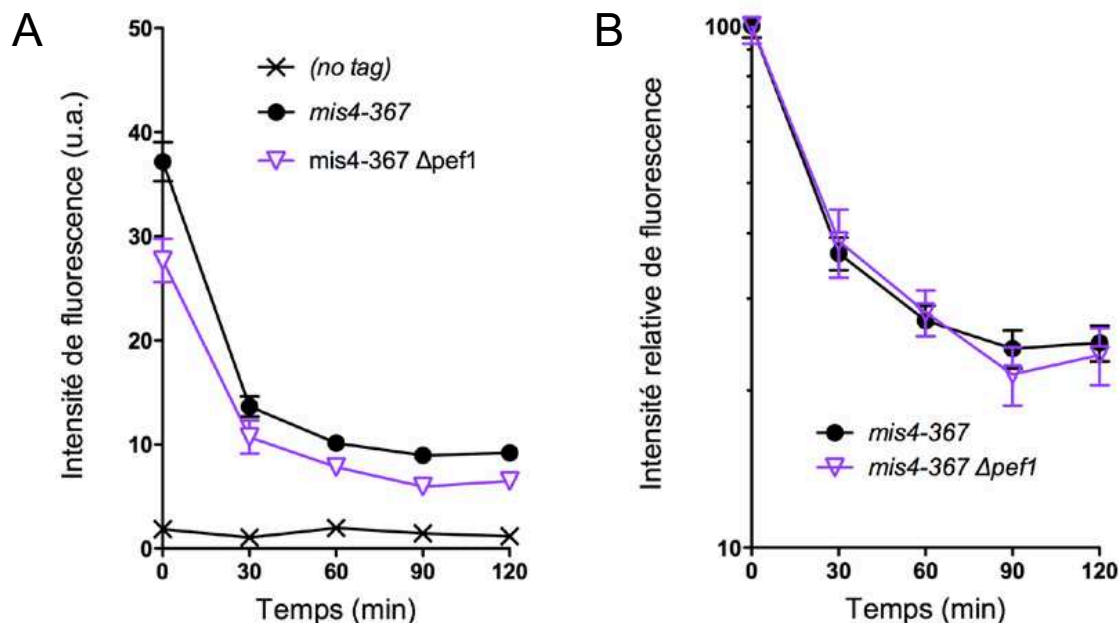


### Figure 20. Analyse de l'association des cohésines à la chromatine en phase G1

Les souches (*rad21-9PK nmt-res1Cter*) ont été arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire à 25°C par la surexpression du fragment C-terminal de Res1 sous le contrôle du promoteur inductible *nmt1*.

**A.** L'association des cohésines à la chromatine a été mesurée en deux temps (10h et 12h) par étalement de chromatine et immunofluorescence indirecte contre Rad21-9PK. L'intensité de fluorescence a été mesurée pour 70 à 100 noyaux pour chaque point expérimental. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance de la moyenne avec  $\alpha=0,05$ .

**B.** L'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux montre que les cellules sont correctement arrêtées en phase G1.



### Figure 21. Analyse de l'association des cohésines à la chromatine en phase G2

Les souches portant les mutations thermosensibles *cdc25-22* et *mis4-367* ont été cultivées à 25°C puis transférées à 36,5°C pour arrêter le chargement des cohésines par l'inactivation de Mis4. L'allèle *cdc25-22* empêche l'entrée en mitose et induit un arrêt G2 strict. L'association de Rad21-9PK à la chromatine est mesurée aux temps indiqués par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps anti-PK sur des étalements de chromatine. L'intensité de fluorescence de Rad21-9PK a été mesurée pour 50 à 110 noyaux par temps dans chaque expérience. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à la moyenne ( $\alpha=0,05$ ).

**A.** Cinétiques de dissociation de Rad21 de la chromatine.

**B.** Chaque jeu de données a été normalisé par rapport à sa valeur au temps 0 (arbitrairement fixée à 100).

est curieux de constater que cette différence est encore plus marquée en fond *mis4-367*. Le chargement des cohésines Rec8 par la protéine mutante Mis4-367 serait hypersensible à la présence de Wapl. Cette observation peut suggérer une régulation du chargement par Wapl.

## VII. Étude de la CDK Pef1

### 1. Effet de la mutation *sup<sup>011</sup>* sur la cohésine méiotique Rec8

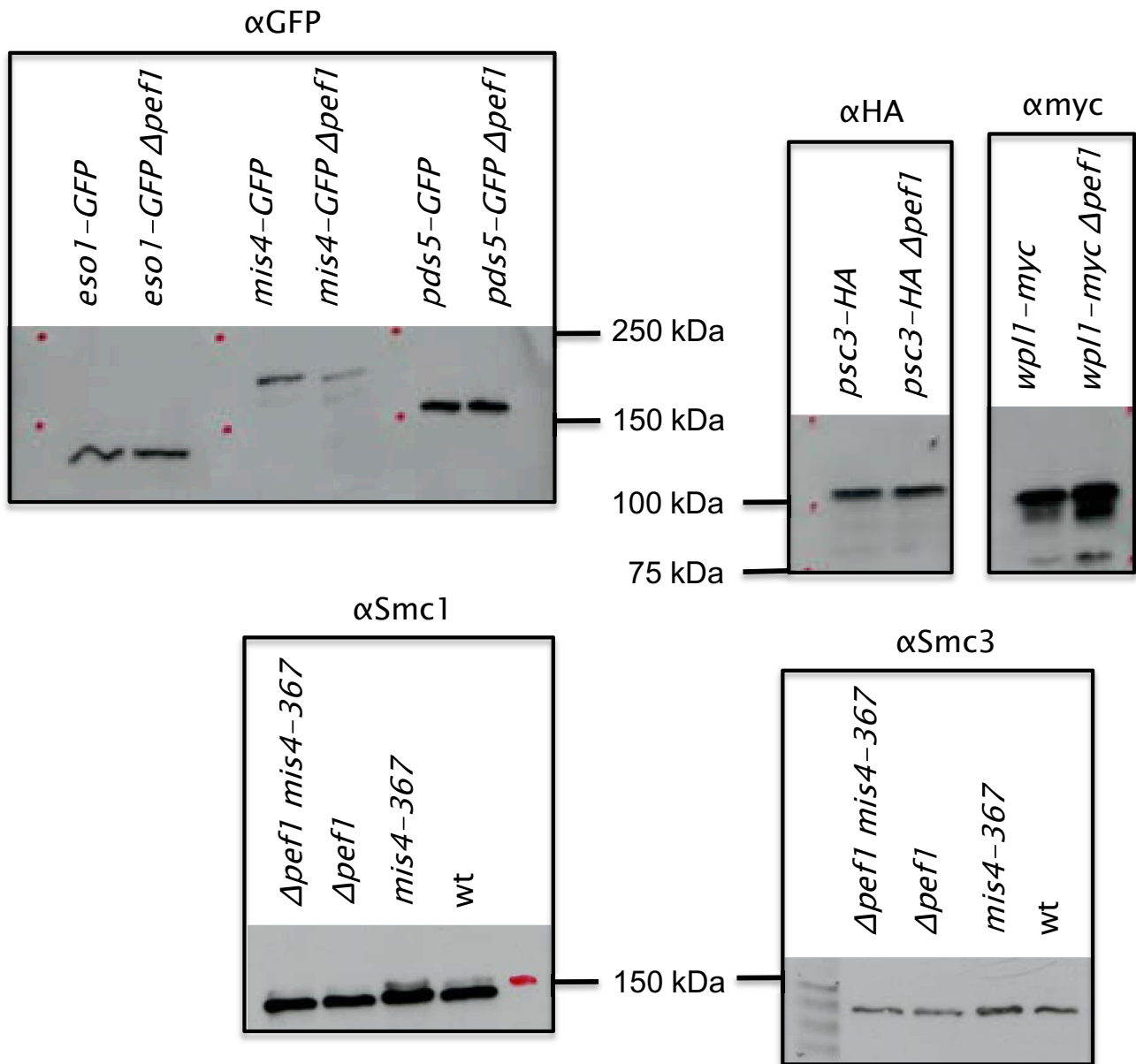
L'effet d'une mutation dans le gène *pef1* (groupe 1, *sup<sup>011</sup>*) a été analysé par l'essai Rec8-GFP comme décrit précédemment. De manière surprenante, l'intensité initiale des signaux dans le double mutant *mis4-367 sup<sup>011</sup>* est inférieure à celle du simple mutant *mis4-367* (Fig. 19A). En revanche, la décroissance de fluorescence est fortement ralentie, ce qui suggère que Pef1 a un effet sur la dissociation des cohésines de la chromatine (Fig. 19B). Si la fonction de Pef1 était restreinte à la dissociation des cohésines, la quantité initiale de Rec8 associée à la chromatine aurait été augmentée dans la souche mutante supprimée. Ce n'est pourtant pas le cas, ce qui suggère que la fonction présumée de Pef1 dans la dissociation des cohésines a un coût sur leur chargement.

### 2. Données préliminaires du rôle de Pef1 sur les cohésines du cycle végétatif

Afin de déterminer si Pef1 a un lien avec les cohésines du cycle mitotique, nous avons mesuré la quantité de Rad21 associée à la chromatine au cours d'un arrêt en phase G1 dans un contexte sauvage ou en l'absence de Pef1. L'arrêt en phase G1 est obtenu par la surexpression de la partie C-terminale de la protéine Res1, titrant ainsi Cdc10, ce qui inactive la fonction du complexe Res1-Cdc10 (Ayte et al, 1995). Les cellules ne peuvent plus entrer en phase S et restent donc bloquées en fin de phase G1 (Ayte et al, 1995; Bernard et al, 2008). L'association à la chromatine de la sous-unité Rad21 du complexe cohésine étiquetée avec 9 PK (Rad21-9PK) a été examinée par immunofluorescence sur des étalements de chromatine dans un fond sauvage, en l'absence de Pas1 (*Δpas1*) ou en l'absence de Pef1 (*Δpef1*). Cette analyse a été effectuée à deux temps au cours de l'arrêt en phase G1 et les résultats sont présentés dans la Figure 20.

En l'absence de Pas1 la quantité de cohésines associées à la chromatine est fortement diminuée par rapport à la souche sauvage en phase G1. L'effet est plus important encore dans une souche *Δpef1*. Ces résultats indiquent que Pef1 et Pas1 régulent positivement la quantité de Rad21 associée aux chromosomes en phase G1 et sont cohérents avec l'analyse effectuée sur la cohésine méiotique Rec8 (Fig. 19).

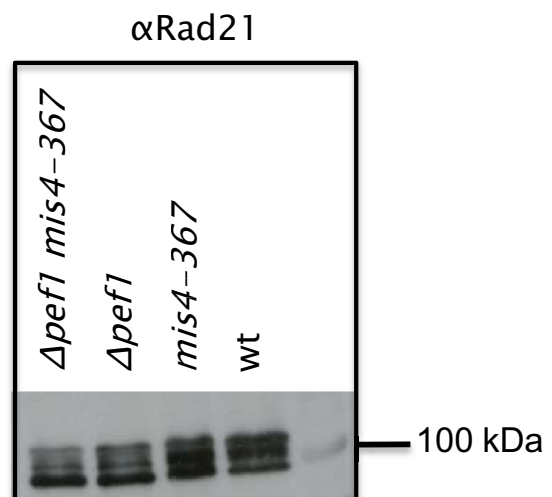
Afin de déterminer si Pef1 avait également un rôle en phase G2, nous avons analysé la cinétique de dissociation de Rad21 de la chromatine dans un arrêt en phase G2. L'expérience consiste à utiliser des cellules de génotype *cdc25-22 mis4-367 rad21-9PK* en phase exponentielle de croissance. L'arrêt des cellules en phase G2 du cycle cellulaire est effectué par



**Figure 22. La délétion de *pef1* ne modifie pas le profil électrophorétique des cohésines**  
Des extraits protéiques totaux de cellules cultivées à 25°C ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, 6%). Les protéines ont été analysées par immunoblot avec les anticorps indiqués.

**Figure 23. La délétion de *pef1* modifie le profil électrophorétique de Rad21**

Des extraits protéiques totaux de cellules cultivées à 25°C ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, 6%). La protéine Rad21 a été analysée par immunoblot. Trois profils électrophorétiques peuvent être distingués. Dans la souche sauvage ainsi que dans la souche *mis4-367*, la forme majoritaire est celle du milieu. Cette forme est sous-représentée dans les extraits protéiques de souches délétées pour *pef1*.



l'inactivation de Cdc25. La protéine Cdc25 est une phosphatase qui contrôle l'entrée et la progression en mitose, en enlevant les résidus phosphate inhibiteurs de sa cible Cdk1. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont majoritairement en phase G2 (80% de la population (Carlson et al, 1999)). Le passage à température restrictive pour l'allèle *cdc25-22* permet d'empêcher l'entrée en mitose et induit un arrêt ferme. En même temps, ce changement de température inactive le complexe de chargement des cohésines. La dissociation des cohésines de la chromatine au cours de l'arrêt en phase G2 a été suivie par des étalements de chromatine dans une souche sauvage et en l'absence de Pef1 (*Δpef1*). La quantité de cohésine Rad21-9PK est mesurée par immunofluorescence. Les résultats sont présentés dans la Figure 21.

Suite à l'inactivation du complexe de chargement dans la souche sauvage, la quantité de cohésines associées à la chromatine diminue au cours du temps, jusqu'à une valeur plateau d'environ 20% de la quantité initiale. En l'absence de Pef1, la quantité initiale de cohésines associées à la chromatine est plus faible (Fig. 21A), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en phase G1. En revanche, la cinétique de dissociation des cohésines n'est pas modifiée par l'absence de Pef1 (souche *Δpef1*) (Fig. 21B). Pef1 n'a donc pas d'effet sur la cinétique de dissociation des cohésines en phase G2.

En conclusion, ces données suggèrent que l'effet de Pef1 sur l'association et la dissociation des cohésines de la chromatine serait restreint à la phase G1 du cycle cellulaire.

### 3. Pef1 : un effet direct ?

La protéine Pef1 est une CDK et de nombreuses protéines de cohésion contiennent la séquence consensus de phosphorylation par les CDKs (NPXSPK). Les protéines Mis4, Wapl, Pds5, Eso1 et Rad21 possèdent toutes ce motif. Pef1 pourrait avoir un effet direct sur l'association des cohésines à la chromatine par la phosphorylation d'une ou plusieurs de ces cibles potentielles. Nous avons donc analysé la mobilité de ces différentes protéines à partir d'extraits cellulaires totaux en présence ou en absence de Pef1.

Le profil de migration des protéines Psm1, Psm3, Psc3, Pds5, Wapl, Mis4 et Eso1 semble inchangé en l'absence de Pef1 (Fig. 22). Seul le profil de phosphorylation de Rad21 paraît modifié dans une souche *Δpef1* (Fig. 23). La protéine Rad21 est hyper-phosphorylée au cours du cycle cellulaire (Adachi et al, 2008; Birkenbihl & Subramani, 1992; Tomonaga et al, 2000) et ces phosphorylations sont corrélées à son association à la chromatine (Tomonaga et al, 2000). Lors de la transition métaphase - anaphase, Rad21 passe d'un état massivement hyper-phosphorylé à un état non phosphorylé (Adachi et al, 2008). Par ailleurs, Rad21 est hypo-phosphorylée dans les mutants *rad21*, *ssl3* et *mis4* (Adachi et al, 2008; Tomonaga et al, 2000) dans lesquels l'association de Rad21 à la chromatine est réduite. En particulier, Rad21 est hypo-phosphorylée en phase G1 suite à l'inactivation de Mis4, mais ce n'est pas le cas en phase G2





(Tomonaga et al, 2000). Rad21 est donc hyper-phosphorylée lorsqu'elle est associée à la chromatine et réciproquement est hypo-phosphorylée sous forme soluble. Il n'est pas connu si la phosphorylation est la cause ou la conséquence de son association à la chromatine. De ce fait, la différence de mobilité observée pourrait être uniquement liée à la différence de répartition des cellules dans les différentes phases du cycle. En conclusion, cette étude préliminaire n'a pas permis de mettre en évidence une modification Pef1-dépendante. Il est à noter que l'expérience est très incomplète. Une phosphorylation peut très bien passer inaperçue par cette approche et de plus, l'expérience n'a pas été réalisée sur des cellules en phase G1, mais sur des cellules cyclantes (majoritairement en phase G2).

### ***Discussion***

L'objectif des travaux présentés était de rechercher des régulateurs de la dynamique des cohésines. Pour cela, nous avons réalisé un crible génétique sélectionnant des mutants supprimant le phénotype de thermosensibilité d'une souche déficiente pour l'activité de chargement des cohésines (utilisation de l'allèle *mis4-367*). Onze mutants ont été identifiés. La ségrégation du phénotype supprimant la thermosensibilité est monogénique pour les onze mutants. Ceux-ci se répartissent en quatre groupes de liaison, définissant quatre gènes distincts. Les quatre gènes identifiés semblent tous impliqués dans la progression du cycle cellulaire et plus particulièrement en réponse à la disponibilité en nutriments. En accord avec cette donnée, la qualité de la source d'azote semble être une composante de l'effet supprimeur.

### **Allonger la durée de la phase G1 ou reproduire le signal de la carence azotée ?**

Dans la souche *mis4<sup>ts</sup>* ou *ssl3<sup>ts</sup>* à température restrictive, la fonction de chargement des cohésines sur les chromosomes est compromise. À l'issue de la phase S, l'établissement de la cohésion n'a pu être réalisé et la cellule subit une mitose catastrophique, ce qui est corrélée à une perte de la viabilité cellulaire (Bernard et al, 2006; Furuya et al, 1998). Il semble raisonnable que le mécanisme par lequel les mutants suppriment la thermosensibilité de la souche *mis4-367* passe par la restauration d'une quantité minimale de cohésine sur la chromatine au moment de l'établissement de la cohésion. Nous avons vérifié que les mécanismes mis en jeu pour supprimer la thermosensibilité de la souche *mis4-367* nécessitent la présence du complexe de chargement des cohésines. En effet, à l'inverse de la souche *mis4-367 Δpef1*, la souche *Δmis4 Δpef1* n'est pas viable (données non montrées). Comme évoqué précédemment, la fonction identifiée des supprimeurs est cohérente avec l'allongement de la durée de la phase G1 dans les mutants correspondants. Cette observation est en revanche difficile à comprendre sachant que dans une souche *mis4-367* arrêtée en phase G1, le passage à température restrictive provoque la



dissociation des cohésines de la chromatine (Bernard et al, 2008). La quantité de cohésines résiduelle sera donc d'autant plus faible que les cellules seront restées longtemps en phase G1. Par conséquent, il paraît peu vraisemblable que ce soit par l'allongement de la durée de la phase G1 que les mutants supprimeurs suppriment la thermosensibilité de la souche *mis4-367*.

On peut imaginer que les mutations supprimeurs (notamment dans *mip1* et *tor2*) peuvent générer une réponse de type carence azotée en milieu riche. Cependant, nous savons (par l'essai Rec8) qu'une carence azotée ne permet pas ni d'inhiber Wapl ni de restaurer un déficit de chargement des cohésines (Fig. 18 et (Bernard et al, 2008)). Cette conclusion doit cependant être nuancée car nous ne connaissons pas le comportement des cohésines de type végétatif (Rad21) lors d'un arrêt G1 induit par la carence azotée. Il reste donc formellement possible que le chargement des cohésines Rad21 soit stimulé ou leur dissociation ralentie dans ces conditions.

### **Les mutants supprimeurs ont-ils un effet sur la dynamique des cohésines ?**

Les expériences utilisant Rec8-GFP ont été effectuées avant de finaliser l'identification des quatre gènes supprimeurs. Dans cet essai, l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire repose sur une réponse à la carence azotée. Les résultats obtenus par cette expérience sont préliminaires et il sera nécessaire de réaliser l'analyse de la dissociation des cohésines de la chromatine dans le cycle végétatif et dans un milieu riche. Néanmoins, les résultats suggèrent que les trois mutants supprimeurs testés ont un effet sur l'association de Rec8 à la chromatine dans ces conditions. Dans une souche *pef1<sup>sup011</sup>*, la quantité de Rec8 associée à la chromatine est réduite mais la dissociation est fortement ralentie. Ceci suggère que dans une souche sauvage, la CDK Pef1 régulerait positivement à la fois le chargement et la dissociation de Rec8. Des résultats préliminaires suggèrent que l'effet existe aussi sur les cohésines du cycle végétatif et que l'effet de Pef1 serait restreint à la phase G1 (Fig. 19 à 21). La phosphorylation des cohésines par la CDK Pef1 pourrait rendre compte d'un effet simultané sur le chargement et la dissociation. Les analyses préliminaires n'ont pas permis d'aller dans ce sens mais cette possibilité n'est pas écartée pour autant.

Nous avons vu que la seule inactivation de Wapl est largement insuffisante à la suppression de la thermosensibilité de *mis4-367* en milieu riche. Lorsque la source d'azote est remplacée par une source « pauvre », la délétion de *wpl1* supprime partiellement la thermosensibilité de *mis4-367*, ce qui suggère que Wapl exerce sa fonction lorsque les cellules sont cultivées dans ce type de milieu. Il est donc peu vraisemblable que les mutations supprimeurs induisent une régulation négative de Wapl. Le mécanisme de suppression pourrait impliquer une inhibition de la dissociation par une voie indépendante de Wapl ou une stimulation de l'activité résiduelle de chargement des cohésines, voire les deux simultanément.



L'essai Rec8 suggère que deux des mutations suppresseurs (*sup*<sup>010</sup> (*mip1*) et *sup*<sup>UVI</sup> (SPAC10F6.13c)) stimuleraient le chargement de Rec8 sur la chromatine. En effet, les mutants supprimés ont une plus grande quantité de Rec8 associée aux centromères que le mutant *mis4-367* dans un arrêt en phase G1 à température permissive. En revanche, la cinétique de décroissance de Rec8-GFP ne semble pas ralentie, ce qui suggère que l'effet suppresseur ne serait dû qu'à une stimulation de la réaction de chargement.

Les connaissances actuelles sur les fonctions de Tor2, Mip1 et Pef1 proposent que les conditions de carence azotée aboutissent à l'extinction de leur fonction. Les données obtenues par l'essai Rec8 ne sont pas en accord avec cette notion. Par exemple, si la carence azotée revient à inactiver Pef1, alors la délétion de *pef1* ne devrait avoir aucun effet dans ces conditions. Or ce n'est clairement pas le cas : Rec8 se comporte différemment selon que les cellules sont de génotype *pef*<sup>+</sup> ou  $\Delta$ *pef1*. Il en résulte que Pef1 mais aussi vraisemblablement Mip1, Tor2, voire SPAC10F6.13c pourraient avoir d'autres rôles et notamment dans la régulation de la quantité de cohésines associées aux chromosomes lors de la phase G1.



---

## **Chapitre III: The acetylation of Psm3 on conserved lysine residues is dispensable for sister-chromatid cohesion in fission yeast but contributes to antagonize Wapl downstream the Eso1 acetyl-transferase**

Amélie Feytout<sup>1,2,#</sup>, Sabine Vaur<sup>1,2,#</sup>, Sylvie Genier<sup>1,2</sup>, Stéphanie Vazquez<sup>1,2</sup> and Jean-Paul Javerzat<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires UMR 5095, 1 rue Camille Saëns, Bordeaux F-33077, France

<sup>2</sup> Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux F-33077, France

# These authors contributed equally to this work

\* Corresponding author: [JPaul.Javerzat@ibgc.u-bordeaux2.fr](mailto:JPaul.Javerzat@ibgc.u-bordeaux2.fr)

Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires CNRS UMR 5095, 1 rue Camille Saëns, Bordeaux F-33077, France. Tel: (33)556999026 Fax: (33)556999067

Running head: Contribution of Psm3 acetylation to cohesion

Word count: Materials and Methods (869); Introduction, Results, Discussion (5794)

41,818 characters (excluding spaces) for abstract, introduction, results, discussion and figure legends





## ***ABSTRACT***

Cohesion establishment during S phase requires the acetyl-transferase Eco1/Eso1/Esco1-2 which acetylates the cohesin subunit Smc3 on conserved lysine residues. Whether Smc3 is the sole effector and how its acetylation promotes cohesion are unknown. Alike in larger eukaryotes, cohesin binding to G1 chromosomes is labile in fission yeast in a reaction stimulated by Wapl. By contrast, a fraction of cohesin is stably bound to post-replicative chromatin. Cohesin stabilization is uneven along the chromosomes. Cohesin remains largely labile at the rDNA but binds peri-centromeres mostly in the stable mode. This pattern is largely unchanged in *eso1Δ wpl1Δ* cells and sister-chromatid cohesion is unaffected, indicating that Eso1 and Wapl are dispensable for these processes. Yet they rely on Eso1 in *wpl<sup>+</sup>* cells, showing that Eso1 main role in cohesion establishment is counteracting Wapl. An acetyl-mimicking form of Smc3 (called Psm3 in fission yeast) renders cohesin less sensitive to Wapl but does not generate the stable mode of cohesin binding. Conversely, non acetyltable *psm3* affects the stable cohesin fraction and sister-chromatid cohesion but cells are viable. We propose that Psm3 acetylation contributes to, but is not the sole molecular event by which Eso1 counteracts Wapl to secure a stable cohesin interaction with post-replicative chromosomes.



---

## ***INTRODUCTION***

Following DNA replication in S phase sister DNA molecules are linked together by cohesin. Thereafter, cohesion between sister chromatids persists throughout the G2 phase and until mitosis where it allows chromosome bi-orientation on the mitotic spindle (16). Defects in this process have been linked to aneuploidy and tumour progression. Cohesin is a multi-subunit protein complex made of a dimer of long flexible Smc subunits which form a ring shape structure stabilized by the binding of a kleisin subunit (Scc1/Rad21 in the mitotic cycle; Rec8 in meiosis) (2, 24). Kleisin cleavage by Separase destroys the ring and allows chromatid separation at anaphase (27, 42, 57). The ring shape of the complex suggested that cohesin ensures cohesion by topological trapping of sister DNA molecules and strong experimental evidence support this model (23), although other modes of cohesin DNA interaction might co-exist (28, 39).

One key aspect of the cohesion cycle is how cohesion is made during S phase. Cohesin is first deposited on unreplicated chromosomes in a reaction requiring ATP hydrolysis by the Smc heads and the cohesin loading complex Scc2/Scc4 (4, 5, 15, 60). In an unperturbed cell cycle, cohesion is made exclusively during S phase and unless in the event of a DNA double-strand break, cohesin loading after DNA replication does not result in functional cohesion (25, 33, 50, 59). Numerous studies have shown that mutations in non-essential factors associated with the replication fork machinery affect sister chromatid cohesion, leading to the notion that cohesion is made in a reaction coupled with replication fork progression (3, 19, 26, 31, 34, 35, 43). One crucial factor associated with the replisome is the acetyl-transferase Eco1/Ctf7 (29, 33, 37). In *eco1* mutants (*eso1* in fission yeast), cohesion is not made or quickly lost after DNA replication although cohesin rings are formed and chromatin bound, resulting in a “cohesin without cohesion” phenotype (49, 53, 56).

Following S phase, cohesion persists until nuclear division. Since cohesion is essential for chromosome segregation, cohesin binding to chromosomes should be stable enough to maintain cohesion during the intervening G2 phase. Live imaging in mammalian cells has shown that cohesin is not stably bound to chromatin during the G1 phase of the cell cycle when chromosomes are not yet replicated. Chromatin bound cohesin exchange with the soluble nuclear pool and the “unloading” reaction relies in part on the Wapl gene product (22, 30). Importantly, a fraction of cohesin becomes stably bound to chromatin as cells progress through S phase. Since sister-chromatid cohesion is made at that time, this raised the possibility that the change in cohesin dynamics might be instrumental to the process of creating and/or maintaining cohesion. Similarly in fission yeast, sustained cohesin binding to G1 chromosomes requires the continued



activity of the cohesin loader (called Mis4/Ssl3 in fission yeast (9, 20)). When the cohesin loader is inactivated in G1, cohesin dissociates completely from chromatin in a Wapl-dependent manner. By contrast, when cohesin loading is inactivated in G2, a pool of cohesin remains bound to chromatin. Cohesin stabilization was affected in the thermosensitive *eso1-H17* mutant, indicating that stable cohesin binding to post-replicative chromosomes requires Eso1 function (12). In human cells, the premature separation of sister chromatids induced by Esco2 depletion is suppressed by down-regulating Wapl, suggesting that Esco2 counteracts Wapl (21).

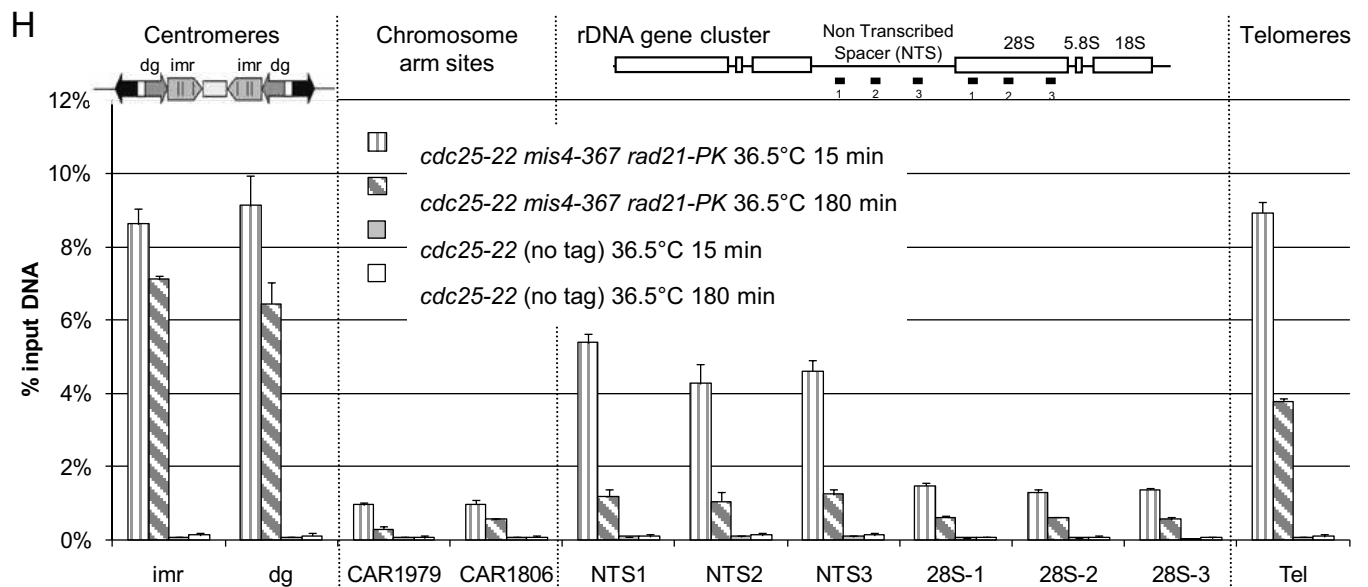
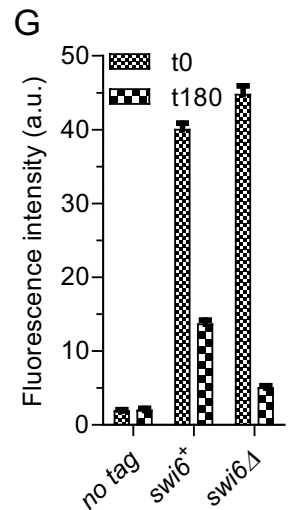
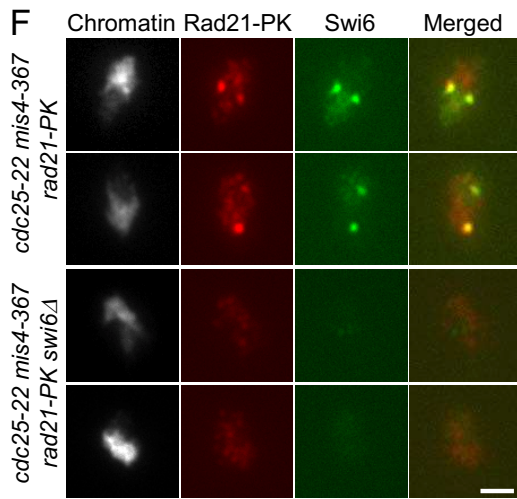
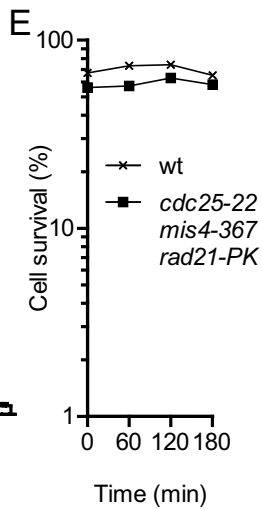
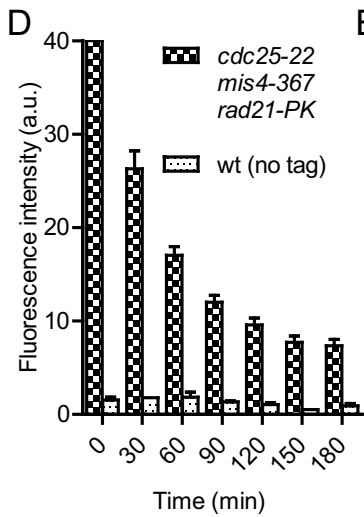
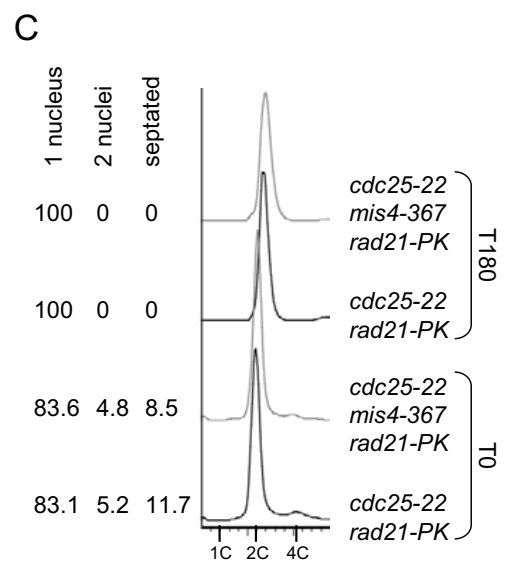
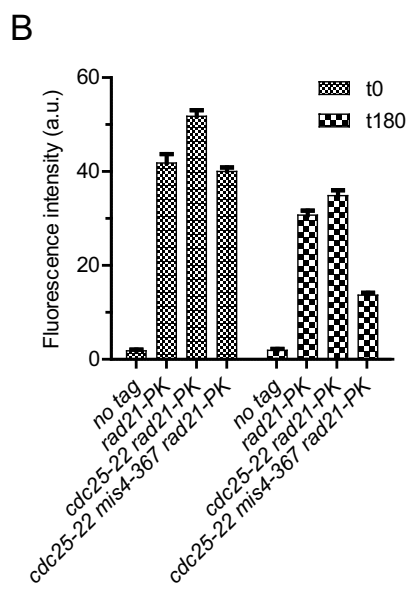
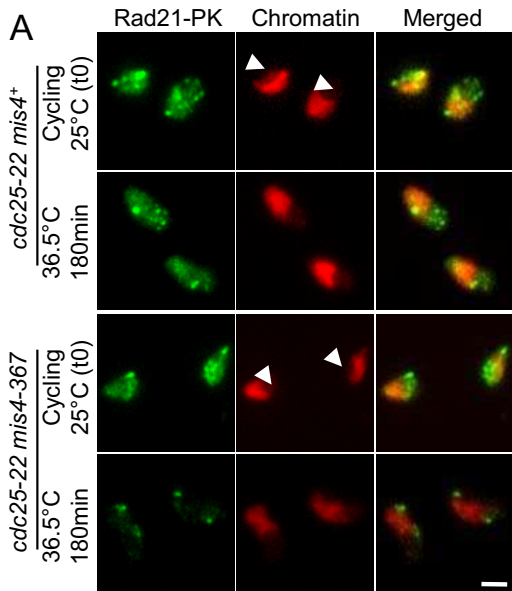
Altogether, these observations suggest a model in which cohesin must be stably bound to chromatin to ensure cohesion and the function of the acetyl-transferase would be to promote cohesin stabilization by preventing Wapl from acting on it. The acetyl-transferase may counteract Wapl through the acetylation of specific substrates. One obvious candidate is Smc3, one of the two Smc molecules that form the ring shape of cohesin. In budding yeast and mammals, Smc3 is acetylated on two adjacent conserved lysine residues (8, 44, 58, 62). Acetyl mimicking mutant forms of Smc3 partially bypass Eco1 requirement in budding yeast. Conversely, non-acetylatable yeast mutants are unviable but this phenotype is alleviated by the deletion of the budding yeast *wpl* homolog (8, 44, 58). These data led to the conclusion that the creation of cohesion requires the acetylation of Smc3 by Eco1. Whether Eco1 function transits exclusively through Smc3 acetylation and whether it promotes cohesion through the stabilization of cohesin interaction with chromosomes are unknown. Unlike fission yeast and mammals, it is unclear whether budding yeast Wapl promotes cohesin removal from chromosomes. Rather, budding yeast Wapl appears to display the opposite activity since it contributes to cohesin binding to chromatin and full cohesion activity (44, 51). In human cells, Smc3 acetylation is required for normal replication fork progression. Failure to acetylate SMC3 slows down fork movement, a phenotype reversed by down-regulating WAPL (55). Whether Smc3 acetylation in mammals impinges on the stabilization of cohesin interaction with chromosomes is unknown. There is however strong experimental evidence that cohesin stabilization requires Sororin, a conserved cohesin associated factor in vertebrates but with no known homolog in lower eukaryotes (48).

Here we address these questions in fission yeast. We first show that the mode of cohesin interaction with post-replicative chromatin is uneven along the chromosome. The large amount of cohesin bound to the rDNA gene cluster remains mostly labile whereas cohesin is mostly bound in a stable mode within peri-centromeric heterochromatin. Cohesin stabilization is affected in an *eso1* mutant but Eso1 function is fully dispensable for cohesin stabilization and



---

sister-chromatid cohesion when the *wpl1* gene is deleted, indicating that the main, if not sole role of Eso1 in cohesion establishment is to counteract Wapl. The cohesin subunit Smc3 (called Psm3 in fission yeast) is acetylated in an Eso1-dependent manner. An acetyl-mimicking form of Psm3 can partially bypass Eso1 requirement, suggesting that Psm3 acetylation may contribute to cohesin stabilization. In favour of this idea, we provide evidence that Psm3 acetylation lowers cohesin susceptibility to Wapl and thereby may contribute to antagonize it. Psm3 acetylation by itself is however insufficient to confer the stable mode of cohesin interaction with chromosomes. We show that Psm3 is unlikely the unique effector of Eso1 function. Whereas the *eso1* gene is essential for viability, a non-acetyltable *psm3* mutant is viable and mostly proficient for cohesin stabilization and long term cohesion. Although preventing Psm3 acetylation does not hinder the process of cohesin stabilization *per se*, the amount of stably-bound cohesin is reduced and cohesion defects can be detected. We propose that Psm3 acetylation may facilitate the reaction promoting a stable mode of cohesin interaction with chromosomes but our data suggest that Psm3 acetylation is not the sole Eso1 dependent event leading to the stable mode of cohesin binding to replicated chromosomes.





**FIG. 1. Characterization of the cohesin fraction stably bound to post-replicative chromosomes**

(A-D) A fraction of Rad21 persists on G2 chromatin after inactivation of the cohesin loading machinery. Cycling cells were shifted to 36.5°C to shut off cohesin loading (*mis4-367*) while keeping cells in G2 (*cdc25-22*). Chromatin bound Rad21-9PK was measured at the indicated time-points by nuclear spreading and immunofluorescence using anti-PK antibodies. (A) Images of nuclear spreads showing chromatin bound Rad21-9PK before (cycling) and 180 min after the temperature shift. Chromatin was counterstained with DAPI. The arrow heads point to the nucleolus which is located in the area of the nucleus unstained by DAPI. Bar=2.5µm. (B) Rad21-9PK fluorescence intensity was measured for 50-100 nuclei for each sample. Error bar = 95% confidence interval of the mean with  $\alpha=0.05$ . (C) Analysis of the cell cycle stage confirms that most cells (>80%) were in the G2 phase before the temperature shift and remained in G2 throughout the experiment. The position of cells within the cell cycle was analysed by DNA content analysis. DAPI and calcofluor staining were used to score mononucleate, binucleate and septated cells. (D) Kinetics of Rad21 dissociation from chromatin. The data presented are the mean of ten independent experiments. Error bar = SEM. (E) Cell survival remained high during the course of the experiment. Cells were withdrawn at the indicated time-points and plated at the permissive temperature to determine the number of viable cells. (F) The major foci of cohesin in the stable fraction co-localize with Swi6. Cells were treated as in (A) and nuclear spreads prepared 180 min after the temperature shift at which time only the stable cohesin fraction is retained on chromatin. Bar=2.5µm. (G) The stable cohesin fraction is reduced in cells lacking Swi6. Rad21-9PK fluorescence intensity was measured for 50-100 nuclei for each sample. Error bar = 95% confidence interval of the mean with  $\alpha=0.05$ . (H) A Rad21 ChiP assay showing the distribution of the labile and stable cohesin fractions along the chromosomes. Cells were cultured as in (A) and processed for ChiP just after (15min) and 180 min after the temperature shift. Rad21 enrichment was measured at centromeres (*imr* and *dg*); two chromosomes arm sites (CAR1806 and CAR1979); within the rDNA gene cluster (NTS and 28S) and at telomeres (TEL). Rad21 enrichment was calculated from duplicate samples. Error bar=SEM.



---

## **RESULTS**

### **Cohesin bound in the stable mode is not evenly distributed along post-replicative chromosomes**

In a previous study, we showed that when the cohesin loading machinery is inactivated in G1 arrested cells, cohesin that was bound to chromosomes dissociated to completion in a reaction stimulated by Wapl. By contrast, when the experiment was made using G2 cells, a fraction of cohesin remained bound to chromosomes (12). In this section we address the kinetics of cohesin removal from chromatin and the pattern of stable cohesin binding along chromosomes. A typical experiment is shown in Figure 1. Cycling cells which are mainly in the G2 phase of cell cycle (FIG. 1C and (14)) were shifted to the restrictive temperature for *cdc25-22* and *mis4-367* to keep cells in G2 and to prevent further cohesin loading. Cohesin binding to chromatin was monitored by nuclear spreads and immunofluorescence against the cohesin subunit Rad21 (FIG. 1A). Inactivation of the cohesin loader lead to a decrease of chromatin bound Rad21 over time. Quantification of the fluorescence signal indicated that the amount of chromatin bound Rad21 three hours after the temperature shift was reduced to ~40% when compared to its isogenic *mis4*<sup>+</sup> control at the same temperature (FIG. 1B). The kinetics of Rad21 dissociation from G2 chromatin upon inactivation of Mis4 is shown in FIG. 1D. The amount of chromatin bound Rad21 decreased with time to reach a plateau after about 150 min. Two populations of cohesin can therefore be distinguished; a labile and a stable fraction. Cell survival remained high throughout the experiment (FIG. 1E), indicating that cohesin complexes that were chromatin bound at late time points (i. e. the stable fraction) provided functional cohesion.

Examination of Rad21 fluorescence on nuclear spreads before and 3 hours after inactivation of the cohesin loader suggested that Rad21 may persist preferentially at some genomic locations (FIG. 1A). Indeed, the major foci of punctuate Rad21 staining co-localised with the heterochromatin protein Swi6 (FIG. 1F), the *S. pombe* HP1 homolog. Swi6 is required for cohesin enrichment within heterochromatin domains (11, 41). Consistently, the major foci of Rad21 staining were absent from nuclear spreads made from *swi6*Δ cells (FIG. 1F) and the stable cohesin fraction was reduced more than two fold (~60%, FIG. 1G). We conclude that Swi6 domains are major sites where cohesin is bound to chromatin in the stable mode in post-replicative cells.



To further characterize the pattern of stable cohesin binding along chromosomes we used a chromatin immunoprecipitation assay (FIG. 1H). Most (~70-80%) Rad21 remained bound to peri-centromeric heterochromatin three hours after inactivation of the cohesin loader. Both telomeres and centromeres are bound by Swi6 and display features of heterochromatin (17). A substantial amount of Rad21 (~40%) also persisted at telomeres but unlike peri-centromeric domains, a large fraction dissociated with time. Heterochromatin might contribute to mark chromosomal domains as sites of cohesin stabilization but other determinants may exist at centromeres to account for the strong stability of Rad21 binding at these sites.

Another major site of cohesin enrichment is the rDNA locus, made of ~100 tandem repeats covering the left and right arm of chromosome III. Examination of nuclear spreads before inactivation of the loading machinery showed a large amount of Rad21 within the nucleolus but this signal was strongly reduced three hours after inactivation of Mis4 (FIG. 1A, arrow heads). By ChiP, Rad21 was mostly enriched within the rDNA non transcribed spacer (NTS) but was reduced to ~25% three hours after inactivation of Mis4 (FIG. 1H). Although the rDNA is a major site of cohesin enrichment, cohesin appears mostly bound in the labile mode.

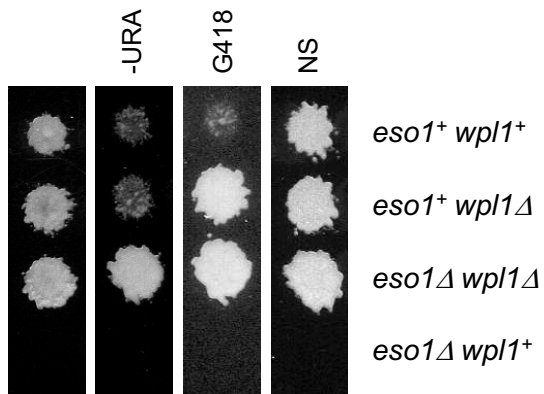
We also assayed the stability of Rad21 binding at two cohesin associated regions (CARs) on chromosome 2. The amount of Rad21 bound at chromosome arm sites is much lower than at centromeres, telomeres and rDNA. These two CARs were chosen because they were among CARs with the highest amount of Rad21 based on published genome wide data (12, 32). Three hours after the temperature shift, the amount of Rad21 bound at CAR1806 and CAR1979 was reduced to ~56% and ~30%, respectively.

From these experiments, we conclude that a fraction of cohesin is stably bound to post-replicative chromosomes. Cohesin does not become stabilized evenly along the chromosomes. Swi6/heterochromatin domains account for ~60% of the stable cohesin fraction and peri-centromeric heterochromatin is a site where cohesin is bound mostly in the stable mode.

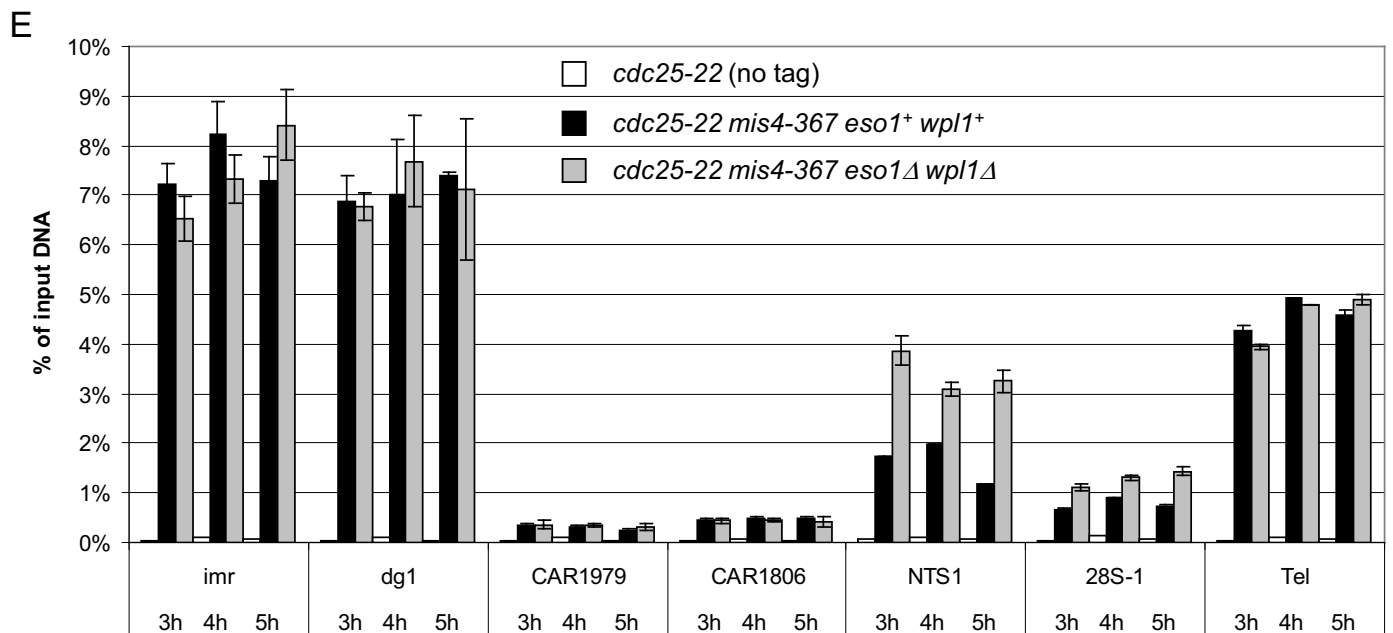
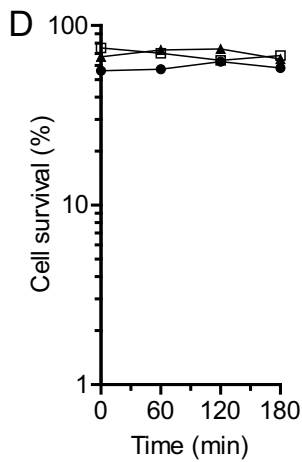
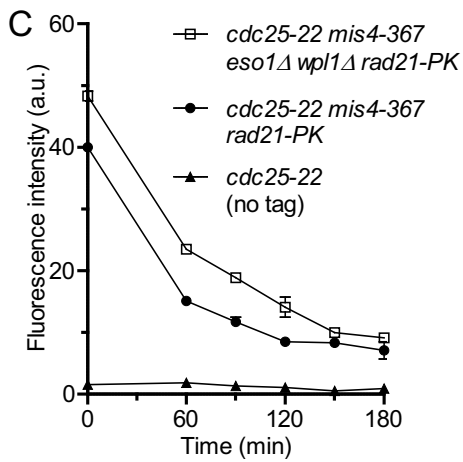
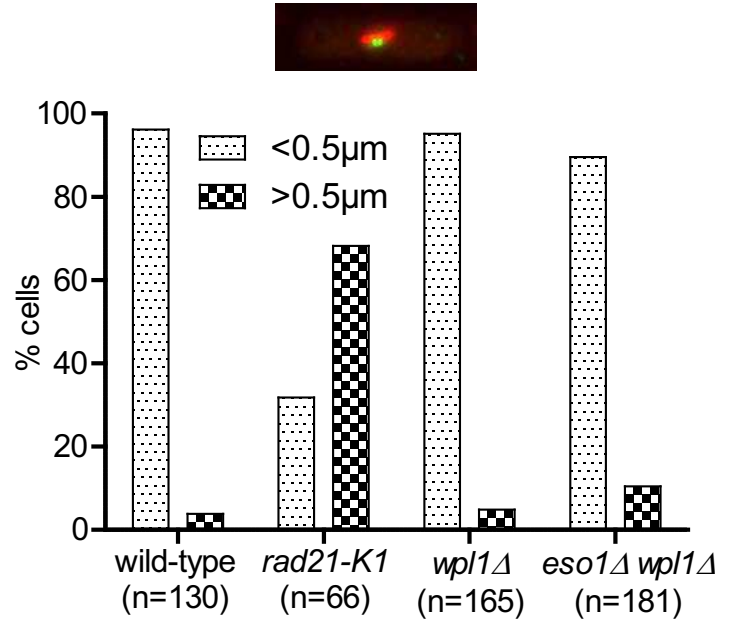
### **Eso1 is dispensable for stable cohesin binding to post replicative chromatin and sister-chromatid cohesion when the *wpl1* gene is deleted**

In a previous study, we reported that *wpl1* stimulates cohesin removal from G1 chromosomes and that cohesin stabilization after S phase was affected when Eso1 function was compromised. This suggests that Eso1 may promote stable cohesin association with chromosomes by counteracting Wapl. There is indeed accumulating evidence in mammals that Wapl and Esc1-2 display opposing activities. Similarly in budding yeast, *ECO1* function can be partially bypassed

A *eso1Δ::ura4<sup>+</sup> wpl1Δ::kan<sup>R</sup>ura4 X ura4*



B *cen2* FISH on metaphase cells



**FIG. 2. Eso1 function is dispensable when the *wpl1* gene is deleted.**

(A) A representative example of tetrad analysis showing that *eso1* $\Delta$  spores do not support colony formation whereas *eso1* $\Delta$  *wpl1* $\Delta$  spores form wild-type sized colonies. Tetrads were dissected and spores deposited on complete medium (left). Colonies were replica plated onto appropriate media to follow the segregation of *eso1* and *wpl1* alleles. -URA: minimum medium lacking uracil. G418: YES+G418. NS: non selective YES medium. (B) Cen2 FISH on metaphase arrested cells. Fixed cells were stained for tubulin and processed for FISH using a probe mapping close to the centromere of chromosome 2. The image shows an example of a typical metaphase cell. The mitotic spindle (red) is <2.5 $\mu$ m in length and the two cen2 FISH signals (green) are closely apposed to each other. No major defect in sister centromere cohesion was observed in *wpl1* $\Delta$  and *wpl1* $\Delta$  *eso1* $\Delta$  cells as opposed to the thermosensitive *rad21-K1<sup>ts</sup>* mutant. (C-E) The stable cohesin fraction is made and functional in *eso1* $\Delta$  *wpl1* $\Delta$  cells. Strains were cultured and processed for nuclear spreading and ChiP as in FIG. 1. (C) Kinetics of Rad21 dissociation from chromosomes. Chromatin bound Rad21-PK was quantified from nuclear spreads. Error bar = SEM from two independent experiments. (D) Cell survival remained high throughout the duration of the experiment. (E) ChiP assay comparing the amount and stability of Rad21 binding to chromosomes in *eso1* $\Delta$  *wpl1* $\Delta$  versus *eso1*<sup>+</sup> *wpl1*<sup>+</sup> cells from 3h to 5h after cohesin loading was shut off. The error bar shows the SEM from two qPCR quantifications.

TABLE 2. *Ch16* minichromosome loss rates

Genetic background	Loss rate	Percent division
wt	12 / 9947	0.12
<i>wpl1</i> Δ	14 / 4931	0.28
<i>eso1</i> Δ <i>wpl1</i> Δ	16 / 5324	0.30
<i>eso1</i> Δ <i>psm3</i> <sup>K105N</sup>	ND <sup>1</sup>	~100
<i>eso1</i> Δ <i>psm3</i> <sup>K105N</sup> <i>wpl1</i> Δ	0 / 2931	< 0.03
<i>eso1</i> Δ <i>psm3</i> <sup>K106N</sup>	ND <sup>1</sup>	~100
<i>eso1</i> Δ <i>psm3</i> <sup>K106N</sup> <i>wpl1</i> Δ	5 / 6054	0.08
<i>eso1</i> Δ <i>psm3</i> <sup>K105NK106N</sup>	50 / 2474	2.02*
<i>eso1</i> Δ <i>psm3</i> <sup>K105NK106N</sup> <i>wpl1</i> Δ	4 / 5694	0.07
<i>psm3</i> <sup>K105NK106N</sup>	25 / 7327	0,34
<i>psm3</i> <sup>K105R</sup>	14 / 5818	0.24
<i>psm3</i> <sup>K105R</sup> <i>wpl1</i> Δ	19 / 6250	0.30
<i>psm3</i> <sup>K106R</sup>	55 / 7772	0.71*
<i>psm3</i> <sup>K106R</sup> <i>wpl1</i> Δ	5 / 6911	0.07
<i>psm3</i> <sup>K105R K106R</sup>	66 / 8371	0.79*
<i>psm3</i> <sup>K105R K106R</sup> <i>wpl1</i> Δ	10 / 6392	0.16

<sup>1</sup> ND: not determined since *Ch16* could not be maintained in this genetic background. The loss rate is therefore estimated as 100%.

\* Statistically significant when compared to wt (P value < 0.0001 by the Chi-square test)

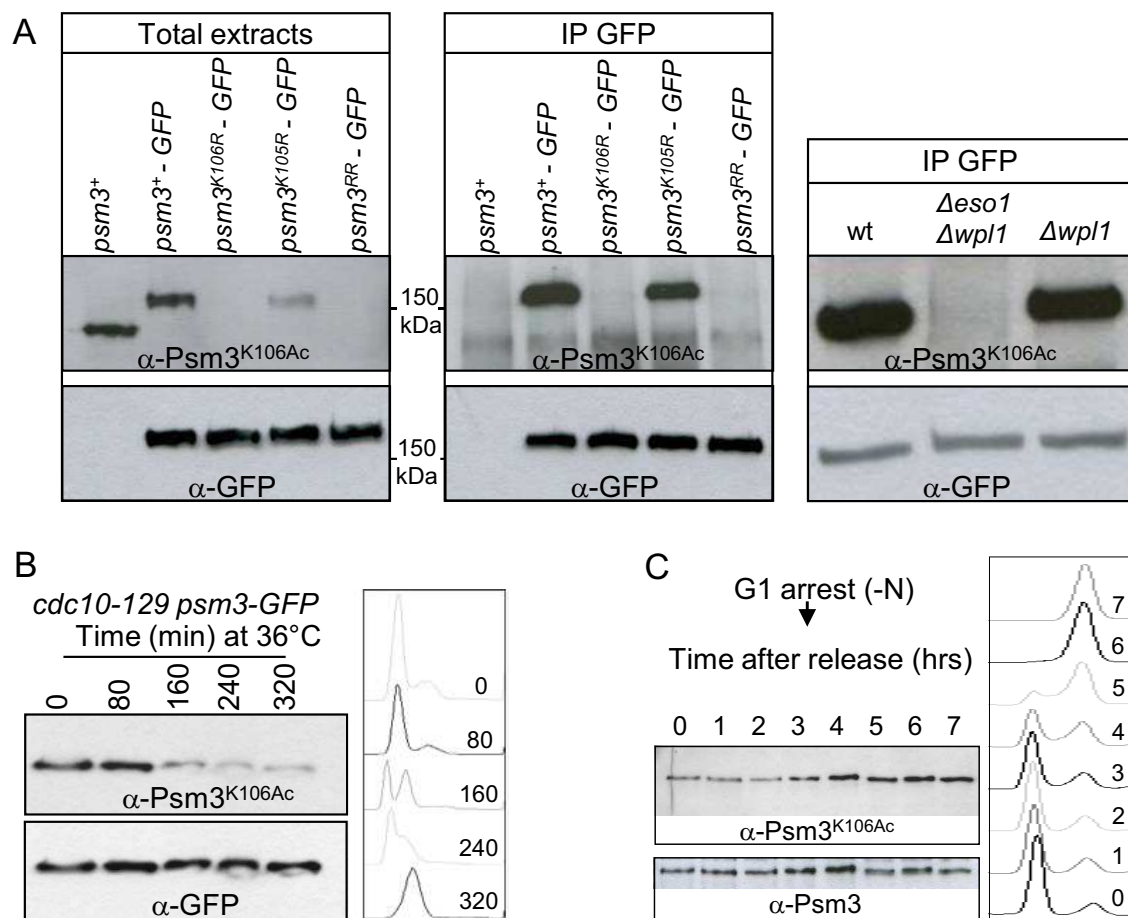


by the deletion of *RAD61*. The genetic interaction between *eso1* and *wpl1* was however not investigated in fission yeast.

As shown in FIG. 2A, a strain deleted for both *eso1* and *wpl1* was viable whereas the deletion of *eso1* alone is lethal (53). The *eso1Δ wpl1Δ* strain formed wild-type sized colonies, suggesting a high level of suppression. To investigate this point we used an assay that allows the detection of infrequent chromosome loss events (TABLE 2). The non-essential linear minichromosome *Ch16* bears a functional centromere and is lost at a frequency of 0.05-0.1% of cell divisions in a wild-type background (1, 40). The deletion of *wpl1* had only a modest impact on *Ch16* loss rate. Importantly, the loss rate did not increase in *eso1Δ wpl1Δ* cells showing that loss of Eso1 function has no detrimental effect on chromosome segregation when Wapl is absent. To see whether subtle cohesion defects might occur, sister chromatid cohesion was assessed by FISH using a probe mapping close to the centromere of chromosome 2. To increase the sensitivity of the assay cells were arrested at metaphase, when cohesion is challenged by spindle forces exerted on sister centromeres. As shown in FIG. 2B, sister centromere separation remained low in *wpl1Δ* and in *eso1Δ wpl1Δ* cells, close to the wild-type control. We conclude that Eso1 function is dispensable for sister chromatid cohesion in the absence of Wapl. This implies that the main if not the sole function of Eso1 in cohesion establishment is counteracting Wapl.

Wapl stimulates cohesin removal and stable cohesin binding to post-replicative chromosomes is affected when Eso1 function is compromised (12). If indeed Eso1 acts solely by counteracting Wapl, the stable cohesin fraction should be formed in *eso1Δ wpl1Δ* as in wild-type. To address this question, cycling cells bearing *mis4-367* and *cdc25-22* were shifted from 25°C to 36.5°C and Rad21 binding to chromatin was monitored by nuclear spreads. As shown in FIG. 2C, the initial amount of chromatin-bound Rad21 was higher in *eso1Δ wpl1Δ* cells when compared to wild-type but at late time-points the amount of Rad21 that remained bound to chromosomes appeared similar. This suggests that the labile fraction of cohesin is increased in size in *eso1Δ wpl1Δ* but the stable fraction may remain unchanged. Cell survival remained high in the two strains (FIG. 2D), indicating that cohesin that remained chromosome bound provided functional cohesion.

To confirm that the stable cohesin fraction was indeed present we used a ChiP assay to assess the amount and stability of chromatin-bound Rad21 at several loci when the G2 arrest was further extended from 3 to 5 hours. As shown in FIG. 2E, the amount of chromatin bound Rad21 did not decrease further at all loci examined, consistent with a stable mode of cohesin binding. The amount of Rad21 bound in the stable mode was similar to that observed in *eso1<sup>+</sup> wpl1<sup>+</sup>* cells at



**FIG. 3. Eso1 dependent Psm3<sup>K106</sup> acetylation during the cell cycle.**

(A) The anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> antibody reacts with Psm3 in a K106 dependent-manner in total extracts (left) and GFP immunoprecipitates (middle). Psm3 detection by anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> antibodies is dependent on Eso1 but not on Wapl (right). (BC) Psm3<sup>K106</sup> acetylation during the cell cycle. (B) Cells bearing the thermosensitive mutation *cdc10-129* were shifted to the restrictive temperature to induce a G1 arrest. Samples were taken at regular time intervals after the temperature shift to monitor Psm3<sup>K106Ac</sup> on total protein extracts as cells progressed from an asynchronous population (Time 0) to a homogeneous G1 arrest. Flow cytometry analysis of DNA content (right) shows that Psm3<sup>K106Ac</sup> starts to decrease as the G1 peak appeared. The drift in the G1 peak to the right at later time points is due to an increase in mitochondrial DNA content as cells elongate (46). (C) Cells were arrested in G1 by nitrogen deprivation and released synchronously into the cell cycle. Psm3<sup>K106Ac</sup> probed from total protein extracts was weakest in cells with a G1 DNA content and began to rise at the time of DNA replication. Anti-Psm3 antibodies were used to adjust protein loading so that a similar amount of Psm3 was present in each sample.

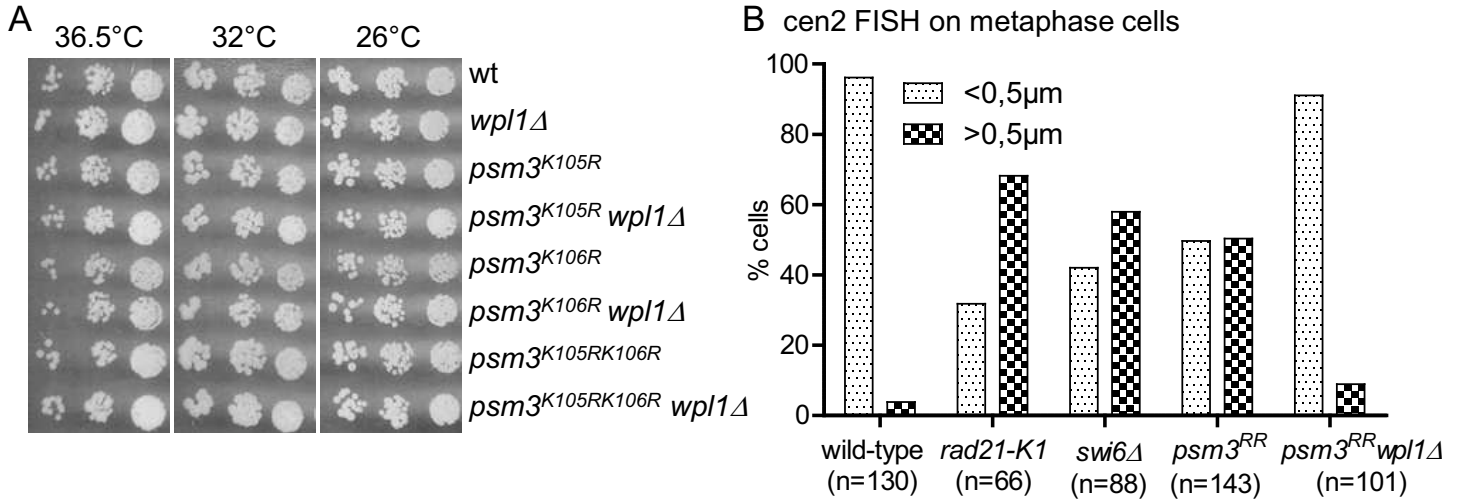
all loci examined except for the rDNA locus, where it was markedly increased when both *eso1* and *wpl1* are deleted.

From these experiments, we conclude that the stable cohesin fraction is made and functional in the absence of both Eso1 and Wapl. The fundamental processes by which cohesin becomes stabilized and the creation of cohesion remain intact and therefore and not dependent on the Eso1-Wapl module. However, Eso1 is essential in wild-type cells indicating that Wapl must be counteracted by Eso1. We have shown previously that the stable cohesin fraction was altered in the *eso1-H17* mutant ((12), see also FIG. 6D, F). This suggests that one functional consequence of counteracting Wapl is the sheltering of cohesin from its removal activity.

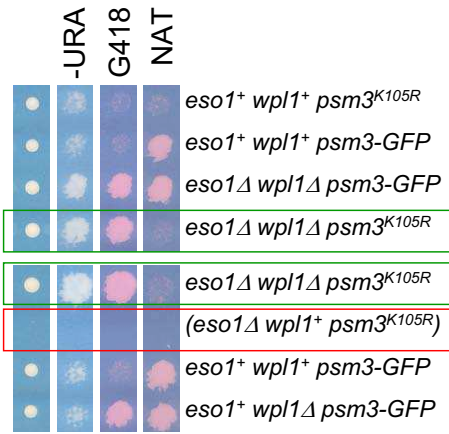
### **Psm3 acetylation is not essential but contributes to Eso1 function**

Eso1 may antagonize Wapl through the acetylation of specific substrates. In budding yeast and mammals, Smc3 is acetylated by Eco1/Esco1 (8, 44, 58, 62) on two adjacent conserved lysine residues which correspond to K105 and K106 in fission yeast Psm3. To see whether Eso1 may act through the acetylation of Psm3, we first asked whether Psm3 was actually acetylated in an Eso1 dependent manner in fission yeast, and whether Psm3 acetylation would be detected at the time of S phase when Eso1 exerts its essential function. As a readout of Eso1 activity, we raised and made use of an antibody that efficiently recognises Psm3<sup>K106Ac</sup> in total protein extracts. As shown in FIG. 3A, the antibody reacts with Psm3 but not when K106 is substituted by the non-acetylatable residue arginine. Acetylated Psm3 is detected in an Eso1-dependent manner but independently from Wapl. During the cell cycle, the amount of the acetylated form was lowest in G1, rose at the time of S phase and remained constant throughout G2 (FIG. 3BC), similar to previous observations made in budding yeast (8, 58).

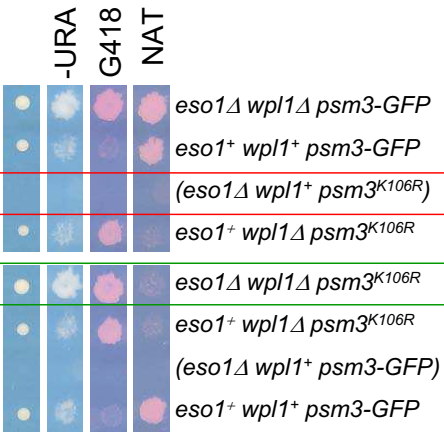
To see whether Eso1 acts through the acetylation of Psm3, mutant alleles were created in which K105, K106 or both lysine residues were replaced by the non acetylatable residue arginine. The mutant alleles were inserted in the genome at the *psm3* locus, replacing the wild-type allele. Surprisingly, all mutant strains were viable and displayed a wild-type growth rate, even when both lysine residues were mutated (FIG. 4A). Genetic analyses (FIG. 4C-E) indicated that the progeny bearing a non acetylatable mutant allele is viable in an *eso1*<sup>+</sup> background but not when the *eso1* gene is deleted. This demonstrates that the viability of non-acetylatable mutants relies on Eso1, indicating that Eso1 exerts a vital function even though the two conserved Psm3 residues cannot be acetylated. We conclude that Eso1 function cannot transit exclusively through the acetylation of these lysine residues.



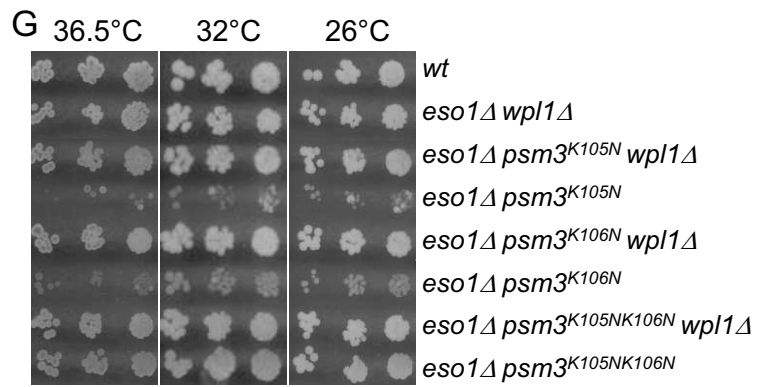
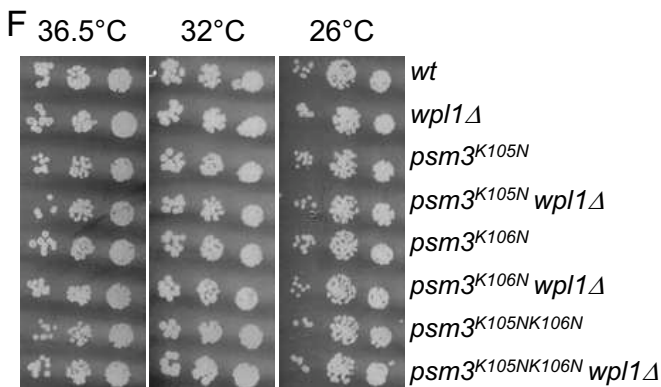
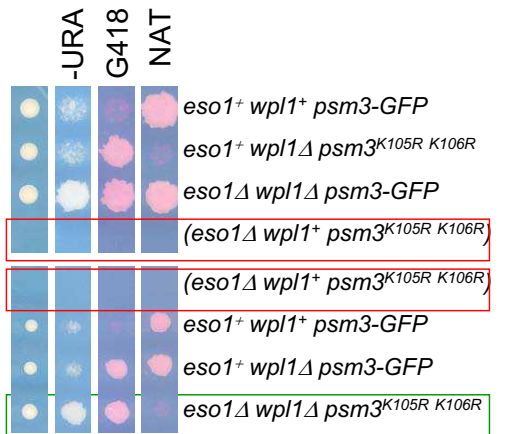
**C** *h<sup>+</sup> ura4 wpl1Δ::kanR*  
*eso1Δ::ura4<sup>+</sup> psm3-GFP-natR*  
*X h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K105R</sup>*



**D** *h<sup>+</sup> ura4 wpl1Δ::kanR*  
*eso1Δ::ura4<sup>+</sup> psm3-GFP-natR*  
*X h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K106R</sup>*



**E** *h<sup>+</sup> ura4 wpl1Δ::kanR*  
*eso1Δ::ura4<sup>+</sup> psm3-GFP-natR*  
*X h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K105R K106R</sup>*



**FIG. 4. Non acetyltable mutants are viable but generate a cohesion defect.**

(A) Non-acetyltable *psm3* mutants display a wild-type growth rate. Serial dilutions of cells were spotted on YES medium and incubated at the indicated temperatures. (B) Cen2 FISH on metaphase arrested cells revealed a *wpl1*-dependent defect in sister centromere cohesion in the *psm3<sup>RR</sup>* mutant. (C-E) Tetrad analysis showing the segregation of *psm3* non acetyltable alleles. Tetrads were dissected and spores deposited on complete medium (left). Colonies were replica plated onto appropriate media to follow the segregation of the markers. -URA: minimum medium lacking uracil. G418: YES medium containing G418. NAT: YES medium containing Nourseothricin. YES plates also contain the vital stain phloxin B as an indicator of cell lethality within the colony. Representative tetrads are shown. Green boxes show that the non-acetyltable *psm3* alleles are neutral in an *esol1Δ wpl1Δ* background. Red boxes show that *esol1Δ* combined with a non-acetyltable *psm3* allele does not form viable progeny. (F-G) Serial dilutions of cells were spotted on YES medium and incubated at the indicated temperatures. (F) Acetyl-mimicking *psm3* mutants are viable and display a wild-type growth rate. (G) Acetyl-mimicking *psm3* alleles can bypass *esol1* requirement. The comparison of colony growth rate shows the additive effect of the amino-acid substitutions.

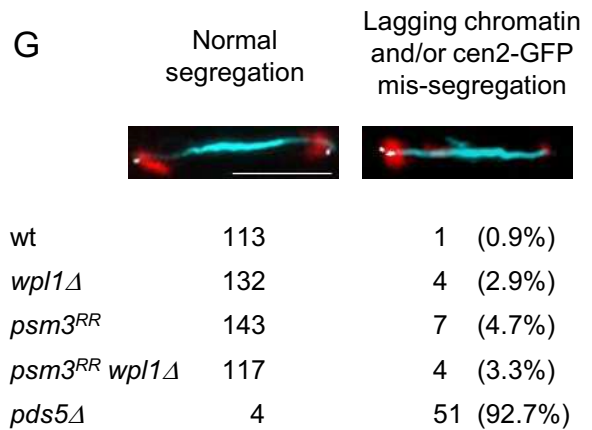
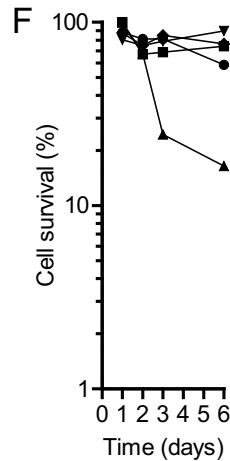
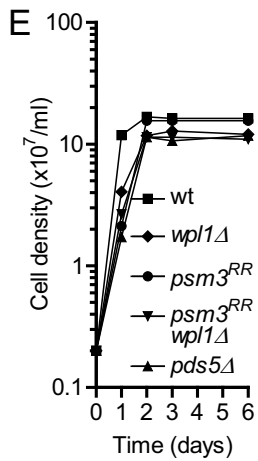
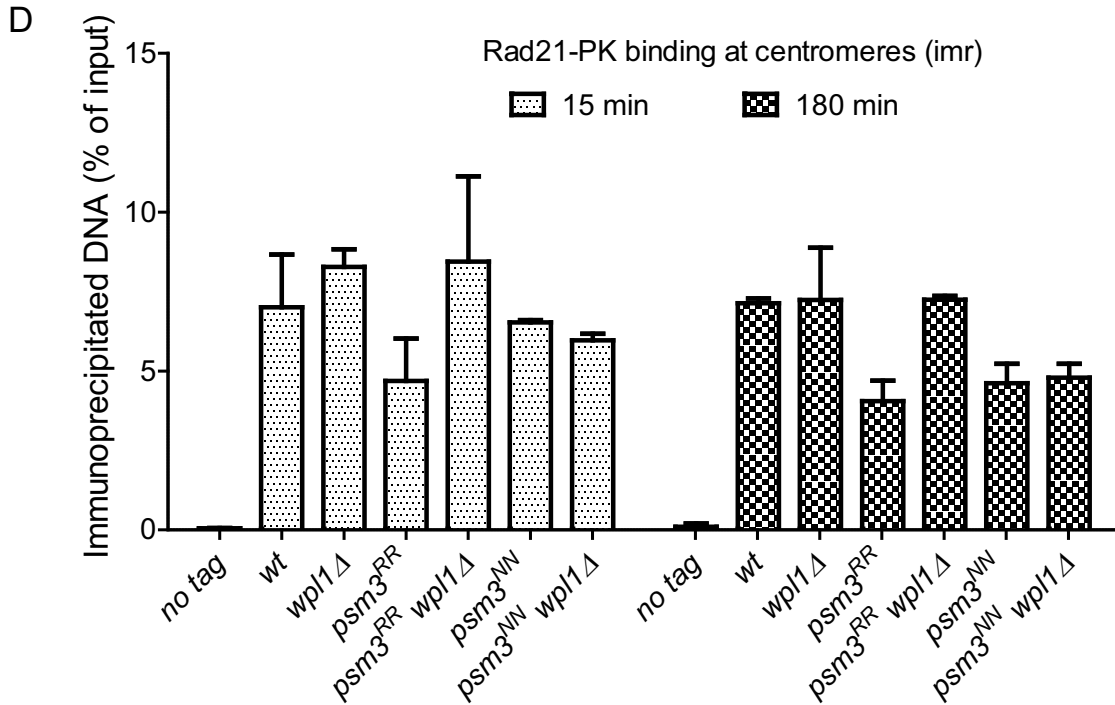
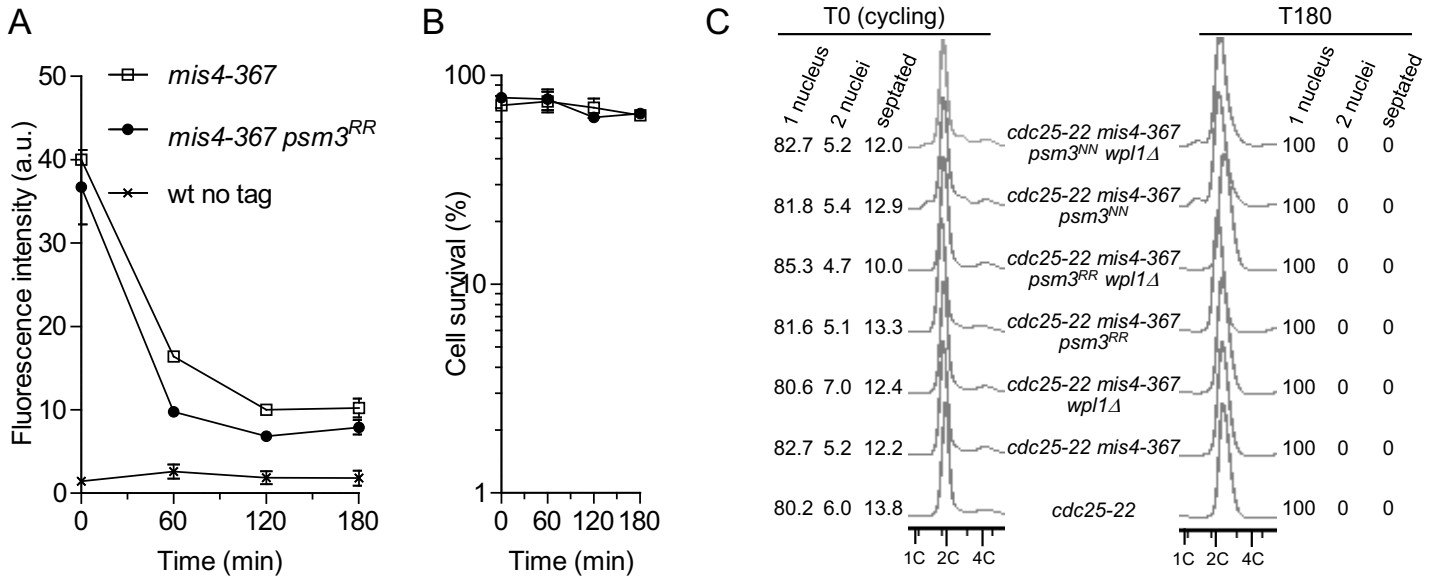


Although viable, *psm3*<sup>K106R</sup> and *psm3*<sup>K105RK106R</sup> (thereafter named *psm3*<sup>RR</sup>) mutants showed an elevated rate of minichromosome loss (TABLE 2) and FISH analysis on metaphase arrested cells revealed an elevated frequency of premature sister chromatid separation in the non acetylatable mutant (FIG. 4B). The severity of the cohesion defect was less severe than in cells bearing the thermosensitive *rad21-K1* mutation (54) that display cohesion defects along the entire length of chromosomes or cells lacking Swi6, which lose cohesion at centromeres (11). Remarkably, all the above phenotypes were fully suppressed by the deletion of the *wpl1* gene (TABLE 2 and FIG. 4B), demonstrating a strict *wpl1*-dependent phenotype. This clearly rules out any unspecific compromised cohesin function due to the amino-acid substitutions within Psm3. We conclude that Wapl generates a cohesion defect when Psm3 cannot be acetylated. The corollary being that Psm3 acetylation contributes to antagonize Wapl.

To further confirm this conclusion, we asked whether acetyl-mimicking forms of Psm3 would bypass Eso1 requirement. Mutant *psm3* alleles were created in which K105, K106 or both lysine residues were replaced by the acetyl-mimicking residue asparagine and inserted in the genome at the *psm3* locus, replacing the wild-type allele. In an otherwise wild-type background, all mutants were viable and did not show any apparent growth defect (FIG. 4F). Both *psm3*<sup>K105N</sup> and *psm3*<sup>K106N</sup> were able to rescue the deletion of *eso1*, albeit poorly (FIG. 4G). By contrast, the double substitution allele *psm3*<sup>K105NK106N</sup> (thereafter named *psm3*<sup>NN</sup>) had a stronger suppressor effect as judged by near wild-type sized colonies indicating that the two mutations had cumulative effects. Consistently, the *Ch16* minichromosome could not be maintained in *eso1Δ psm3*<sup>K105N</sup> and *eso1Δ psm3*<sup>K106N</sup> cells but could be propagated in an *eso1Δ psm3*<sup>NN</sup> background (TABLE 2). The suppression was yet incomplete since *Ch16* loss rate was increased ~17 fold as compared to wild-type. Remarkably, the deletion of *wpl1* in this genetic context reduced *Ch16* loss rate to wild-type level, indicating that residual defects in *eso1Δ psm3*<sup>NN</sup> are strictly *wpl1*-dependent. This further confirms that Psm3 acetylation contributes to antagonizing Wapl and is consistent with the conclusion that only a fraction of Eso1 function is exerted through the acetylation of Psm3.

### **Preventing Psm3 acetylation reduces the amount of cohesin bound in the stable mode**

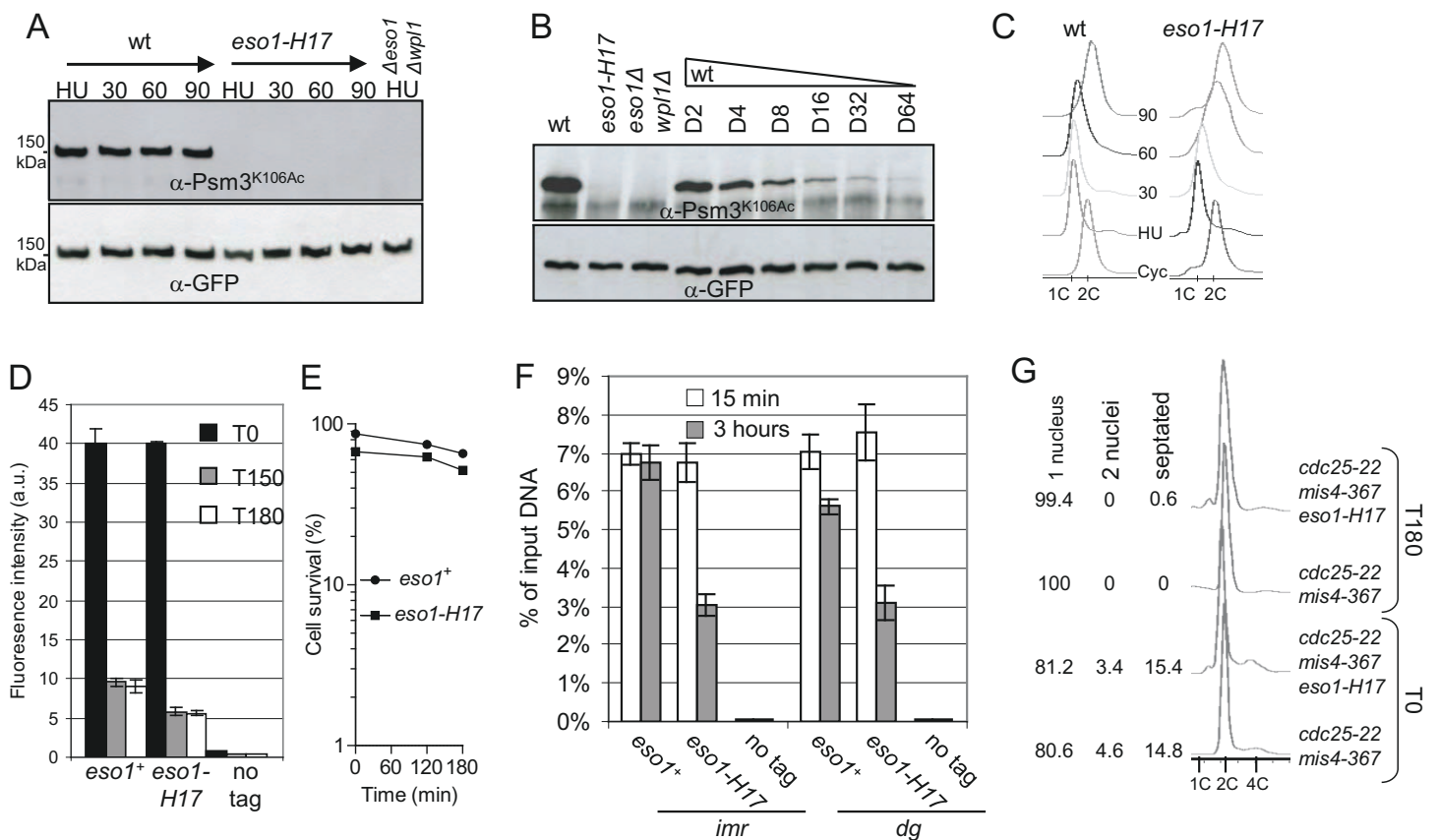
The non-acetylatable *psm3* mutant is viable whereas *eso1Δ* is lethal, strongly suggesting that Eso1 function does not transit exclusively through Psm3 acetylation. However, *psm3*<sup>RR</sup> showed an elevated rate of chromosome loss and a cohesion defect was detectable in metaphase cells, all





**FIG. 5. Effect of non acetyltable Psm3 on stable cohesin binding to chromosomes and long term cohesion.**

(A-C) Strains were cultured and processed for nuclear spreading and ChiP as in FIG. 1. (A) Kinetics of Rad21 dissociation from chromatin. Chromatin bound Rad21-PK was quantified from nuclear spreads. Error bar = SEM from two independent experiments. (B) Cell survival during the course of the experiment (C) Cell cycle staging of cells used for the ChiP assay (D) before and after the temperature shift (D) ChiP assay showing the amount of Rad21 bound to peri-centromeric regions (*imr*) just after (15min) and 180 min after the temperature shift. Rad21 enrichment was calculated from duplicate samples. Error bar=SEM. (E-G) Non acetyltable Psm3 does not affect long term cohesion. (E) Cells were grown to saturation in EMM2-YE medium to arrest them in G2. Samples were taken at the indicated time points to determine cell survival (F). After 6 days, cells were transferred into fresh medium and chromosome segregation was observed during the first division after re-entry into the cell cycle (G). Anaphase cells (spindle length > 5 $\mu$ m) were scored for lagging chromatin (red) and/or cen2-GFP (white) mis-segregation. Bar = 5 $\mu$ m.



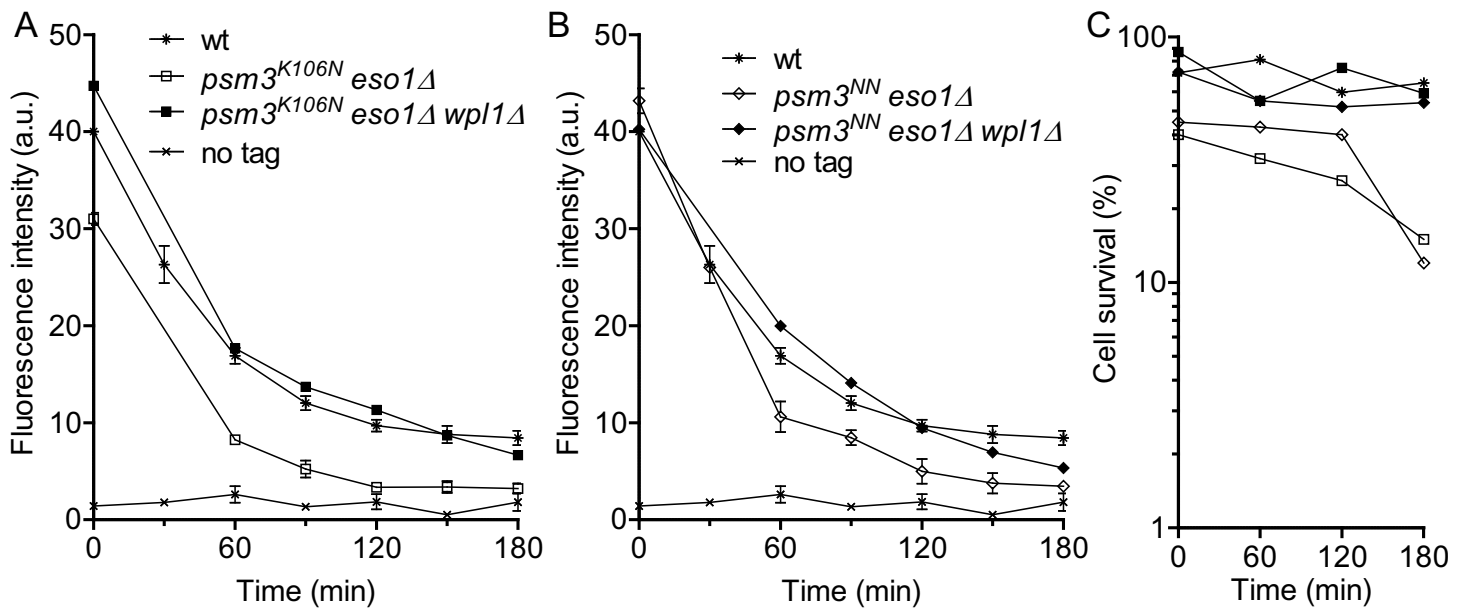
**FIG. 6. Psm3<sup>K106Ac</sup> is not detectable in the *eso1-H17* mutant strain at the permissive temperature**

(A) Cells were cultured at 25°C, arrested in early S phase by adding 12mM hydroxyurea (HU) and released into the cell cycle. Samples were taken at indicated time points (min). Psm3-GFP was immunoprecipitated from total protein extracts and probed with anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> antibodies. Equal amounts of Psm3-GFP were verified by probing with anti-GFP antibodies. (B) Psm3-GFP immunopurified from wt was serially diluted with Psm3-GFP immunopurified from *eso1* $\Delta$  *wpl1* $\Delta$  cells and probed with anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> and anti-GFP antibodies as in (A). (C) DNA content analysis before and after release from the HU arrest. (D-G) The stable cohesin fraction is reduced in the *eso1-H17* mutant at the permissive temperature. The strains contain the *cdc25-22* and *mis4-367* alleles and were cultured and processed for nuclear spreading and ChiP as in FIG. 1. (D) Chromatin bound Rad21-PK was quantified from nuclear spreads before (T0) and after the temperature shift (T150 and T180 min). Error bar = SEM from duplicate samples. (E) Cell survival during the course of the experiment. (F) ChiP assay showing the amount of Rad21 bound to pericentromeric regions (*imr* and *dg*) just after (15min) and 3 hours after the temperature shift. Rad21 enrichment was calculated from duplicate samples. Error bar=SEM. (G) FACS and cell cycle staging of cells before and after the shift to 36.5°C.

of which suppressed by the deletion of *wpl1* showing that Psm3 acetylation contributes to antagonizing Wapl. We therefore asked whether Psm3 acetylation would contribute to the creation of the stable cohesin fraction. FIG. 5A shows the kinetics of Rad21 dissociation from G2 chromosomes in a *psm3<sup>RR</sup>* mutant background. For all time points, the amount of chromatin bound Rad21 was reduced when compared to the *psm3<sup>+</sup>* control but a plateau was still observed for late time points. Consistently, cell viability remained high throughout the experiment (FIG. 5B) indicating that cohesin that remained bound to chromosomes at late time points provided functional cohesion, even though the stable cohesin fraction was quantitatively reduced. This point was further investigated by looking at Rad21 binding within peri-centromeric domains using chromatin immunoprecipitation (FIG. 5D). Indeed, the amount of Rad21 associated with peri-centromeric heterochromatin was reduced in *psm3<sup>RR</sup>* cells as compared to wild-type. The reduction was already apparent for the early time-point (15min) and was not exacerbated by the 3 hours time of G2 arrest. This shows that non-acetylated Psm3 generates a defect that lowers the amount of the stable cohesin fraction but not its stability. Remarkably, this phenotype is strictly dependent on the presence of Wapl since deletion of *wpl1* restored the amount of stably bound Rad21 to wild-type levels (FIG. 5D). The acetyl-mimicking allele *psm3<sup>NN</sup>* was included in the experiment. Most Rad21 remained bound to the peri-centromere in this genetic background. Unlike cohesin with Psm3<sup>RR</sup>, the amount and stability of bound-Rad21 was merely affected by the presence of Wapl in the *psm3<sup>NN</sup>* mutant, suggesting that Psm3 acetylation renders cohesin less sensitive to Wapl.

To further investigate whether the non-acetylatable *psm3* mutant was proficient for sister-chromatid cohesion, we asked whether cohesion would be maintained upon an extensive period of G2 arrest. To do so, cells were grown to saturation in EMM2-YE medium which causes cells to arrest in the G2 phase of the cell cycle (52). Long term cohesion between sister chromatids was assessed by measuring cell survival and the observation of cells undergoing their first mitosis upon re-entry into the cell cycle. The viability of cells expressing non-acetylatable Psm3 remained high upon re-entry into the cell cycle (FIG. 5F) and aberrant anaphase cells were scarce (FIG. 5G). By contrast, the deletion of *pds5* which is required for long term cohesion caused massive chromosome segregation defects and a sharp decline in cell survival, as described previously (53).

During the course of this study, we discovered that the *eso1-H17* thermosensitive mutant was strongly deficient for Psm3 acetylation, even at the permissive temperature. When *eso1-H17* cells were synchronized in early S phase at 25°C and then allowed to progress through S phase



**FIG. 7. Acetyl-mimicking forms of Psm3 by themselves are not sufficient for sustained Rad21 binding to chromatin.**

All strains contain the *cdc25-22* and *mis4-367* mutations and were cultured and processed as in FIG. 1. (A-B) Kinetics of Rad21 dissociation from chromatin. Chromatin bound Rad21 was measured from nuclear spreads. Error bars = SEM from at least two independent experiments except for the *wpl1Δ* controls that were done once. The data are presented into two separate graphs for clarity. (C) Cell survival was determined at the indicated time-points.

and G2 at 25°C, purified Psm3-GFP did not react with the anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> antibody (FIG. 6A).

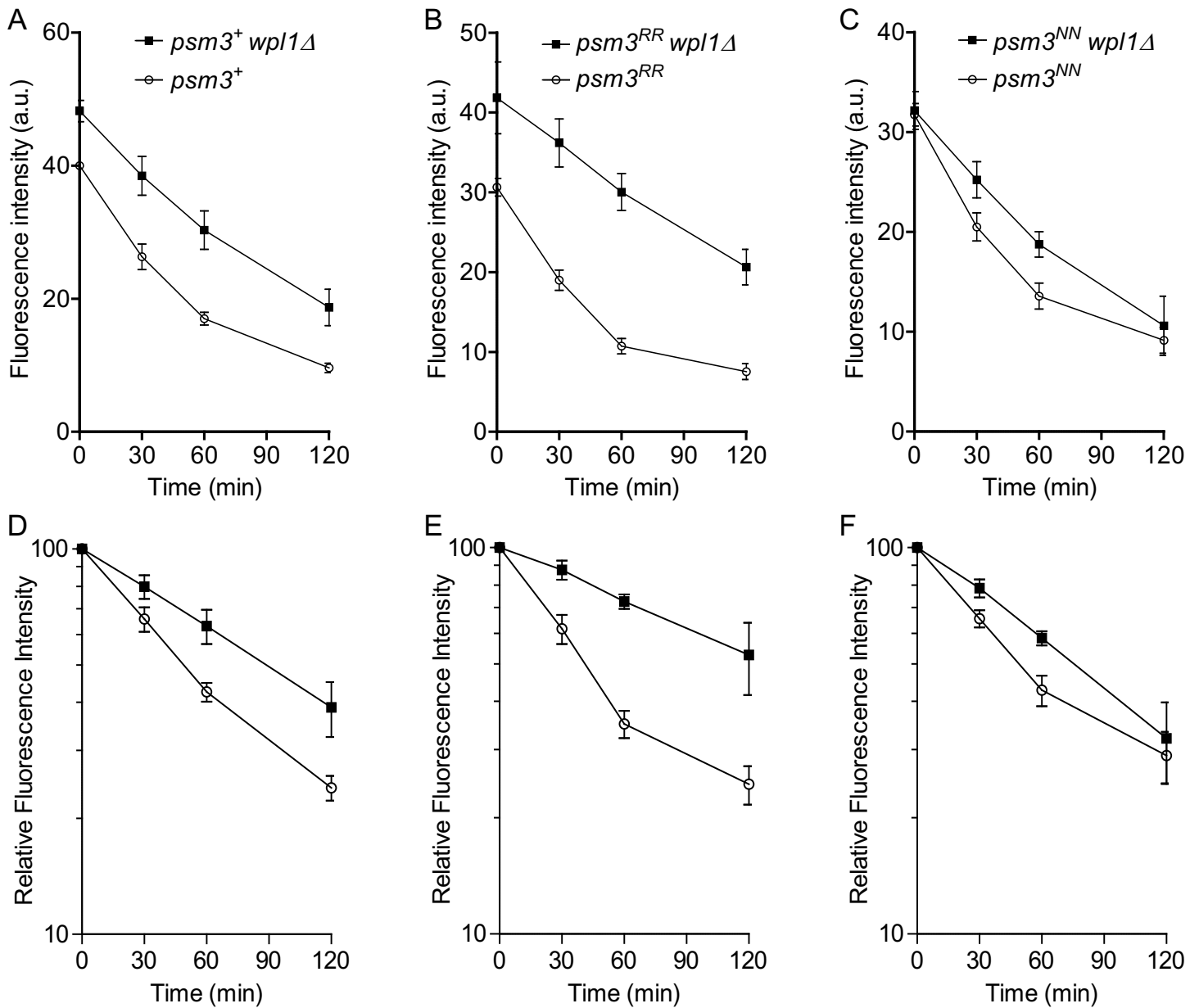
To estimate the detection level of the antibody, Psm3-GFP purified from wild-type cells was serially diluted with non acetylated Psm3-GFP purified from *eso1Δ wpl1Δ* cells. As shown in FIG. 6B the anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> antibody still reacted with wild-type Psm3 when diluted 64 fold. We conclude that Psm3 acetylation is not detectable in the *eso1-H17* mutant even at the permissive temperature with a reduction in acetylated Psm3 of a least 64-fold the level found in wild-type cells.

Next we asked whether the stable cohesin fraction was affected in this situation. Cells bearing *cdc25-22 mis4-367 eso1-H17* cells were cultured at 25°C. These are mainly in the G2 phase of the cell cycle (FIG. 6C) so that DNA replication and cohesion establishment were made at the permissive temperature for *eso1-H17*. The cells were then shifted to 36.5°C to inactivate Cdc25 and Mis4, as to keep cells in the G2 phase and probe the stability of chromatin bound cohesin. The amount of Rad21 bound to chromatin was monitored by nuclear spreads and ChiP at pericentromeric domains. FIG. 6D and 6F show that the stable cohesin fraction is made in *eso1-H17* cells but the amount is reduced ~2 fold. Since Psm3 acetylation is reduced at least 64-fold, the amount of cohesin bound in the stable mode is not quantitatively correlated with the level of Psm3 acetylation.

Altogether, the data gathered with the non acetyltable *psm3* mutant and wild-type *psm3* in an *eso1-H17* background converge to the conclusion that the acetylation of Psm3 contributes to, but is not essential for stable cohesin binding to post-replicative chromosomes.

### **Acetyl-mimicking forms of Psm3 cannot bypass Eso1 function to generate the stable cohesin fraction**

Acetyl-mimicking alleles of *psm3* allow cell survival in the absence of Eso1, suggesting that cohesin binding to post-replicative chromatin must be stabilized to some extent. To address this question, we looked at cohesin binding stability in a genetic context in which *eso1Δ* cells are kept alive by the sole presence of an acetyl-mimicking form, Psm3<sup>NN</sup> or Psm3<sup>K106N</sup> (the experiment was not attempted for Psm3<sup>K105N</sup> because the *eso1Δ psm3<sup>K105N</sup>* grew very poorly). As before, cycling cells were shifted to 36.5°C to inactivate Mis4 as to prevent further cohesin deposition and cells were prevented to enter mitosis by the *cdc25-22* mutation. As shown in FIG. 7, chromatin bound Rad21 as well as cell viability dropped steadily with time. It is of note that this phenotype was more pronounced in *psm3<sup>K106N</sup>* than in *psm3<sup>NN</sup>*, correlating their efficiency of *eso1Δ* suppression. This indicates that Psm3<sup>NN</sup> does provide some level of cohesin stabilization.



**FIG. 8. The acetylation status of Psm3 modulates Wapl-dependent cohesin removal from chromatin.**

All strains contain the *cdc25-22* and *mis4-367* mutations and were cultured and processed as in FIG. 1. (A-C) Chromatin bound Rad21 was measured from nuclear spreads. (D-F) Kinetics of Rad21 dissociation from chromatin. Each data set (A-C) was normalized respective to its time 0 value (arbitrary set at 100). Error bar = SEM from 3 to 5 independent experiments.

This might be sufficient to allow cell survival when they are actively cycling but not upon prolonged G2 arrest. As expected, deletion of *wpl1* in this genetic background improved both sustained Rad21 binding to chromatin and cell survival. This is consistent with the notion that Psm3 acetylation contributes to, but is not the sole molecular event required to generate the stable mode of cohesin interaction with chromosomes.

### **Psm3 acetylation renders cohesin less sensitive to Wapl-dependent removal.**

An acetyl-mimicking form of Psm3 can partially bypass Eso1 requirement, suggesting that Psm3 acetylation contributes to antagonize Wapl. To ask whether the status of Psm3 acetylation would modify cohesin susceptibility to Wapl, we compared the kinetics of Rad21 decay in cells bearing *psm3<sup>RR</sup>* or *psm3<sup>NN</sup>* in the presence or absence of Wapl. As before, the amount of chromatin bound Rad21 was measured in post-replicative (G2) cells after inactivation of the cohesin loader. We focussed on the early time-points of the experiment to assess the kinetics at which the labile cohesin fraction is removed from chromosomes (FIG. 8). In cells expressing *psm3<sup>+</sup>* (FIG. 8D), the steady state amount of chromatin-bound Rad21 at time 0 was increased by the deletion of *wpl1*, and the rate of Rad21 dissociation from chromatin was slightly slower, consistent with Wapl promoting cohesin removal. In cells expressing the non acetyltable allele *psm3<sup>RR</sup>*, the kinetics of Rad21 dissociation was more sensitive to Wapl (FIG. 8E). By contrast, in cells expressing the acetyl-mimicking mutant form of Psm3, the deletion of *wpl1* had a much reduced effect (FIG. 8F).

The acetylation status of Psm3 may therefore contribute to regulate the labile cohesin fraction by modulating cohesin susceptibility to Wapl. Non acetylated Psm3 renders cohesin more sensitive to Wapl. Conversely, the acetylated form renders cohesin less sensitive to Wapl.

Altogether, we propose that Eso1-mediated acetylation of Psm3 is a molecular event that contributes to antagonize Wapl. This alone can improve the stability of cohesin association with chromatin but does not provide a full level of cohesin stabilization. We suggest that long term cohesion between sister-chromatids requires another Eso1-molecular event to achieve the stable mode of cohesin binding to post-replicative chromosomes.

## ***DISCUSSION***

### **Different modes of cohesin binding along post-replicative chromosomes**

Live imaging in mammalian cells revealed that cohesin complexes cycle on and off G1 chromosomes but a sub-population of cohesin is stably bound to chromatin after DNA replication (22). Similarly in fission yeast, inactivation of the cohesin loader in G1 cells lead to a





complete removal of cohesin from chromatin. By contrast, a fraction of cohesin remained chromatin bound when the experiment was made with post-replicative (G2) cells (12). In the present study we further characterized the behaviour of cohesin in post-replicative cells. The population of cohesin that remains bound to chromosomes after shutting off cohesin loading appears very stable since the amount of chromatin bound cohesin did not decrease when the experiment was extended up to 5 hours (FIG. 2E). This is reminiscent of the stable mode of cohesin binding observed in mammalian cells after S phase (22). The change in cohesin dynamics correlates with S phase progression in mammalian cells (22), suggesting it is produced by the replication coupled mechanism leading to sister-chromatid cohesion. Accordingly, the stable cohesin fraction provides functional cohesion in fission yeast and it is altered when the function of the cohesion establishment factor Eso1 is compromised ( (12) and FIG. 6D, F).

Examination of cohesin binding along G2 chromosomes revealed that cohesin complexes bound in the stable mode are not evenly distributed. Most sites appear to contain a mixture of the two cohesin sub-populations. The labile fraction may represent cohesin complexes that were excluded from the stabilization reaction during S phase, or cohesin that became loaded onto chromosomes after this process. The rDNA gene cluster is a major site of cohesin binding. A rough estimate from chromosome spreads indicates that cohesin bound to the nucleolus in G2 cells represents 40-50% of the total amount of chromatin bound cohesin (data not shown). Most (~75%, FIG. 1H) cohesin is bound in the labile mode at that site. This suggests that the nucleolus may act as a reservoir of cohesin that may be important in the event of a DNA DSB or in the regulation of gene expression (18).

The major foci of stably-bound cohesin co-localize with the heterochromatin protein Swi6 and deletion of *swi6* reduces the stable cohesin fraction to 40% of the wild-type amount (FIG. 1F-G). Swi6 domains are therefore major sites where cohesin is bound in the stable mode. Why the stable mode of cohesin binding is favoured at those sites is unknown. Swi6 interacts with the cohesin subunit Psc3 and it was proposed that this may create a local enrichment in cohesin (41). However, a high amount of cohesin does not necessarily imply a stable binding mode for cohesin as exemplified by the rDNA gene cluster. This raises the possibility that chromatin features may mark chromosomal domains as preferential sites for cohesin stabilization during DNA replication.

**Eso1 function is dispensable for stable cohesin binding to chromosomes and sister-chromatid cohesion when the *wpl1* gene is deleted**



Eso1 function is essential in an otherwise wild-type background but dispensable when *wpl1* is deleted. A minichromosome loss assay indicated that *eso1Δ wpl1Δ* segregate their chromosomes with high fidelity (TABLE 2) and sister-chromatid cohesion appears unaffected as assayed by FISH on metaphase cells (FIG. 2B), a sensitive assay as cohesion is challenged by spindle forces exerted on sister-centromeres. The labile cohesin fraction is still present and its amount appeared slightly increased. The stable cohesin fraction is made and is similar in size and distribution along chromosomes to that observed in wild-type cells (FIG. 2C, F). The fundamental processes by which cohesin becomes stabilized and the creation of cohesion remain intact and are therefore not dependent on the Eso1-Wapl module. However, Eso1 is required for both processes in *wpl1*<sup>+</sup> cells. Hence, the sole but essential function of Eso1 in cohesion establishment is to counteract Wapl.

### **Psm3 acetylation contributes to antagonize Wapl**

In budding yeast and mammals, Smc3 is acetylated on two conserved lysine residues (8, 44, 58, 62). We therefore asked whether Eso1 would antagonize Wapl through this pathway. A non-acetylatable mutant form does not support cell viability in budding yeast (8, 44, 58, 62). By contrast, the very same amino-acid substitutions in fission yeast Psm3 are without consequences at the gross level. The strain is viable and grows as wild-type. The viability of the non-acetylatable mutant is strictly dependent on Eso1, demonstrating that Eso1 exerts an essential function even when the two conserved lysine residues are replaced by arginine (FIG. 4E). This other function for Eso1 is currently unknown.

Careful examination of the non-acetylatable *psm3* mutant revealed an elevated rate of minichromosome loss (TABLE 2), the stable cohesin fraction is made but reduced in size (FIG. 5A, D) and a cohesion defect could be detected in metaphase cells (FIG. 4B). All the phenotypes are suppressed by the deletion of *wpl1* demonstrating that this is the presence of Wapl – and not the amino acid substitutions *per se* – that is responsible for the observed phenotypes. This strongly argues that in wild-type, Psm3 acetylation contributes to antagonize Wapl. By looking at the kinetics of Rad21 dissociation from chromatin (FIG. 8), we provide evidence that an acetyl-mimicking form of Psm3 renders the labile cohesin fraction less sensitive to Wapl-dependent removal. Conversely, a mutant mimicking the non acetylated state has the opposite effect. These data are consistent with the notion that Psm3 acetylation does provide a sheltering effect from Wapl, thereby providing a more stable mode of cohesin interaction with chromatin.



However, Psm3 acetylation by itself might not be sufficient to create a stable cohesin fraction. In an *eso1<sup>+</sup> psm3<sup>NN</sup>* background, the two cohesin subpopulations are observed. The labile fraction is mostly insensitive to Wapl but still dissociate with time (FIG. 8F). By contrast, the same nuclei contain a stable cohesin population (FIG. 5D). Since both cohesin sub-populations are made of acetyl-mimic Psm3, another event must make the difference. We suggest the second event is Eso1-dependent since in *eso1Δ psm3<sup>NN</sup>* cells, the stable cohesin fraction is not observed (FIG. 7B). The phenotype is alleviated by the deletion of *wpl1*, further suggesting that the second event contributes to antagonize Wapl.

### **What is the role of Psm3 acetylation?**

Three recent studies in budding yeast reported that Smc3 is deacetylated by Hos1 following cohesin release from chromatin at anaphase (7, 13, 61). Therefore Smc3 is kept acetylated from the time of DNA replication and until cohesin cleavage, suggesting that the acetylated state may be required for maintaining cohesion. In *S. pombe*, we show here that a non-acetyltable Psm3 mutant is proficient for long term cohesion. Likewise, the *eso1-H17* mutant is also able to cope with a prolonged period of G2 arrest (53) although we show here that Psm3 acetylation is below the detection level. These observations strongly argue that Psm3 acetylation may not be required for maintaining sister-chromatid cohesion. What is the role of Psm3 acetylation then? In budding yeast, the amount of Pds5 bound to cohesin was reduced in cells expressing an acetyl-mimicking form of Smc3 (51). Similarly in human cells, SMC3 acetylation seems to reduce WAPL and PDS5A binding to cohesin (55). These observations suggest that acetylated Smc3 may stimulate a remodelling of cohesin at the time of cohesion establishment. Non acetylated SMC3 slows down replication fork progression in human cells and generate cohesion defects (55). Preventing SMC3 acetylation may slower cohesin remodelling and the establishment reaction, leading to reduced replication fork velocity and occasional failure to connect sister-chromatids within the replisome. The phenotypes of the non acetyltable *psm3* mutant reported here are consistent with this interpretation. A facilitating, rather than an obligatory role may also explain why preventing Smc3 acetylation may have different consequences depending on the organism.

To summarize, we suggest that the main function of Eso1 in cohesion establishment is counteracting Wapl. Psm3 acetylation contributes to antagonize Wapl and this may facilitate the cohesion establishment reaction. Meanwhile, a second Eso1-dependent event is required to fully antagonize Wapl as to promote sustained cohesin binding to chromosomes and long term cohesion.



## ***Materials and methods***

**Strains, media, genetics and cytological techniques.** The strains used in this study are listed in TABLE 1. The *psm3* alleles were created by site directed mutagenesis and replacement of the wild-type allele by homologous recombination in a diploid strain using a PCR based gene targeting strategy (6). Genomic DNA from the final haploid mutant strains was PCR amplified and sequenced to confirm the presence of the desired mutations. The *psm3-GFP* strains were created by PCR based gene targeting using pFA6a-GFP(S65T)-natMX6 as template (45). Media and genetics techniques were as described (38). Synthetic medium EMM2 was used unless otherwise stated. Synthetic medium lacking a nitrogen source (EMM2-N) was used to arrest cells in G1 by nitrogen starvation. Complete YPD medium was used to release cells into the cell cycle after nitrogen starvation induced G1 arrest. Cell cycle progression was followed by flow cytometry after propidium iodine staining of ethanol-fixed cells (38). Growth to saturation in EMM2-YE medium was used to arrest cells in the G2 phase of the cell cycle (52). The *Ch16* minichromosome loss assay was done by the method of the half-sectoring colonies as described (1). Cell fixation and immunofluorescence were as described (10). FISH was done using cosmid c1228 as a centromere 2 linked probe (36). Cells bearing the *cut9-665* mutation were grown to early log phase in YES medium at 25°C and shifted to 3.5 hours at 36.5°C to arrested cells at metaphase. Cells were fixed and processed for anti-tubulin immunofluorescence and FISH as described (11). Spindle length and distance between FISH signals were measured using the Metamorph software.

**Measurement of Rad21 decay on chromatin.** Cells bearing *rad21-9PK* (47) and the thermosensitive *mis4-367* and *cdc25-22* alleles were grown to mid-log phase in EMM2 medium at 25°C and then shifted to 36.5°C, a restrictive temperature for *mis4-367* and *cdc25-22*. In a typical time-course experiment, cells were collected at time 0 and 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes after the temperature shift. Nuclear spreading, indirect immunofluorescence and signal quantification were done as described (12). All experiments included the *mis4-367 cdc25-22 rad21-PK* reference strain. The raw data were remarkably similar between independent experiments so that each data set was normalized relative to the reference strain as follows. The time 0 value from the reference strain was set at 40 (which was the mean value of all experiments), and all the data were normalized relative to this value. The data presented are the mean +/- SEM of at least two independent experiments.

**Antibodies, protein extracts, immunoprecipitation, Western blotting and chromatin immunoprecipitation.** Anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> antibodies were raised by Eurogentec. Rabbits were

TABLE 1. Strain list

Strain number	Genotype
2	<i>h</i> <sup>-</sup>
405	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>cdc25-22</i>
596	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4</i>
807	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>leu1 ura4 ade6-210 his1-102 cut9-665 swi6::his1</i> <sup>+</sup>
1176	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>leu1 ura4 ade6-210 his1-102 cut9-665 rad21-K1<sup>ts</sup>-ura4</i> <sup>+</sup>
3203	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mis4-367 cdc25-22</i>
3333	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan</i> <sup>R</sup>
3355	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mis4-367 cdc25-22 wpl1::kan</i> <sup>R</sup> <i>rad21-9PK-kan</i> <sup>R</sup>
3448	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>cdc25-22 rad21-9PK-kan</i> <sup>R</sup>
3459	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>mis4-367cdc25-22 eso1-H17 rad21-9PK-kan</i> <sup>R</sup>
3469	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4 wpl1::kan</i> <sup>R</sup> <i>eso1::ura4</i> <sup>+</sup> <i>psm3-GFP-ura4</i> <sup>+</sup>
3505	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 wpl1::kan</i> <sup>R</sup> <i>psm3-GFP-ura4</i> <sup>+</sup>
3678	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4 psm3-GFP-nat</i> <sup>R</sup>
3726	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 mis4-367 wpl1::hyg</i> <sup>R</sup> <i>eso1::ura4</i> <sup>+</sup> <i>cdc25-22 rad21-9PK-kan</i> <sup>R</sup>
3789	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>rad21-9PK-kan</i> <sup>R</sup>
3808	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 wpl1::kan</i> <sup>R</sup> <i>eso1::ura4</i> <sup>+</sup>
3820	<i>h</i> <sup>+</sup>
3912	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4 wpl1::kan</i> <sup>R</sup> <i>eso1::ura4</i> <sup>+</sup> <i>psm3-GFP-nat</i> <sup>R</sup>
3913	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 wpl1::kan</i> <sup>R</sup> <i>eso1::ura4</i> <sup>+</sup> <i>psm3-GFP-nat</i> <sup>R</sup>
3916	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4 psm3</i> <sup>K105R</sup>
3918	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4 psm3</i> <sup>K105R</sup> <i>wpl1::kan</i> <sup>R</sup>
3920	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4 smc3</i> <sup>K106N</sup>
3921	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 smc3</i> <sup>K106N</sup> <i>wpl1::kan</i> <sup>R</sup>
3925	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ura4 eso1-H17 psm3-GFP-nat</i> <sup>R</sup>
3930	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 smc3</i> <sup>K105N</sup> <i>wpl1::kan</i> <sup>R</sup>
3931	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 psm3</i> <sup>K106R</sup> <i>wpl1::kan</i> <sup>R</sup>
3932	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 psm3</i> <sup>K106R</sup>
3940	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 wpl1::kan</i> <sup>R</sup> <i>eso1::ura4</i> <sup>+</sup> <i>psm3</i> <sup>K106N</sup>
3942	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ura4 eso1::ura4</i> <sup>+</sup> <i>psm3</i> <sup>K106N</sup>



immunized with the KLH coupled peptide CRTIGLKK<sup>106Ac</sup>DEYSL. Sera were immunodepleted by affinity against the non-acetylated form of the peptide and antibodies were then affinity purified against the acetylated peptide. Anti-Psm3 antibodies were made by Proteogenics. Rabbits were immunized with a recombinant peptide corresponding to the N terminal 630 residues. Sera were affinity purified against the recombinant peptide. Anti-PK antibodies (monoclonal mouse anti V5 tag, AbD serotec) were used for nuclear spreads (1/500).

Total protein extracts were prepared from cycling log phase cells. Cells ( $5 \times 10^8$ ) were collected, rinsed in ice-cold PBS 1mM PMSF and frozen on dry ice. Lysis was performed in 125 $\mu$ l ice-cold lysis buffer (50mM Hepes pH 7.6; 100mM KCl; 2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.25% Triton X-100; 1mM DTT; 0.1% SDS; 10mM Sodium butyrate; Glycerol 10%) with inhibitors (Protease inhibitor cocktail Sigma P8215, 1mM PMSF, 1mM Na vanadate, 20mM  $\beta$ -glycerophosphate) using a glass bead beater (Cryoprep). The volume was increased by the addition of 275 $\mu$ l of ice-cold lysis buffer with protease inhibitors and the extracts clarified by two successive rounds of centrifugation at 18000 rcf at 4°C.

Psm3-GFP was immuno-purified by adding to the lysate 3  $\mu$ g of polyclonal anti-GFP antibodies (A11122, Molecular Probes) and 50  $\mu$ l Protein A coated magnetic beads (Miltenyi Biotec) pre-washed in lysis buffer. After one hour on ice, immune complexes were recovered on a magnetic column, washed three times with lysis buffer and eluted with Laemmli buffer.

Western blotting was done according to standard procedures using rabbit anti-Psm3<sup>K106Ac</sup> (1/1000), monoclonal anti-GFP (Roche 1/1000), anti-Psm3 (1/5000).

Chromatin immunoprecipitation was done essentially as described (12) with the following modifications. Cells were fixed with formaldehyde (2.5% final) for 10 min at 36.5°C and 15 min at room temperature after which time samples were cooled on ice for 5 min. Cells were washed four times with ice cold PBS. Cell pellets were frozen on dry ice and stored at -80°C. Chromatin was prepared from  $2 \times 10^8$  cells and fragmented using a Bioruptor sonicator (Diagenode). Immunoprecipitation was carried out in IP buffer (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris/Cl pH 8.1) using 3.5  $\mu$ g anti-PK antibodies (monoclonal mouse anti V5 tag, AbD serotec). Immune complexes were collected using ChIP-Adembeads (Ademtech, # 04240), washed and recovered according to manufacturer instructions. Quantification was performed by real time PCR in the presence of SYBR Green using a Stratagene Mx3000P cycler. PCR primers are as follows.

*imr*: TTTTGGACAGAATGGATGGA and GCGGAGTAAGGCTAATCACG.

*dgl*: ACGGCATCGCTTGTACTTTT and TGAGGTTTCATGATGGGTTCA.

3972 *h<sup>-</sup> ura4 smc3<sup>K105N</sup>*  
3975 *h<sup>+</sup> ura4 psm3<sup>K105RK106R</sup>*  
3993 *h<sup>+</sup> ura4 wpl1::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup>*  
3995 *h<sup>+</sup> ura4 wpl::kanR*  
3996 *h<sup>-</sup> ura4 wpl1::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105N</sup>*  
3999 *h<sup>-</sup> ura4 eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105NK106N</sup>*  
4000 *h<sup>-</sup> ura4 wpl1::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105NK106N</sup>*  
4001 *h<sup>-</sup> ura4 smc3<sup>K105NK106N</sup>*  
4002 *h<sup>-</sup> ura4 smc3<sup>K105NK106N</sup> wpl::kanR*  
4004 *h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K105RK106R</sup>*  
4005 *h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K105RK106R</sup> wpl1::kan<sup>R</sup>*  
4027 *h<sup>-</sup> ura4 eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105N</sup>*  
4177 *h<sup>+</sup> mis4-367 psm3<sup>K105RK106R</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4179 *h<sup>-</sup> mis4-367 psm3<sup>K105RK106R</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup> wpl1::hyg<sup>R</sup>*  
4187 *h<sup>+</sup> mis4-367 psm3<sup>K105NK106N</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4190 *h<sup>+</sup> mis4-367 wpl1::hyg<sup>R</sup> psm3<sup>K105NK106N</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4192 *h<sup>-</sup> mis4-367 cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4193 *h<sup>-</sup> mis4-367 wpl1::hyg<sup>R</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4255 *h<sup>-</sup> psm3-GFP-nat<sup>R</sup> cdc10-129*  
4394 *h<sup>90</sup> leu1-32 ura4 psm3<sup>K105RK106R</sup> cen2-LacO his7<sup>+</sup>-LacI-GFP*  
4398 *h<sup>90</sup> leu1-32 ura4 cen2-LacO his7<sup>+</sup>-LacI-GFP*  
4433 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 psm3<sup>K105RK106R</sup> wpl1::kan<sup>R</sup> Ch16(ade6-216)*  
4437 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 psm3<sup>K106R</sup> Ch16(ade6-216)*  
4439 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 psm3<sup>K106R</sup> wpl1::kan<sup>R</sup> Ch16(ade6-216)*  
4443 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 wpl1::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> Ch16(ade6-216)*  
4445 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 Ch16(ade6-216)*  
4447 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 wpl1::kan<sup>R</sup> Ch16(ade6-216)*  
4452 *h<sup>90</sup> leu1-32 ura4 psm3<sup>K105RK106R</sup> cen2-LacO his7<sup>+</sup>-LacI-GFP wpl1::hyg<sup>R</sup>*  
4456 *h<sup>90</sup> leu1-32 ura4 cen2-LacO his7<sup>+</sup>-LacI-GFP wpl1::hyg<sup>R</sup>*  
4457 *h<sup>90</sup> leu1-32 ura4 cen2-LacO his7<sup>+</sup>-LacI-GFP pds5::nat<sup>R</sup>*  
4466 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 psm3<sup>K105R</sup> wpl1::kan<sup>R</sup> Ch16(ade6-216)*  
4468 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 psm3<sup>K105R</sup> Ch16(ade6-216)*  
4470 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 psm3<sup>K105RK106R</sup> Ch16(ade6-216)*

---

CAR1806: AGCAAAAGCACCGACTTCAT and TTCAAAGCTGCTCTCCCATT.  
CAR1979: GGCAGGCATGTCTTGGTTAT and TTCCTGCTTACCACGGTTTC.  
NTS1: TCCACCTTCCCATAACATGC and AGCTGAAGCCAGAGTGC.  
NTS2: TCTCTCATTTTCCATTGAACCA and TTCAGGGTCGGTAGAGTCAGA.  
NTS3: CTCTCAATCCATCCATCAAAC and CCAAATGTGGAAAATGGACA.  
28S-1: ACGGACCAAGGAGTCTAGCA and GTTCCCACCTGCATTCACTT.  
28S-2: TCCGTATGAAAGTTGCACGA and CCGTGTTGATTCCACCTTCT.  
28S-3: CGAAGCAGAATTCGGTAAGC and AACCTGTCTCACGACGGTCT.  
TEL: ATGCTTTGGCCACTGTTCT and TCAAACCGCAAAAACGATG.

### *Aknowledgments*

We thank K. Gull, H. Okayama, C. Schmidt, T. Toda, F. Uhlmann and Y. Watanabe for the generous gift of reagents and strains. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, la Région Aquitaine and grants from l'Association pour la Recherche sur le Cancer and l'Agence Nationale de la Recherche (BLAN06-2\_135754). A. F. was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

4478 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 psm3<sup>K105NK106N</sup> Ch16(ade6-216)*  
4487 *h<sup>+</sup> ura4 mis4-367 eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105NK106N</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4528 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105NK106N</sup> Ch16(ade6-216)*  
4530 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105NK106N</sup> wpl1::kan<sup>R</sup> Ch16(ade6-216)*  
4546 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 wpl1::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K106N</sup> Ch16(ade6-216)*  
4552 *h<sup>-</sup> psm3<sup>K105RK106R</sup> cut9-665*  
4553 *h<sup>-</sup> wpl1::kan<sup>R</sup> psm3<sup>K105RK106R</sup> cut9-665*  
4590 *h<sup>-</sup> leu1-32 ura4 wpl1::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> cut9-665*  
4592 *h<sup>-</sup> leu1-32 ura4 wpl1::kan<sup>R</sup> cut9-665*  
4594 *h<sup>-</sup> leu1-32 ura4 cut9-665*  
4750 *h<sup>-</sup> ura4 mis4-367 wpl1::hyg<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K106N</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4753 *h<sup>-</sup> ura4 mis4-367 wpl1::hyg<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105NK106N</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
4785 *h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K105R</sup>-GFP-nat<sup>R</sup>*  
4787 *h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K106R</sup>-GFP-nat<sup>R</sup>*  
4789 *h<sup>-</sup> ura4 psm3<sup>K105RK106R</sup>-GFP-nat<sup>R</sup>*  
4826 *h<sup>-</sup> leu1 ura4 ade6-210 wpl1::kan<sup>R</sup> eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K105N</sup> Ch16(ade6-216)*  
4977 *h<sup>-</sup> ura4 mis4-367 eso1::ura4<sup>+</sup> psm3<sup>K106N</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*  
5234 *h<sup>+</sup> ura4 mis4-367 swi6::ura4<sup>+</sup> cdc25-22 rad21-9PK-kan<sup>R</sup>*

---

---

## **REFERENCES**

1. **Allshire, R. C., E. R. Nimmo, K. Ekwall, J. P. Javerzat, and G. Cranston.** 1995. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev* **9**:218-33.
2. **Anderson, D. E., A. Losada, H. P. Erickson, and T. Hirano.** 2002. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol* **156**:419-24.
3. **Ansbach, A. B., C. Noguchi, I. W. Klanssek, M. Heidlebaugh, T. M. Nakamura, and E. Noguchi.** 2008. RFCctf18 and the Swi1-Swi3 complex function in separate and redundant pathways required for the stabilization of replication forks to facilitate sister chromatid cohesion in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **19**:595-607.
4. **Arumugam, P., S. Gruber, K. Tanaka, C. H. Haering, K. Mechtler, and K. Nasmyth.** 2003. ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol* **13**:1941-53.
5. **Arumugam, P., T. Nishino, C. H. Haering, S. Gruber, and K. Nasmyth.** 2006. Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal Winged-Helix domain of its kleisin subunit. *Curr Biol* **16**:1998-2008.
6. **Bahler, J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J. R. Pringle.** 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**:943-51.
7. **Beckouet, F., B. Hu, M. B. Roig, T. Sutani, M. Komata, P. Uluocak, V. L. Katis, K. Shirahige, and K. Nasmyth.** 2010. An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion. *Mol Cell* **39**:689-99.
8. **Ben-Shahar, T. R., S. Heeger, C. Lehane, P. East, H. Flynn, M. Skehel, and F. Uhlmann.** 2008. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* **321**:563-6.
9. **Bernard, P., J. Drogat, J. F. Maure, S. Dheur, S. Vaur, S. Genier, and J. P. Javerzat.** 2006. A screen for cohesion mutants uncovers Ssl3, the fission yeast counterpart of the cohesin loading factor Scc4. *Curr Biol* **16**:875-81.
10. **Bernard, P., K. Hardwick, and J. P. Javerzat.** 1998. Fission yeast bub1 is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. *J. Cell Biol.* **143**:1775-1787.



11. **Bernard, P., J. F. Maure, J. F. Partridge, S. Genier, J. P. Javerzat, and R. C. Allshire.** 2001. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* **294**:2539-2542.
12. **Bernard, P., C. K. Schmidt, S. Vaur, S. Dheur, J. Drogat, S. Genier, K. Ekwall, F. Uhlmann, and J. P. Javerzat.** 2008. Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes. *EMBO J* **27**:111-21.
13. **Borges, V., C. Lehane, L. Lopez-Serra, H. Flynn, M. Skehel, T. Rolef Ben-Shahar, and F. Uhlmann.** 2010. Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle. *Mol Cell* **39**:677-88.
14. **Carlson, C. R., B. Grallert, T. Stokke, and E. Boye.** 1999. Regulation of the start of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **112 ( Pt 6)**:939-46.
15. **Ciosk, R., M. Shirayama, A. Shevchenko, T. Tanaka, A. Toth, and K. Nasmyth.** 2000. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol. Cell* **5**:243-254.
16. **Dewar, H., K. Tanaka, K. Nasmyth, and T. U. Tanaka.** 2004. Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature* **428**:93-7.
17. **Ekwall, K., J. P. Javerzat, A. Lorentz, H. Schmidt, G. Cranston, and R. Allshire.** 1995. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* **269**:1429-31.
18. **Feeney, K. M., C. W. Wasson, and J. L. Parish.** 2010. Cohesin: a regulator of genome integrity and gene expression. *Biochem J* **428**:147-61.
19. **Fernius, J., and A. L. Marston.** 2009. Establishment of cohesion at the pericentromere by the Ctf19 kinetochore subcomplex and the replication fork-associated factor, Csm3. *PLoS Genet* **5**:e1000629.
20. **Furuya, K., K. Takahashi, and M. Yanagida.** 1998. Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes Dev.* **12**:3408-3418.
21. **Gandhi, R., P. J. Gillespie, and T. Hirano.** 2006. Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol* **16**:2406-17.
22. **Gerlich, D., B. Koch, F. Dupeux, J. M. Peters, and J. Ellenberg.** 2006. Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol* **16**:1571-8.





23. **Haering, C. H., A. M. Farcas, P. Arumugam, J. Metson, and K. Nasmyth.** 2008. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* **454**:297-301.
24. **Haering, C. H., J. Lowe, A. Hochwagen, and K. Nasmyth.** 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* **9**:773-88.
25. **Haering, C. H., D. Schoffnegger, T. Nishino, W. Helmhart, K. Nasmyth, and J. Lowe.** 2004. Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell* **15**:951-64.
26. **Hanna, J. S., E. S. Kroll, V. Lundblad, and F. A. Spencer.** 2001. *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* **21**:3144-58.
27. **Hauf, S., I. C. Waizenegger, and J. M. Peters.** 2001. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* **293**:1320-3.
28. **Huang, C. E., M. Milutinovich, and D. Koshland.** 2005. Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**:537-42.
29. **Kenna, M. A., and R. V. Skibbens.** 2003. Mechanical link between cohesion establishment and DNA replication: Ctf7p/Eco1p, a cohesion establishment factor, associates with three different replication factor C complexes. *Mol Cell Biol* **23**:2999-3007.
30. **Kueng, S., B. Hegemann, B. H. Peters, J. J. Lipp, A. Schleiffer, K. Mechtler, and J. M. Peters.** 2006. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* **127**:955-67.
31. **Lai, M. S., M. Seki, A. Ui, and T. Enomoto.** 2007. Rmi1, a member of the Sgs1-Top3 complex in budding yeast, contributes to sister chromatid cohesion. *EMBO Rep* **8**:685-90.
32. **Lengronne, A., Y. Katou, S. Mori, S. Yokobayashi, G. P. Kelly, T. Itoh, Y. Watanabe, K. Shirahige, and F. Uhlmann.** 2004. Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* **430**:573-8.
33. **Lengronne, A., J. McIntyre, Y. Katou, Y. Kanoh, K. P. Hopfner, K. Shirahige, and F. Uhlmann.** 2006. Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* **23**:787-99.
34. **Mayer, M. L., S. P. Gygi, R. Aebersold, and P. Hieter.** 2001. Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **7**:959-70.
35. **Miles, J., and T. Formosa.** 1992. Evidence that POB1, a *Saccharomyces cerevisiae* protein that binds to DNA polymerase alpha, acts in DNA metabolism in vivo. *Mol Cell Biol* **12**:5724-35.



36. **Mizukami, T., W. I. Chang, I. Garkavtsev, N. Kaplan, D. Lombardi, T. Matsumoto, O. Niwa, A. Kounosu, M. Yanagida, T. G. Marr, and et al.** 1993. A 13 kb resolution cosmid map of the 14 Mb fission yeast genome by nonrandom sequence-tagged site mapping. *Cell* **73**:121-32.
37. **Moldovan, G. L., B. Pfander, and S. Jentsch.** 2006. PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell* **23**:723-32.
38. **Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse.** 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**:795-823.
39. **Nasmyth, K., and C. H. Haering.** 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* **43**:525-58.
40. **Niwa, O., T. Matsumoto, Y. Chikashige, and M. Yanagida.** 1989. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere. *EMBO J.* **8**:3045-3052.
41. **Nonaka, N., T. Kitajima, S. Yokobayashi, G. Xiao, M. Yamamoto, S. I. Grewal, and Y. Watanabe.** 2002. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* **4**:89-93.
42. **Oliveira, R. A., R. S. Hamilton, A. Pauli, I. Davis, and K. Nasmyth.** 2010. Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nat Cell Biol* **12**:185-92.
43. **Petronczki, M., B. Chwalla, M. F. Siomos, S. Yokobayashi, W. Helmhart, A. M. Deutschbauer, R. W. Davis, Y. Watanabe, and K. Nasmyth.** 2004. Sister-chromatid cohesion mediated by the alternative RF-CCtf18/Dcc1/Ctf8, the helicase Chl1 and the polymerase-alpha-associated protein Ctf4 is essential for chromatid disjunction during meiosis II. *J Cell Sci* **117**:3547-59.
44. **Rowland, B. D., M. B. Roig, T. Nishino, A. Kurze, P. Uluocak, A. Mishra, F. Beckouet, P. Underwood, J. Metson, R. Imre, K. Mechtler, V. L. Katis, and K. Nasmyth.** 2009. Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell* **33**:763-74.
45. **Sato, M., S. Dhut, and T. Toda.** 2005. New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **22**:583-91.
46. **Sazer, S., and S. W. Sherwood.** 1990. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* **97 ( Pt 3)**:509-16.
47. **Schmidt, C. K., N. Brookes, and F. Uhlmann.** 2009. Conserved features of cohesin binding along fission yeast chromosomes. *Genome Biol* **10**:R52.



48. **Schmitz, J., E. Watrin, P. Lenart, K. Mechtler, and J. M. Peters.** 2007. Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. *Curr Biol* **17**:630-6.
49. **Skibbens, R. V., L. B. Corson, D. Koshland, and P. Hieter.** 1999. Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev.* **13**:307-319.
50. **Strom, L., C. Karlsson, H. B. Lindroos, S. Wedahl, Y. Katou, K. Shirahige, and C. Sjogren.** 2007. Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science* **317**:242-5.
51. **Sutani, T., T. Kawaguchi, R. Kanno, T. Itoh, and K. Shirahige.** 2009. Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr Biol* **19**:492-7.
52. **Tanaka, K., Z. Hao, M. Kai, and H. Okayama.** 2001. Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *EMBO J* **20**:5779-90.
53. **Tanaka, K., T. Yonekawa, Y. Kawasaki, M. Kai, K. Furuya, M. Iwasaki, H. Murakami, M. Yanagida, and H. Okayama.** 2000. Fission yeast Eco1p is required for establishing sister chromatid cohesion during S phase. *Mol. Cell. Biol.* **20**:3459-3469.
54. **Tatebayashi, K., J. Kato, and H. Ikeda.** 1998. Isolation of a *Schizosaccharomyces pombe* rad21ts mutant that is aberrant in chromosome segregation, microtubule function, DNA repair and sensitive to hydroxyurea: possible involvement of Rad21 in ubiquitin-mediated proteolysis. *Genetics* **148**:49-57.
55. **Terret, M. E., R. Sherwood, S. Rahman, J. Qin, and P. V. Jallepalli.** 2009. Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature* **462**:231-4.
56. **Toth, A., R. Ciosk, F. Uhlmann, M. Galova, A. Schleiffer, and K. Nasmyth.** 1999. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev.* **13**:320-333.
57. **Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth.** 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**:37-42.
58. **Unal, E., J. M. Heidinger-Pauli, W. Kim, V. Guacci, I. Onn, S. P. Gygi, and D. E. Koshland.** 2008. A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* **321**:566-9.
59. **Unal, E., J. M. Heidinger-Pauli, and D. Koshland.** 2007. DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* **317**:245-8.



---

## **Chapitre IV : Pds5 est un régulateur négatif et positif de l'association des cohésines aux chromosomes et de la cohésion.**

### ***Introduction***

Des cribles génétiques chez la levure et les champignons ont identifié plusieurs classes de facteurs de cohésion (Uhlmann, 2003). Parmi eux, Pds5/BimD/Spo76 est une protéine conservée de la levure à l'homme (Denison et al, 1993; Geck et al, 1999; van Heemst et al, 1999). La protéine Pds5 interagit physiquement avec les cohésines (Hartman et al, 2000; Panizza et al, 2000; Sumara et al, 2000; Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). Chez la levure *S. cerevisiae*, Pds5 est essentielle à la viabilité cellulaire et est requise pour le maintien de la cohésion (Panizza et al, 2000; Stead et al, 2003), ainsi qu'à la condensation des chromosomes (Hartman et al, 2000). En revanche dans la levure *S. pombe*, Pds5 n'est pas essentielle et un mutant  $\Delta pds5$  ne présente des défauts de cohésion qu'après un arrêt prolongé en phase G2 ou M (Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). Chez *Sordaria* et *Aspergillus*, Spo76/BimD est importante pour la cohésion et la condensation (van Heemst et al, 1999; van Heemst et al, 2001). Des défauts de cohésion sont également observés en méiose chez *C. elegans*, où les défauts mitotiques sont en revanche bien moins sévères (Wang et al, 2003). Il apparaît donc que la fonction et la nécessité de Pds5 diffèrent selon l'organisme considéré. Néanmoins, l'idée générale qui se dégage de ces observations est qu'en l'absence de Pds5 la cohésion est altérée.

### **A. Interaction entre Pds5, Wapl et les cohésines**

#### **1) Localisation chromosomique**

Comme le complexe cohésine, Pds5 se localise aux chromosomes dès l'entrée en phase S chez la levure *S. cerevisiae* et dès la télophase chez les vertébrés et ce jusqu'à la transition métaphase – anaphase (Hartman et al, 2000; Losada et al, 2005; Panizza et al, 2000; Sumara et al, 2000). Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, le complexe cohésine et Pds5 s'associent aux mêmes sites chromosomiques (Hartman et al, 2000; Panizza et al, 2000; Schmidt et al, 2009; Tanaka et al, 2001),

Dans tous les organismes considérés, la localisation chromosomique de Pds5 (PDS5B) est dépendante du complexe cohésine (Hartman et al, 2000; Losada et al, 2005; Panizza et al, 2000; Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). Chez *S. pombe* et dans des cellules de vertébrés, le complexe cohésine est toujours localisé aux chromosomes en l'absence de Pds5 (PDS5A et





PDS5B) (Losada et al, 2005; Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). Chez la levure *S. cerevisiae*, la quantité du complexe cohésine (Scc1) associée à la chromatine est fortement réduite en l'absence de Pds5 (Panizza et al, 2000).

Ces résultats indiquent que le recrutement des cohésines à la chromatine n'est pas strictement dépendant de Pds5, mais Pds5 semble réguler leur association, ce qui suggère une interaction fonctionnelle forte entre Pds5 et les complexes cohésines.

## 2) Interactions physiques entre Pds5 et les cohésines

Les vertébrés ont la particularité de posséder deux paralogues de Pds5 : PDS5A et PDS5B (Losada et al, 2005), toutes deux nucléaires. Les deux protéines PDS5A et PDS5B ne co-immunoprécipitent pas l'une avec l'autre (Losada et al, 2005). Dans des extraits cellulaires de vertébrés immunoprécipités avec PDS5A ou PDS5B, tous les membres du complexe cohésine sont détectés dans l'immunoprécipitat (SMC1, SMC3, SCC1 et SA1/2 (les deux isoformes de Scc3 chez les vertébrés)) (Losada et al, 2005; Sumara et al, 2000). Néanmoins, les cohésines ne sont pas déplétées de l'extrait et les auteurs suggèrent qu'une partie seulement des cohésines est associée à PDS5 (Losada et al, 2005; Sumara et al, 2000). L'interaction de PDS5A et PDS5B avec le complexe cohésine est sensible à de fortes concentrations salines (Losada et al, 2005; Sumara et al, 2000) alors que ce n'est pas le cas pour les interactions entre les sous-unités du complexe cohésine. Pds5 présente ainsi des propriétés distinctes des autres sous-unités du complexe cohésines. Collectivement, ces données suggèrent que Pds5 est une sous-unité facultative du complexe cohésine.

Des expériences de reconstitution *in vitro*, utilisant des protéines humaines recombinantes exprimées dans des lysats de réticulocytes (Shintomi & Hirano, 2009) indiquent que la protéine humaine hPDS5B n'interagit pas directement avec hSA1. En revanche, hPDS5B peut interagir directement avec hRAD21 et cette interaction est stimulée par la présence de hSA1 (Shintomi & Hirano, 2009). Autrement dit, même si hRAD21 peut se lier directement à hPDS5B, hRAD21-hSA1 offre un meilleur contexte pour cette association. Chez *S. cerevisiae*, Pds5 co-immunoprécipite Scc1 et des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont révélé de manière nouvelle et surprenante que Pds5 pouvait également être en contact avec la région charnière de Smc1 (Mc Intyre et al, 2007). Cette observation ouvre la possibilité que Pds5 puisse favoriser l'interaction entre les têtes globulaires des Smc (via Scc1) et la région charnière de Smc1. Cette conformation pourrait être adoptée transitoirement lors de l'association des cohésines à l'ADN (Gruber et al, 2006).



Chez *S. cerevisiae* et conformément aux résultats obtenus chez les mammifères, l'interaction de Pds5 avec Smc1 est abolie en absence de Scc1 (Mc Intyre et al, 2007), ce qui suggère que l'interaction de Pds5 avec les cohésines dépend également de Scc1. Les protéines Scc1 et Pds5 co-précipitent dans des extraits de *S. cerevisiae* et cette interaction est sensible aux sels (Mc Intyre et al, 2007). Comme chez les mammifères, Pds5 et Scc3 n'interagissent pas directement *in vitro* (Rowland et al, 2009) ni *in vivo* par FRET (Mc Intyre et al, 2007) chez *S. cerevisiae*.

### 3) Interactions physiques entre Wapl et Pds5

Les protéines Pds5 et Wapl interagissent physiquement dans des cellules humaines ou de xénope (Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006; Shintomi & Hirano, 2009). En effet, le fractionnement par centrifugation sur gradient de saccharose d'extraits protéiques natifs de cellules humaines indique que hWAPL et hPDS5A co-sédimentent toutes deux dans une même fraction, distincte de celle contenant le complexe cohésine (Kueng et al, 2006), ce qui suggère que Wapl et Pds5 forment un sous-complexe. La protéine WAPL co-immunoprécipite les cohésines, mais aussi PDS5A et PDS5B (Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006; Shintomi & Hirano, 2009). En l'absence de SCC1, la co-immunoprécipitation de PDS5A avec WAPL est fortement réduite (Kueng et al, 2006), mais ce n'est pas le cas avec PDS5B (Shintomi & Hirano, 2009). Les auteurs suggèrent que la formation du sous-complexe Wapl-Pds5 est dépendante de la sous-unité Scc1 du complexe cohésine.

Conformément aux résultats obtenus chez les mammifères, l'interaction de Pds5 avec Wapl dans la levure *S. cerevisiae* a été mise en évidence par co-immunoprécipitation (Rowland et al, 2009; Sutani et al, 2009), ainsi que par double-hybride (Sutani et al, 2009). Cette interaction est également observée *in vitro*, indiquant que Wapl et Pds5 interagissent directement (Rowland et al, 2009). Les protéines Pds5 et Wapl peuvent donc former un sous-complexe indépendamment des cohésines chez *S. cerevisiae*.

## **B. Fonction de Pds5 dans l'établissement et/ou le maintien de la cohésion des chromatides sœurs**

### Chez les vertébrés

Dans des cellules humaines traitées avec des siRNA spécifiques de *hPDS5A* ou de *hPDS5B*, la morphologie des chromosomes métaphasiques est altérée (Losada et al, 2005). Les cellules traitées avec des siRNA ciblant *hPDS5A* présentent des défauts de cohésion au niveau



des bras de chromosomes (Losada et al, 2005). En revanche, lorsque les cellules sont traitées avec des siRNA ciblant *hPDS5B*, les centromères sont fréquemment séparés et la cohésion des chromatides sœurs peut être totalement perdue, produisant alors des chromatides uniques (Losada et al, 2005). Dans les deux cas (déplétion de PDS5A ou de PDS5B), la condensation des chromosomes est altérée et la congression des chromosomes au niveau du plan métaphasique est défectueuse (Losada et al, 2005). Les auteurs suggèrent que les deux protéines Pds5 humaines contribuent à l'assemblage correct des chromosomes métaphasiques, avec des paires de chromatides fermement associées. Les auteurs proposent également qu'il pourrait exister une division des fonctions entre hPDS5A et hPDS5B dans la cohésion au niveau des bras de chromosomes (hPDS5A) et du centromère (hPDS5B).

#### Chez la levure

Chez *S. cerevisiae*, lorsque Pds5 est inactivée (par l'utilisation d'un allèle thermosensible) dès la phase G1 (Hartman et al, 2000; Panizza et al, 2000) ou dès la phase S (utilisation d'hydroxyurée) (Noble et al, 2006; Stead et al, 2003), les chromatides sœurs se séparent au cours de la phase S et la fréquence de séparation augmente au cours du temps. Ceci suggère que la cohésion des chromatides sœurs n'est pas établie ou n'est pas maintenue. L'inactivation de Pds5 dans des cellules bloquées en métaphase induit une perte de cohésion (Hartman et al, 2000; Panizza et al, 2000), suggérant un rôle de Pds5 dans le maintien de la cohésion.

Ces données indiquent que chez *S. cerevisiae* la protéine Pds5 est requise au maintien de la cohésion des chromatides sœurs, ce qui n'exclue pas un rôle possible dans l'établissement de la cohésion lors de la phase S.

Chez la levure *S. pombe*, contrairement à la levure *S. cerevisiae*, la délétion du gène *pds5* n'est pas létale (Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). En condition normale de croissance, les souches dépourvues de Pds5 présentent une fréquence élevée (x10) de perte de chromosomes (mesure de la fréquence de perte du minichromosome non essentiel Ch16) (Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). La protéine Pds5 n'est pas essentielle mais contribue à la fidélité de la ségrégation des chromosomes. La méiose est quant à elle fréquemment anormale en l'absence de Pds5, où 30% des asques ont moins de quatre spores. Le contenu en ADN de ces spores anormales est alors augmenté ou diminué par rapport à une spore haploïde normale (Wang et al, 2002).



Il a été clairement montré que Pds5 est nécessaire à la cohésion à long terme chez *S. pombe*. Lors d'un arrêt prolongé en phase G2 du cycle cellulaire, la viabilité des cellules  $\Delta pds5$  chute au cours du temps et ceci est corrélé à une perte progressive de cohésion. En effet, la fréquence de séparation d'une paire de centromères frères marqués par la GFP augmente au cours de l'arrêt en phase G2. Lorsque ces cellules sont replacées en conditions de croissance, la première mitose suivant l'arrêt en phase G2 se caractérise par des erreurs massives de ségrégation des chromosomes (Tanaka et al, 2001). La protéine Pds5 serait donc nécessaire au maintien de la cohésion des chromatides sœurs et non à son établissement.

La viabilité des souches  $\Delta pds5$  est également perdue suite à un arrêt en mitose (Wang et al, 2002). Les cellules  $\Delta pds5$  sont hypersensibles au thiabendazole, un poison du fuseau mitotique. La délétion de *pds5* combinée à une mutation dans le gène de la  $\beta$ -tubuline provoque une perte de la viabilité cellulaire à une température où les deux simples mutants sont viables (Wang et al, 2002). Ces données suggèrent que Pds5 est impliquée dans le maintien de la viabilité lors d'un délai en début de mitose. Effectivement, lorsque l'arrêt en prométaphase est levé, les cellules  $\Delta pds5$  ont une proportion élevée de chromosomes traînant sur le fuseau mitotique (Wang et al, 2002). Ces défauts de ségrégation aboutissent en une multitude d'anormalités létales tels que l'absence totale de ségrégation ou le phénotype *cut* (cell untimely torn (Hirano et al, 1986)). De façon étonnante, aucune séparation prématurée des chromatides sœurs n'a pourtant été mesurée au cours de l'arrêt en métaphase (Wang et al, 2002).

En conclusion, la fonction de Pds5 dans le maintien de la cohésion semble être conservée dans les différents organismes.

### **C. Fonction du module Wapl-Pds5 dans la régulation de l'association des cohésines à la chromatine**

#### Chez les vertébrés

La protéine WAPL régule la dynamique des cohésines chez l'Homme (Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006). Lorsque la fonction de WAPL est compromise, le temps de résidence des cohésines sur la chromatine est augmenté en interphase (Kueng et al, 2006). En mitose, la majeure partie des cohésines est dissociée des chromosomes en prophase par le PDP (Prophase Dissolution Pathway). Ne persistent que les cohésines des régions centromériques et de quelques sites sur les bras de chromosomes (Waizenegger et al, 2000). Lors d'un arrêt prolongé en début de mitose, les chromosomes adoptent une forme typique en X, dans laquelle les bras des chromatides sœurs sont séparés les uns des autres, tandis que les centromères demeurent





étroitement connectés. Cette dissociation des cohésines en prophase est dépendante de l'activité de la protéine Wapl (Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006).

La protéine Pds5 est impliquée dans le maintien de la cohésion (Hartman et al, 2000; Losada et al, 2005; Panizza et al, 2000; Stead et al, 2003) et on pourrait s'attendre à ce que l'association des cohésines à la chromatine soit déstabilisée en l'absence de Pds5. De façon inattendue, les chromosomes métaphasiques de cellules de xénope déplétées pour PDS5A et PDS5B conservent un taux élevé de cohésines sur les chromosomes (Losada et al, 2005; Shintomi & Hirano, 2009). La déplétion de PDS5A et PDS5B reproduit exactement les effets de la déplétion de WAPL (Shintomi & Hirano, 2009). Dans des cellules déplétées pour PDS5, les deux chromatides sœurs sont étroitement liées l'une à l'autre (Shintomi & Hirano, 2009). La résolution des chromatides sœurs en prophase est donc sévèrement compromise lors de la déplétion des protéines endogènes WAPL ou PDS5A et PDS5B. De façon remarquable, ces défauts sont supprimés par la réintroduction de hWAPL ou hPDS5B, et ce même lorsque l'ajout a lieu lors de l'entrée en mitose (Shintomi & Hirano, 2009). L'effet de WAPL et PDS5B sur la résolution des chromatides sœurs s'effectue de ce fait dans une fenêtre de temps très court. Le module Wapl-Pds5 promeut donc la dissociation des cohésines de la chromatine en début de mitose.

#### Chez la levure

La fonction de Pds5 et Wapl dans la dissociation des cohésines ne semble pas être conservée chez *S. cerevisiae*. Plusieurs travaux montrent à l'inverse que l'absence de Wapl (Rad61) a pour effet une diminution de la quantité de cohésines sur les chromosomes (Rowland et al, 2009; Sutani et al, 2009) et aucun effet de Wapl sur la dissociation des cohésines n'a pu être observé en mitose chez *S. cerevisiae* (Sutani et al, 2009). De la même manière, lorsque la fonction de Pds5 est compromise, la quantité de cohésines associée à la chromatine diminue (Panizza et al, 2000; Sutani et al, 2009). Pds5 et Wapl semblent donc requises pour l'association des cohésines aux chromosomes chez *S. cerevisiae*, soulevant la possibilité que les défauts de cohésion dans les mutants de *PDS5* soient liés à un défaut d'association des cohésines à la chromatine.

Chez la levure *S. pombe*, Wapl régule négativement l'association des cohésines à la chromatine (cf. chapitre précédent et (Bernard et al, 2008)). La délétion de *wpl1* supprime la létalité d'une souche délétée pour le facteur d'établissement de la cohésion *esol*. Dans une souche  $\Delta esol \Delta wpl1$  les cohésines sont associées de manière stable à la chromatine (cf. chapitre



précédent). Ceci est cohérent avec les rôles opposés de Wapl et d'Eso1 dans l'association stable des cohésines aux chromosomes. De la même manière, une souche délétée à la fois pour *pds5* et *eso1* est viable (Tanaka et al, 2001). Ceci suggère que chez *S. pombe*, Pds5 pourrait également être impliquée dans la dissociation des cohésines de la chromatine.

En conclusion, Pds5 semble avoir deux fonctions qui apparaissent antagonistes au cours du cycle cellulaire. La protéine Pds5 est impliquée dans le maintien de la cohésion en interphase chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* ainsi que chez les vertébrés. D'autre part, Pds5 facilite la dissociation des cohésines en mitose. La fonction de Pds5 semble donc varier au cours du cycle cellulaire. La fonction de Pds5 pourrait être régulée par des modifications post-transcriptionnelles, telles que la sumoylation, l'acétylation ou la phosphorylation (Ivanov et al, 2002; Losada et al, 2005; Stead et al, 2003). L'apparente variabilité des phénotypes liés à la perte de fonction de Pds5 au cours du cycle cellulaire et au travers des organismes pourrait alors s'expliquer par ces différences de régulation.

#### **D. Fonction de Pds5 dans l'établissement de la cohésion**

Chez la levure *S. cerevisiae*, une souche délétée pour *PDS5* et/ou *ECO1* n'est pas viable (Noble et al, 2006). La surexpression d'*ECO1* supprime partiellement la thermosensibilité des mutants *pds5<sup>ts</sup>*, ce qui n'est pas le cas pour les autres mutants du complexe cohésine (Noble et al, 2006). Cette suppression est dépendante du domaine acétyltransférase (Noble et al, 2006). Réciproquement, la surexpression de *PDS5* supprime partiellement la thermosensibilité des mutants d'*eco1<sup>ts</sup>* (Noble et al, 2006). Ces résultats suggèrent que Pds5 pourrait coopérer avec Eco1 pour établir la cohésion. Cette hypothèse est supportée par l'interaction physique entre ces deux partenaires observée par GST pull-down (Noble et al, 2006).

À l'inverse, il a été reporté que Pds5 pourrait s'opposer à la réaction d'établissement de la cohésion. *PDS5* fait partie des *loci* identifiés dans un crible recherchant des suppresseurs de la thermosensibilité d'un mutant *eco1<sup>ts</sup>* (Sutani et al, 2009). Dans un essai de cohésion (concaténation de plasmides), le défaut de cohésion dans les cellules *eco1<sup>ts</sup>* est partiellement restauré par une mutation dans *PDS5* (Rowland et al, 2009). Ces résultats suggèrent que dans un contexte sauvage, Pds5 a une activité anti-cohésion qui s'oppose à Eco1. Autrement dit, Eco1 doit contrecarrer Pds5 pour établir la cohésion. En effet, la co-immunoprécipitation d'un variant Smc3 mimant l'état acétylé avec Pds5 est très réduite (Sutani et al, 2009), ce qui suggère que l'acétylation de Smc3 pourrait diminuer l'interaction entre Pds5 et les cohésines. Cette observation est supportée par le fait que la surexpression d'*ECO1* réduit la quantité de Wapl et



Pds5 associée à la chromatine (Sutani et al, 2009). Ces données indiquent que le facteur d'établissement de la cohésion Eco1 pourrait, en acétylant Smc3, promouvoir la dissociation de Wapl et Pds5 des cohésines.

En résumé, les données obtenues chez *S. cerevisiae* suggèrent que Pds5 pourrait rassembler des fonctions *a priori* antagonistes. D'une part Pds5 est nécessaire au maintien de la cohésion ainsi qu'à l'association des cohésines aux chromosomes et d'autre part Pds5 contrecarre l'activité d'Eco1 et Eco1 semble promouvoir la dissociation de Pds5 des cohésines.

Dans des cellules humaines, l'acétylation de SMC3 est requise pour la progression des fourches de réplication. Un défaut d'acétylation de SMC3 ralentit le mouvement de la fourche et ce phénotype est restauré par la déplétion de WAPL par siRNA (Terret et al, 2009). L'interaction de WAPL et PDS5A avec les cohésines est inversement corrélée avec l'acétylation de SMC3 (Terret et al, 2009). Les auteurs proposent que le rôle de l'acétylation de SMC3 serait d'évincer le module WAPL-PDS5 des cohésines afin qu'elles adoptent une configuration qui ne perturbe pas la progression de la fourche de réplication.

Chez la levure *S. pombe*, la délétion d'*eso1* est létale, mais la viabilité est restaurée par la délétion de *pds5* (Tanaka et al, 2001). La protéine essentielle Eso1 devient donc dispensable en l'absence de Pds5. Les protéines Eso1 et Pds5 interagissent en double-hybride (Tanaka et al, 2001) et cette interaction est perdue à température restrictive pour l'allèle thermosensible *eso1-H17*. Dans des conditions de croissance non perturbées, la fréquence de séparation des chromatides sœurs dans la souche  $\Delta pds5 \Delta eso1$  en phase exponentielle de croissance est comparable à celle obtenue dans la souche  $\Delta pds5$ , soit légèrement au dessus de la souche sauvage (Tanaka et al, 2001), et les chromosomes ségrégent correctement (Tanaka et al, 2001). Dans des cellules délétées pour *eso1* et *pds5*, la cohésion des chromatides sœurs est établie et ce bien que le facteur d'établissement de la cohésion soit absent.

Ces observations indiquent que Pds5 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'association des cohésines à la chromatine mais aussi dans l'établissement et/ou le maintien de la cohésion. Nous avons voulu déterminer ce qu'il en était chez *S. pombe*. Afin de mieux comprendre la fonction de Pds5 dans le processus de cohésion, nous avons entrepris d'étudier les relations fonctionnelles entre Pds5, Wapl, Eso1 et les cohésines.



---

## Résultats

### A. Pds5 et Wapl coopèrent pour réguler l'interaction des cohésines à la chromatine

Chez *S. pombe*, l'inactivation du complexe de chargement en phase G1 conduit à une dissociation complète des cohésines de la chromatine de façon dépendante de la protéine Wapl (Bernard et al, 2008). Le même type d'expérience a été réalisé dans un contexte  $\Delta pds5$  afin de déterminer l'implication de Pds5 dans ce processus.

L'expérience consiste à utiliser des cellules de génotype *nmt-res1Cter mis4-367 rad21-9PK* arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire. Cet arrêt est effectué par la surexpression de la partie C-terminale de Res1, comme décrit dans le chapitre II. Les cellules sont transférées à 37°C pour inactiver le complexe de chargement des cohésines. L'association de la sous-unité Rad21 du complexe cohésine étiquetée avec 9 PK (Rad21-9PK) est examinée par immunofluorescence sur des étalements de chromatine dans un fond génétique sauvage, en absence de Wapl ( $\Delta wpl1$ ), en absence de Pds5 ( $\Delta pds5$ ) et en l'absence de Pds5 et de Wapl ( $\Delta pds5 \Delta wpl1$ ). Les résultats sont présentés dans la Figure 1.

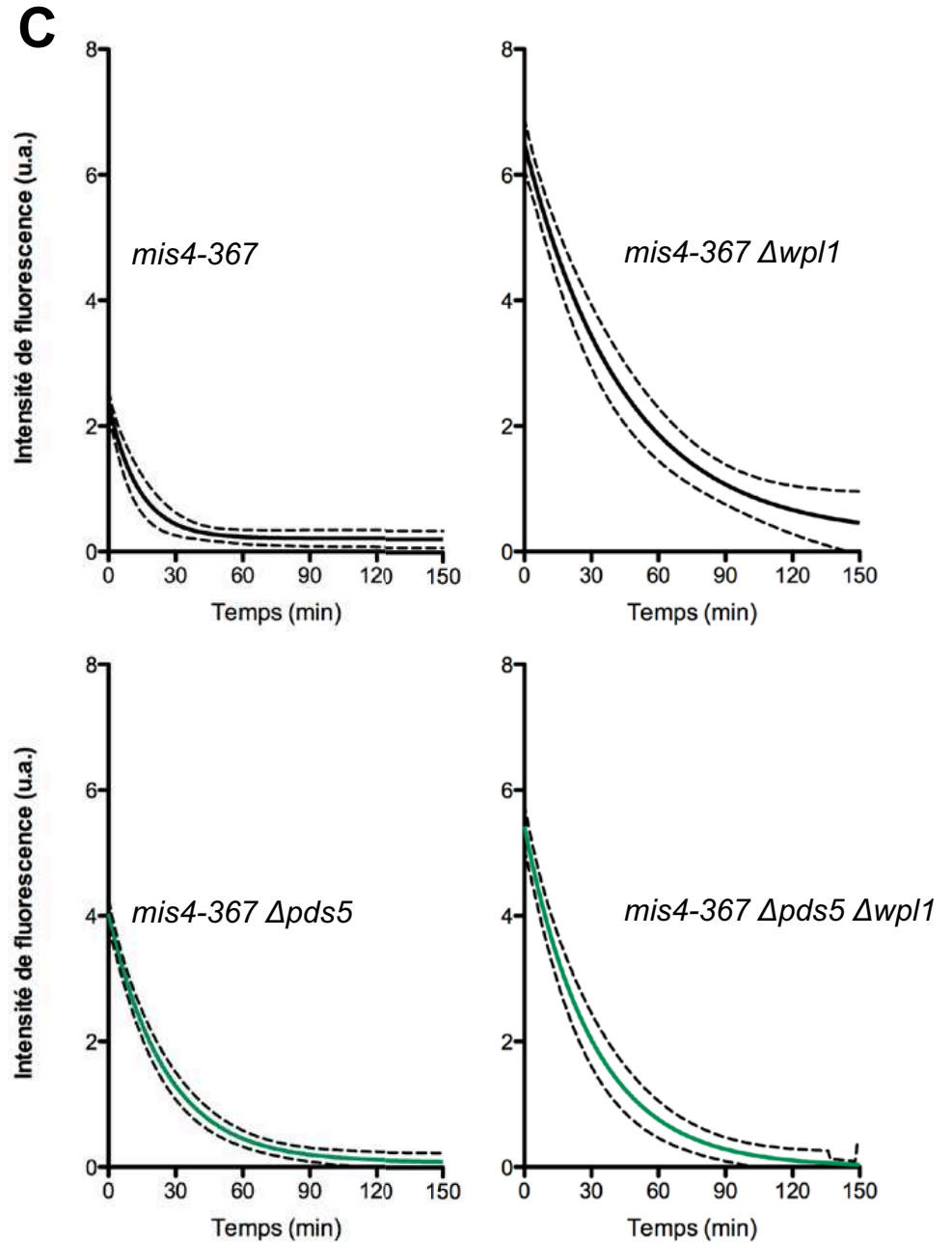
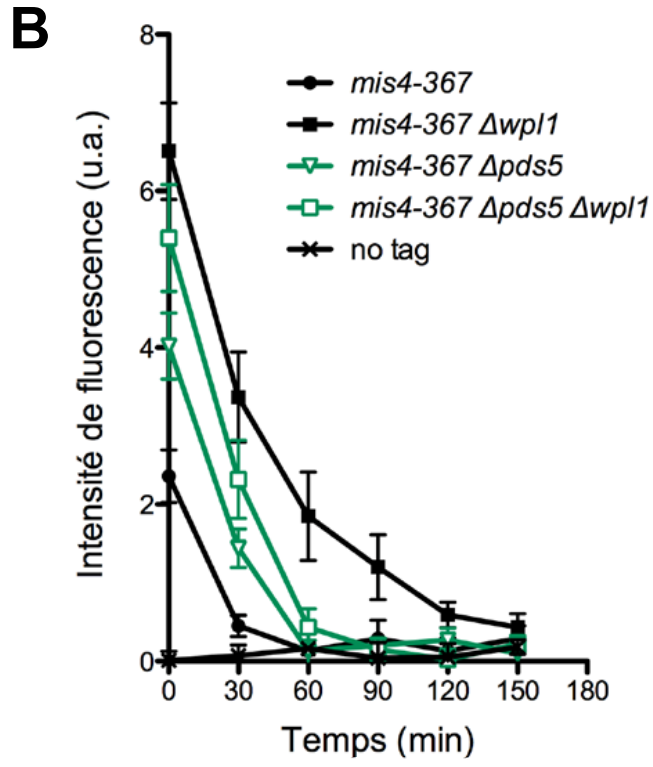
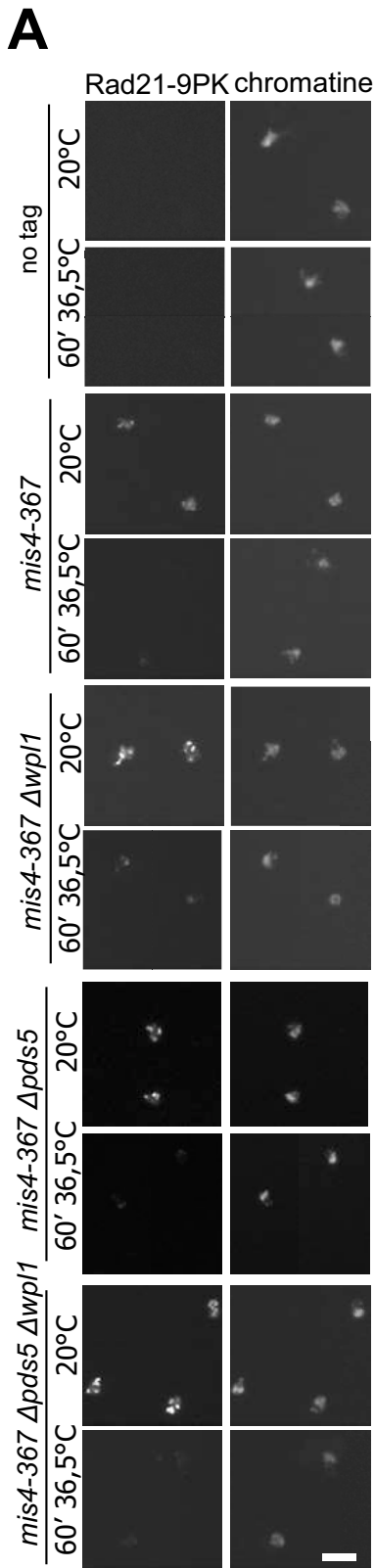
Dans la souche sauvage, suite à l'inactivation du complexe de chargement, la quantité de cohésines associées à la chromatine diminue au cours du temps, jusqu'à se confondre avec le bruit de fond expérimental déterminé dans une souche *rad21<sup>+</sup>* ("no tag"). En phase G1, la totalité des cohésines est labile et la cinétique de dissociation permet d'évaluer la demi-vie des cohésines associées à la chromatine. Elle est estimée à environ 9 minutes. En l'absence de Wapl, la quantité initiale de cohésines associées à la chromatine est augmentée, la cinétique de dissociation est ralentie, et la demi-vie est augmentée à environ 30 minutes. Ceci est en accord avec le rôle connu de Wapl dans la dissociation des cohésines (Bernard et al, 2008; Gandhi et al, 2006; Kueng et al, 2006). Ces données sont remarquablement similaires aux résultats obtenus par FRAP dans les cellules de mammifères, où le temps de résidence dans le contrôle a été estimé à  $8,4 \pm 3,3$  minutes et augmenté à  $18,2 \pm 6,2$  minutes en l'absence de Wapl (Kueng et al, 2006).

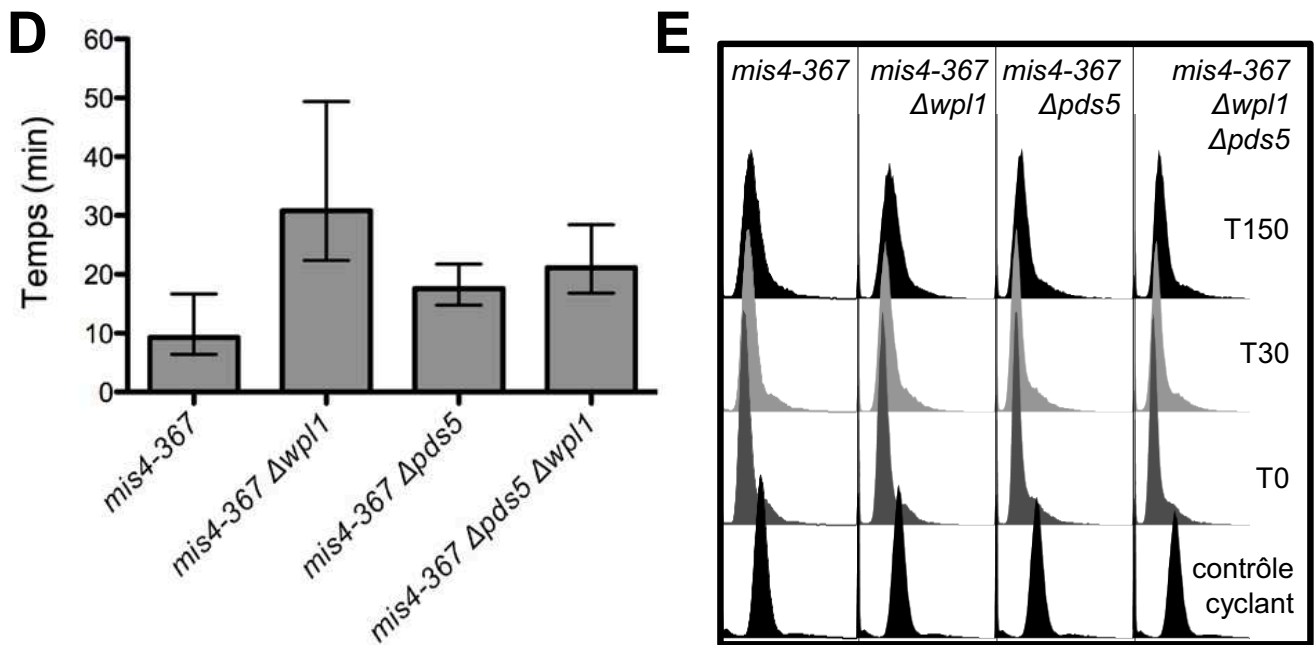
En l'absence de Pds5, la quantité initiale de cohésines associée à la chromatine est plus importante, la cinétique de dissociation est ralentie et la demi-vie est de vingt minutes environ. En l'absence de Pds5 comme en l'absence de Wapl, la demi-vie est donc augmentée par rapport au contrôle. La protéine Pds5 a donc une fonction similaire à celle de Wapl, c'est-à-dire dissocier les cohésines de la chromatine.

La demi-vie des cohésines sur les chromosomes dans le double mutant  $\Delta pds5 \Delta wpl1$  est très semblable à celle du simple mutant  $\Delta pds5$ . Il ne semble donc pas y avoir d'effet additif entre









**Figure 1. L'association de la cohésine mitotique Rad21 à la chromatine est régulée par Wapl et Pds5 en phase G1**

Les souches (*mis4-367 nmt-res1Cter*) ont été arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire à 25°C par la surexpression du fragment C-terminal de Res1 sous le contrôle du promoteur inducible *nmt1*. Les cellules ont été transférées à 36,5°C (température restrictive pour *mis4-367*) de façon à inactiver le complexe de chargement des cohésines. L'association des cohésines à la chromatine a été mesurée au cours du temps par étalement de chromatine et immunofluorescence indirecte contre Rad21-9PK. La chromatine a été colorée au DAPI.

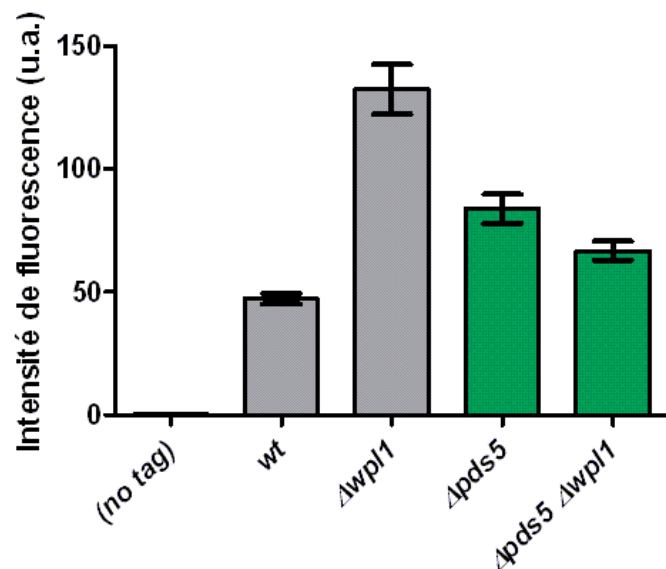
**A.** Images d'étalements de chromatine montrant l'association de Rad21 avant (T0 à 20 C) et 60 minutes après transfert à 36,5°C (barre = 5 µm).

**B.** Cinétique de dissociation de Rad21 de la chromatine. L'intensité de fluorescence a été mesurée pour 30 à 100 noyaux pour chaque point expérimental. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance de la moyenne avec  $\alpha=0,05$ .

**C.** Estimation du temps de demi-vie de Rad21 sur la chromatine. Les courbes de dissociation sont compatibles avec un modèle de décroissance exponentielle simple. Les courbes en pointillé représentent l'intervalle de confiance de la courbe modélisée (en trait plein).

**D.** Le temps de demi-vie est la durée pour laquelle 50% de la quantité initiale de Rad21 a été dissociée des chromosomes. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de prédiction ( $\alpha=0,05$ ).

**E.** L'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux montre que les cellules restent arrêtées en G1 pendant toute la durée de l'expérience.



**Figure 2. L'association de la cohésine mitotique Rad21 à la chromatine est régulée par Wapl et Pds5 en phase G1**

Les souches (*mis4<sup>+</sup> nmt-res1Cter*) ont été arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire à 25°C (cf. Fig. 1). L'association des cohésines à la chromatine a été mesurée par étalement de chromatine et immunofluorescence indirecte contre Rad21-9PK.

ces deux mutations, suggérant que les deux gènes sont dans une même voie de régulation où *Δpds5* serait épistatique sur *Δwpl1*. Autrement dit, en l'absence de Pds5, la délétion de *wpl1* a très peu d'effet, ce qui suggère que Pds5 est nécessaire à l'action de Wapl. Un autre résultat apparaît dans l'analyse du double mutant. En l'absence de Wapl, la délétion de *pds5* déstabilise les cohésines. Pds5 semble donc stabiliser l'interaction des cohésines avec la chromatine (au moins dans un contexte *Δwpl1*).

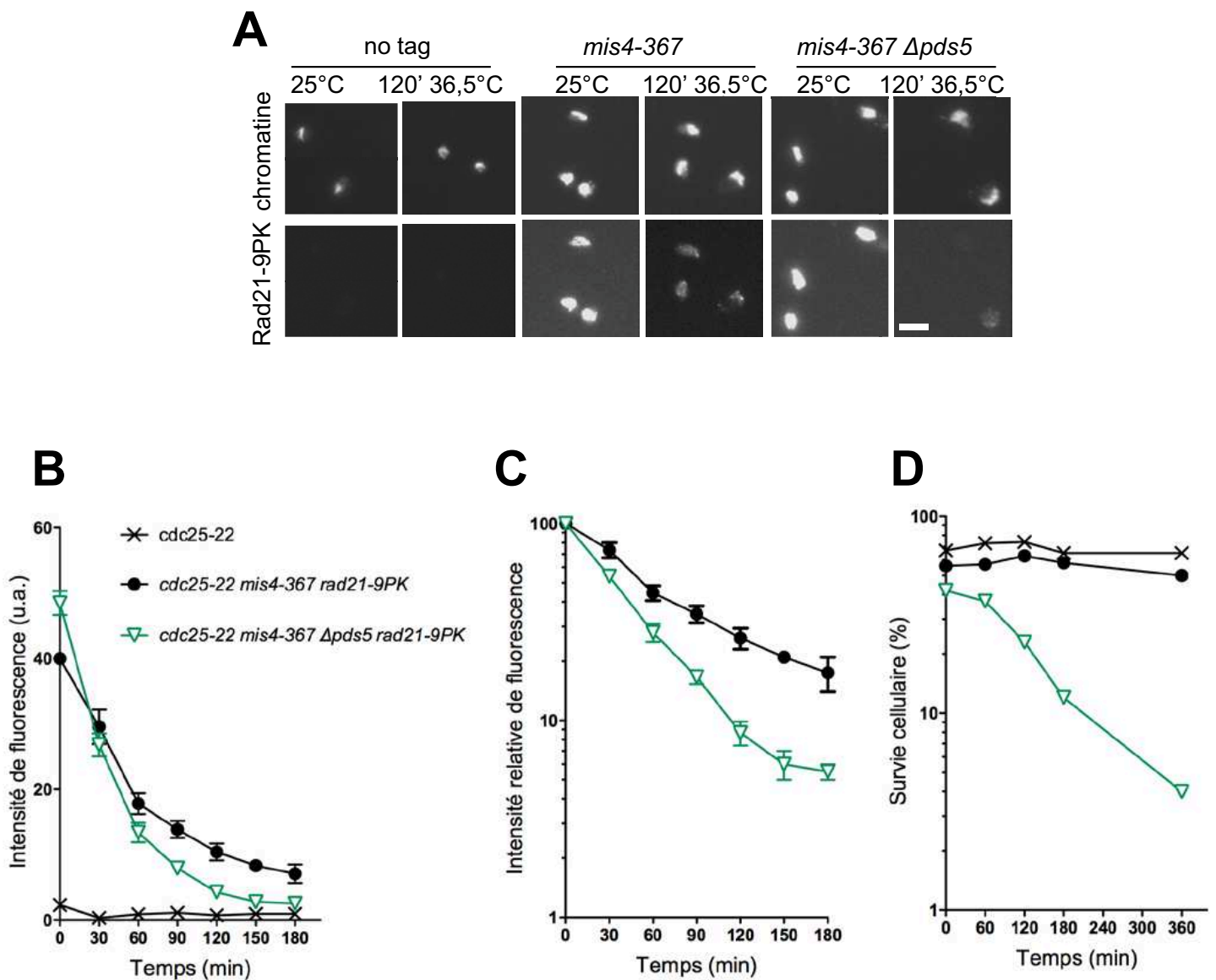
Nous avons également mesuré la quantité de cohésines associée aux chromosomes de phase G1 à l'équilibre, c'est-à-dire dans un contexte sauvage pour Mis4 (Figure 2). La délétion de *wpl1*, comme celle de *pds5* déplace l'équilibre dans le sens d'une augmentation de la quantité de Rad21 liée aux chromosomes et la quantité observée dans le double-mutant est similaire à celle observée dans *Δpds5*. Ce résultat est en accord avec une diminution de la dissociation des cohésines de la chromatine dans les souches mutantes et avec la relation d'épistasie observée entre *Δpds5* et *Δwpl1*.

Pds5 semble donc avoir deux fonctions a priori antagonistes en G1. Pds5, comme Wapl, stimule la dissociation des cohésines de la chromatine et la relation d'épistasie entre *Δpds5 Δwpl1* indique que Wapl n'a pas ou peu d'effet en l'absence de Pds5. Ceci suggère que la présence de Pds5 est requise pour la fonction de Wapl. D'autre part, la délétion de *pds5* dans un fond génétique *Δwpl1* se traduit par une diminution de la quantité de cohésines liées à la chromatine ce qui suggère que Pds5 a aussi un rôle dans la stabilisation de l'interaction des cohésines avec les chromosomes.

## **B. Pds5 est nécessaire à la formation et/ou au maintien de la fraction stable de cohésines sur les chromosomes**

### **1) Pds5 est nécessaire au maintien des cohésines sur les chromosomes en phase G2**

La protéine Pds5 est impliquée dans le maintien de la cohésion lors d'un arrêt prolongé en phase G2 (Tanaka et al, 2001). Nous avons cherché à savoir si l'érosion de la cohésion dans les cellules *Δpds5* pouvait être la conséquence d'une perte des cohésines liées aux chromosomes. Pour répondre à cette question, l'association des cohésines à la chromatine a été analysée par immunofluorescence indirecte contre la sous-unité Rad21 du complexe cohésine, sur des étalements de chromatine réalisés au cours d'un arrêt en phase G2.



### Figure 3. En phase G2, l'association stable des cohésines à la chromatine est dépendante de Pds5

Les souches portant les mutations thermosensibles *cdc25-22* et *mis4-367* ont été cultivées à 25°C puis transférées à 36,5°C pour arrêter le chargement des cohésines par l'inactivation de Mis4. L'allèle *cdc25-22* empêche l'entrée en mitose et induit un arrêt G2 strict. L'association de Rad21-9PK à la chromatine est mesurée aux temps indiqués par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps anti-PK sur des étalements de chromatine.

**A.** Images d'étalements de chromatine montrant l'association de Rad21 à la chromatine avant (T0) et après 120 minutes (T180) à 36,5°C. (barre = 5 µm).

**B.** Cinétiques de dissociation de Rad21 de la chromatine. L'intensité de fluorescence de Rad21-9PK a été mesurée pour 30 à 100 noyaux par temps dans chaque expérience. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne de quatre expériences indépendantes.

**C.** Chaque jeu de données a été normalisé par rapport à sa valeur au temps 0 (arbitrairement fixée à 100). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne de quatre expériences indépendantes.

**D.** La viabilité des cellules est compromise en l'absence de Pds5. Les cellules sont récoltées aux temps indiqués et étalées à température permissive afin de déterminer le nombre de cellules viables.

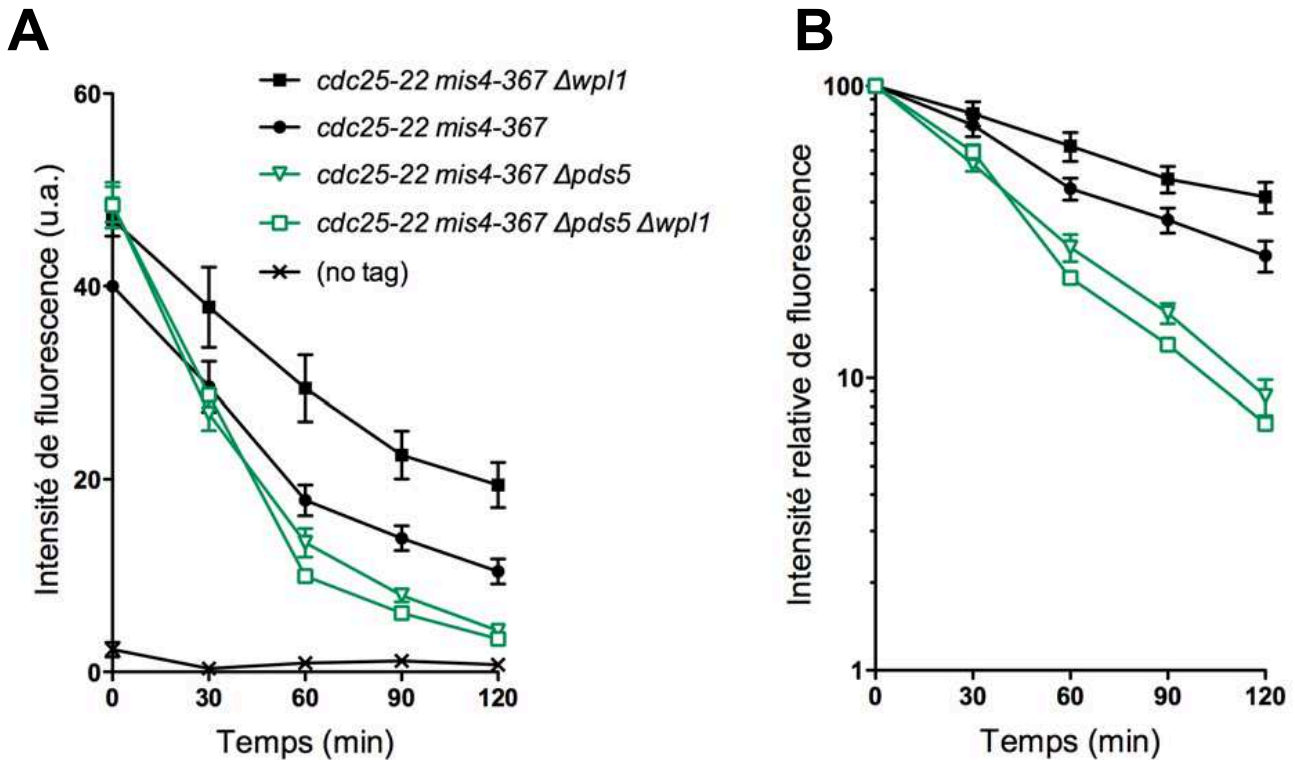
L'expérience consiste à utiliser des cellules de génotype *cdc25-22 mis4-367 rad21-9PK* en phase exponentielle de croissance. L'arrêt des cellules en phase G2 du cycle cellulaire est effectué par l'inactivation de Cdc25, comme décrit dans le chapitre II. Le passage à température restrictive pour les allèles *cdc25-22* et *mis4-367* permet à la fois d'empêcher l'entrée en mitose et d'induire un arrêt ferme en fin de G2 et d'inactiver le complexe de chargement des cohésines. La dissociation des cohésines de la chromatine au cours de l'arrêt en phase G2 est suivie par des étalements de chromatine. L'association de la sous-unité Rad21 du complexe cohésine étiquetée avec 9 PK (Rad21-9PK) a été examinée dans un fond génétique sauvage, en absence de Wapl (*Δwpl1*), en absence de Pds5 (*Δpds5*) et en l'absence de Pds5 et de Wapl (*Δpds5 Δwpl1*). La quantité de cohésines étiquetées est mesurée par immunofluorescence. En parallèle, la viabilité des cellules est quantifiée par leur capacité à former des colonies après étalement d'un nombre déterminé de cellules et croissance à température permissive (25°C). Les résultats sont présentés dans les Figures 3 et 4.

Dans la souche sauvage, suite à l'inactivation du complexe de chargement, la quantité de cohésines diminue au cours du temps, puis se stabilise au niveau d'une valeur plateau d'environ 20% de la quantité initiale. La survie des cellules reste élevée au cours de l'arrêt, ce qui indique que les complexes cohésines restants associés aux chromosomes aux temps tardifs de la cinétique sont suffisants pour fournir une cohésion fonctionnelle. En l'absence de Pds5, la quantité initiale de cohésines associées à la chromatine est plus importante, mais chute rapidement pour se confondre avec le bruit de fond expérimental déterminé dans une souche *rad21<sup>+</sup>* ("no tag" dépourvue d'étiquette 9PK). Contrairement à une souche sauvage, en l'absence de Pds5 l'ensemble des cohésines est dissocié de la chromatine. La protéine Pds5 est donc nécessaire à la formation et/ou au maintien d'une fraction stable de cohésines. La dissociation complète des cohésines que nous observons est donc corrélée à la perte de cohésion décrite par Tanaka (Tanaka et al, 2001). De ces données, nous concluons que Pds5 est nécessaire à la création et/ou au maintien de la fraction de cohésine associée de manière stable à la chromatine, elle-même nécessaire à la cohésion à long terme et à la viabilité cellulaire.

L'instabilité de l'association des cohésines à la chromatine en l'absence de Pds5 n'est pas compensée par la délétion du gène *wpl1*

La cinétique de dissociation du double mutant *Δpds5 Δwpl1* est très similaire à celle du simple mutant *Δpds5* (Fig. 4). Ce n'est donc pas Wapl qui dissocie les cohésines en l'absence de Pds5. Soit les cohésines sans Pds5 sont intrinsèquement instables, soit il existe un autre facteur qui agit en *trans* sur le complexe pour promouvoir sa dissociation des chromosomes. La protéine



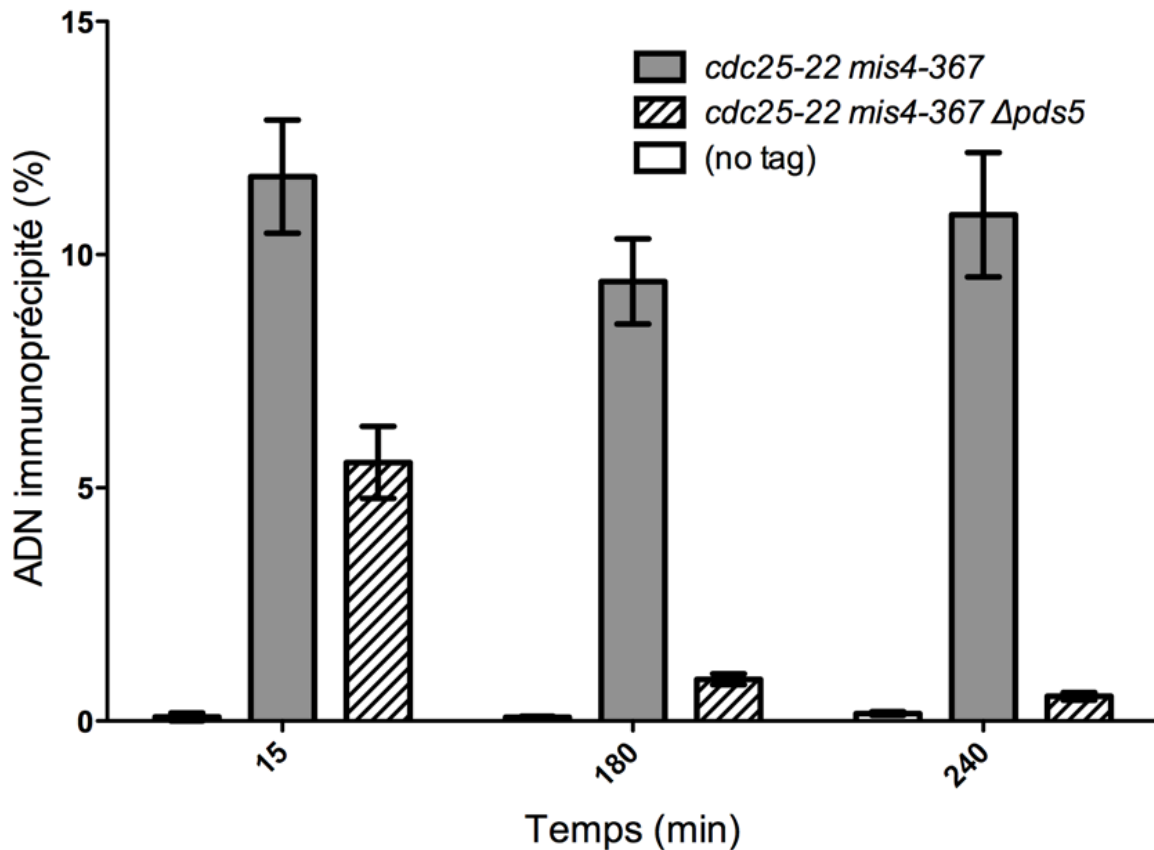


**Figure 4. L'instabilité de l'interaction cohésines - chromatine en l'absence de Pds5 n'est pas restaurée par la délétion du gène *wpl1*.**

Les souches portant les mutations thermosensibles *cdc25-22* et *mis4-367* ont été cultivées à 25°C puis transférées à 36,5°C pour arrêter le chargement des cohésines par l'inactivation de Mis4. L'allèle *cdc25-22* empêche l'entrée en mitose et induit un arrêt G2 strict. L'association de Rad21-9PK à la chromatine est mesurée aux temps indiqués par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps anti-PK sur des étalements de chromatine.

**A.** Cinétiques de dissociation de Rad21 de la chromatine. L'intensité de fluorescence de Rad21-9PK a été mesurée pour 40 à 100 noyaux par temps dans chaque expérience. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne de deux à quatre expériences indépendantes.

**B.** Chaque jeu de données a été normalisé par rapport à sa valeur au temps 0 (arbitrairement fixée à 100). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne de deux à quatre expériences indépendantes.



**Figure 5. Pds5 est nécessaire au maintien de l'association des cohésines aux régions péri-centromériques**

Les souches portant les mutations thermosensibles *cdc25-22* et *mis4-367* ont été cultivées à 25°C puis transférées à 36,5°C pour arrêter le chargement des cohésines par l'inactivation de Mis4. L'allèle *cdc25-22* empêche l'entrée en mitose et induit un arrêt G2 strict. Les cellules ont été traitées pour une immuno-précipitation de chromatine aux temps indiqués après le transfert à température restrictive. L'enrichissement de Rad21 a été mesuré dans les régions péri-centromérique (*imr*) et calculé à partir de deux qPCR indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'erreur à la moyenne.



Pds5 est donc nécessaire à la stabilité de l'association des cohésines à la chromatine. Une autre conclusion de cette expérience est que, comme en phase G1 (paragraphe précédent), les cohésines sans Pds5 sont insensibles à l'activité dissociatrice de Wapl, ce qui confirme la notion que la fonction de Wapl dans la dissociation des cohésines de la chromatine nécessite Pds5.

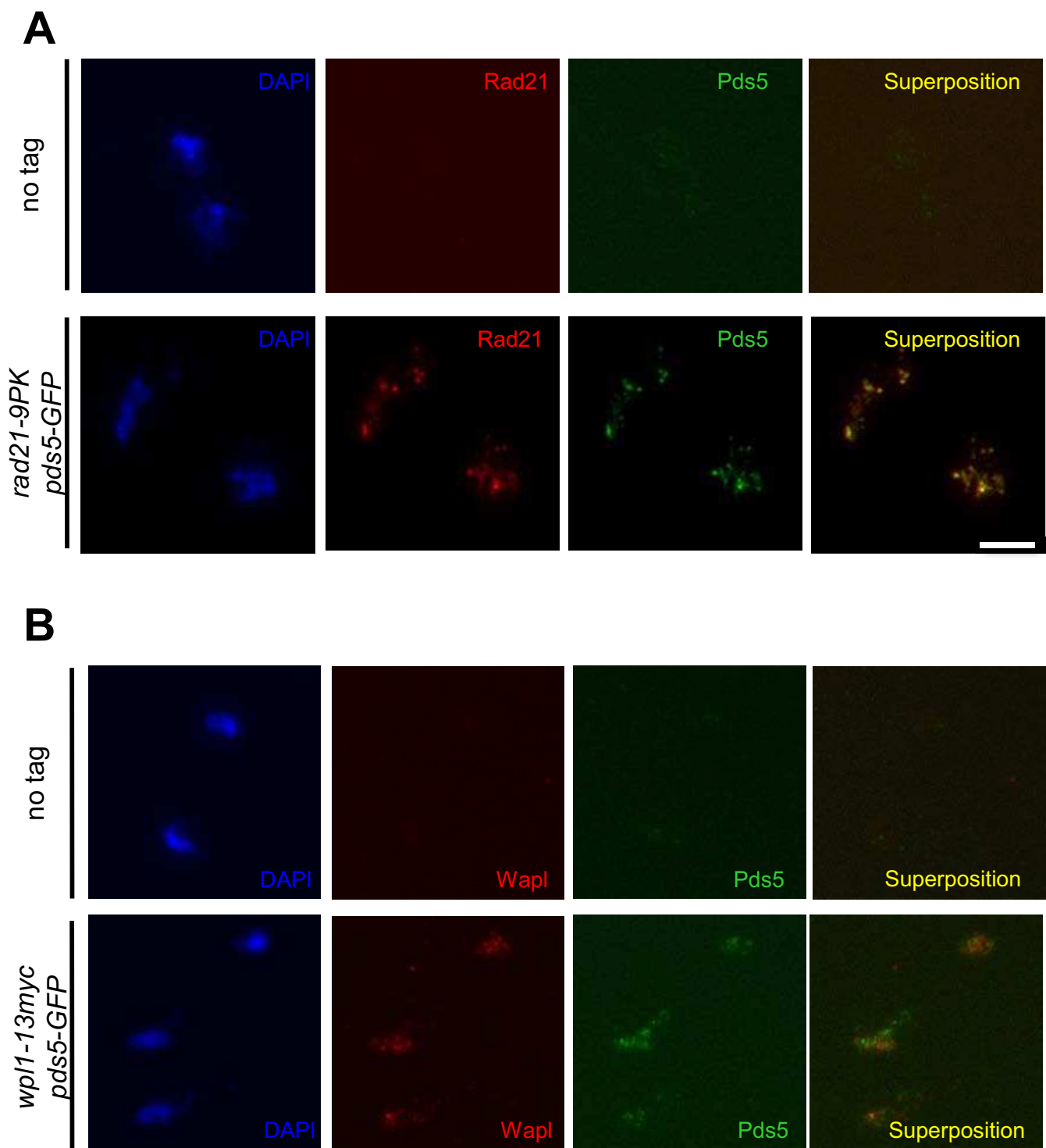
### **1) Pds5 est nécessaire au maintien des cohésines aux régions péri-centromériques**

L'association des cohésines à la chromatine est stable au niveau des centromères (cf. chapitre précédent), où la cohésion est particulièrement importante pour une correcte ségrégation des chromosomes (Bernard et al, 2001b; Nonaka et al, 2002). Pour tester l'effet de Pds5 sur cette zone majeure de cohésion, nous avons réalisé une expérience d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) dans les mêmes conditions que précédemment. L'expérience consiste à utiliser des cellules de génotype *cdc25-22 mis4-367 rad21-9PK* en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont transférées à température restrictive pour arrêter le chargement des cohésines et empêcher l'entrée en mitose. L'association des cohésines à la chromatine est suivie au cours du temps par ChIP contre Rad21-PK au niveau des répétitions *imr* des centromères (zones hétérochromatiques situées de part et d'autre du domaine central).

Suite à l'inactivation du complexe de chargement en phase G2, la quantité de Rad21 immunoprécipitée aux centromères reste constante au cours du temps dans une souche sauvage (Fig. 5). À l'inverse, elle chute dramatiquement en l'absence de Pds5. La stabilité d'interaction des cohésines avec les régions péri-centromériques est donc dépendante de Pds5.

### **C. Pds5 co-localise avec la fraction stable de cohésines**

Les données obtenues dans les paragraphes précédents indiquent que Wapl promeut la dissociation des cohésines en présence de Pds5, tandis que Pds5 stabilise l'interaction des cohésines à la chromatine lorsque Wapl est absente. Si l'association de Pds5 aux complexes cohésines les rend stables, on s'attend à ce que la protéine Pds5 reste sur la chromatine avec la fraction stable de cohésines après inactivation du complexe de chargement des cohésines et dissociation des complexes cohésines labiles en phase G2. Nous avons donc examiné la localisation de Pds5 avec les cohésines Rad21 de la fraction stable. Pour cela, nous avons réalisé des étalements de chromatine après inactivation du complexe de chargement et arrêt prolongé du cycle cellulaire en phase G2 (les souches possèdent les allèles thermosensibles *cdc25-22 mis4-367*). Nous avons utilisé une souche contenant simultanément les allèles *rad21-9PK* et *pds5-*



**Figure 6. Localisation comparée de Pds5, Wapl et de la fraction de Rad21 stablement associée aux chromosomes**

Les souches portant les mutations thermosensibles *cdc25-22* et *mis4-367* ont été cultivées à 25°C puis transférées à 36,5°C pour arrêter le chargement des cohésines par l'inactivation de Mis4. L'allèle *cdc25-22* empêche l'entrée en mitose et induit un arrêt G2 strict. L'association de Rad21-9PK, Pds5-GFP et Wapl-13myc à la chromatine est examinée par étalement de chromatine trois heures après le transfert à 36,5°C, temps pour lequel ne persiste que la fraction de Rad21 associée de façon stable aux chromosomes (barre = 5µm).

**A.** Pds5 colocalise avec Rad21. Rad21-9PK est détectée par un anticorps anti-PK (rouge) et Pds5-GFP par un anticorps anti-GFP (vert). La superposition des images montre la co-localisation des signaux Pds5 et Rad21.

**B.** Pds5 et Wapl ont une localisation chromosomique distincte. Wapl-13myc est détectée par un anticorps anti-myc (rouge) et Pds5-GFP par un anticorps anti-GFP (vert). La superposition des images montre que Pds5 et Wapl occupent des sites chromosomiques majoritairement distincts.

*GFP*. Après trois heures d'inactivation du complexe de chargement en phase G2, les cohésines labiles se sont dissociées et ne restent sur la chromatine que les cohésines stables. De façon remarquable, les signaux Pds5-GFP co-localisent avec les signaux de la fraction stable de Rad21-9PK et réciproquement les signaux de la fraction stable de Rad21-9PK co-localisent avec les signaux Pds5-GFP (Fig. 6). Ces données suggèrent que la fraction de cohésines stablement associée à la chromatine contient Pds5.

#### **D. Wapl et la fraction stable de cohésines occupent des sites chromosomiques distincts**

Pds5 stabilise l'interaction des cohésines à la chromatine et reste associée à la chromatine aux mêmes sites chromosomiques que la fraction stable de cohésines. À l'inverse, Wapl promeut la dissociation des cohésines. Comment se comporte la protéine Wapl lorsque la fraction labile de cohésines se dissocie ?

Nous avons voulu examiner l'interaction de Wapl avec les cohésines de la fraction stable (en l'occurrence avec Pds5). Pour cela, nous avons utilisé la même approche que précédemment, avec une souche portant simultanément les allèles *pds5-GFP* et *wpl1-13myc*. Les images de la Figure 6 montrent que les signaux de fluorescence Wapl-13myc sont très largement distincts de ceux de Pds5-GFP. La localisation chromosomique de Wapl semble donc être distincte de celle des cohésines de la fraction stable. Cette observation suggère que la fraction stable de cohésine pourrait être créée par l'éviction de Wapl.

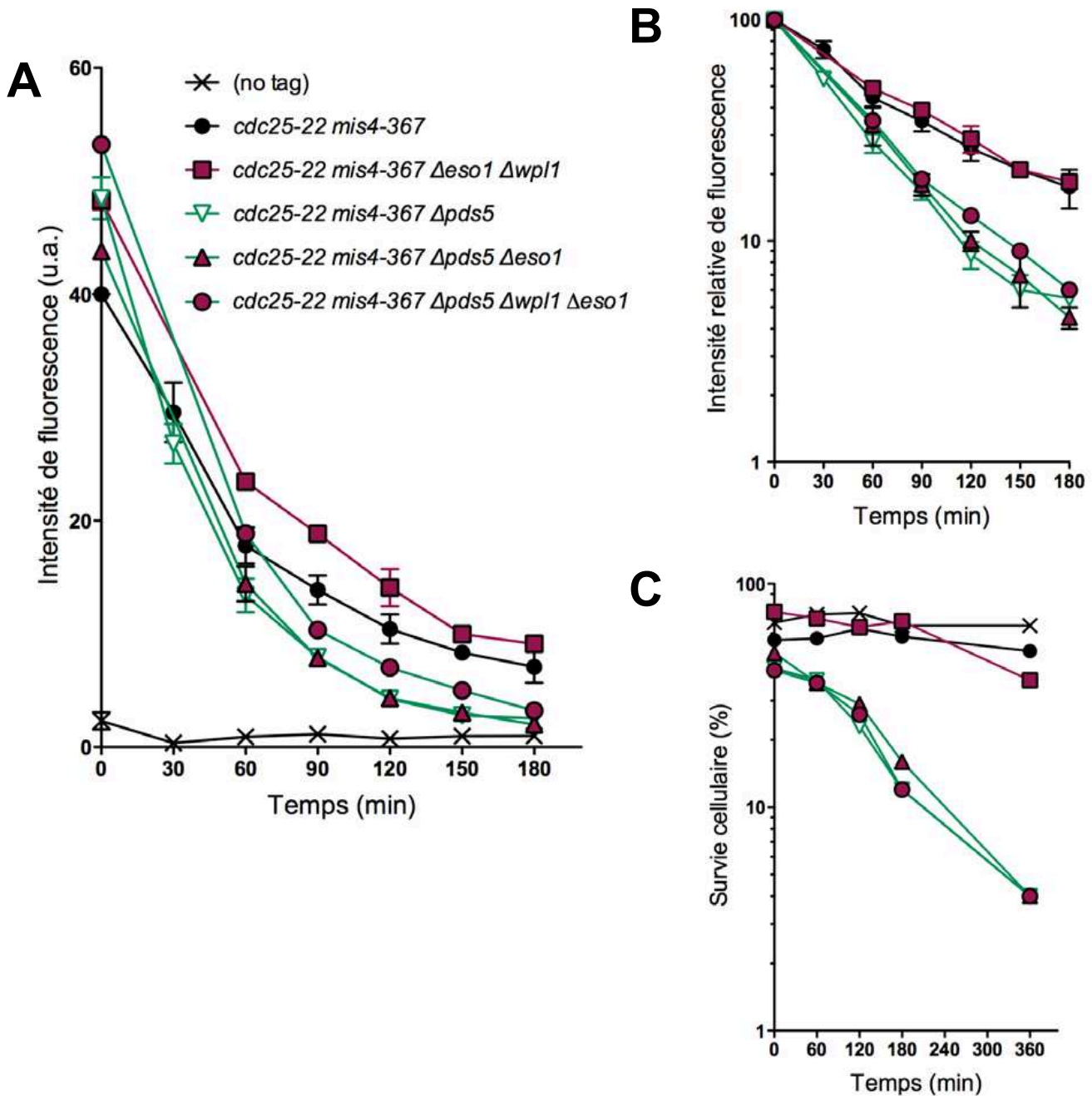
#### **E. Eso1 agit via Pds5**

La protéine Eso1 est impliquée dans l'établissement de la cohésion (Skibbens et al, 1999; Tanaka et al, 2000; Toth et al, 1999) et lorsque sa fonction est compromise, la fraction stable de cohésines est altérée ((Bernard et al, 2008) et cf. chapitre précédent). En l'absence de Pds5, nous avons observé des défauts de stabilité de l'interaction des cohésines à la chromatine comme c'est le cas dans un mutant d'*eso1*, ce qui soulève la question de savoir si Eso1 fonctionne en l'absence de Pds5.

##### **1) La cinétique de dissociation des cohésines en fond *Δpds5* est indépendante d'Eso1.**

De la même manière que précédemment, l'association des cohésines à la chromatine a été analysée par immunofluorescence indirecte sur des étalements de chromatine réalisés au cours d'un arrêt en phase G2. En parallèle, la viabilité des cellules est mesurée par leur capacité à





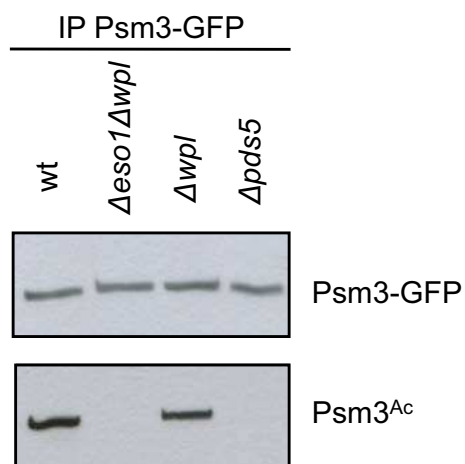
**Figure 7. La cinétique de dissociation de Rad21 de la chromatine en fond  $\Delta pds5$  est indépendante d'Eso1**

Les souches portant les mutations thermosensibles *cdc25-22* et *mis4-367* ont été cultivées à 25°C puis transférées à 36,5°C pour arrêter le chargement des cohésines par l'inactivation de la sous-unité Mis4 du complexe de chargement. L'allèle *cdc25-22* empêche l'entrée en mitose et induit un arrêt G2 strict. L'association de Rad21-9PK à la chromatine est mesurée aux temps indiqués par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps anti-PK sur des étalements de chromatine.

**A.** Cinétiques de dissociation de Rad21 de la chromatine. L'intensité de fluorescence de Rad21-9PK a été mesurée pour 40 à 100 noyaux par temps dans chaque expérience. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne de deux à quatre expériences indépendantes.

**B.** Chaque jeu de données a été normalisé par rapport à sa valeur au temps 0 (arbitrairement fixée à 100). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne de deux à quatre expériences indépendantes.

**C.** La viabilité des cellules est compromise en l'absence de Pds5. Les cellules sont récoltées aux temps indiqués et étalées à température permissive afin de déterminer le nombre de cellules viables.



**Figure 8. Pds5 est nécessaire à l'acétylation de Psm3**

Psm3-GFP a été immunopurifiée d'extraits protéiques de cellules sauvages,  $\Delta$ eso1  $\Delta$ wpl1,  $\Delta$ wpl1 et  $\Delta$ pds5. Le niveau d'acétylation de Psm3 a été examiné par immunoblot avec des anticorps anti-Psm3<sup>K106Ac</sup>, reconnaissant Psm3 lorsque K106 est acétylée. Un second immunoblot avec des anticorps anti-GFP montre que la quantité de Psm3-GFP immunoprécipitée est similaire pour toutes les souches.

former des colonies par étalement d'un nombre déterminé de cellules et croissance à température permissive (25°C). Les résultats sont présentés dans la Figure 7.

La cinétique de dissociation de Rad21 ainsi que la viabilité du double mutant *Apds5* *Δeso1* est très semblable à celle du simple mutant *Apds5*, indiquant qu'Eso1 ne peut stabiliser les cohésines qu'en présence de Pds5.

## 2) La protéine Psm3 n'est pas acétylée en l'absence de Pds5

La sous-unité Smc3 du complexe cohésine est un substrat de l'acétyl-transférase Eco1 (Ben-Shahar et al, 2008; Unal et al, 2008; Zhang et al, 2008a). L'acétylation concerne deux résidus lysines contiguës, très conservés, qui correspondent aux lysines 105 et 106 dans l'espèce humaine et chez *S. pombe* ((Zhang et al, 2008a) et chapitre précédent). Nous avons développé des anticorps polyclonaux contre le peptide RTIGLKK<sup>106Ac</sup>DEYSL et montré ainsi que l'acétylation de Psm3<sup>K106</sup> est dépendante d'Eso1 (Figure 7 et chapitre précédent). De manière remarquable, l'acétylation de K106 est indétectable dans un fond génétique *Apds5* (Fig. 8). L'acétylation de Psm3<sup>K106</sup> est donc dépendante de Pds5.

Une idée simple pouvant expliquer que Pds5 puisse être nécessaire à la fonction d'Eso1 serait qu'en l'absence de Pds5, Eso1 ne soit plus localisée correctement. Nous avons donc déterminé la quantité d'Eso1 associée à la chromatine en présence ou en l'absence de Pds5. Pour cela, des étalements de chromatine ont été réalisés sur des souches *eso1-GFP* et *eso1-GFP Apds5* au cours d'un arrêt en phase S (utilisation d'hydroxyurée), lorsque Eso1 exerce sa fonction essentielle. La quantité d'Eso1 associée à la chromatine est déterminée par immunofluorescence.

La quantité d'Eso1 associée à la chromatine n'est pas significativement modifiée par l'absence de Pds5, elle n'est donc pas dépendante de Pds5 (données non montrées). Il est cependant possible qu'en l'absence de Pds5 la localisation chromosomique d'Eso1 soit modifiée. Des expériences complémentaires (ChiP) sont nécessaires pour vérifier ce point.

L'ensemble de ces résultats nous indique que la protéine Pds5 semble être nécessaire à la fonction d'Eso1 dans la stabilisation de l'association des cohésines à la chromatine.





## ***Discussion***

Le chargement pré-répliatif des complexes cohésines sur la chromatine est un pré-requis indispensable à l'établissement de la cohésion. Dans un cycle cellulaire normal, c'est-à-dire sans dommage à l'ADN, la cohésion est établie en phase S, lors d'une réaction couplée à la réplication de l'ADN. Suite à l'inactivation du complexe de chargement en phase G1, la totalité des cohésines se dissocie de la chromatine. En revanche après la phase S, donc en phase G2, deux fractions de cohésines coexistent : une fraction labile, comme en phase G1, et une nouvelle fraction, stable. Le facteur d'établissement de la cohésion Eso1 est nécessaire à la formation de cette fraction de cohésines associées de manière stable à la chromatine (Bernard et al, 2008). Nous développons l'idée que la fraction stable est le produit de la réaction d'établissement de la cohésion.

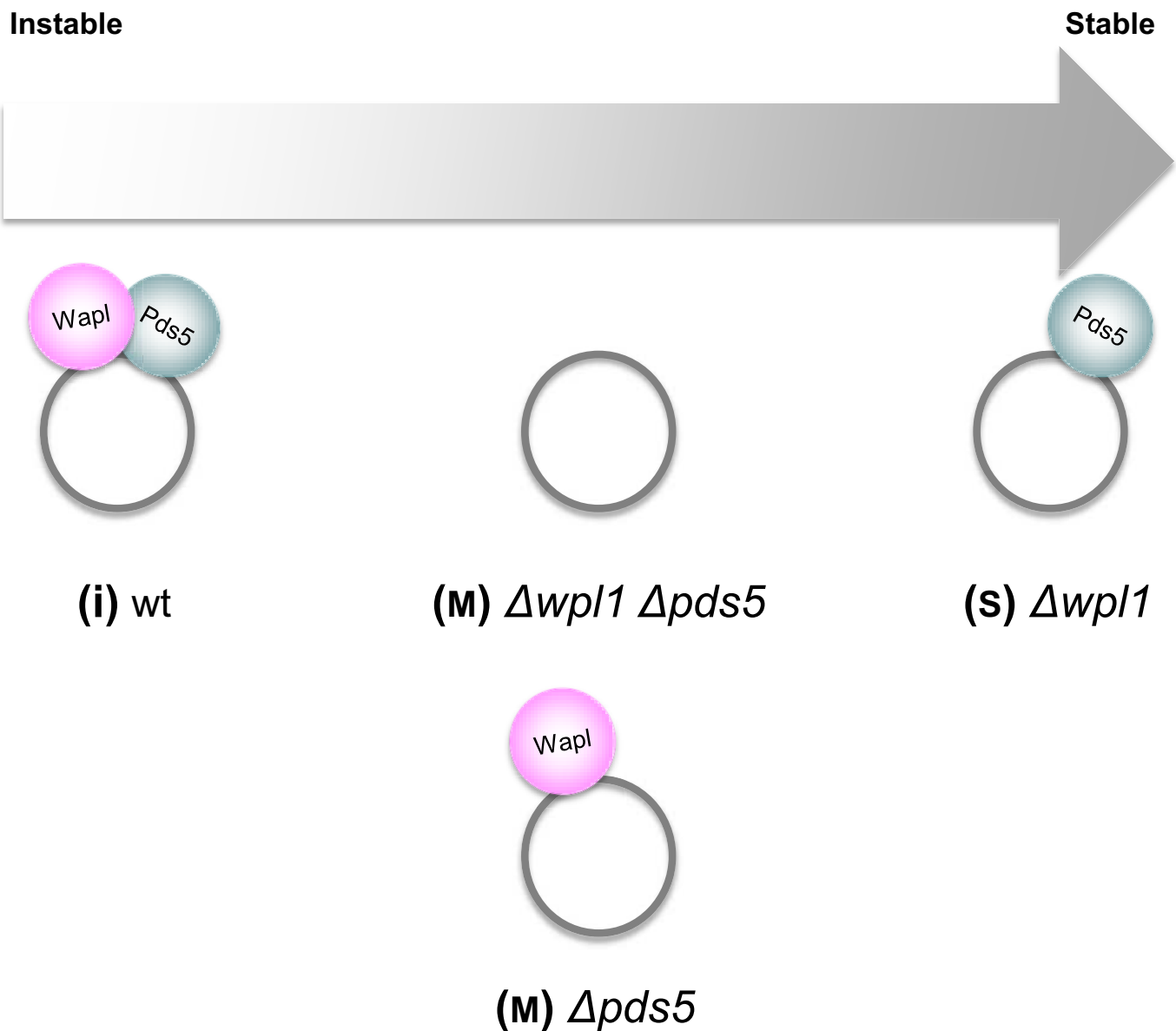
La fonction d'Eso1 est essentielle pour la viabilité et la création de la cohésion. Cependant, une souche  $\Delta pds5 \Delta eso1$  est viable. Il en résulte l'idée que Pds5 a une fonction d'anti-établissement qui doit être contrecarrée par Eso1. Cependant nos résultats indiquent que Pds5 est nécessaire au maintien de la cohésion et de l'association des cohésines à la chromatine à l'issue de la phase S. La protéine Pds5 semble avoir deux fonctions antagonistes : une fonction d'anti-établissement de la cohésion et une fonction de maintien de la cohésion.

## **Les fonctions antagonistes de Pds5 dans la régulation de l'association de la cohésines à la chromatine**

L'analyse des données obtenues en phase G1 du cycle cellulaire nous donne accès à la stabilité des complexes cohésines en fonction de leur association aux différents régulateurs Wapl et Pds5. L'expérience réalisée sur des chromosomes non répliqués a permis de s'affranchir de la réaction d'établissement de la cohésion et des modifications post-transcriptionnelles qui pourraient s'en suivre.

### **Pds5 est nécessaire à la fonction de Wapl dans la dissociation des cohésines des chromosomes**

En contexte  $pds5^+$ , la délétion de *wpl1* entraîne une stabilisation de l'association des cohésines à la chromatine. Wapl est donc impliquée dans la dissociation des cohésines des chromosomes. En l'absence de Pds5, la délétion de *wpl1* n'entraîne pas de stabilisation de l'association des cohésines à la chromatine. La fonction dissociatrice de Wapl est donc dépendante de la protéine Pds5. En accord avec cette idée, la délétion de *pds5* entraîne une stabilisation de l'association des cohésines à la chromatine en phase G1. On sait par ailleurs que



**Figure 9. Classement des différents niveaux de stabilité d'association des cohésines à la chromatine en phase G1**

Ce classement est obtenu par l'analyse du temps de demi-vie des complexes cohésine sur les chromosomes de phase G1. Le complexe dont l'association à la chromatine est la plus instable (i) correspond à une cohésine d'une souche sauvage. Il contient à la fois Pds5 et Wapl. Le complexe dont l'association à la chromatine est la plus stable (s) contient seulement Pds5. Il est obtenu dans une souche  $\Delta wpl1$ . Les cohésines dépourvues de Pds5 ont un niveau intermédiaire de stabilité d'association à la chromatine (M) (souches  $\Delta pds5$  et  $\Delta pds5 \Delta wpl1$ ).

Pds5 et Wapl forment un complexe. Ces résultats suggèrent que le complexe Wapl – Pds5 a une activité de dissociation des cohésines de la chromatine en phase G1.

#### Pds5 stabilise l'association des cohésines aux chromosomes en l'absence de Wapl

En contexte  $\Delta wpl1$  l'association des cohésines aux chromosomes est stabilisée. Dans ces conditions, la délétion de *pds5* déstabilise l'association des cohésines à la chromatine. Ces résultats indiquent qu'en l'absence de Wapl, Pds5 a une fonction de stabilisation de l'association des cohésines à la chromatine.

#### Régulation du niveau de stabilité de l'association des cohésines à la chromatine par les protéines Wapl et Pds5

Les résultats obtenus en phase G1 nous permettent d'établir un « classement » des complexes cohésines en fonction de leur stabilité d'association avec la chromatine (Fig. 9). Il est supposé que ces complexes existent, bien que nous ne l'ayons pas vérifié. Le plus instable (noté "I") est le complexe cohésine d'une souche sauvage, contenant le module dissociateur (à la fois Pds5 et Wapl). Viennent ensuite les complexes de stabilité intermédiaire, notés "M" (souches  $\Delta pds5$  ou  $\Delta pds5 \Delta wpl1$ ), ne contenant pas Pds5. Finalement, le complexe qui présente l'association la plus stable avec les chromosomes de phase G1, noté "S" (souche  $\Delta wpl1$ ) contient le module stabilisateur (Pds5 seul).

#### **Pds5 est nécessaire au maintien des cohésines sur les chromosomes**

Si l'établissement de la cohésion en phase S consiste en la stabilisation de l'interaction des cohésines avec la chromatine, ce classement suggère que le produit final serait un complexe cohésine conservant Pds5 mais dépourvu de Wapl. Les données issues de l'analyse de cellules post-répliquatives semblent aller dans ce sens. Nous avons vu que Pds5 est nécessaire à la viabilité des cellules lors d'un arrêt prolongé en phase G2. Des expériences complémentaires d'étalements de chromatine et de ChIP ont permis de montrer que Pds5 est nécessaire au maintien des cohésines sur la chromatine en phase G2. Cette fonction de Pds5 est corrélée à celle dans le maintien de la cohésion des chromatides sœurs, décrite par Tanaka (Tanaka et al, 2001). La protéine Pds5 est donc nécessaire à la cohésion à long terme ainsi qu'au maintien de l'association des cohésines à la chromatine. En accord avec cette notion, la protéine Pds5 co-localise avec les cohésines de la fraction stable, ce qui n'est pas le cas de la protéine Wapl. Ces données suggèrent que la liaison de Pds5 aux cohésines est continuellement requise pour les maintenir associées à la chromatine. L'inactivation de Pds5 spécifiquement en phase G2 permettrait de confirmer ce point et les données obtenues chez *S. cerevisiae* sont en accord avec cette notion (Panizza et al, 2000; Sutani et al, 2009).



La délétion de *pds5* n'est cependant létale que lors d'un arrêt prolongé en phase G2. Nous montrons qu'en effet, la dissociation des cohésines est corrélée avec la perte de viabilité. C'est un processus relativement lent, ce qui explique vraisemblablement pourquoi les cellules  $\Delta pds5$  restent viables lorsqu'elles cyclent activement. Les cellules  $\Delta pds5$  seraient donc figées dans la situation "M". Il en est de même des cellules  $\Delta pds5 \Delta wpl1$ , confirmant l'épistasie observée en G1, ce qui suggère que Wapl agit *via* Pds5.

### **Pds5 est nécessaire à la fonction du facteur d'établissement de la cohésion, Eso1**

Nous avons vu qu'en l'absence de Pds5, Psm3 n'était pas acétylée et la délétion d'*eso1* ne modifie pas la cinétique de dissociation des cohésines, ce qui suggère qu'Eso1 n'agit pas en l'absence de Pds5. L'analyse des données obtenues en phase G1 suggère qu'en l'absence de Pds5, l'interaction des cohésines avec la chromatine resterait figée dans un état semi-stable, "M". L'épistasie de  $\Delta pds5$  sur  $\Delta eso1$  suggère ainsi qu'Eso1 ne modifie pas cet état. Une interprétation possible serait que la fonction d'Eso1 nécessite Pds5. En accord avec cette idée, Pds5 et Eso1 interagissent en double hybride (Tanaka et al, 2001). Eso1-H17<sup>ts</sup> interagit également en double hybride avec Pds5 mais cette interaction est perdue à température restrictive (Tanaka et al, 2001). Une possibilité serait que Pds5 est nécessaire au recrutement d'Eso1 sur la chromatine. Des expériences préliminaires indiquent cependant que la quantité d'Eso1 associée aux chromosomes n'est pas dépendante de Pds5. Il reste néanmoins à savoir si la localisation chromosomique d'Eso1 n'est pas altérée par l'absence de Pds5, notamment aux fourches de réplication. Un autre problème potentiel pouvant obscurcir la relation entre Pds5 et Eso1 est la présence d'un domaine polymérase $\eta$  dans Eso1. Des données indiquent que ce dernier n'est pas nécessaire à la fonction de cohésion (Tanaka et al, 2000). Il reste cependant possible que le domaine polymérase confère à Eso1 des localisations chromosomiques qui ne sont pas pertinentes de la fonction d'établissement de la cohésion.

### **Comment expliquer que les fonctions de Pds5 semblent si différentes chez *S. cerevisiae* ?**

La fonction de Pds5 dans le maintien de la cohésion est conservée dans les différents organismes. Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation de Pds5 ou de Wapl diminue la quantité de cohésines associée à la chromatine (Rowland et al, 2009; Sutani et al, 2009). La délétion de *PDS5* est létale (Hartman et al, 2000; Panizza et al, 2000) tandis que la délétion de *RAD61* (*WPL1*) provoque des défauts de cohésion (Sutani et al, 2009). En revanche, chez *S. pombe* et dans les cellules de mammifères, Wapl promeut la dissociation des cohésines de la chromatine (Bernard et al, 2008; Kueng et al, 2006). La délétion de *wpl1* chez *S. pombe* ne provoque pas de



défauts de cohésion (cf. chapitre III) tandis que la délétion de *pds5* ne compromet pas la viabilité cellulaire dans des conditions normales de croissance (Tanaka et al, 2001; Wang et al, 2002). En l'absence de Pds5, la fonction de Wapl est compromise et l'interaction des complexes cohésines à la chromatine est à un niveau de stabilité intermédiaire, noté "M" (souches  $\Delta pds5$  ou  $\Delta pds5 \Delta wpl1$ ) (Fig. 9). La fonction de Wapl semble donc distincte entre ces deux organismes. Le fait que Pds5 et Wapl soient présentes dans un même complexe permet de suggérer que c'est la fonction du complexe qui est conservée mais pas nécessairement les fonctions attribuées à chaque protéine individuellement. Inactiver l'un des membres du complexe pourrait alors perturber la fonction du second. La situation chez *S. pombe* serait ainsi très exceptionnelle car la délétion de *wpl1* ne semble pas affecter la fonction de Pds5 dans la stabilisation de l'association des cohésines à la chromatine. On peut imaginer qu'*a contrario* chez *S. cerevisiae*, la perte de Wapl affecte la fonction de stabilisation de Pds5. En conclusion, les fonctions du module Wapl-Pds5 seraient conservées mais le partage des fonctions entre les deux partenaires a pu être modifié au cours de l'évolution.

Les données de la littérature et celles présentées dans ce chapitre soulignent la dualité de fonction de Pds5. La protéine Pds5 est nécessaire à la fonction de Wapl ce qui conduit à déstabiliser l'interaction des cohésines avec la chromatine. À l'opposé, Pds5 est requise pour une interaction stable des cohésines avec la chromatine. De façon remarquable, Wapl semble être exclue des cohésines de la fraction stable. Enfin, Pds5 apparaît nécessaire à la fonction d'Eso1. Cette dualité suggère que Pds5 puisse être l'élément clef de la transition opérée lors de l'établissement de la cohésion.

Le chapitre suivant propose un modèle de travail qui prend en compte les données présentées dans l'ensemble de ce manuscrit.





## Chapitre V : Discussion générale et perspectives

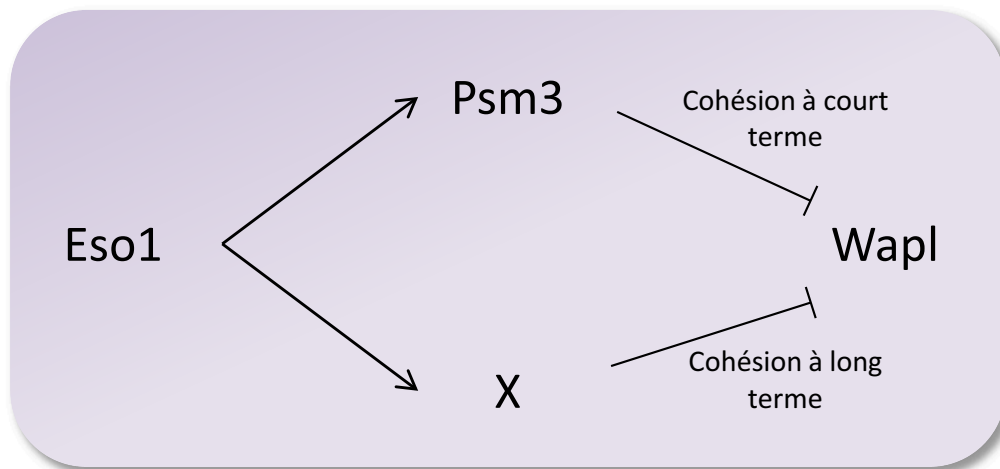
La cohésion des chromatides sœurs est un processus essentiel à la viabilité cellulaire et la plupart des facteurs impliqués sont conservés au cours de l'évolution. Le chargement pré-répliatif des complexes cohésines sur la chromatine est un pré-requis indispensable à l'établissement de la cohésion. Au cours d'un cycle cellulaire normal (autrement dit sans dommage à l'ADN), la cohésion est établie uniquement au cours de la phase S, lors d'une réaction couplée à la réplication. La cohésion est ensuite maintenue tout au long de la phase G2 et elle est finalement détruite en mitose pour permettre la ségrégation des chromatides sœurs. Une question fondamentale dans cette thématique est de comprendre comment la cohésion est établie au cours de la phase S.

Les paragraphes qui suivent ont pour but d'élaborer progressivement un modèle permettant de rendre compte de nos données ainsi que de celles obtenues dans les autres organismes modèles.

### Le modèle de travail avec deux événements en aval d'Eso1

En phase G1, l'intégralité des cohésines est associée de manière labile à la chromatine. En revanche, lorsque les cellules progressent à travers la phase S, une fraction d'entre elles est stabilisée. À l'issue de la phase S (en phase G2), deux fractions de cohésines co-existent sur la chromatine : une fraction labile (comme en phase G1) et une fraction associée de manière stable. L'établissement de la cohésion en phase S s'accompagne donc de la stabilisation de l'association des cohésines sur la chromatine. Ceci suggère que cette stabilisation pourrait être le produit de la réaction d'établissement de la cohésion. Nous avons montré chez *S. pombe* que la fonction d'Eso1 est nécessaire à la stabilisation de l'association des cohésines aux chromosomes (Bernard et al, 2008). La protéine Wapl est quant à elle impliquée dans la dissociation des cohésines de la chromatine (Bernard et al, 2008; Kueng et al, 2006). La délétion d'*eso1* est létale en contexte *wpl1*<sup>+</sup> mais Eso1 est dispensable en l'absence de Wapl et les cellules  $\Delta eso1 \Delta wpl1$  n'ont pas de défauts de cohésion (cf. chapitre III). Ces données indiquent que la principale fonction d'Eso1 est de contrecarrer la fonction de Wapl. Quel est le mécanisme moléculaire par lequel Eso1 contrecarre la fonction de Wapl ? La sous-unité Smc3 du complexe cohésine (Psm3 chez *S. pombe*) est acétylée par Eco1 ce qui fait d'elle un candidat évident.

De manière remarquable, nos données indiquent que tandis que le gène *eso1* est essentiel à la viabilité cellulaire, une souche dans laquelle Psm3 ne peut pas être acétylée (*psm3<sup>RR</sup>*) est viable et compétente pour la stabilisation des cohésines ainsi que pour la cohésion à long terme. Ceci suggère que l'acétylation de Psm3 n'est pas la seule fonction d'Eso1. Néanmoins, lorsque



**Figure 1. Modèle de travail avec deux évènements d’acétylation en aval d’Eso1**

La fonction principale d’Eso1 est de contrecarrer Wapl. Le facteur d’établissement de la cohésion Eso1 acétyle deux protéines : Psm3 et une protéine inconnue. Chacune de ces acétylation contribue à contrecarrer la fonction de Wapl, mais l’acétylation des deux cibles d’Eso1 contrecarre totalement la fonction de Wapl. Acétyler seulement Psm3 permet de former une cohésion à court terme, tandis que l’acétylation de la protéine X permet la cohésion à long terme.

Psm3 ne peut pas être acétylée ( $psm3^{RR}$ ), la part de la fraction stable est réduite, et des défauts de cohésion sont mesurés lors d'un arrêt en métaphase. Ces défauts sont totalement supprimés par la délétion du gène *wpl1*. Nous en avons conclu que lorsque Psm3 ne peut pas être acétylée, Wapl génère un défaut d'association des cohésines aux chromosomes et de cohésion des chromatides sœurs. Par conséquent, l'acétylation de Psm3 contribue à contrecarrer la fonction de Wapl.

Dans la souche  $eso1^+ psm3^{NN}$  la quantité de cohésines associées aux chromosomes et leur stabilité ne sont pas significativement affectées par la présence de Wapl, suggérant que l'acétylation de Psm3 rend les cohésines moins sensibles à Wapl. Les allèles de Psm3 mimant l'état acétylé ( $psm3^{NN}$ ) permettent la survie cellulaire en l'absence d'Eso1, ce qui suggère que l'association des cohésines aux chromosomes post-réplicatifs est stabilisée dans une certaine mesure. Cependant dans la souche  $\Delta eso1 psm3^{NN}$ , la fraction de cohésines associées de manière stable aux chromosomes est altérée car elle s'érode au cours d'un arrêt en phase G2 et la viabilité cellulaire chute. Ce n'est pas le cas dans la souche  $eso1^+ psm3^{NN}$ , où une fraction de cohésines est associée de manière stable aux chromosomes post-réplicatifs, ce qui suggère encore une fois l'existence d'une autre fonction d'Eso1. La délétion de *wpl1* dans la souche  $\Delta eso1 psm3^{NN}$  améliore à la fois la stabilisation des cohésines sur la chromatine et la viabilité cellulaire. Ceci est cohérent avec la notion que l'acétylation de Psm3 contribue à contrecarrer Wapl, mais elle n'est pas suffisante pour contrecarrer totalement la fonction de Wapl et seulement une partie de la fonction d'Eso1 est effectuée *via* l'acétylation de Psm3.

De l'ensemble de ces données nous proposons que l'acétylation de Psm3 par Eso1 contribue à contrecarrer Wapl. Cette seule acétylation permet d'augmenter la stabilité de l'association des cohésines à la chromatine mais ne produit pas un haut degré de stabilisation. Nous suggérons que la cohésion à long terme entre les chromatides sœurs requiert un autre événement moléculaire dépendant d'Eso1 pour assurer la stabilisation de l'association des cohésines sur les chromosomes post-réplicatifs. Cet événement supplémentaire en aval d'Eso1 pourrait consister en l'acétylation d'une autre cible, inconnue (Fig. 1), ou en une autre fonction, également inconnue. La protéine Wapl contrecarre la stabilisation des cohésines sur la chromatine et la formation d'une cohésion à long terme. Comment les événements réalisés par Eso1 contrecarrent-ils Wapl ? Nos données suggèrent que la fraction de cohésines associée de manière stable aux chromosomes contient Pds5 mais a évincé Wapl. En accord avec cette idée, il a été proposé que la fonction d'Eco1 ou plus particulièrement l'acétylation de Psm3 pourrait diminuer l'interaction des cohésines avec Wapl (Sutani et al, 2009; Terret et al, 2009). De plus, nos données indiquent que Pds5 est nécessaire au maintien des cohésines sur les chromosomes (cf. chapitre IV). Enfin, en l'absence de Wapl, nous avons vu que Pds5 aurait une fonction de

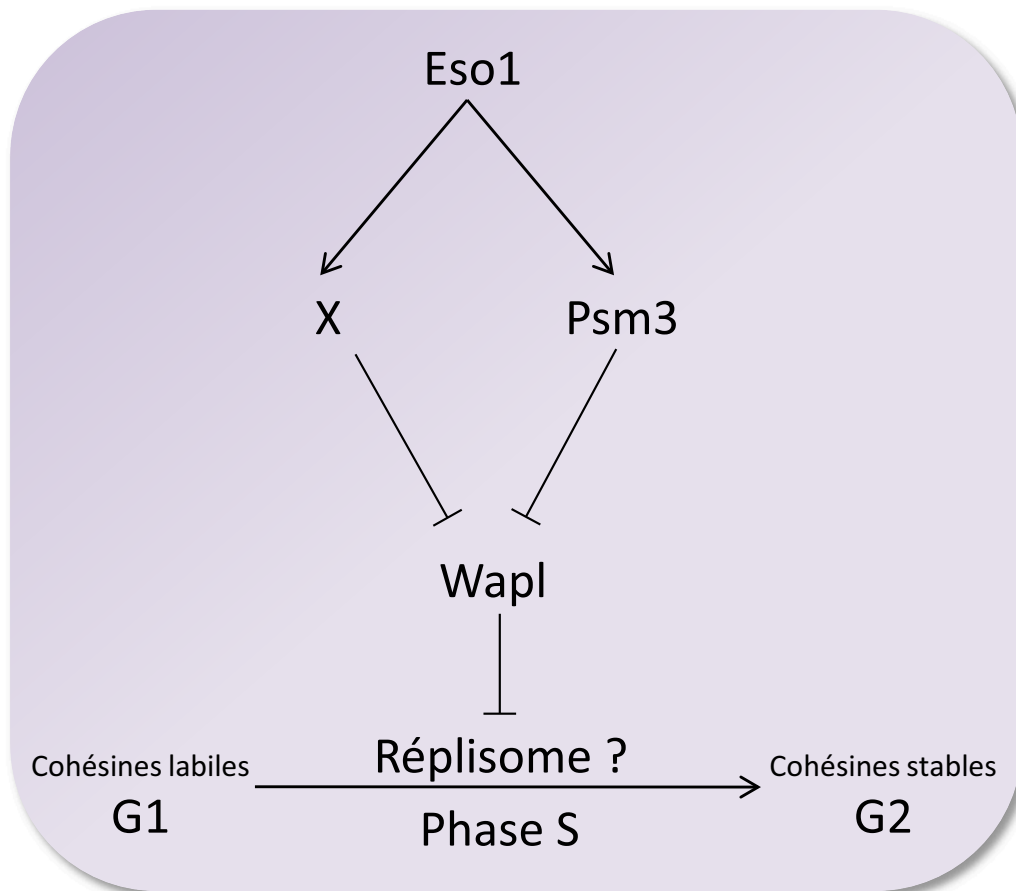


stabilisation (cf. chapitre IV). Il semble donc crucial de conserver la protéine Pds5 associée aux complexes cohésines destinés à faire la cohésion des chromatides sœurs. On peut envisager que les deux événements en aval d'Eso1 induisent l'éviction de Wapl tout en conservant la protéine Pds5, qui stabilise l'interaction cohésine-chromatine en l'absence de Wapl.

### **Est-ce réellement Eso1 qui effectue la stabilisation des cohésines sur la chromatine ?**

Dans une souche sauvage, le facteur d'établissement de la cohésion Eso1 est essentiel pour contrecarrer la fonction de Wapl et ainsi permettre la stabilisation de l'interaction cohésines-chromatine. Notre modèle suppose que cette stabilisation est obtenue par deux événements en aval d'Eso1, conduisant à évincer Wapl tout en conservant Pds5. Cependant, nous avons vu que la délétion simultanée d'*eso1* et de *wpl1* n'a pas d'incidence sur la cohésion ni le pattern de stabilisation des cohésines sur la chromatine par rapport à une souche sauvage (cf. chapitre III). Ce modèle peut-il rendre compte de la non-essentialité du module Eso1-Wapl ? Deux cas de figure sont envisageables en l'absence simultanée d'Eso1 et de Wapl :

Une première possibilité est que dans une souche  $\Delta eso1 \Delta wpl1$ , les cohésines interagissent de manière stable avec la chromatine dès la phase G1 du cycle cellulaire. Par conséquent, le pattern de stabilisation des cohésines sur la chromatine serait prédéfini et ceci ne serait pas un obstacle à la réplication. L'établissement de la cohésion des chromatides sœurs aurait lieu lors du passage du réplisome à l'intérieur des complexes cohésines et consisterait en la capture des chromatides sœurs émergeant de la fourche de réplication. L'éviction de Wapl n'a pas lieu d'être (*wpl1* est délété) et le complexe final est stable. De manière similaire, dans une souche sauvage, la seule inactivation de Wapl par Eso1 produirait la stabilisation de l'interaction cohésines-chromatine. Les événements en aval d'Eso1 provoqueraient l'éviction de Wapl, tandis que le simple passage du réplisome au travers des complexes cohésines permettrait la capture des deux chromatides sœurs à l'intérieur d'un même complexe. En revanche en l'absence de l'acétyltransférase, le produit final serait le même que le produit initial : des cohésines activement dissociées par Wapl et donc incapables de maintenir la cohésion. Ces prédictions sont faites dans l'hypothèse où les cohésines sont associées à la chromatine dans le mode stable dès la phase G1 dans une souche  $\Delta eso1 \Delta wpl1$ . Ceci n'est vraisemblablement pas le cas. Nous avons vu qu'en l'absence de Wapl, la demi-vie des cohésines était augmentée en phase G1 mais elles ne sont pas stables pour autant (ce qui est également vrai dans des cellules de mammifère (Kueng et al, 2006)). Les cinétiques de dissociation suggèrent fortement qu'il n'y a pas de fraction stable en phase G1 dans une souche  $\Delta wpl1$ . On peut supposer qu'il en est de même dans une souche  $\Delta wpl1 \Delta eso1$  en phase G1.



**Figure 2. Modèle de travail avec deux évènements essentiels à la stabilisation des cohésines sur la chromatine**

La réalisation des fonctions d'Eso1 contrecarre totalement la fonction de Wapl. La stabilisation des cohésines est effectuée par un facteur inconnu (par exemple le réplisome). En l'absence d'Eso1, la protéine Wapl inhibe la stabilisation des cohésines par le réplisome.

Si en effet, dans une souche *Δesol Δwpl1*, les cohésines ne sont pas associées à la chromatine dans le mode stable dès la phase G1, alors contrecarrer la fonction de Wapl ne serait pas suffisant pour créer la fraction de cohésines associée de façon stable à la chromatine. Dans une souche *Δesol Δwpl1*, les cohésines seraient labiles en G1 mais pour autant nous savons qu'elles sont correctement stabilisées à l'issue de la phase S. Le processus fondamental par lequel les cohésines sont stabilisées et la cohésion créée s'opère donc indépendamment du module Eso1-Wapl. Il faut alors postuler l'existence d'un autre facteur (inconnu) qui va induire la transition vers le mode stable d'association des cohésines à la chromatine. Pourtant en présence de Wapl, la protéine Eso1 est essentielle à ce processus. Le processus de stabilisation interviendrait au cours de la phase S mais ne permettrait pas de rendre les cohésines insensibles à Wapl. L'unique mais essentielle fonction d'Eso1 serait de contrecarrer Wapl au moment de la phase S pour rendre les cohésines insensibles à son activité de dissociation.

Un candidat est Psc3 (Scc3 chez *S. cerevisiae*). Curieusement, Psc3 n'est pas trouvée associée au complexe cohésine chez *S. pombe* dans des expériences d'immunoprécipitation (Tomonaga et al, 2000). Elle pourrait n'être associée qu'aux cohésines de la fraction stable où son rôle pourrait être de catalyser la transition vers le mode stable. Il est troublant de constater que Psc3 interagit en double hybride avec Swi6 (Nonaka et al, 2002) et que les domaines hétérochromatiques constituent 50% de la fraction stable de cohésines. De plus, le gène *SCC3* de *S. cerevisiae* fait partie des *loci* suppresseurs d'*eco1<sup>ts</sup>* (Rowland et al, 2009) et c'est également le cas chez *S. pombe* (Sabine Vaur, communication personnelle).

Un second candidat (non exclusif) est la machinerie de réplication. De nombreux facteurs liés à la machinerie de réplication ont été impliqués dans l'établissement de la cohésion. On peut envisager que le processus de stabilisation soit produit par le réplisome, suite à une modification post-traductionnelle des cohésines (phosphorylation – sumoylation). Par exemple, la DDK (Dfp1-dépendent kinase) Hsk1 interagit avec Swi6 *via* sa sous-unité régulatrice Dfp1 et l'abrogation de cette interaction crée des défauts de cohésion chez *S. pombe* (Bailis et al, 2003; Bailis & Forsburg, 2004). En tenant compte de ces observations et spéculations, l'établissement de la cohésion dans une souche sauvage aurait lieu à l'intérieur du réplisome. En amont du réplisome, le mode d'interaction des cohésines aux chromosomes serait labile. Le réplisome induirait une stabilisation du complexe cohésine coordonné à l'émergence des chromatides sœurs de façon à les capturer. De manière concomitante, Eso1 agirait par l'acétylation de ses cibles ce qui provoquerait l'éviction définitive de Wapl tout en conservant Pds5. Dans le même temps, Psc3 (ou un autre facteur) pourrait être incorporé aux complexes cohésines et le produit final serait associé de façon très stable aux chromosomes.





En conclusion, la protéine Eso1 doit contrecarrer totalement la fonction de Wapl (autrement dit Eso1 doit effectuer ses deux fonctions) pour que Psc3 (par exemple) et/ou le réplisome stabilise l'interaction des cohésines avec la chromatine (Fig. 2).

### **Que se passe-t-il lorsque la protéine Eso1 inhibe partiellement Wapl ?**

Tandis qu'une souche  $\Delta eso1 psm3^{RR}$  n'est pas viable, la souche  $eso1^+ psm3^{RR}$  est viable. Ceci est en accord avec l'idée que dans une souche  $eso1^+ psm3^{RR}$ , Psm3 ne peut pas être acétylée tandis que la seconde fonction d'Eso1 pourrait être réalisée. Dans ces conditions, nous avons vu que les cohésines post-répliquatives sont associées de façon stable à la chromatine mais leur quantité est réduite et il existe des défauts de cohésion (cf. chapitre III). Réciproquement, dans une souche  $\Delta eso1 psm3^{NN}$ , le variant de Psm3 mime l'état acétylé mais la seconde fonction d'Eso1 n'est pas réalisée. Il en résulte que les cohésines se dissocient au cours du temps dans un arrêt G2 (cf. chapitres III et IV). Un effet poison semble donc être obtenu lorsque l'une des deux fonctions d'Eso1 n'est pas réalisée. L'effet poison peut se concevoir si la réaction de stabilisation du complexe cohésine à l'intérieur du réplisome est ralentie et/ou inefficace à générer le produit final. Ceci pourrait provoquer un découplage de la réaction de stabilisation avec la réplication, générant des complexes cohésines non stabilisés (donc labiles et ne fournissant pas de cohésion à long terme, comme dans la souche  $\Delta eso1 psm3^{NN}$ ) mais aussi des complexes stables mais n'ayant pas capturé les deux chromatides sœurs ( $eso1^+ psm3^{RR}$ ). C'est le ralentissement de la réaction de stabilisation du complexe cohésine qui induirait un ralentissement de la vitesse de réplication, comme observé dans les cellules humaines lorsque Smc3 n'est pas acétylée (Terret et al, 2009). Bien que très spéculatif, ce modèle permet de rendre compte des observations.

L'idée qui se dégage est que la réaction de stabilisation nécessite notamment deux (au moins) événements en aval d'Eso1 mais si l'un des deux est absent, la réaction de stabilisation pourrait être ralentie. Ceci aurait pour conséquence un découplage de la réaction de stabilisation avec la progression du réplisome, provoquant des défauts d'établissement de cohésion.

### **Quelle est la fonction du module Wapl-Eso1 ?**

Nous avons montré que la fonction d'Eso1 est dispensable lorsque le gène *wpl1* est délété et la délétion des deux gènes n'a peu, voire pas d'impact sur la cohésion des chromatides sœurs (cf. chapitre III). En l'absence du module Eso1-Wapl l'établissement de la cohésion des chromatides sœurs et son maintien ne sont donc pas compromis. Le pattern de localisation des cohésines associées de manière stable n'est globalement pas altéré. Le mode d'interaction des cohésines aux chromosomes post-répliquatifs est donc largement indépendant du module Wapl-Eso1.



Pourquoi ces deux gènes sont-ils conservés ? Nous avons centré notre intérêt sur la fraction stable de cohésines, mais qu'en est-il de la fraction labile ? Il est clair que la délétion de Wapl augmente leur temps de résidence sur la chromatine, sans pour autant les figer complètement. On peut imaginer qu'un module formé par deux activités antagonistes ait le potentiel de réguler finement la dynamique des cohésines. Wapl semble promouvoir constitutivement la dissociation des cohésines, tandis qu'Eso1 peut-être par l'acétylation de multiples substrats, pourrait contrecarrer Wapl et promouvoir globalement ou localement une augmentation du niveau de stabilité de l'interaction cohésines - chromatine et une cohésion de type intermédiaire (avec des cohésines dont le mode d'interaction avec la chromatine est semi-stable). Une telle dynamique pourrait réguler l'association des cohésines à la chromatine dans l'espace, dans le temps et dans le niveau de stabilité. Le module Eso1-Wapl pourrait fournir un pool de cohésines rapidement mobilisable par l'inactivation de Wapl, par exemple en cas de cassure double-brin de l'ADN. Les données obtenues chez *S. cerevisiae* vont dans ce sens. En l'absence de Wapl, une cohésion peut être générée *de novo* en G2 et ce même en l'absence de cassures double-brin d'ADN (Heidinger-Pauli et al, 2009). On peut encore imaginer que le module Eso1-Wapl pourrait être requis dans la régulation de l'expression génique. Récemment, les cohésines ont été impliquées dans la création de boucles de chromatine. Celles-ci favorisent l'interaction enhanceur - promoteur ou *a contrario*, permettent d'isoler l'enhancer (Kagey et al, 2010; Parelho et al, 2008; Wendt et al, 2008). Une interaction modulable des cohésines (*via* le module acétyltransférase – Wapl) permettrait ainsi de conférer une régulation dynamique de l'expression génique.



## Bibliographie

- Adachi Y, Kokubu A, Ebe M, Nagao K, Yanagida M (2008) Cut1/separase-dependent roles of multiple phosphorylation of fission yeast cohesion subunit Rad21 in post-replicative damage repair and mitosis. *Cell Cycle* **7**(6): 765-776
- Alvarez B, Moreno S (2006) Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J Cell Sci* **119**(Pt 21): 4475-4485
- Arumugam P, Gruber S, Tanaka K, Haering CH, Mechtler K, Nasmyth K (2003) ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol* **13**(22): 1941-1953
- Atienza JM, Roth RB, Rosette C, Smylie KJ, Kammerer S, Rehbock J, Ekblom J, Denissenko MF (2005) Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **4**(3): 361-368
- Ayte J, Leis JF, Herrera A, Tang E, Yang H, DeCaprio JA (1995) The Schizosaccharomyces pombe MBF complex requires heterodimerization for entry into S phase. *Mol Cell Biol* **15**(5): 2589-2599
- Bailis JM, Bernard P, Antonelli R, Allshire RC, Forsburg SL (2003) Hsk1-Dfp1 is required for heterochromatin-mediated cohesion at centromeres. *Nat Cell Biol* **5**(12): 1111-1116
- Bailis JM, Forsburg SL (2004) S phase assembly of centromeric heterochromatin and cohesion. *Cell Cycle* **3**(4): 416-418
- Balakrishnan L, Gloor JW, Bambara RA (2010) Reconstitution of eukaryotic lagging strand DNA replication. *Methods* **51**(3): 347-357
- Bausch C, Noone S, Henry JM, Gaudenz K, Sanderson B, Seidel C, Gerton JL (2007) Transcription alters chromosomal locations of cohesin in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **27**(24): 8522-8532
- Beauchene NA, Diaz-Martinez LA, Furniss K, Hsu WS, Tsai HJ, Chamberlain C, Esponda P, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ (2010) Rad21 is required for centrosome integrity in human cells independently of its role in chromosome cohesion. *Cell Cycle* **9**(9): 1774-1780
- Bell SP, Stillman B (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**(6374): 128-134
- Ben-Shahar TR, Heeger S, Lehane C, East P, Flynn H, Skehel M, Uhlmann F (2008) Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* **321**(5888): 563-566
- Bernard P, Drogat J, Maure JF, Dheur S, Vaur S, Genier S, Javerzat JP (2006) A screen for cohesion mutants uncovers Ssl3, the fission yeast counterpart of the cohesin loading factor Scc4. *Curr Biol* **16**(9): 875-881
- Bernard P, Hardwick K, Javerzat JP (1998) Fission yeast bub1 is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. *J Cell Biol* **143**(7): 1775-1787
- Bernard P, Maure JF, Javerzat JP (2001a) Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **3**(5): 522-526
- Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC (2001b) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* **294**(5551): 2539-2542
- Bernard P, Schmidt CK, Vaur S, Dheur S, Drogat J, Genier S, Ekwall K, Uhlmann F, Javerzat JP (2008) Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes. *Embo J* **27**(1): 111-121
- Birkenbihl RP, Subramani S (1992) Cloning and characterization of rad21 an essential gene of Schizosaccharomyces pombe involved in DNA double-strand-break repair. *Nucleic Acids Res* **20**(24): 6605-6611



- Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F, Nasmyth K (2000) Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* **103**(3): 387-398
- Caligiuri M, Beach D (1993) Sct1 functions in partnership with Cdc10 in a transcription complex that activates cell cycle START and inhibits differentiation. *Cell* **72**(4): 607-619
- Carlson CR, Grallert B, Stokke T, Boye E (1999) Regulation of the start of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **112** ( Pt 6): 939-946
- Chang CR, Wu CS, Hom Y, Gartenberg MR (2005) Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. *Genes Dev* **19**(24): 3031-3042
- Choi JH, Li Y, Guo J, Pei L, Rauch TA, Kramer RS, Macmil SL, Wiley GB, Bennett LB, Schnabel JL, Taylor KH, Kim S, Xu D, Sreekumar A, Pfeifer GP, Roe BA, Caldwell CW, Bhalla KN, Shi H Genome-wide DNA methylation maps in follicular lymphoma cells determined by methylation-enriched bisulfite sequencing. *PLoS One* **5**(9)
- Chu Z, Eshaghi M, Poon SY, Liu J (2009) A Cds1-mediated checkpoint protects the MBF activator Rep2 from ubiquitination by anaphase-promoting complex/cyclosome-Ste9 at S-phase arrest in fission yeast. *Mol Cell Biol* **29**(18): 4959-4970
- Ciosk R, Shirayama M, Shevchenko A, Tanaka T, Toth A, Shevchenko A, Nasmyth K (2000) Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell* **5**(2): 243-254
- Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D (1996) Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**(24): 3081-3093
- Denison SH, Kafer E, May GS (1993) Mutation in the bimD gene of *Aspergillus nidulans* confers a conditional mitotic block and sensitivity to DNA damaging agents. *Genetics* **134**(4): 1085-1096
- Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ (2007) Regulation of centromeric cohesion by sororin independently of the APC/C. *Cell Cycle* **6**(6): 714-724
- Diffley JF, Cocker JH, Dowell SJ, Harwood J, Rowley A (1995) Stepwise assembly of initiation complexes at budding yeast replication origins during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl* **19**: 67-72
- Donze D, Adams CR, Rine J, Kamakaka RT (1999) The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **13**(6): 698-708
- Dorsett D (2009) Cohesin, gene expression and development: lessons from *Drosophila*. *Chromosome Res* **17**(2): 185-200
- Dorsett D, Eissenberg JC, Misulovin Z, Martens A, Redding B, McKim K (2005) Effects of sister chromatid cohesion proteins on cut gene expression during wing development in *Drosophila*. *Development* **132**(21): 4743-4753
- Eckert CA, Gravidahl DJ, Megee PC (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**(3): 278-291
- Errico A, Cosentino C, Rivera T, Losada A, Schwob E, Hunt T, Costanzo V (2009) Tipin/Tim1/And1 protein complex promotes Pol alpha chromatin binding and sister chromatid cohesion. *Embo J* **28**(23): 3681-3692
- Fantes P, Nurse P (1977) Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp Cell Res* **107**(2): 377-386
- Funabiki H, Kumada K, Yanagida M (1996) Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *Embo J* **15**(23): 6617-6628
- Furuya K, Takahashi K, Yanagida M (1998) Faithful anaphase is ensured by Mis4, a sister chromatid cohesion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase. *Genes Dev* **12**(21): 3408-3418





- Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* **8**(4): 358-366
- Gandhi R, Gillespie PJ, Hirano T (2006) Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol* **16**(24): 2406-2417
- Geck P, Szelei J, Jimenez J, Sonnenschein C, Soto AM (1999) Early gene expression during androgen-induced inhibition of proliferation of prostate cancer cells: a new suppressor candidate on chromosome 13, in the BRCA2-Rb1 locus. *J Steroid Biochem Mol Biol* **68**(1-2): 41-50
- Gerlich D, Koch B, Dupeux F, Peters JM, Ellenberg J (2006) Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol* **16**(15): 1571-1578
- Gillespie PJ, Li A, Blow JJ (2001) Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins. *BMC Biochem* **2**: 15
- Gimenez-Abian JF, Sumara I, Hirota T, Hauf S, Gerlich D, de la Torre C, Ellenberg J, Peters JM (2004) Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol* **14**(13): 1187-1193
- Glynn EF, Megee PC, Yu HG, Mistrot C, Unal E, Koshland DE, DeRisi JL, Gerton JL (2004) Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* **2**(9): E259
- Graumann PL, Knust T (2009) Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome Res* **17**(2): 265-275
- Gregson HC, Schmiesing JA, Kim JS, Kobayashi T, Zhou S, Yokomori K (2001) A potential role for human cohesin in mitotic spindle aster assembly. *J Biol Chem* **276**(50): 47575-47582
- Gresham D, Ruderfer DM, Pratt SC, Schacherer J, Dunham MJ, Botstein D, Kruglyak L (2006) Genome-wide detection of polymorphisms at nucleotide resolution with a single DNA microarray. *Science* **311**(5769): 1932-1936
- Gruber S, Arumugam P, Katou Y, Kuglitsch D, Helmhart W, Shirahige K, Nasmyth K (2006) Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell* **127**(3): 523-537
- Gruber S, Haering CH, Nasmyth K (2003) Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**(6): 765-777
- Guacci V, Hogan E, Koshland D (1994) Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* **125**(3): 517-530
- Guan J, Ekwurtzel E, Kvist U, Yuan L (2008) Cohesin protein SMC1 is a centrosomal protein. *Biochem Biophys Res Commun* **372**(4): 761-764
- Gullerova M, Proudfoot NJ (2008) Cohesin complex promotes transcriptional termination between convergent genes in *S. pombe*. *Cell* **132**(6): 983-995
- Gutz H, Schmidt H (1985) Switching genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol* **9**: 325-331
- Haering CH, Farcas AM, Arumugam P, Metson J, Nasmyth K (2008) The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* **454**(7202): 297-301
- Haering CH, Lowe J, Hochwagen A, Nasmyth K (2002) Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* **9**(4): 773-788
- Hakimi MA, Bochar DA, Schmiesing JA, Dong Y, Barak OG, Speicher DW, Yokomori K, Shiekhattar R (2002) A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* **418**(6901): 994-998
- Hanna JS, Kroll ES, Lundblad V, Spencer FA (2001) *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* **21**(9): 3144-3158
- Hartman T, Stead K, Koshland D, Guacci V (2000) Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **151**(3): 613-626



- Hartmuth S, Petersen J (2009) Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *J Cell Sci* **122**(Pt 11): 1737-1746
- Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters JM (2005) Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* **3**(3): e69
- Hauf S, Waizenegger IC, Peters JM (2001) Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* **293**(5533): 1320-1323
- Heidinger-Pauli JM, Unal E, Guacci V, Koshland D (2008) The kleisin subunit of cohesin dictates damage-induced cohesion. *Mol Cell* **31**(1): 47-56
- Heidinger-Pauli JM, Unal E, Koshland D (2009) Distinct targets of the Eco1 acetyltransferase modulate cohesion in S phase and in response to DNA damage. *Mol Cell* **34**(3): 311-321
- Hirano T, Funahashi S, Uemura T, Yanagida M (1986) Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cutmutants that block nuclear division but not cytokinesis. *Embo J* **5**(11): 2973-2979
- Hoque MT, Ishikawa F (2001) Human chromatid cohesin component hRad21 is phosphorylated in M phase and associated with metaphase centromeres. *J Biol Chem* **276**(7): 5059-5067
- Huang CE, Milutinovich M, Koshland D (2005) Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1455): 537-542
- Ishiguro T, Tanaka K, Sakuno T, Watanabe Y (2010) Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nat Cell Biol* **12**(5): 500-506
- Ivanov D, Nasmyth K (2005) A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* **122**(6): 849-860
- Ivanov D, Nasmyth K (2007) A physical assay for sister chromatid cohesion in vitro. *Mol Cell* **27**(2): 300-310
- Ivanov D, Schleiffer A, Eisenhaber F, Mechtler K, Haering CH, Nasmyth K (2002) Eco1 is a novel acetyltransferase that can acetylate proteins involved in cohesion. *Curr Biol* **12**(4): 323-328
- Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J, Young RA (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* **467**(7314): 430-435
- Katis VL, Lipp JJ, Imre R, Bogdanova A, Okaz E, Habermann B, Mechtler K, Nasmyth K, Zachariae W (2010) Rec8 phosphorylation by casein kinase 1 and Cdc7-Dbf4 kinase regulates cohesin cleavage by separase during meiosis. *Dev Cell* **18**(3): 397-409
- Kenna MA, Skibbens RV (2003) Mechanical link between cohesion establishment and DNA replication: Ctf7p/Eco1p, a cohesion establishment factor, associates with three different replication factor C complexes. *Mol Cell Biol* **23**(8): 2999-3007
- Kerrebrock AW, Miyazaki WY, Birnby D, Orr-Weaver TL (1992) The *Drosophila* mei-S332 gene promotes sister-chromatid cohesion in meiosis following kinetochore differentiation. *Genetics* **130**(4): 827-841
- Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, Jeffery L, Baek ST, Lee H, Shim YS, Lee M, Kim L, Heo KS, Noh EJ, Lee AR, Jang YJ, Chung KS, Choi SJ, Park JY, Park Y, Kim HM, Park SK, Park HJ, Kang EJ, Kim HB, Kang HS, Park HM, Kim K, Song K, Song KB, Nurse P, Hoe KL (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* **28**(6): 617-623
- Kim JS, Krasieva TB, LaMorte V, Taylor AM, Yokomori K (2002a) Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage. *J Biol Chem* **277**(47): 45149-45153
- Kim ST, Xu B, Kastan MB (2002b) Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev* **16**(5): 560-570



- Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y (2004) The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* **427**(6974): 510-517
- Kitajima TS, Miyazaki Y, Yamamoto M, Watanabe Y (2003) Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *Embo J* **22**(20): 5643-5653
- Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y (2006) Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* **441**(7089): 46-52
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K (1999) A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**(1): 91-103
- Kogut I, Wang J, Guacci V, Mistry RK, Megee PC (2009) The Scc2/Scc4 cohesin loader determines the distribution of cohesin on budding yeast chromosomes. *Genes Dev* **23**(19): 2345-2357
- Kong X, Ball AR, Jr., Sonoda E, Feng J, Takeda S, Fukagawa T, Yen TJ, Yokomori K (2009) Cohesin associates with spindle poles in a mitosis-specific manner and functions in spindle assembly in vertebrate cells. *Mol Biol Cell* **20**(5): 1289-1301
- Koshland D, Hartwell L (1987) The structure of sister minichromosome DNA before anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **238**(4834): 1713-1716
- Kueng S, Hegemann B, Peters BH, Lipp JJ, Schleiffer A, Mechtler K, Peters JM (2006) Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* **127**(5): 955-967
- Lengronne A, Katou Y, Mori S, Yokobayashi S, Kelly GP, Itoh T, Watanabe Y, Shirahige K, Uhlmann F (2004) Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* **430**(6999): 573-578
- Lengronne A, McIntyre J, Katou Y, Kanoh Y, Hopfner KP, Shirahige K, Uhlmann F (2006) Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* **23**(6): 787-799
- Lindqvist A, Rodriguez-Bravo V, Medema RH (2009) The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* **185**(2): 193-202
- Losada A, Hirano M, Hirano T (2002) Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* **16**(23): 3004-3016
- Losada A, Hirano T (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* **19**(11): 1269-1287
- Losada A, Yokochi T, Hirano T (2005) Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* **118**(Pt 10): 2133-2141
- Luo H, Li Y, Mu JJ, Zhang J, Tonaka T, Hamamori Y, Jung SY, Wang Y, Qin J (2008) Regulation of intra-S phase checkpoint by ionizing radiation (IR)-dependent and IR-independent phosphorylation of SMC3. *J Biol Chem* **283**(28): 19176-19183
- Majka J, Burgers PM (2004) The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**: 227-260
- Matsuo T, Otsubo Y, Urano J, Tamanoi F, Yamamoto M (2007) Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Mol Cell Biol* **27**(8): 3154-3164
- Mayer ML, Gygi SP, Aebersold R, Hieter P (2001) Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* **7**(5): 959-970
- Mayer ML, Pot I, Chang M, Xu H, Aneliunas V, Kwok T, Newitt R, Aebersold R, Boone C, Brown GW, Hieter P (2004) Identification of protein complexes required for efficient sister chromatid cohesion. *Mol Biol Cell* **15**(4): 1736-1745



- Mc Intyre J, Muller EG, Weitzer S, Snyderman BE, Davis TN, Uhlmann F (2007) In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **26**(16): 3783-3793
- McGuinness BE, Hirota T, Kudo NR, Peters JM, Nasmyth K (2005) Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol* **3**(3): e86
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**(1): 35-45
- Milutinovich M, Unal E, Ward C, Skibbens RV, Koshland D (2007) A multi-step pathway for the establishment of sister chromatid cohesion. *PLoS Genet* **3**(1): e12
- Misulovin Z, Schwartz YB, Li XY, Kahn TG, Gause M, Macarthur S, Fay JC, Eisen MB, Pirrotta V, Biggin MD, Dorsett D (2007) Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma*
- Miyamoto M, Tanaka K, Okayama H (1994) *res2+*, a new member of the *cdc10+*/SWI4 family, controls the 'start' of mitotic and meiotic cycles in fission yeast. *Embo J* **13**(8): 1873-1880
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2006) PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell* **23**(5): 723-732
- Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823
- Moyer SE, Lewis PW, Botchan MR (2006) Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10236-10241
- Musacchio A, Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 379-393
- Nakajima M, Kumada K, Hatakeyama K, Noda T, Peters JM, Hirota T (2007) The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *J Cell Sci* **120**(Pt 23): 4188-4196
- Nakashima N, Tanaka K, Sturm S, Okayama H (1995) Fission yeast Rep2 is a putative transcriptional activator subunit for the cell cycle 'start' function of Res2-Cdc10. *Embo J* **14**(19): 4794-4802
- Nasmyth K, Haering CH (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* **74**: 595-648
- Nasmyth K, Haering CH (2009) Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* **43**: 525-558
- Nezi L, Musacchio A (2009) Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **21**(6): 785-795
- Nick McElhinny SA, Gordenin DA, Stith CM, Burgers PM, Kunkel TA (2008) Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell* **30**(2): 137-144
- Noble D, Kenna MA, Dix M, Skibbens RV, Unal E, 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**(21): 2528-2536
- Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, Xiao G, Yamamoto M, Grewal SI, Watanabe Y (2002) Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* **4**(1): 89-93
- Oliveira RA, Hamilton RS, Pauli A, Davis I, Nasmyth K (2010) Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nat Cell Biol* **12**(2): 185-192
- Panizza S, Tanaka T, Hochwagen A, Eisenhaber F, Nasmyth K (2000) Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr Biol* **10**(24): 1557-1564





- Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG, Merckenschlager M (2008) Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell*
- Petronczki M, Chwalla B, Siomos MF, Yokobayashi S, Helmhart W, Deutschbauer AM, Davis RW, Watanabe Y, Nasmyth K (2004) Sister-chromatid cohesion mediated by the alternative RF-CCtf18/Dcc1/Ctf8, the helicase Chl1 and the polymerase-alpha-associated protein Ctf4 is essential for chromatid disjunction during meiosis II. *J Cell Sci* **117**(Pt 16): 3547-3559
- Potapova TA, Daum JR, Pittman BD, Hudson JR, Jones TN, Satinover DL, Stukenberg PT, Gorbsky GJ (2006) The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature* **440**(7086): 954-958
- Potts PR, Porteus MH, Yu H (2006) Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *Embo J* **25**(14): 3377-3388
- Rabitsch KP, Gregan J, Schleiffer A, Javerzat JP, Eisenhaber F, Nasmyth K (2004) Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr Biol* **14**(4): 287-301
- Rabitsch KP, Toth A, Galova M, Schleiffer A, Schaffner G, Aigner E, Rupp C, Penkner AM, Moreno-Borchart AC, Primig M, Esposito RE, Klein F, Knop M, Nasmyth K (2001) A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression. *Curr Biol* **11**(13): 1001-1009
- Rankin S, Ayad NG, Kirschner MW (2005) Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. *Mol Cell* **18**(2): 185-200
- Riedel CG, Katis VL, Katou Y, Mori S, Itoh T, Helmhart W, Galova M, Petronczki M, Gregan J, Cetin B, Mudrak I, Ogris E, Mechtler K, Pelletier L, Buchholz F, Shirahige K, Nasmyth K (2006) Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* **441**(7089): 53-61
- Rieder CL, Cole RW, Khodjakov A, Sluder G (1995) The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* **130**(4): 941-948
- Rollins RA, Korom M, Aulner N, Martens A, Dorsett D (2004) *Drosophila* nipped-B protein supports sister chromatid cohesion and opposes the stromalin/Sec3 cohesion factor to facilitate long-range activation of the cut gene. *Mol Cell Biol* **24**(8): 3100-3111
- Rollins RA, Morcillo P, Dorsett D (1999) Nipped-B, a *Drosophila* homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics* **152**(2): 577-593
- Rowland BD, Roig MB, Nishino T, Kurze A, Uluocak P, Mishra A, Beckouet F, Underwood P, Metson J, Imre R, Mechtler K, Katis VL, Nasmyth K (2009) Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell* **33**(6): 763-774
- Rowles A, Tada S, Blow JJ (1999) Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J Cell Sci* **112** ( Pt 12): 2011-2018
- Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, Distèche CM, Philippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A (2008) CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(24): 8309-8314
- Sakuno T, Tada K, Watanabe Y (2009) Kinetochores geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* **458**(7240): 852-858
- Schmidt CK, Brookes N, Uhlmann F (2009) Conserved features of cohesin binding along fission yeast chromosomes. *Genome Biol* **10**(5): R52
- Schmidt H (1993) Effective long range mapping in *Schizosaccharomyces pombe* with the help of swi5. *Curr Genet* **24**(3): 271-273
- Schmitz J, Watrin E, Lenart P, Mechtler K, Peters JM (2007) Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. *Curr Biol* **17**(7): 630-636



- Seitan VC, Banks P, Laval S, Majid NA, Dorsett D, Rana A, Smith J, Bateman A, Krpic S, Hostert A, Rollins RA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Benard CY, Hekimi S, Newbury SF, Strachan T (2006) Metazoan Scc4 homologs link sister chromatid cohesion to cell and axon migration guidance. *PLoS Biol* **4**(8): e242
- Shinozaki-Yabana S, Watanabe Y, Yamamoto M (2000) Novel WD-repeat protein Mip1p facilitates function of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Mol Cell Biol* **20**(4): 1234-1242
- Shintomi K, Hirano T (2009) Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev* **23**(18): 2224-2236
- Sjogren C, Nasmyth K (2001) Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **11**(12): 991-995
- Skibbens RV (2004) Chl1p, a DNA helicase-like protein in budding yeast, functions in sister-chromatid cohesion. *Genetics* **166**(1): 33-42
- Skibbens RV, Corson LB, Koshland D, Hieter P (1999) Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev* **13**(3): 307-319
- Sonoda E, Matsusaka T, Morrison C, Vagnarelli P, Hoshi O, Ushiki T, Nojima K, Fukagawa T, Waizenegger IC, Peters JM, Earnshaw WC, Takeda S (2001) Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell* **1**(6): 759-770
- Stead K, Aguilar C, Hartman T, Drexel M, Meluh P, Guacci V (2003) Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol* **163**(4): 729-741
- Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW (2001) Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**(6): 715-726
- Strom L, Karlsson C, Lindroos HB, Wedahl S, Katou Y, Shirahige K, Sjogren C (2007) Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science* **317**(5835): 242-245
- Strom L, Lindroos HB, Shirahige K, Sjogren C (2004) Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol Cell* **16**(6): 1003-1015
- Sullivan M, Higuchi T, Katis VL, Uhlmann F (2004) Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell* **117**(4): 471-482
- Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH, Peters JM (2000) Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* **151**(4): 749-762
- Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM (2002) The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* **9**(3): 515-525
- Sutani T, Kawaguchi T, Kanno R, Itoh T, Shirahige K (2009) Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr Biol* **19**(6): 492-497
- Takahashi TS, Yiu P, Chou MF, Gygi S, Walter JC (2004) Recruitment of *Xenopus* Scc2 and cohesin to chromatin requires the pre-replication complex. *Nat Cell Biol* **6**(10): 991-996
- Tanaka K, Hao Z, Kai M, Okayama H (2001) Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *Embo J* **20**(20): 5779-5790
- Tanaka K, Okayama H (2000) A pcl-like cyclin activates the Res2p-Cdc10p cell cycle "start" transcriptional factor complex in fission yeast. *Mol Biol Cell* **11**(9): 2845-2862
- Tanaka K, Yonekawa T, Kawasaki Y, Kai M, Furuya K, Iwasaki M, Murakami H, Yanagida M, Okayama H (2000) Fission yeast Eso1p is required for establishing sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell Biol* **20**(10): 3459-3469
- Terret ME, Sherwood R, Rahman S, Qin J, Jallepalli PV (2009) Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature* **462**(7270): 231-234



- Tomonaga T, Nagao K, Kawasaki Y, Furuya K, Murakami A, Morishita J, Yuasa T, Sutani T, Kearsley SE, Uhlmann F, Nasmyth K, Yanagida M (2000) Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* **14**(21): 2757-2770
- Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K (1999) Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* **13**(3): 320-333
- Uhlmann F (2003) Chromosome cohesion and separation: from men and molecules. *Curr Biol* **13**(3): R104-114
- Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**(6739): 37-42
- Uhlmann F, Nasmyth K (1998) Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol* **8**(20): 1095-1101
- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA, Koonin EV, Nasmyth K (2000) Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**(3): 375-386
- Unal E, Arbel-Eden A, Sattler U, Shroff R, Lichten M, Haber JE, Koshland D (2004) DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell* **16**(6): 991-1002
- Unal E, Heidinger-Pauli JM, Kim W, Guacci V, Onn I, Gygi SP, Koshland DE (2008) A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* **321**(5888): 566-569
- Unal E, Heidinger-Pauli JM, Koshland D (2007) DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* **317**(5835): 245-248
- Urano J, Comiso MJ, Guo L, Aspuria PJ, Deniskin R, Tabancay AP, Jr., Kato-Stankiewicz J, Tamanoi F (2005) Identification of novel single amino acid changes that result in hyperactivation of the unique GTPase, Rheb, in fission yeast. *Mol Microbiol* **58**(4): 1074-1086
- van Heemst D, James F, Poggeler S, Berteaux-Lecellier V, Zickler D (1999) Spo76p is a conserved chromosome morphogenesis protein that links the mitotic and meiotic programs. *Cell* **98**(2): 261-271
- van Heemst D, Kafer E, John T, Heyting C, van Aalderen M, Zickler D (2001) BimD/SPO76 is at the interface of cell cycle progression, chromosome morphogenesis, and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6267-6272
- van Slegtenhorst M, Mustafa A, Henske EP (2005) Pas1, a G1 cyclin, regulates amino acid uptake and rescues a delay in G1 arrest in Tsc1 and Tsc2 mutants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Hum Mol Genet* **14**(19): 2851-2858
- Vaur S, Cubizolles F, Plane G, Genier S, Rabitsch PK, Gregan J, Nasmyth K, Vanoosthuysse V, Hardwick KG, Javerzat JP (2005) Control of Shugoshin function during fission-yeast meiosis. *Curr Biol* **15**(24): 2263-2270
- Verleur N, Elgersma Y, Van Roermund CW, Tabak HF, Wanders RJ (1997) Cytosolic aspartate aminotransferase encoded by the AAT2 gene is targeted to the peroxisomes in oleate-grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **247**(3): 972-980
- Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM (2000) Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**(3): 399-410
- Wang F, Yoder J, Antoshechkin I, Han M (2003) *Caenorhabditis elegans* EVL-14/PDS-5 and SCC-3 are essential for sister chromatid cohesion in meiosis and mitosis. *Mol Cell Biol* **23**(21): 7698-7707
- Wang SW, Read RL, Norbury CJ (2002) Fission yeast Pds5 is required for accurate chromosome segregation and for survival after DNA damage or metaphase arrest. *J Cell Sci* **115**(Pt 3): 587-598



- Warren WD, Steffensen S, Lin E, Coelho P, Loupart M, Cobbe N, Lee JY, McKay MJ, Orr-Weaver T, Heck MM, Sunkel CE (2000) The *Drosophila* RAD21 cohesin persists at the centromere region in mitosis. *Curr Biol* **10**(22): 1463-1466
- Watanabe Y, Nurse P (1999) Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**(6743): 461-464
- Watanabe Y, Yokobayashi S, Yamamoto M, Nurse P (2001) Pre-meiotic S phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. *Nature* **409**(6818): 359-363
- Watrin E, Peters JM (2009) The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *Embo J* **28**(17): 2625-2635
- Watrin E, Schleiffer A, Tanaka K, Eisenhaber F, Nasmyth K, Peters JM (2006) Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression. *Curr Biol* **16**(9): 863-874
- Weisman R, Roitburg I, Schonbrun M, Harari R, Kupiec M (2007) Opposite effects of tor1 and tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics* **175**(3): 1153-1162
- Weitzer S, Lehane C, Uhlmann F (2003) A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Curr Biol* **13**(22): 1930-1940
- Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*
- Xu H, Boone C, Brown GW (2007) Genetic dissection of parallel sister-chromatid cohesion pathways. *Genetics* **176**(3): 1417-1429
- Xu H, Boone C, Klein HL (2004) Mrc1 is required for sister chromatid cohesion to aid in recombination repair of spontaneous damage. *Mol Cell Biol* **24**(16): 7082-7090
- Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J (2002) SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* **16**(5): 571-582
- Zhang J, Shi X, Li Y, Kim BJ, Jia J, Huang Z, Yang T, Fu X, Jung SY, Wang Y, Zhang P, Kim ST, Pan X, Qin J (2008a) Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol Cell* **31**(1): 143-151
- Zhang N, Kuznetsov SG, Sharan SK, Li K, Rao PH, Pati D (2008b) A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol* **183**(6): 1019-1031
- Zhu Y, Takeda T, Nasmyth K, Jones N (1994) pct1+, which encodes a new DNA-binding partner of p85cdc10, is required for meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* **8**(8): 885-898

