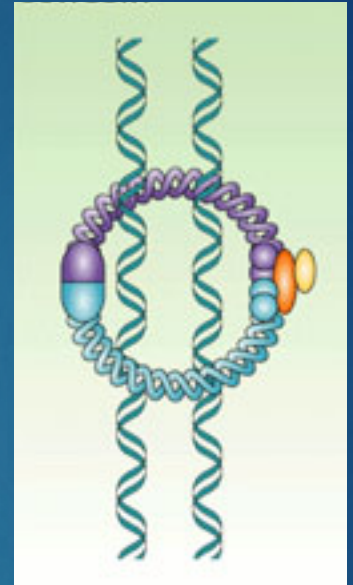


COHESINES

Physiologie et Physiopathologie

Dr Céline Dupont
Laboratoire de Cytogénétique
Hôpital Robert Debré, Paris



© 2003 *Nature Publishing Group*
Hagstrom, K. A. & Meyer, B. J.

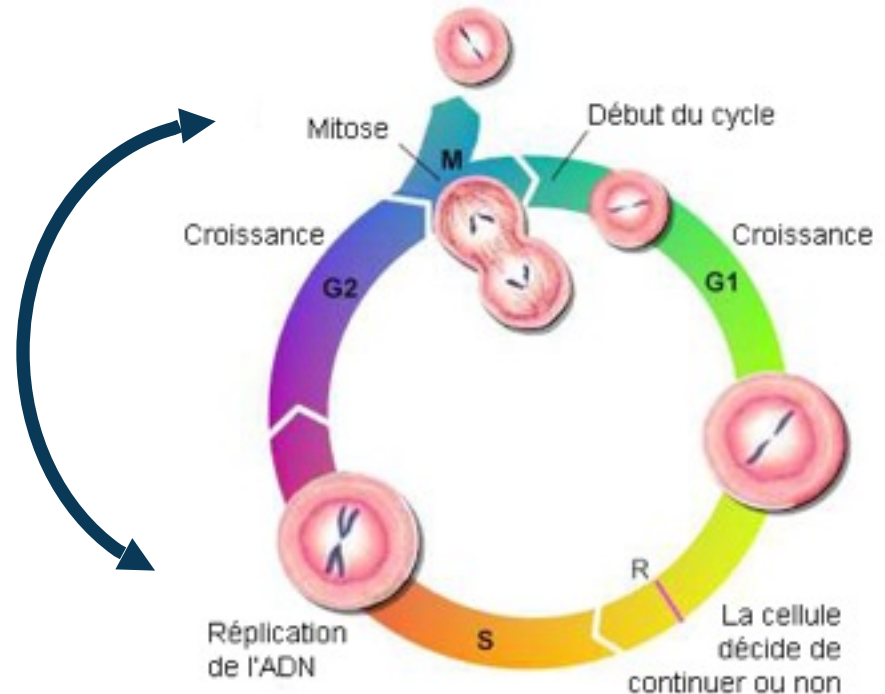
Division des cellules eukaryotes

► Temps entre la phase S (réplication) et la transition métaphase-anaphase:



« GLUE » entre les chromatides
soeurs= COHESINES

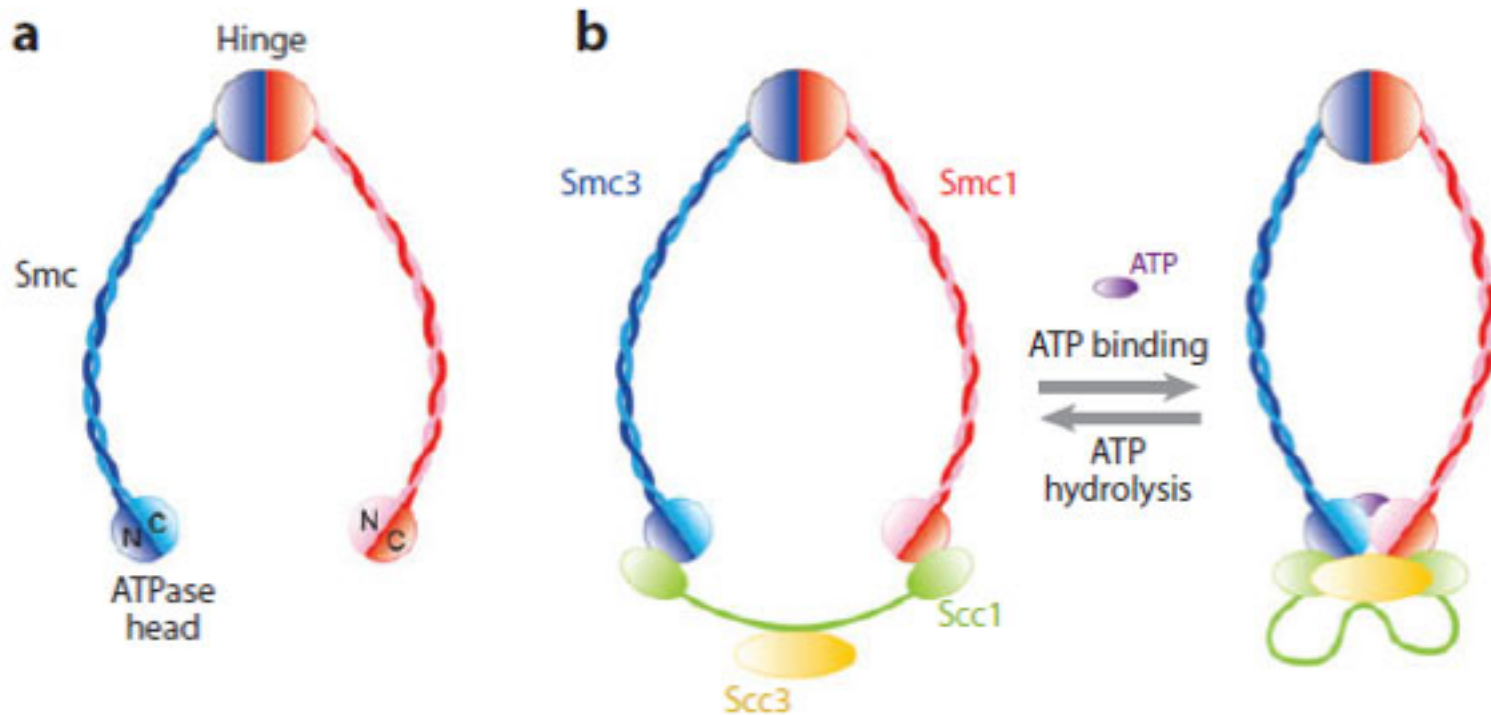
1^{er} rôle: nécessaire à la bonne
ségrégation des chromatides soeurs
pendant la mitose et la méiose



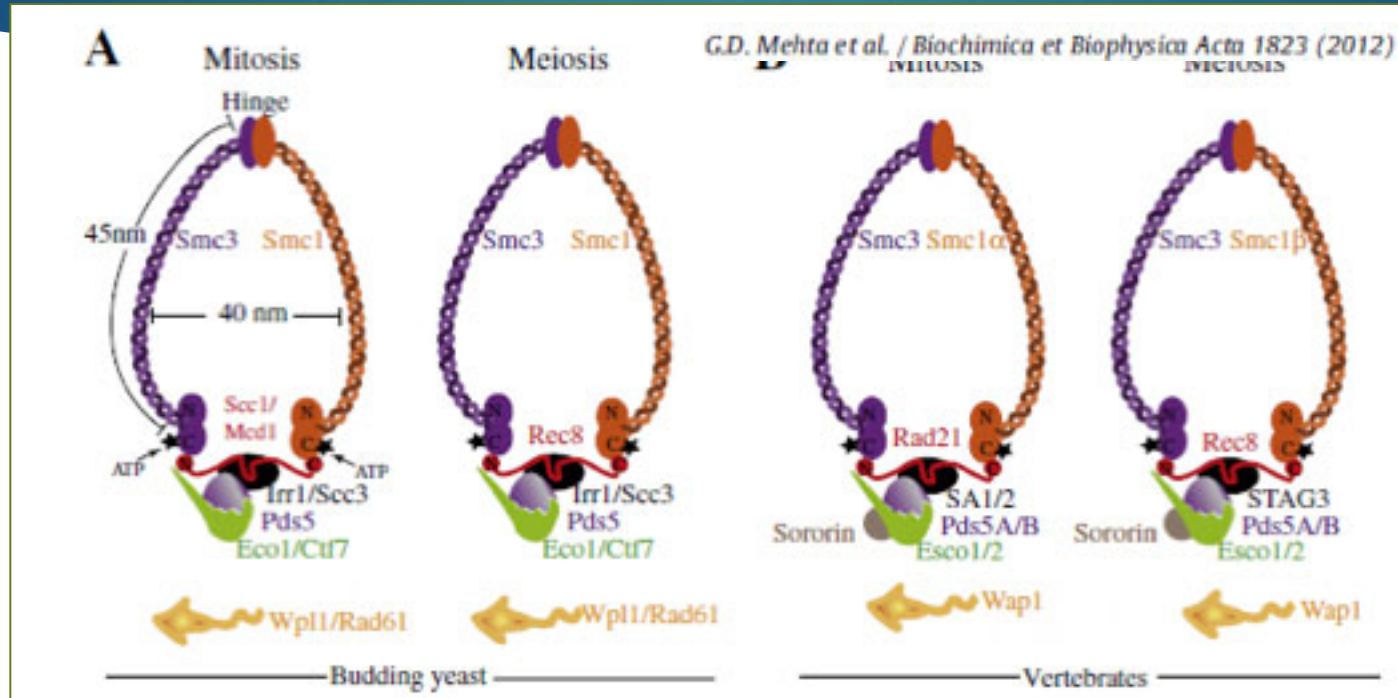
PHYSIOLOGIE

ARCHITECTURE MOLECULAIRE DU COMPLEXE COHESINE-1-

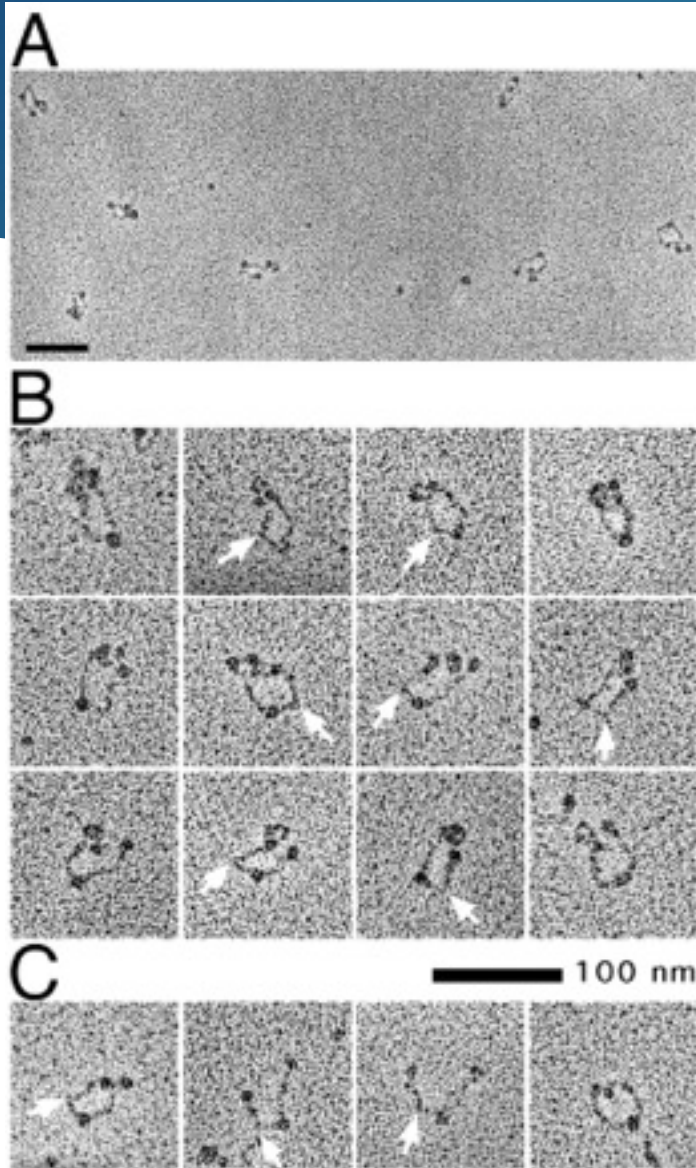
- 4 sous-unités en forme d'anneau:



ARCHITECTURE MOLECULAIRE DU COMPLEXE COHESINE-2-



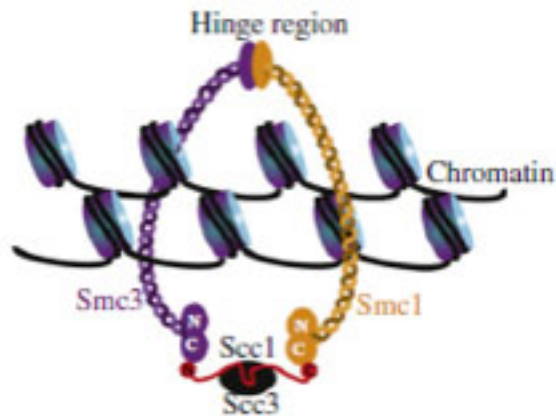
- ▶ 2 types de complexes cohésines (CC) coexistent chez les vertébrés:
 - ▶ Cohésines-SA1 (++télomères) et cohésines-SA2



Electron micrographs of the human cohesin complexes. (A) An example field of molecules. (B) The structure of holocomplexes can be classified into two major groups on the basis of the configuration of their coiled-coil arms. In the first row the molecules are in a 'coils-spread' conformation, with their catalytic domains and the non-SMC proteins mostly superimposed. In the second and third rows the molecules are in an open-V conformation with the heads somewhat separated. The non-SMC complex appears either as a separate globule between the catalytic domains (second row), or bound to one of them (third row). A kink is often observed at a fixed position in one of the two coiled-coil arms (indicated by arrows). (C) SMC heterodimers (hSMC1-hSMC3) show mostly open-V configurations. Again, one of the coiled-coil arms often displays a kink (indicated by arrows). B and C are the same magnification. Bars, 100 nm.

FIXATION A L'ADN: 4 principaux modèles

A One ring/embrace model

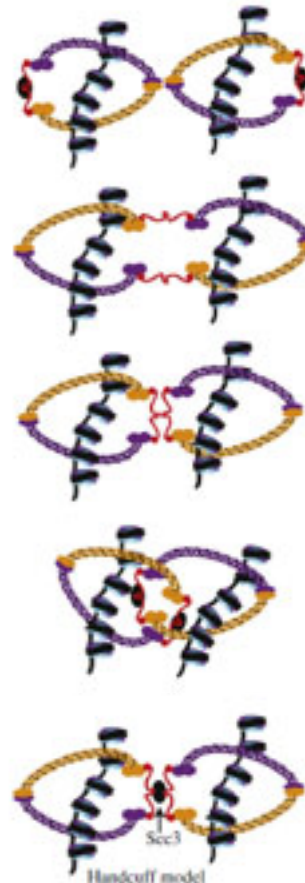


Selon ce modèle: 1 complexe peut entourer deux fibres de 10nm.

MAIS:

- Observée qu'à l'état non cohésif
- Fourche de réplication ne peut pas passer
- Diamètre de l'anneau: état statique impossible pour rôle des cohésines dans réplication, transcription et réparation de l'ADN

B Two rings model



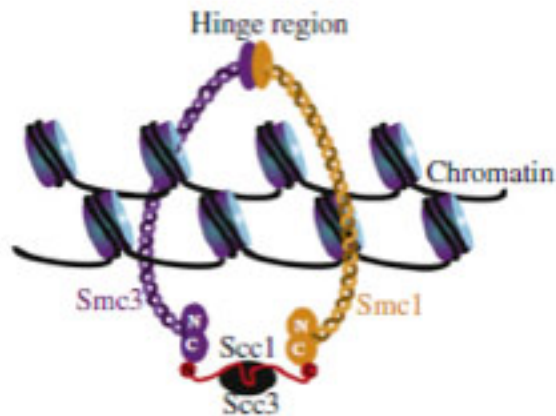
- 5 possibilités avec 2 anneaux
- 1 seule avec preuve expérimentale: modèle des menottes:

- Chaque anneau (Smc1/Smc3/Scc1) entoure une chromatide et c'est Scc3 qui les accroche pendant la réplication de l'ADN
- Zhang et al.,: Smc1, Smc3 et Rad21 coimmunoprécipitent ensemble et pas SA1 et SA2 (Scc3): Complexe cohésine n'est pas qu'un seul anneau: menottes++

-Mais attention: expériences sur des cellules surexprimant les cohésines: à prendre avec précaution

FIXATION A L'ADN: 4 principaux modèles

A One ring/embrace model

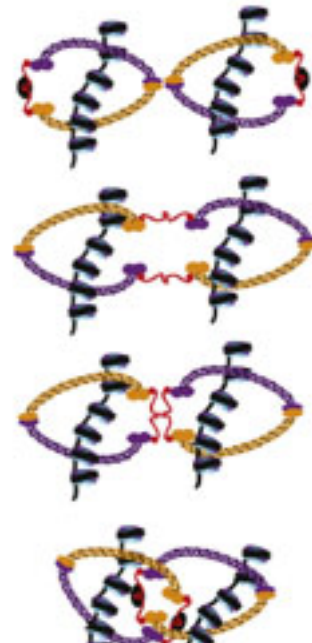


Selon ce modèle: 1 complexe peut entourer deux fibres de 10nm.

MAIS:

- Observée qu'à l'état non cohésif
- Fourche de réplication ne peut pas passer
- Diamètre de l'anneau: état statique impossible pour rôle des cohésines dans réplication, transcription et réparation de l'ADN

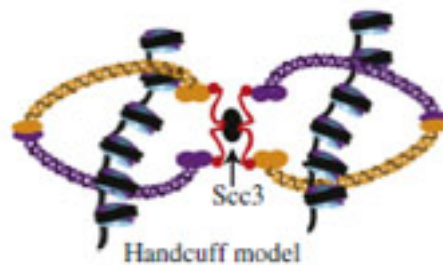
B Two rings model



- 5 possibilités avec 2 anneaux
- 1 seule avec preuve expérimentale: modèle des menottes:

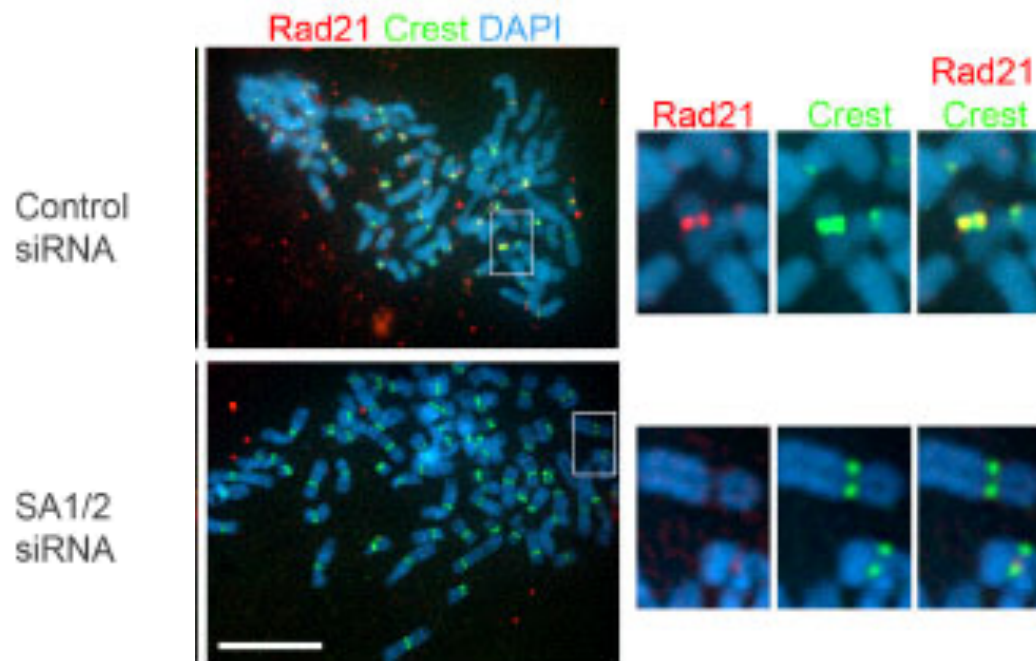
- Chaque anneau (Smc1/Smc3/Scc1) entoure une chromatide et c'est Scc3 qui les accroche pendant la réplication de l'ADN
- Zhang et al.,: Smc1, Smc3 et Rad21 coimmunoprécipitent ensemble et pas SA1 et SA2 (Scc3): Complexe cohésine n'est pas qu'un seul anneau: menottes++

Attention: expériences sur des cellules surexprimant les cohésines: à prendre avec précaution



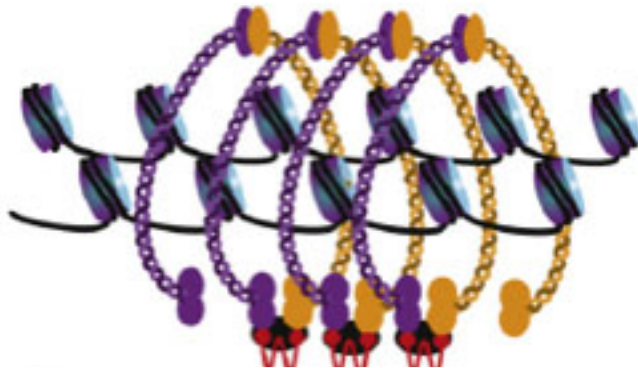
A handcuff model for the cohesin complex

Nenggang Zhang,¹ Sergey G. Kuznetsov,² Shyam K. Sharan,² Kaiyi Li,¹ Pulivarthi H. Rao,¹ and Debananda Pati¹



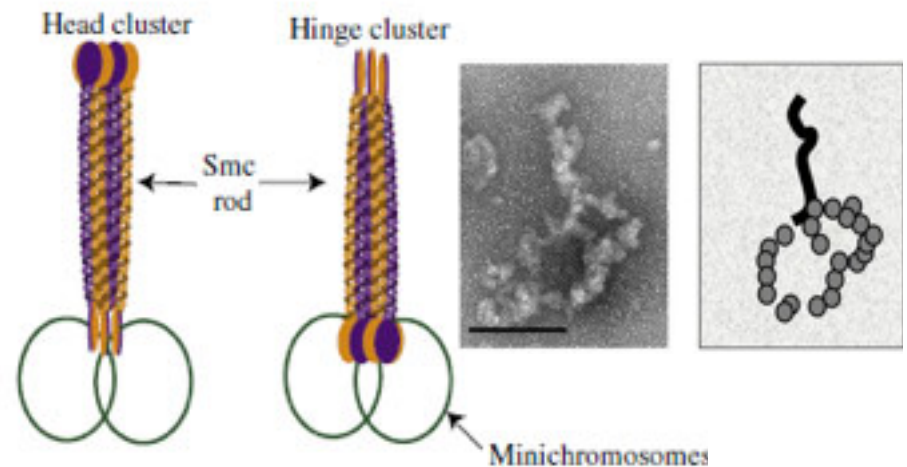
FIXATION A L'ADN

C Bracelet model



Connexion de Smc1 et Smc3 par Scc1/
Rad21 de façon spiralée, multimérique,
comme un bracelet, les deux
chromatides passant dans la spirale
Pas de preuve expérimentale de ce
modèle

D Rod model



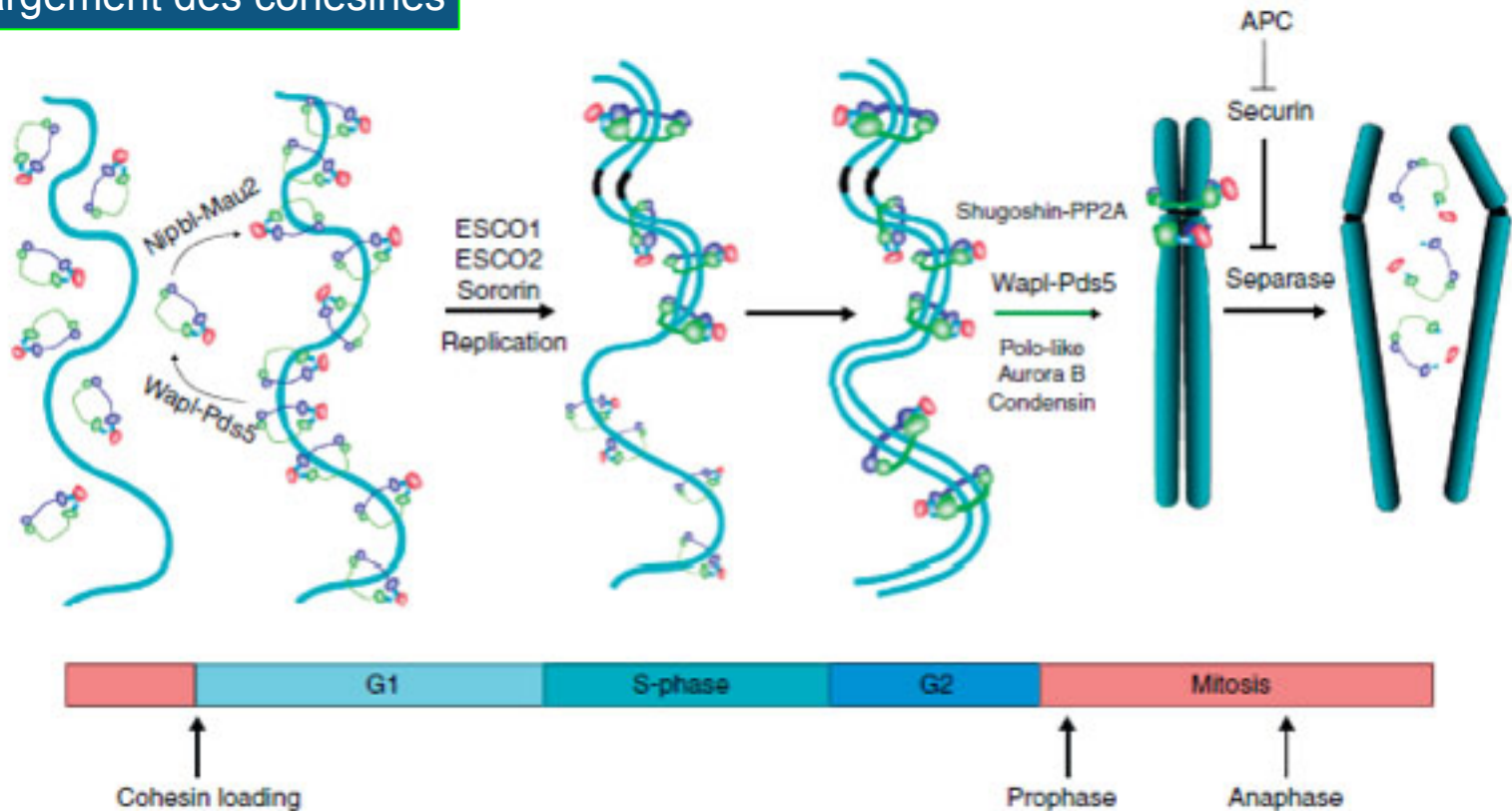
Etude chez la levure: (TEM analysis)
Les minichromosomes « sœur » accrochés au bout
des cohésines qui ont une forme de tige

CYCLE DES COHESINES

2-Etablissement de la cohésion

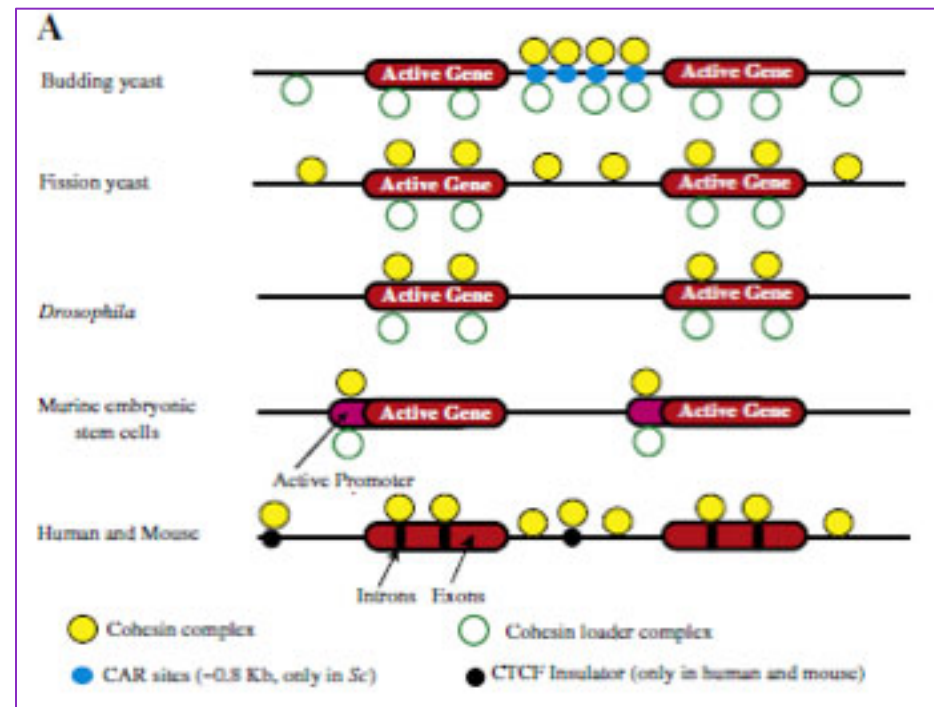
1-Chargement des cohésines

3- relarguage des cohésines

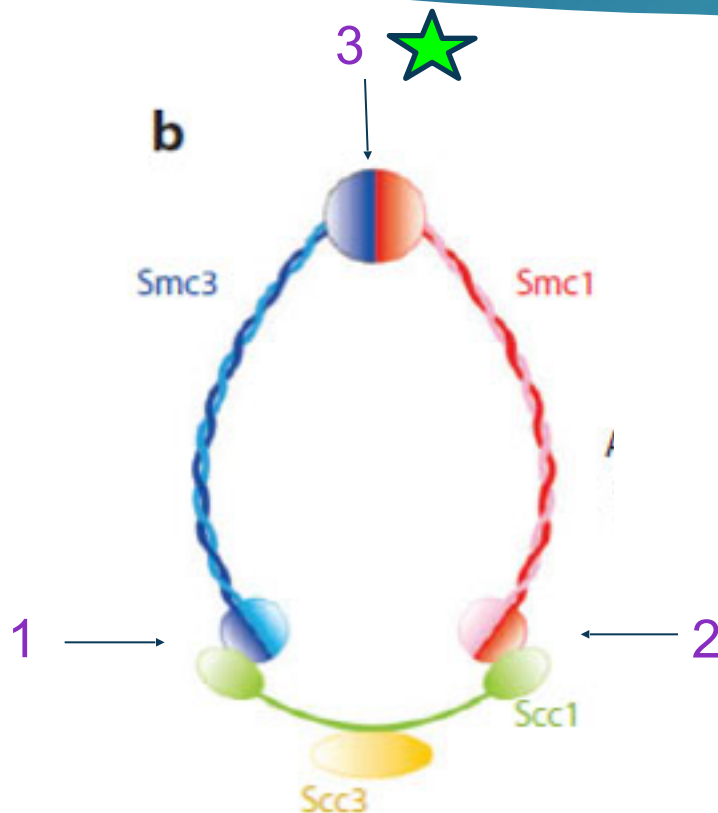


1- Chargement des cohésines: où??

- **CARs** (Cohesin Associated Region) 1/10 à 15kb
- **adhérines**
- *S.cerevisiae*: **Scs2-Scs4**
- *Drosophila*: **Nipped B**
- Fission yeast: **Mis4/Ssl3**
- Embryons murins: **Nipbl**
- Humains et souris: **NIPBL**
 - CTCF
 - 49% des CC intergéniques +++
 - 35% dans introns
 - 13% dans 5kb amont ou aval des gènes actifs et inactifs



1- Chargement des cohésines: **comment??**

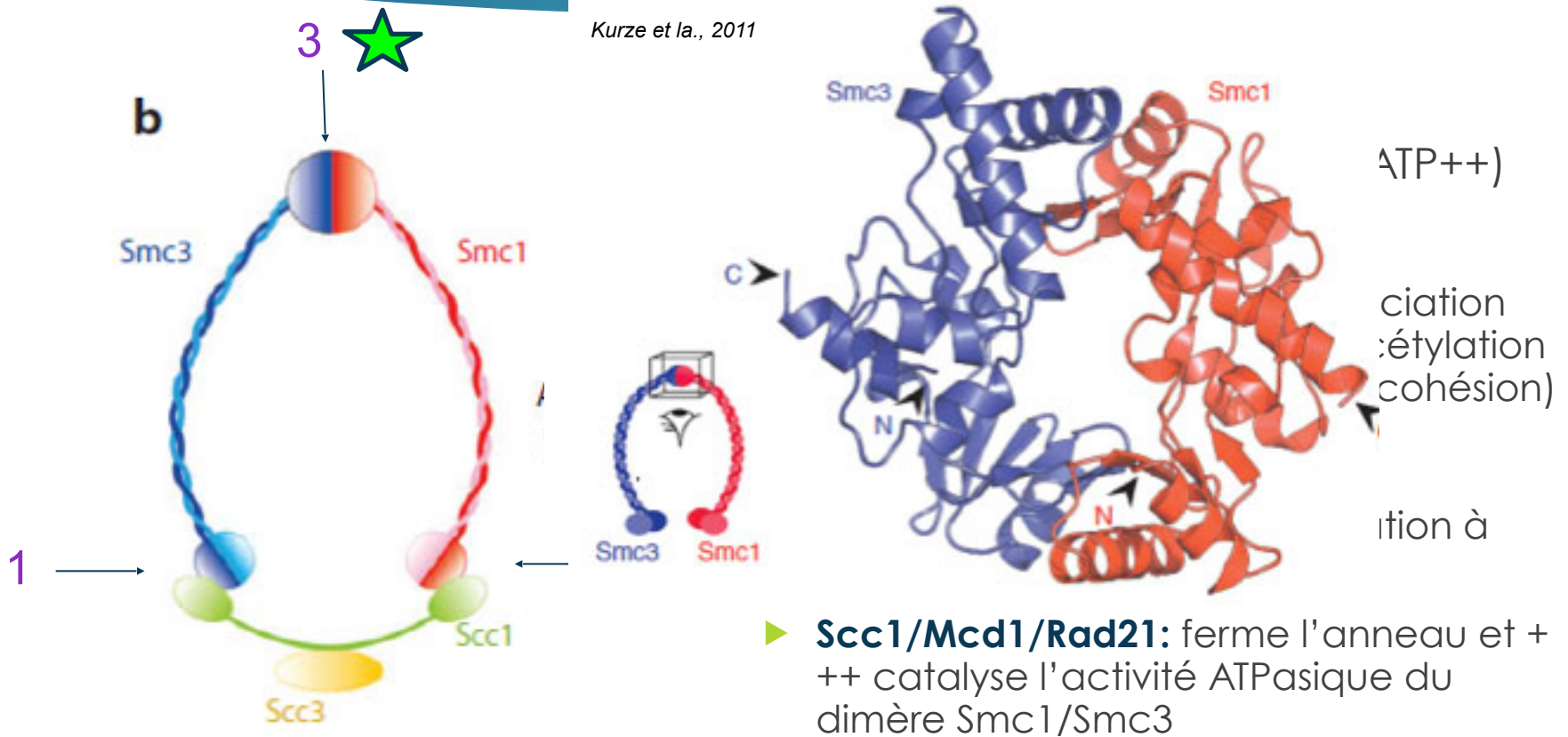


Par où passe l'ADN???

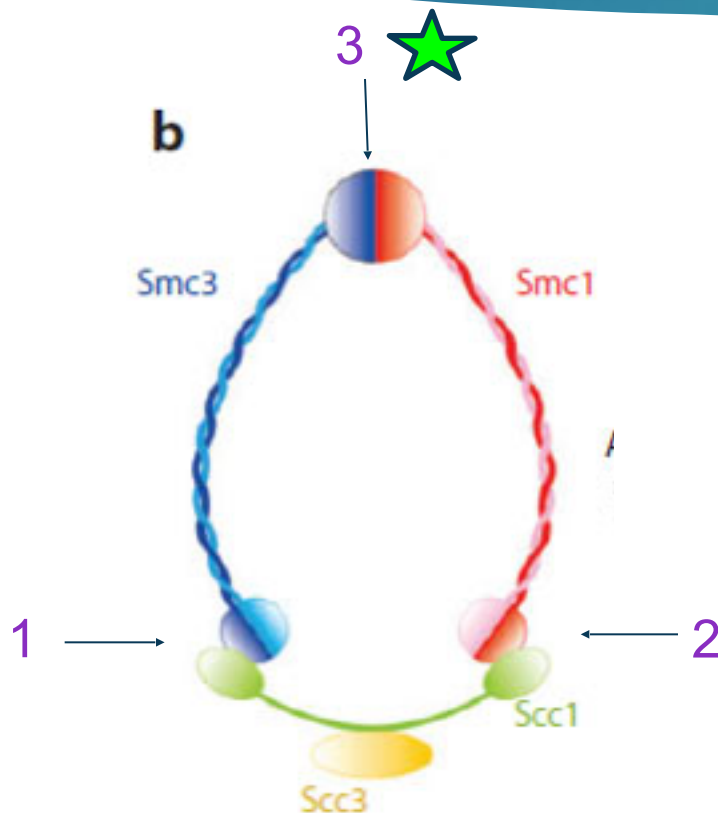
- ▶ **3:** Charnière Smc1/Smc3+++ (ATP++)
- ▶ Canal chargé positivement
 - ▶ Mutants: diminution de la dissociation charnière et diminution de l'acétylation de Smc3 (c.a.d établissement cohésion)
- ▶ Fonction ATP +++
 - ▶ Assemblage du complexe, fixation à l'ADN et translocation des CC
 - ▶ **Scc1/Mcd1/Rad21:** ferme l'anneau et ++ catalyse l'activité ATPasique du dimère Smc1/Smc3

1- Chargement des cohésines: comment??

Kurze et la., 2011



1- Chargement des cohésines: **comment??**



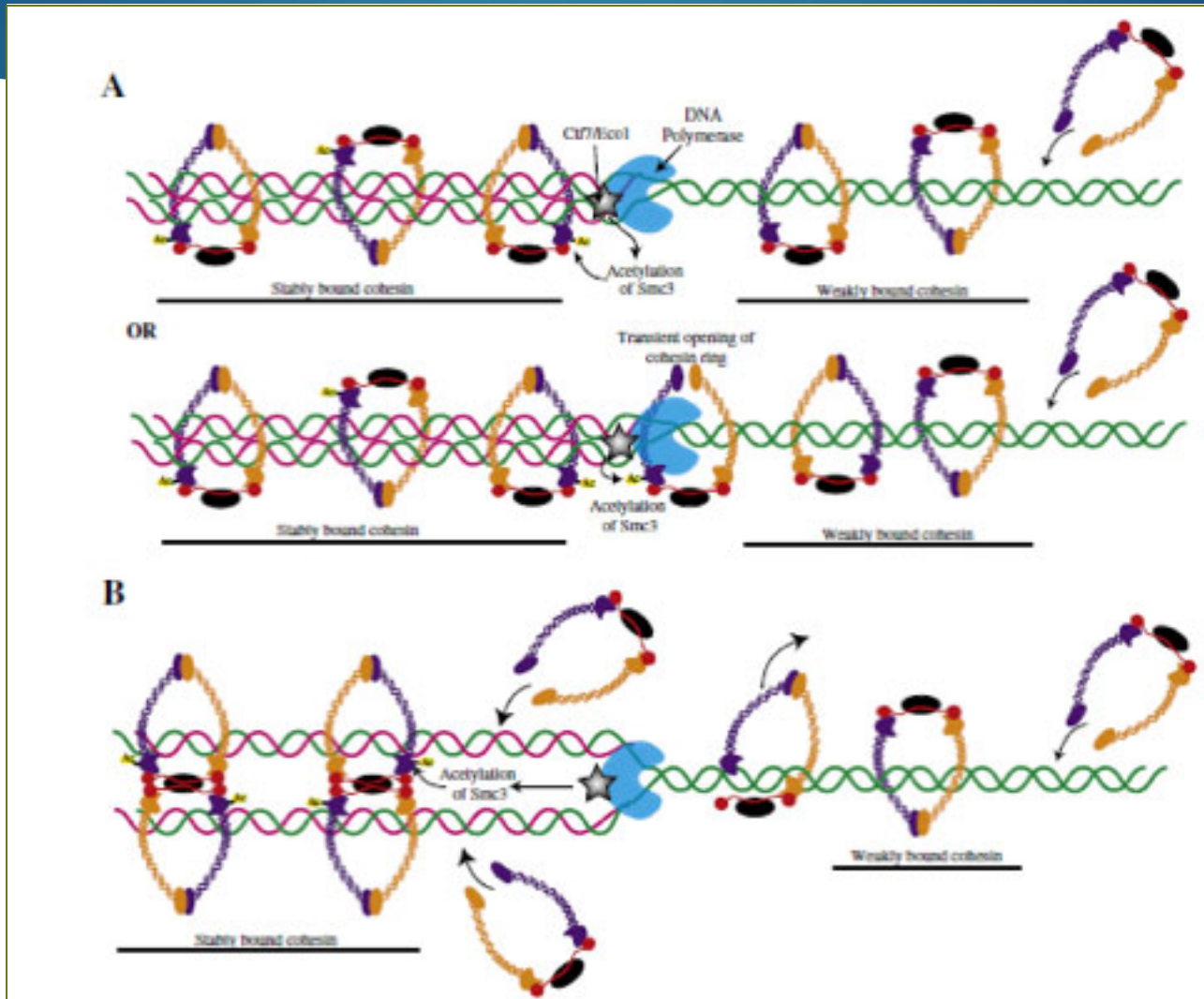
Par où passe l'ADN???

- ▶ **3:** Charnière Smc1/Smc3+++ (ATP++)
- ▶ Canal chargé positivement
 - ▶ Mutants: diminution de la dissociation charnière et diminution de l'acétylation de Smc3 (c.a.d établissement cohésion)
- ▶ Fonction ATP +++
 - ▶ Assemblage du complexe, fixation à l'ADN et translocation des CC
 - ▶ **Scc1/Mcd1/Rad21:** ferme l'anneau et ++ catalyse l'activité ATPasique du dimère Smc1/Smc3

2- Etablissement de la cohésion

- ▶ Acteur clef: **Ctf7/Eco1** – homologues humains: **ESCO1/ESCO2**:
 - ▶ **Acétyl-transférase**
 - ▶ Substrat moléculaire: Lysine 112 et 113 (+++) **Smc3**
 - ▶ Nécessaire à l'établissement de la cohésion
 - ▶ Acétyle aussi Scc1 en phase G2/M mécanisme d'établissement de la cohésion après lésion ADN (, mécanisme post replicatif, indépendant de Smc3)
 - ▶ Acétylation Smc3 par ESCO est **inversée par HDAC8** (permet de recommencer le cycle cellulaire des CC)
- ▶ **Lien +++ réplication et cohésion**
 - ▶ Mutation sous-unité complexe de réplication mime mutation Eco1
 - ▶ association Ctf7/Eco1++ avec fourche de réplication
- ▶ 2 principaux modèles:

2- Etablissement de la cohésion



3- Régulation de la cohésion

- ▶ **Sororine**: facteur important à la **cohésion** vertébrés
 - ▶ Mutants: défaut sévère de cohésion en phase G2
 - ▶ Réplication+ acétylation SMC3: entraîne fixation sororine aux CC qui elle-même **décroche Wap1 de Pds5** (association anti-cohésive)
 - ▶ S'associe en phase S aux CC
 - ▶ Est active en Phase G2: +++ établissement ou maintien de la cohésion
 - ▶ **Protection** des CC accrochés

3- Régulation de la cohésion

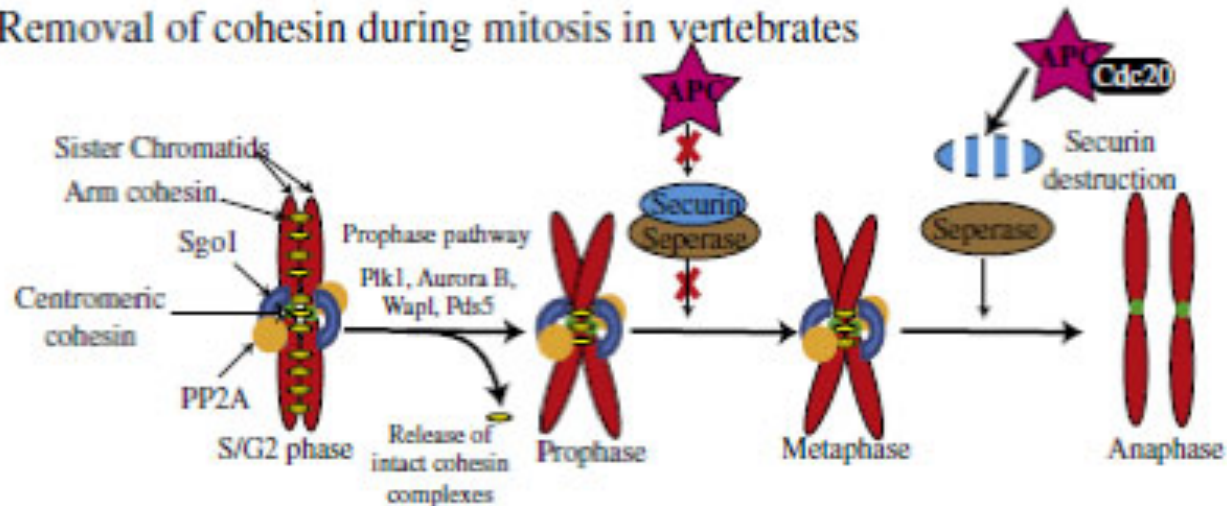
- ▶ **Pds5**: facteur **cohésif et anti-cohésif**
 - ▶ Nombreux HEAT repeat (interaction prot-prot++)
 - ▶ Interagit avec s-u du CC: Smc1/Smc3/Scc1 et aussi++: Eco1/Sororine/Wap1
- ▶ Association Pds5-Eco1 ou Sororine: **état cohésif**
 - ▶ Mutant Pds5 cf mutants Eco1 (cohesin without cohesion)
- ▶ Association Pds5-Wap1: état **anti-cohésif** passant par une sumoylation de Pds5 (modif post-translationnelle)

3- Régulation de la cohésion

- ▶ **Wap1/Rad61/Wpl1**: facteur **anti-cohésif**
 - ▶ Élévation des taux de Wap1/rad61 provoque une **diminution du taux de CC** accrochés à la chromatine
 - ▶ Contribue à décrocher les CC pendant la prophase: **déstabilisation du CC**
 - ▶ Lié à Pds5
 - ▶ Cette activité **inhibée par la Sororine** qui le sépare de Pds5
 - ▶ Sa liaison aux CC dépend de la présence de Scc1 et SA1-SA2 (Scc3)
 - ▶ A priori **pas de rôle dans établissement** de la cohésion chez les vertébrés

4-Relargage des cohésines

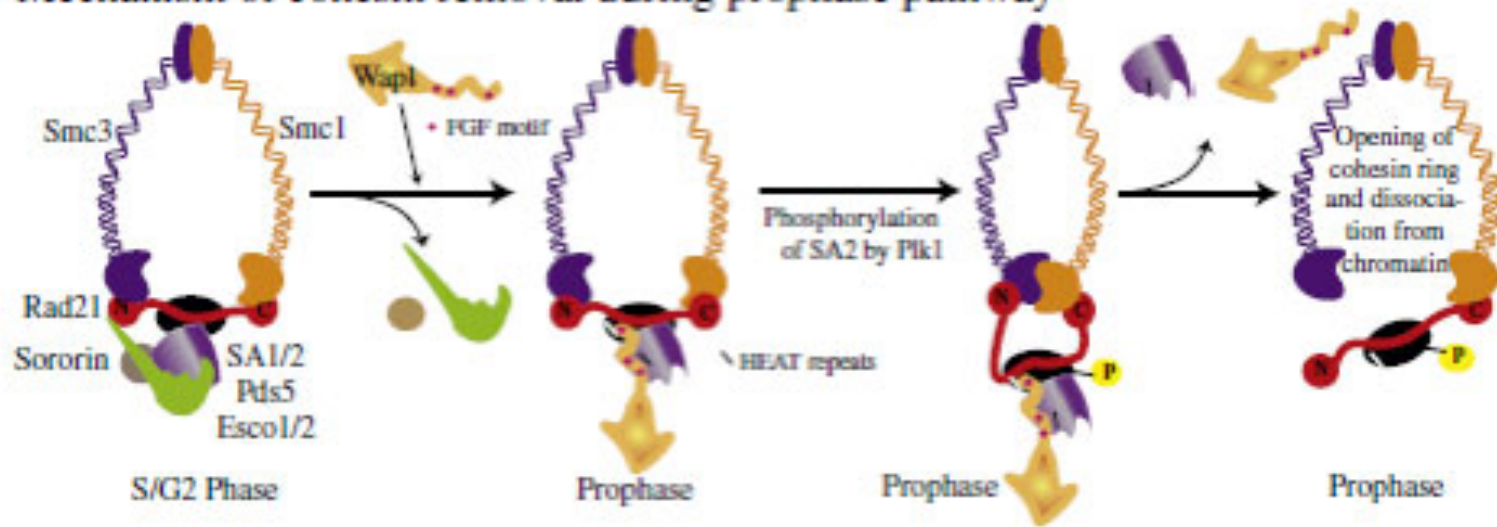
A Removal of cohesin during mitosis in vertebrates



- V: Majorité des CC enlevés pendant la prophase: « **prophase pathway** »
 - CC liés aux bras chromosomiques
- **Transition métaphase-anaphase:** CC centromériques enlevés grâce à la Séparase

4-Relargage des cohésines: « prophase pathway »

B Mechanism of cohesin removal during prophase pathway



- **Association Wap1-Pds5: état anticonhésif** en déplaçant interaction Pds5-sororine et/ou -Eco1
- Ouverture de l'anneau **sans clivage de Scc1** par 2 mécanismes
 - Association Wap1-Pds5 et -SA1/SA2: dissocie les CC de la chromatine: ouverture porte SMC3-Rad21
 - Phosphorylation SA2 par une kinase Plk1: fragilise les CC

4-relargage des cohésines: « prophase pathway »

► IMPORTANCE DU « PROPHASE PATHWAY »:

- 1) dissociation des CC des bras chromosomiques est nécessaire à
 - La **condensation** des chromosomes qui a lieu à cette étape
 - La **bonne ségrégation** des chromatides sœurs par orientation correcte de la topoisomerase
- 2) dissociation de ces CC sans clivage de Scc1: **pool de CC complets** prêts à se refixer sur la chromatine après mise en place de l'enveloppe nucléaire
 - Rôle des CC dans la régulation des gènes +++ phase G1 avant l'établissement de la cohésion!!!!

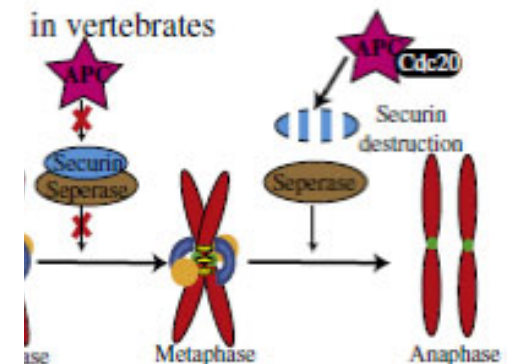
4-relargage des cohésines: Cohésines centromériques

► « Prophase pathway »: CC centromériques et péricentromériques protégés par Sgo1

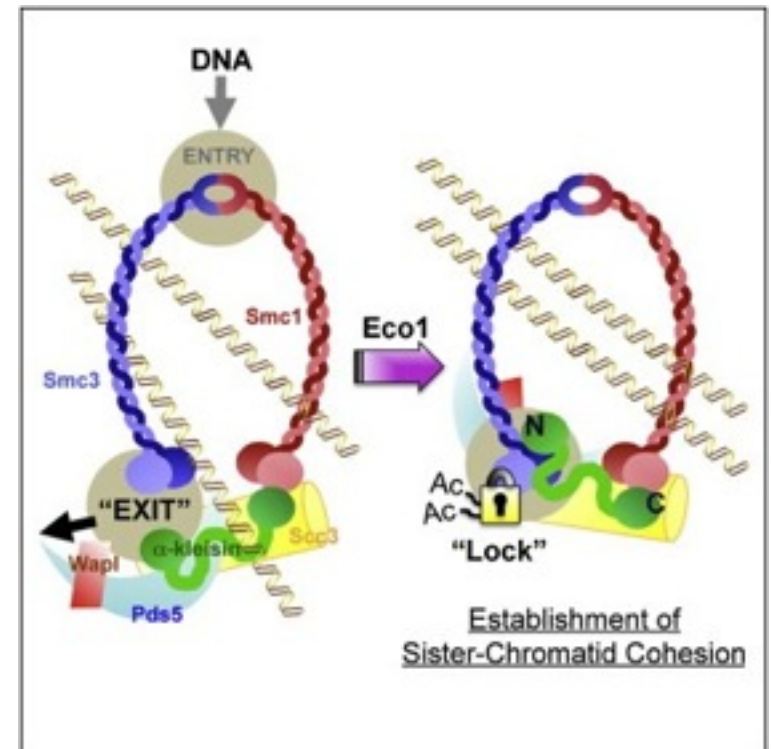
- Recrutement d'une phosphatase: PP2A au niveau des centromères
- Complexe Sgo1-PPA2A: déphosphoryle SA2 (protège contre dissociation par Wap1)

► Début anaphase:

- Avant: Séparase inhibée par Sécurine
- Une fois les kinétochores des 2 CS fixés correctement au fuseau: « checkpoint » active voie APC/C: dégrade la sécurine: libère la séparase: Dégrade Scc1
- Scc1 revient en fin de phase G1 quand APC inactif



- ▶ **REGULATION DE LA COHESION et DE SA DISSOCIATION : MODIFICATIONS POST-TRANSLATIONNELLES DES SOUS UNITES DU CC ET DES PROTEINES ASSOCIEES**
- ▶ **Acétylation:** état cohésif
- ▶ **Phosphorylation:** régulation positive et négative de la cohésion
- ▶ **Sumoylation et ubiquitination:** état anti-cohésif

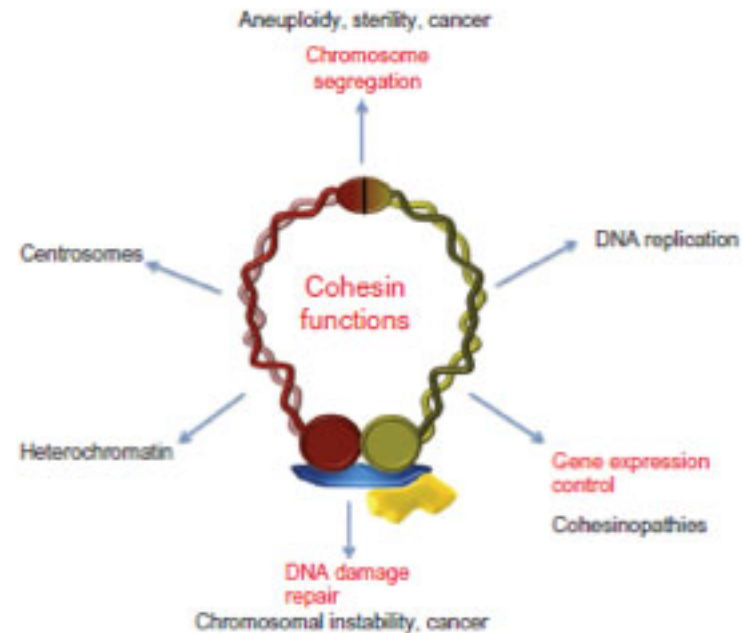




FONCTION DES COHESINES

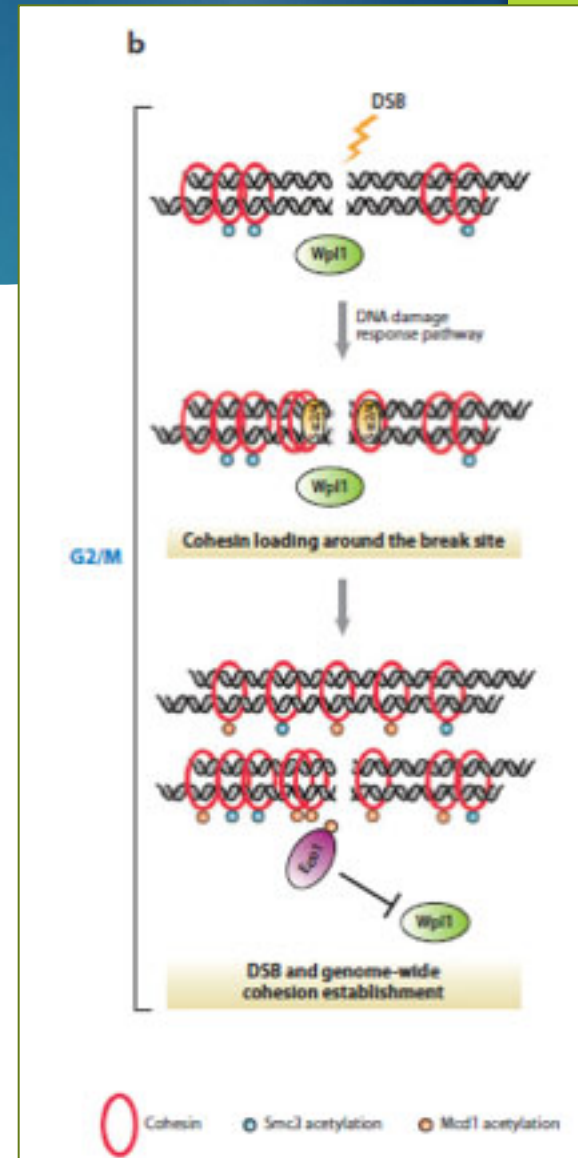
Principaux rôles des cohésines

- ▶ Ségrégation des chromatides sœurs
- ▶ **Réparation de l'ADN**
- ▶ **Fonctions liées au centrosome**
- ▶ **Régulation transcriptionnelle**
- ▶ Condensation et morphogénèse chromosomique
- ▶ Rôles liés à la méiose...



Réparation de l'ADN

- ▶ Cohésion nécessaire à la réparation des lésions de l'ADN post-réplicatif: « **Damage Induced-Cohesion** » ou DI-cohesion
- ▶ Recrutement des CC au niveau des lésions:
 - ▶ **Marque épigénétique**: phosphorylation histone H2AX par des kinases du cycle cellulaire
 - ▶ **Complexe MRX** situé au niveau des lésion: recrute les CC
- ▶ **Élévation taux de Ctf7/Eco1**
 - ▶ Substrat cible: **acétylation Scc1**
- ▶ DI-cohésion **ne suffit pas** à réparer l'ADN mais commence le processus



Fonction au niveau des centrosomes

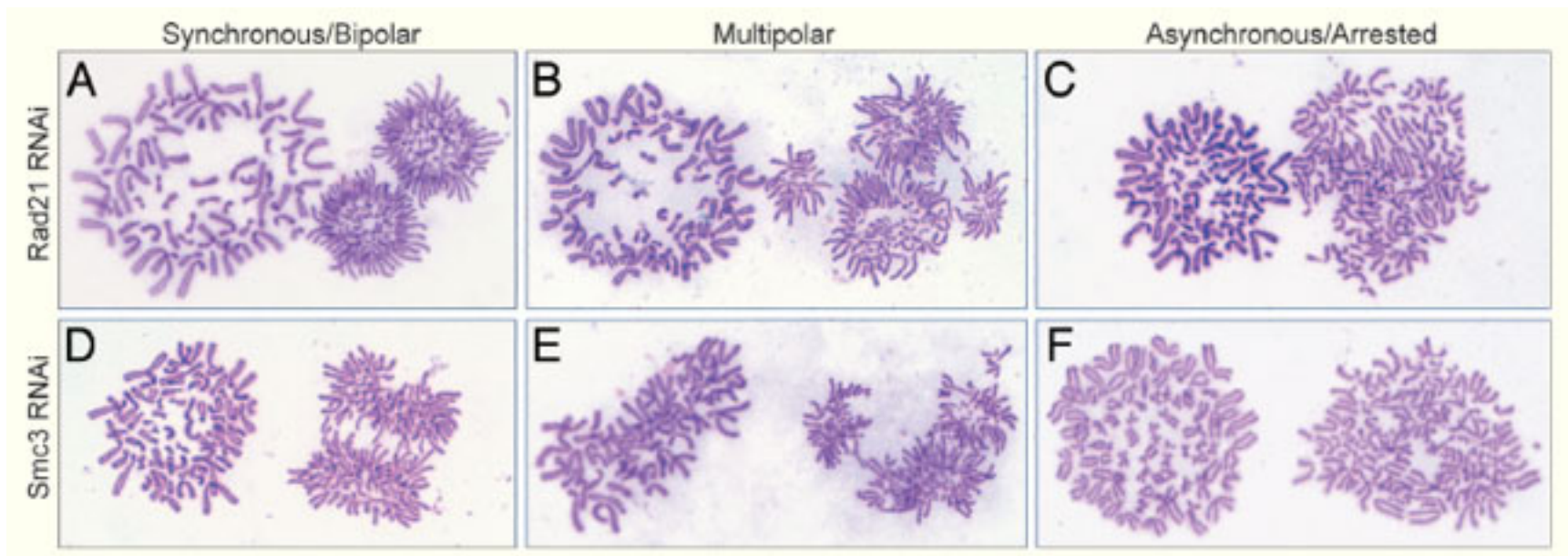
Cell Cycle 9: 176A-177J, May 1, 2010; © 2010 Landes Bioscience

Cohesin is needed for bipolar mitosis in human cells

Laura A. Diaz-Martinez,^{1,3*} Nicole A. Beauchamp,^{1,2} Katherine Furniss,² Pedro Esponda,³ Juan F. Giménez-Albián^{1,3*}
and Duncan J. Clarke^{1,4*}

- **CC:** maintien de l'intégrité des pôles du fuseau mitotique (indépendamment de la ségrégation des CS)

- Anaphase bipolaire



REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE: historique

2004-2005

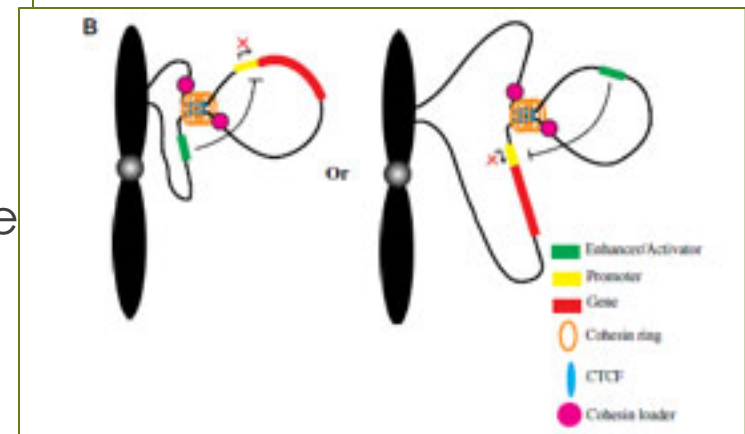
2008

- ▶ lien entre mutations cohésines ou facteurs associés et maladies du développement humain
 - ▶ Krantz/Tonkin: mutation *NIPBL* et CdLS
 - ▶ Vega: mutation *ESCO2* et Sd de Roberts

- ▶ mécanismes moléculaires pouvant relier les CC aux anomalies du développement

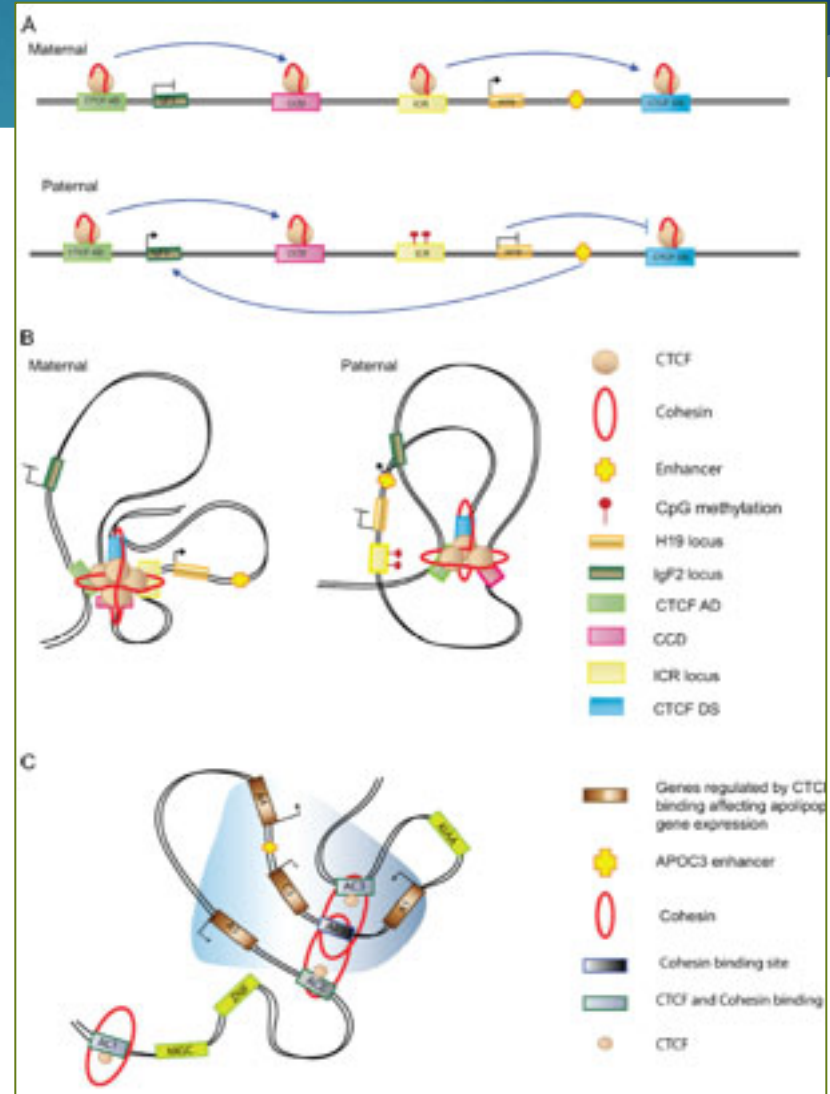
REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE: mécanismes

- ▶ CC créent des **boucles chromatinienne**s à de nombreux loci importants exprimés de manière différentielle pendant le développement
- ▶ 50-70% des sites de fixation des CC communs avec ceux de **CTCF** : insulateur [ChiP] (Wendt et al., 2008; Parelho et al., 2008)
- ▶ CC nécessaires à la fonction insulatrice de CTCF (Wendt et al., 2009)
- ▶ CC régule l'expression génique en modifiant l'architecture locale chromatinienne au moins de deux manières
 - ▶ Dépendante de CTCF
 - ▶ Indépendante de CTCF



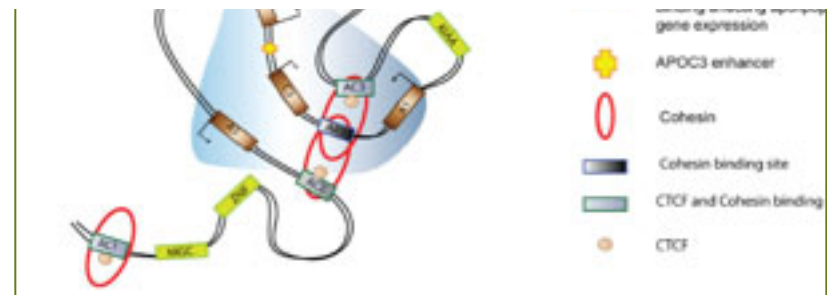
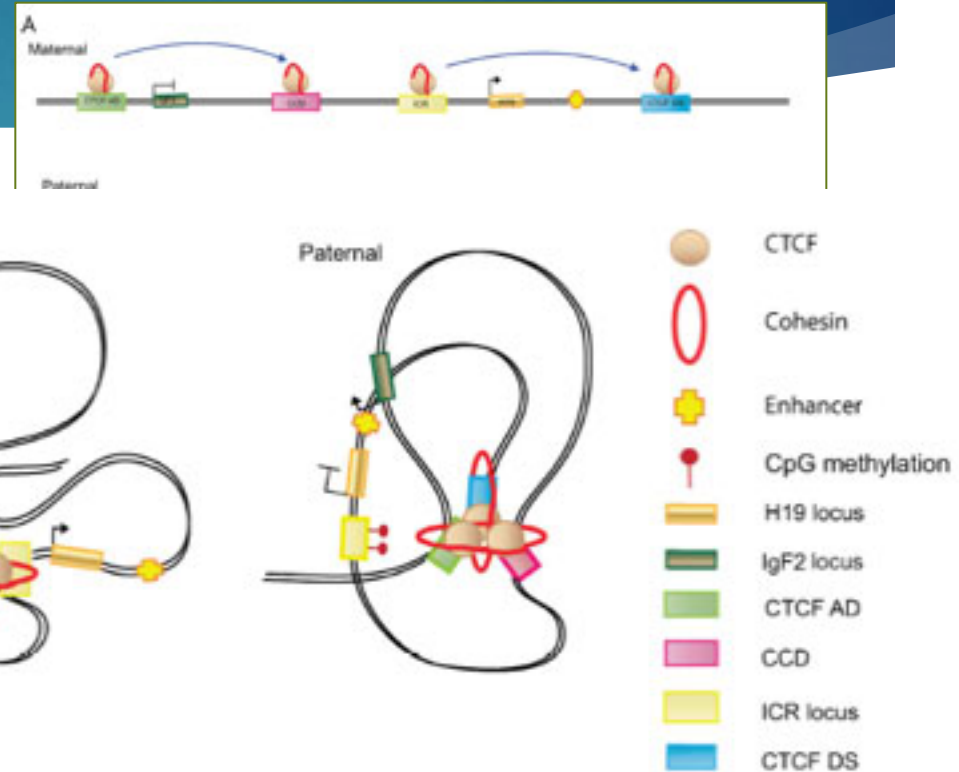
REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE mécanisme dépendant de CTCF

- ▶ *H19/IGF2*
- ▶ *IFNG*
- ▶ Apolipoprotéine cluster
- ▶ B-globine
- ▶ *Igh*
- ▶ MHC classe II
- ▶ *HoxA*
- ▶ Rc α cellules T...



REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE mécanisme dépendant de CTCF

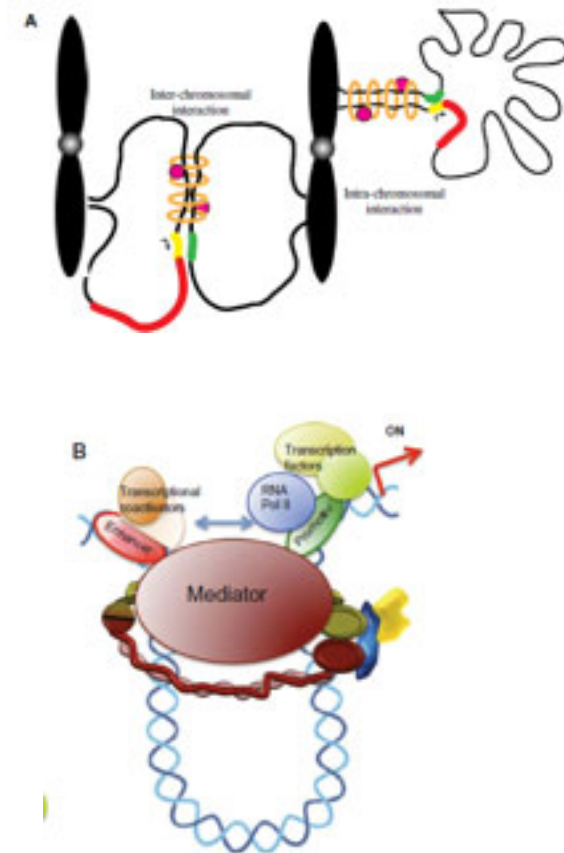
- ▶ *H19/IGF2*
- ▶ *IFNG*
- ▶ Apolipoprotéine cluster
- ▶ B-globine
- ▶ *Igh*
- ▶ MHC classe II
- ▶ *HoxA*
- ▶ Rc α cellules T...



REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

mécanisme indépendant de CTCF

- Sites de fixation des CC **sans CTCF**
- Coïncident significativement avec « enhancers » et promoteurs de gènes tissu-spécifiques
 - CC: recruteraient et/ou stabiliseraient FT à ces sites
- Complexe « Mediator » (interagit avec RNA polymerase II)
 - Maintien de la pluripotence
 - Plutôt boucles de courte distance (contraire de son action avec CTCF): interactions promoteurs-enhancer (cellules spé)
 - Complexe cohesin-mediator: architecte chromatinien maintenant boucles à certains loci pour activer l'expression génique



Ex locus de la β -globine: 2 mécanismes

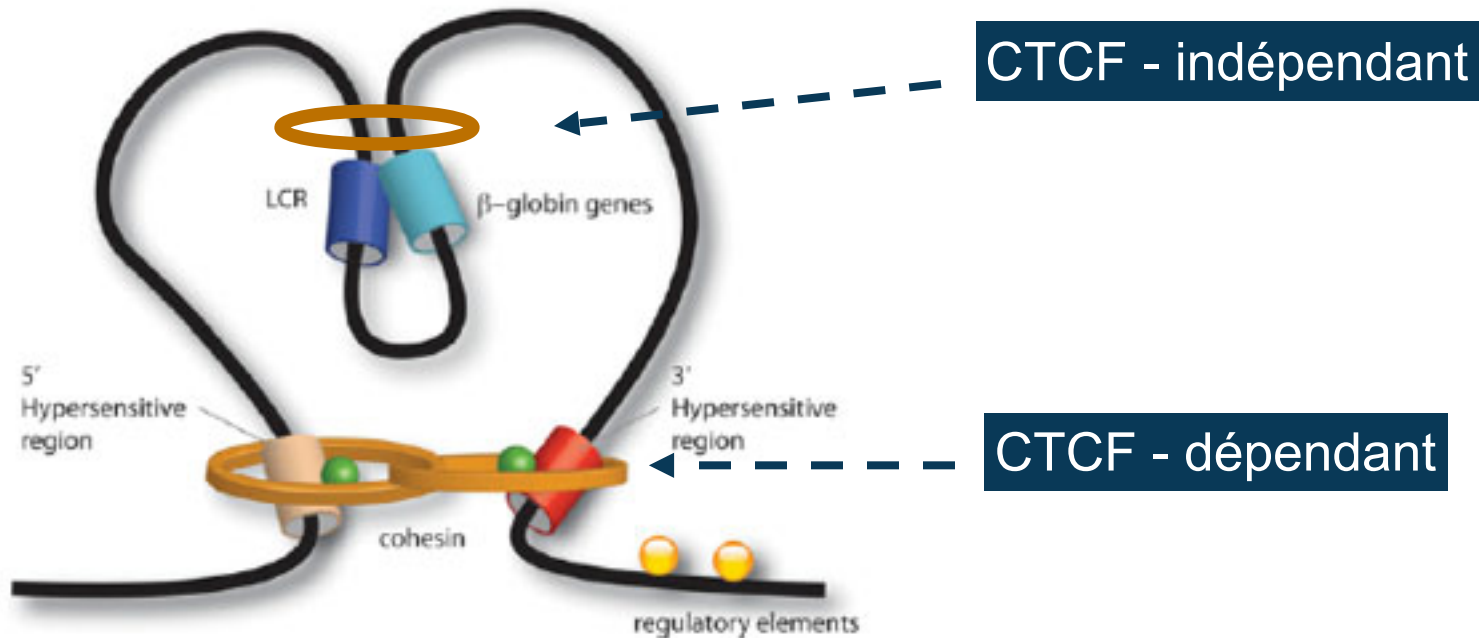
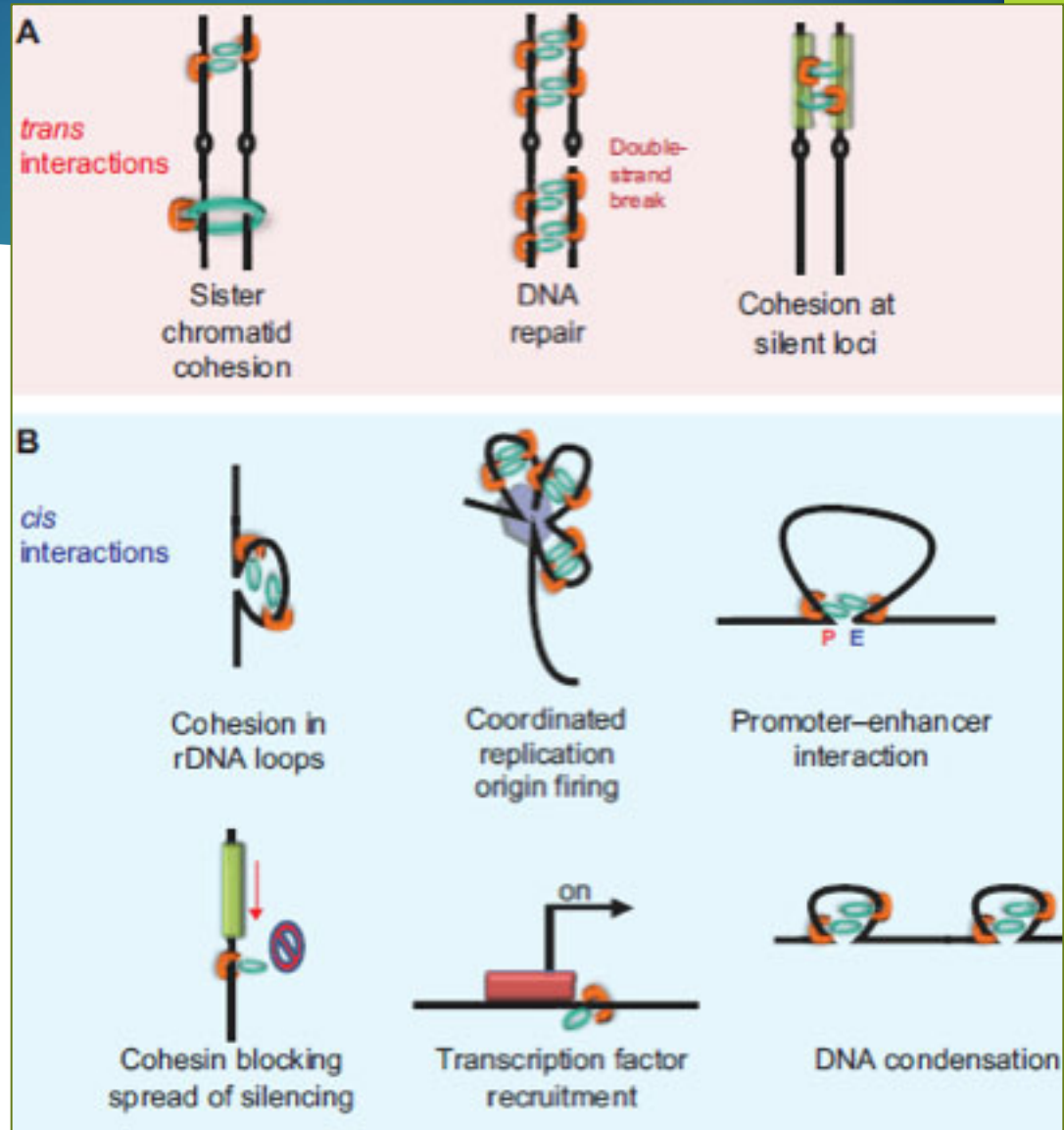


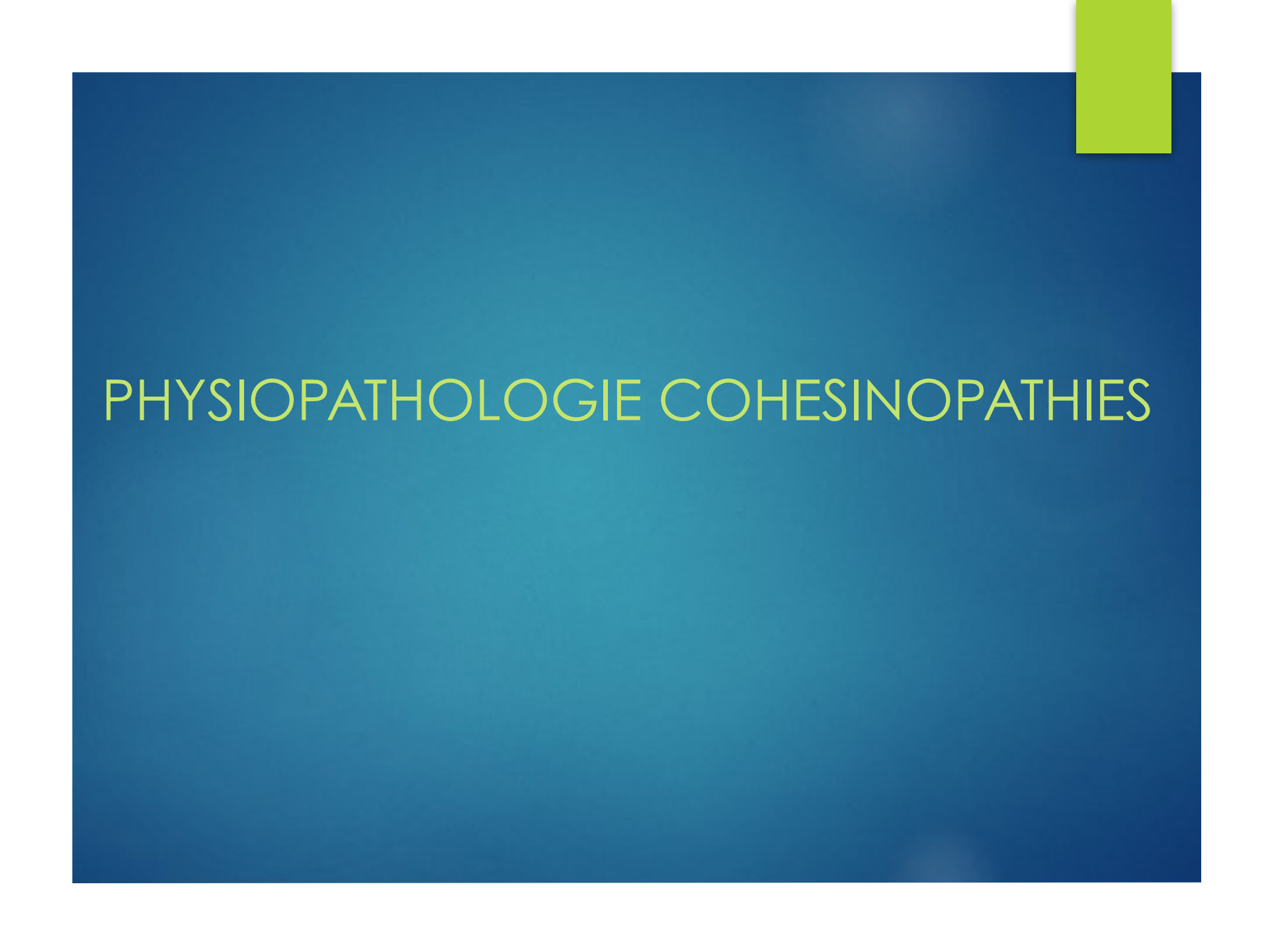
Figure 4 Structure of the β -globin locus

Régulation expression génique

- ▶ Boucles chromatinienne: **causes ou conséquences** de l'expression génique??
- ▶ **Très faible déplétion en CC peut altérer l'expression génique** alors qu'il faut que cette perte soit très importante (>80% des CC) pour altérer la ségrégation chromosomique
- ▶ Rôles propres des CC dans l'expression génique
 - ▶ Bloque enhancer : inhibe l'expression (Drosophile et IGF2/H19 chez Mm)
 - ▶ CC se fixent à des répétitions hétérochromatiques et liaison avec complexes polyComb (Drosophile): répression génique
 - ▶ Blocage de la RNA polymerase II et transition de l'état de « pause » à l'élongation (transcription)

BILAN





PHYSIOPATHOLOGIE COHESINOPATHIES

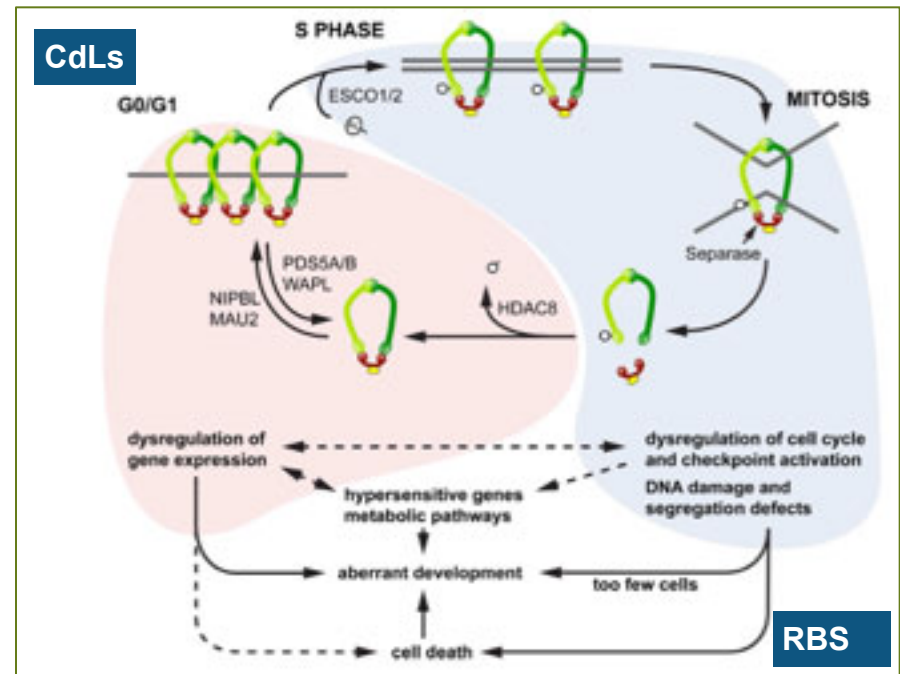
Cohésinopathies

► Base génétique commune

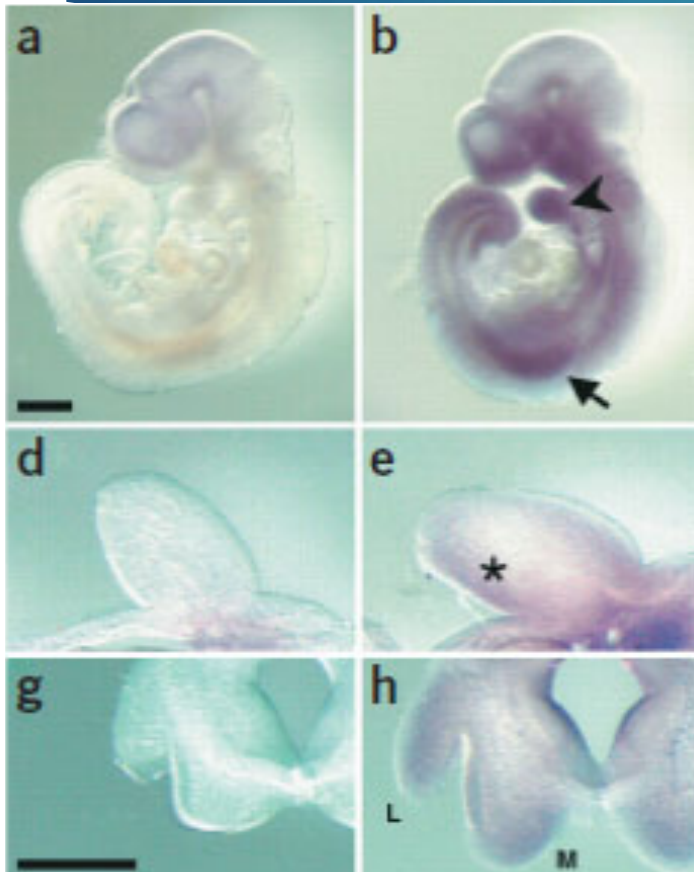
- CdLS: dérégulation transcriptionnelle
- RBS: taux élevé d'apoptose et diminution de la prolifération cellulaire des progéniteurs

► Mutations ESCO2: taux élevé de cellules en apoptose: cf syndrome de Roberts

► CdLS: modèle de dérégulation de la transcription:



CORNELIA DE LANGE



- ▶ Autosomique dominant, 1/10000
- ▶ associe
 - ▶ Retard mental
 - ▶ Dysmorphie faciale
 - ▶ Anomalie des membres supérieurs
 - ▶ Retard de croissance
- ▶ = 1^{er} gène impliqué: adhérine: **Scc2/NIPBL** (60% des patients)
 - ▶ Pattern d'expression chez la souris conforme aux signes cliniques (Krantz et al., 2004)
 - ▶ 2009: modèle de souris mutée NIPBL: phénotype du CdLs

CORNELIA DE LANGE

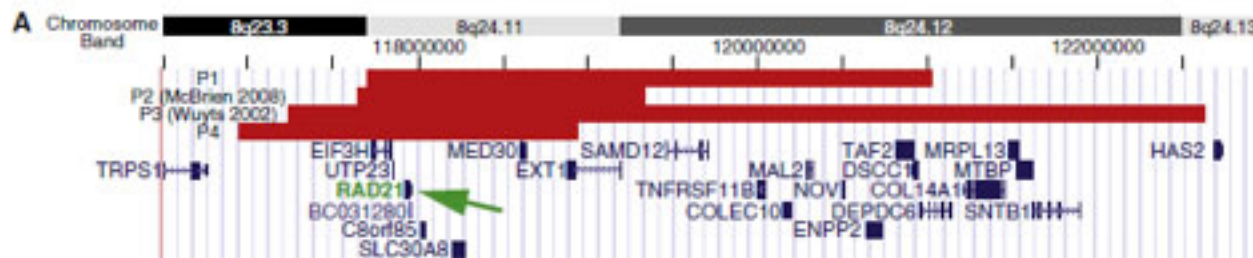
- ▶ **NIPBL**: modification locale de la chromatine par recrutement d'une histone déacétylase
 - ▶ Nombreuses mutations NIPBL altèrent cette fonction
- ▶ Autres gènes mutés dans le CdLs:
 - ▶ SMC1 α (lié à l' X) 5%/ SMC3 <1%: phénotype moins sévère
 - ▶ Autres possibilités (modèles animaux): STAG1/STAG2, PDS5B, HDAC8

Deardorff et al., 2012:

Puce chez 101 patients atteints de CdLs et 189 patients avec symptômes similaires:

1 microdélétion 8q24.1 emportant **RAD21**

+ 2 patients avec mutations dans **RAD21**

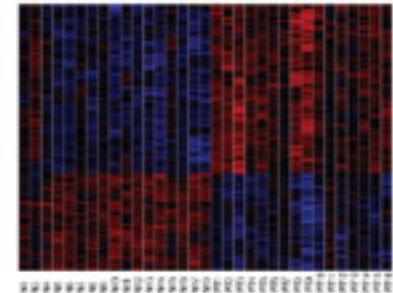


CORNELIA DE LANGE: mécanisme

- Pas de défaut mitotique ni de taux élevé d'apoptose!!

Transcriptional Dysregulation in *NIPBL* and Cohesin Mutant Human Cells

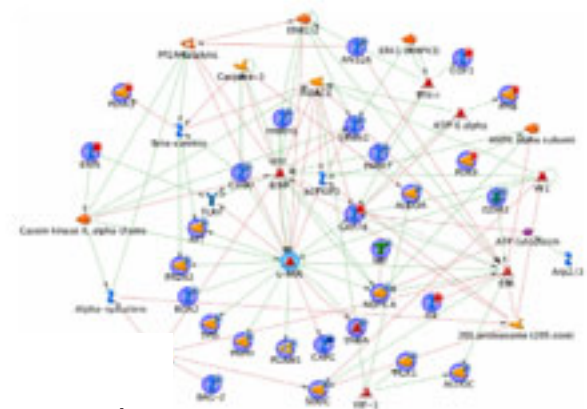
Jinglan Liu¹, Zhe Zhang², Masashige Bando³, Takehiko Itoh³, Matthew A. Deardorff^{1,4}, Dinah Clark¹, Maninder Kaur¹, Stephany Tandy¹, Tatsuro Kondoh⁵, Eric Rappaport⁶, Nancy B. Spinner^{1,4}, Hugo Vega⁷, Laird G. Jackson⁸, Katsuhiko Shirahige³, Ian D. Krantz^{1,4*}



- Puce d'expression sur cellules lymphoblastoïdes mutées *NIPBL*: 339 gènes dérégulés (ex: *HOXD*)
- Faible différence d'expression+++

Proteomic Profile Identifies Dysregulated Pathways in Cornelia de Lange Syndrome Cells With Distinct Mutations in *SMC1A* and *SMC3* Genes

Anna Gimigliano^{1,†}, Linda Mannini^{2,†}, Laura Bianchi¹, Michele Puglia¹, Matthew A. Deardorff¹, Stefania Menga², Ian D Krantz¹, Antonio Musio^{2,†}, and Luca Bini¹



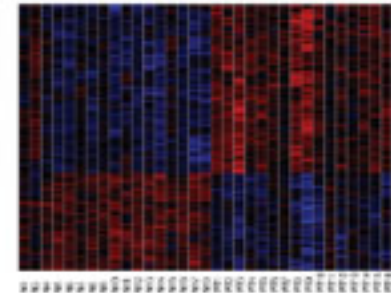
- Cellules mutées pour *SMC1A* et *SMC3*: 46 protéines dérégulées (métabolisme, cytosquelette, voie des ARNs...)
 - Un lien entre elles: c-MYC, dérégulé dans le CdLS (cf mutants Rad21) et diminution fixation CC nv 1^{er} exon c-MYC

CORNELIA DE LANGE: mécanisme

- Pas de défaut mitotique ni de taux élevé d'apoptose!!

Transcriptional Dysregulation in *NIPBL* and Cohesin Mutant Human Cells

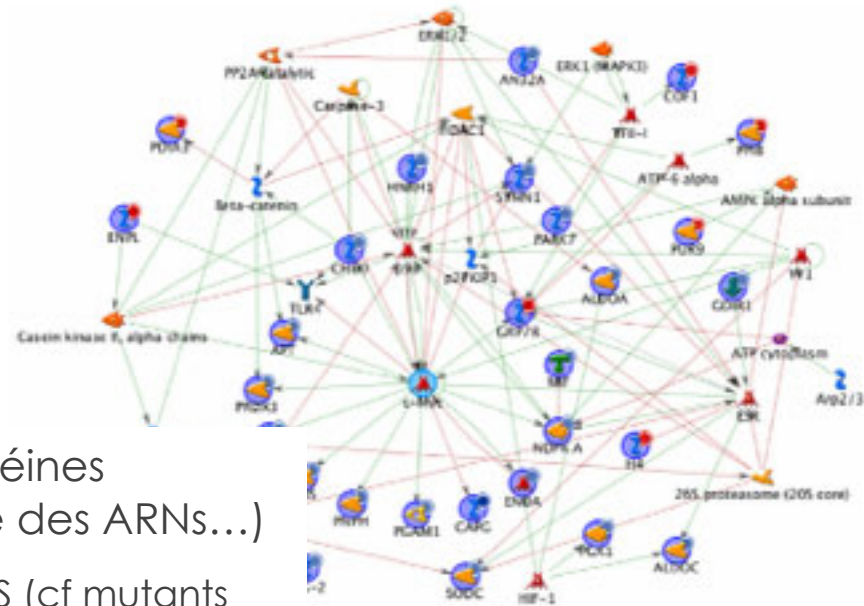
Jinglan Liu¹, Zhe Zhang², Masashige Bando³, Takehiko Itoh³, Matthew A. Deardorff^{1,4}, Dinah Clark¹, Maninder Kaur¹, Stephany Tandy¹, Tatsuro Kondoh⁵, Eric Rappaport⁶, Nancy B. Spinner^{1,4}, Hugo Vega⁷, Laird G. Jackson⁸, Katsuhiko Shirahige³, Ian D. Krantz^{1,4*}



- Puce d'expression sur cellules lymphoblastoïdes mutées *NIPBL*: 339 gènes dérégulés (ex: *HOXD*)
- Faible différence d'expression+++

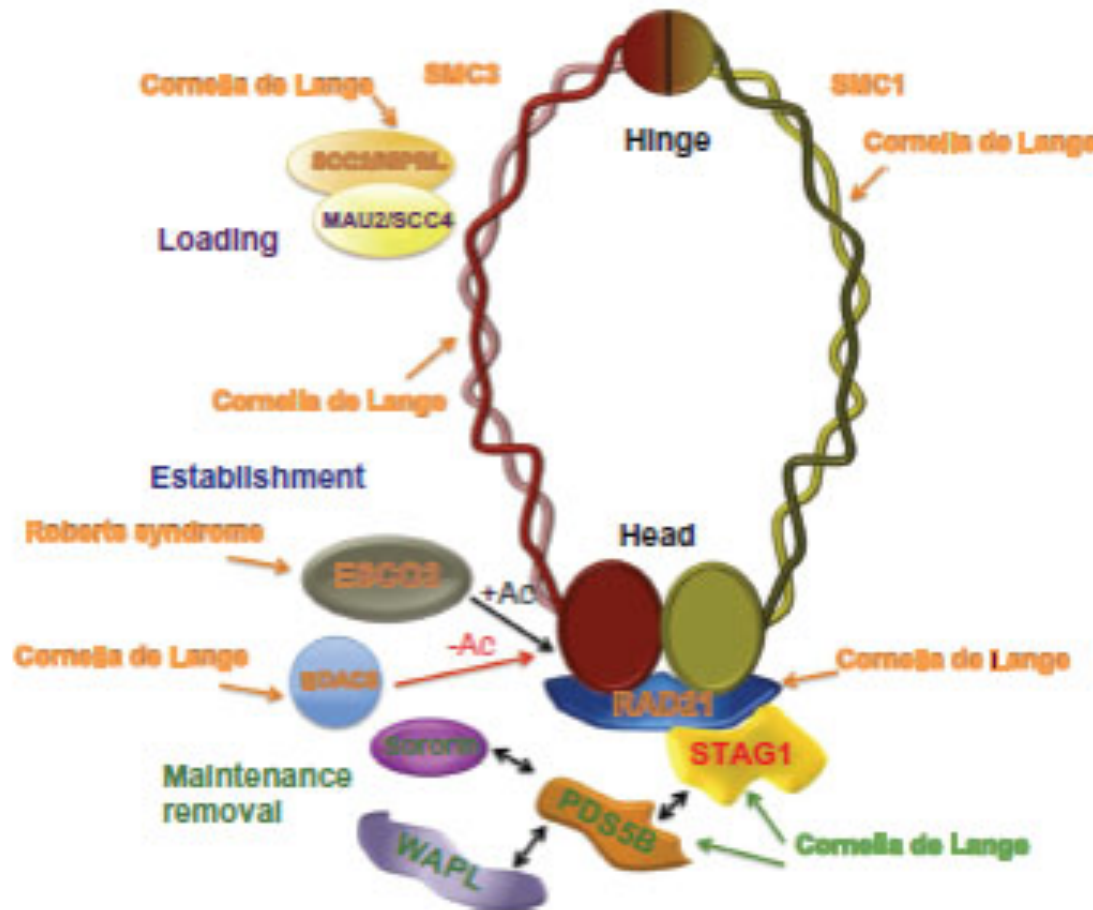
Proteomic Profile Identifies Dysregulated Pathways in Cornelia de Lange Syndrome Cells With Distinct Mutations in *SMC* Genes

Anna Gimigliano^{1,†}, Linda Mannini^{2,†}, Laura Bianchi¹, Michele Puglia¹, Matthew A. Deardorff¹, Stefania Menga², Ian D. Krantz¹, Antonio Musio^{2,*}, and Luca Bini¹



- Cellules mutées pour *SMC1A* et *SMC3*: 46 protéines dérégulées (métabolisme, cytosquelette, voie des ARNs...)
 - Un lien entre elles: c-MYC, dérégulé dans le CdLS (cf mutants *Rad21*) et diminution fixation CC nv 1^{er} exon c-MYC

PHYSIOPATHOLOGIE DES PRINCIPALES COHESINOPATHIES



CONCLUSION

- ▶ Depuis une quinzaine d'année où les cohésines ont été découvertes chez la levure et *Xenopus* comme **acteur clef de la ségrégation des chromosomes**: **Nombre de fonctions des cohésines augmente de manière exponentielle**: de la régulation génique à la condensation des chromosomes en passant par la réparation de l'ADN
- ▶ Régulation transcriptionnelle : Cohésine= **marque épigénétique** contrôlant l'expression génique
 - ▶ **MAIS: complexité** du ou des mécanismes par le-(les)-quel(s) les cohésines activent ou répriment un gène directement ou indirectement
- ▶ **Complexité des interactions** avec les différentes cibles et substrats pour une grande variabilité de fonctions différentes
 - ▶ **Et pourtant: un seul complexe protéique!!!**
- ▶ Cohésines et protéines associées= **organisateur clef de la chromatine à la fois pendant la mitose et l'interphase: « architectines »**

FUTURES DIRECTIONS

- ▶ Etude des **cohésinopathies** : meilleure compréhension des mécanismes
- ▶ Etude des **signaux moléculaires** activant les cohésines
- ▶ Etude des **différents « pool » de cohésines** : sont-elles toutes destinées aux mêmes fonctions?
- ▶ Etude de la **conformation spatiale des CC**:
 - ▶ stable ou non sur les chromatides
 - ▶ Modèles 1 ou 2 anneaux ?? : « photographie »
- ▶ ...

Translational mechanisms at work in the cohesinopathies

Jennifer L. Gerton

The Stowers Institute for Medical Research; Kansas City, MO USA

- ▶ CC réguleraient l'expression génique en se fixant directement aux promoteurs et enhancers
- ▶ Gerton propose: influenceraient l'expression génique à travers des modifications de la traduction en agissant sur les ARNs (cf ribosomopathies)

LE SEIGNEUR DES ANNEAUX

LA COMMUNAUTE DE L'ANNEAU



The End