



HAL
open science

Étude du rôle des méthyltransférases de la Lysine 20 de l’Histone H4 dans la dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire

Fanny Izard

► **To cite this version:**

Fanny Izard. Étude du rôle des méthyltransférases de la Lysine 20 de l’Histone H4 dans la dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT136 . tel-01716420

HAL Id: tel-01716420

<https://theses.hal.science/tel-01716420v1>

Submitted on 23 Feb 2018

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
Unité de recherche : Institut de recherche en Cancérologie de Montpellier

Etude du rôle des méthyltransférases de la Lysine 20 de l'Histone H4 dans la dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire

Présentée par Fanny IZARD
Le 21 Novembre 2017

Sous la direction de Eric JULIEN

Devant le jury composé de

Frédéric Bantignies, DR, Institut de génétique humaine (IGH), Montpellier	Examineur
Philippe Arnaud, DR, Génétique reproduction et développement (GReD), Clermont-Ferrand	Examineur
Sophie Polo, CR, Centre épigénétique et destin cellulaire (CECD), Paris	Rapporteur
Jean-Sébastien Hoffmann, DR, Centre de recherche en cancerologie de toulouse (CRCT), Toulouse	Rapporteur
Éric Julien, CR, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM), Montpellier	Directeur de thèse
Charlotte Grimaud CR, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier (IRCM), Montpellier	Co-encadrante



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

À Aurélien.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les Dr Sophie Polo, Jean-Sébastien Hoffmann, Frédéric Bantignies et Philippe Arnaud d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. J'espère que la lecture aura été agréable aux deux rapporteurs et que vous aurez tous trouvé un intérêt à évaluer ce travail ! Je remercie aussi beaucoup les membres du jury de mes comités de thèse, Frédéric Bantignies, Philippe Coulombe et David Llères, vous m'avez beaucoup aidée à faire progresser ce travail par vos conseils tout au long de ma thèse.

Je remercie particulièrement Marion Peter qui m'a encadrée durant mes deux stages de master et qui m'a enseignée les bases du FRET/FLIM, ce qui m'a servi plus tard pour entamer le projet d'étude de compaction de la chromatine. Merci Marion, pour ta patience et ta disponibilité ! Ce projet d'étude de compaction de la chromatine n'aurait pas été envisageable sans l'aide de David Llères qui m'a aussi formée au FRET au tout début de ma thèse, qui m'a fourni les premières lignées H2B-2FP et qui était toujours disponible pour m'aider lorsque le microscope déconnait ou que j'avais un problème avec une analyse. Tu es pour beaucoup dans l'avancement de ce projet David. Merci aussi à la plateforme MRI pour leur aide technique !

Je remercie aussi tous les collaborateurs qui nous ont permis d'aborder dans notre équipe des aspects bien éloignés de nos travaux habituels.

Merci à tous les membres historiques de l'équipe Claude Sardet qui m'ont accueillie dans leur équipe à l'IGMM en octobre 2013 (déjà !). Un merci particulier à Claude qui a entamé les démarches pour que je fasse une thèse dans cette équipe. Je me suis sentie très entourée grâce à vous tous ! Je me rappelle de Julien qui regarde le coucher de soleil avec Thibault le soir et des apéros qu'on a pu partager (qu'est-ce que vous m'avez manqué par la suite !!), de la gentillesse et de l'écoute de Stéphanie, des râleries de Fafa (continues Fafa, faut pas se laisser faire !), de Conception, de Hélène, et des rires de Geneviève bien sûr, et tout ça je crois que je ne l'oublierai jamais. Merci à Julien Brustel de m'avoir passé le flambeau sur le projet réplication, j'ai été très contente de te rencontrer ! Merci en particulier à Geneviève, Fafa et Stéphanie qui ont suivi à l'IRCM et qui ont permis de faire perdurer l'esprit CSL un peu ! Merci Geneviève pour tous ces moments, pour ta fougue, ta bonne humeur, j'ai aimé voir à travers toi tes enfants grandir ! Bonne continuation, tu me manqueras ! Merci Fafa pour ton écoute aussi, j'ai apprécié tous tes conseils, surtout ceux qui me disaient de ne pas trop m'en faire avec le travail, la vie ce n'est pas ça, tu as bien raison !

Merci aux 3 stagiaires qui sont passés et qui ont contribué à ce travail de thèse, Céline, Ambrine, Yannick, bonne chance pour la suite. Merci surtout à toi Yannick de reprendre ce travail de thèse et de te lancer dans le FRET, j'espère que tu ne le regretteras pas.

Merci à tous ceux qui ont fait que ces années à l'IRCM ont été agréables, à nos voisins les Djiane, à Rémi surtout qui soutient juste après moi. Tu vois que ça l'aura fait ! Tu es la preuve vivante qu'on peut écrire une thèse en 1 mois et demi tout en continuant les manip et en participant à un congrès ! Bravo !

Je remercie éééénormément mon équipe bien sûr. Amel, tu me manques ! Merci beaucoup pour tous tes conseils, ces très nombreuses pauses café et au final cette amitié, j'espère que tu pourras être là le jour de la soutenance ! Nabiya, je te souhaite le meilleur pour la suite ! Occupes toi bien du petit Yannick :)

Charlotte, j'ai du mal à trouver les mots, mais en vrac je te remercie pour ta graaande disponibilité, ta bonne humeur, ta compréhension, ton soutien moral indéfectible, merci pour tout ton temps passé à m'aider à travers des relectures de dossiers, des comités à préparer, des réponses sur des questions scientifiques. Tu es une très bonne scientifique Charlotte, ta vivacité d'esprit et ton sens critique m'impressionnent ! Donc bravo et merci, tout le meilleur pour la suite dans ta vie familiale et professionnelle. Tu me manqueras !

On arrive au passage compliqué. ERIC ! J'ai beaucoup trop de mercis à t'adresser ! J'ai eu tellement de chance de tomber sur toi à la fin de mon master. Merci de m'avoir fait confiance au tout début pour entamer cette thèse avec toi sans me connaître, merci pour ton soutien précieux au niveau technique et humain, merci pour tout ce temps passé à m'aider, j'espère que tu ne l'as pas regretté, merci d'avoir essayé de me donner confiance en moi, en me félicitant et en m'encourageant. Merci aussi de m'avoir remise en place des fois quand je déconnais ! J'ai beaucoup aimé te rencontrer puis passer ces quatre années avec toi, tu es un très bon chercheur et aussi un super formateur, les stagiaires et thésards qui continueront avec toi auront beaucoup de chance.

Je remercie aussi mes parents, ma soif d'apprendre vient de vous. Maman tu as toujours été étonnée qu'une littéraire comme toi ait pu donner naissance à une scientifique comme moi, mais à travers ton sens critique, ton goût de la découverte et ton encouragement sans faille, tu as grandement contribué à ce que je nourrisse l'envie de faire des longues études et que je réussisse ! Papa, j'ai voulu tout savoir du monde qui nous entoure grâce à toi et à ta curiosité, et surtout grâce à un jour où tous les deux sur ton tracteur tu me donnais le nom des fleurs sur le bord du chemin. Merci Bonne-maman, tu es notre phare à tous. Merci ! Merci à Arthur, mon jumeau, tu as été d'un soutien sans faille tout au long de cette thèse, comme tu l'as été depuis toujours. Merci à Claire, ma sœur, merci à Julien mon grand frère. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Merci à tous les autres : Christiane, Manu, Doud, Martin, Amandine, à tous mes amis : Claire, Gilou, Gaston, Elina, Aïda, Camille, Axelle, Anna, Fred ... La vie ne serait pas la même sans vous ! Merci Julien, on avait commencé une thèse presque ensemble, et je la finis seule, tu nous manques à tous Julien et tu aurais dû être là pour cette soutenance.

Merci à ma très très belle Famille, Christian, Marie et Céline. Merci de m'avoir intégrée dans votre famille et d'avoir toujours été là pour nous dans les bons et les mauvais moments.

Aurélien, cette thèse t'est dédiée (ça veut pas dire que tu dois te sentir obligé de la lire en entier !). Je n'y serais jamais arrivé sans ton soutien. Une autre vie nous attend et je suis tellement contente de la vivre encore avec toi (<3).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	8
AVANT-PROPOS	12
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	18
PARTIE 1 : DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA DIVISION CELLULAIRE ET VOIE DE METHYLATION H4K20	20
1. ROLES DES PROTEINES "NON-HISTONES" DANS LA CONDENSATION DES CHROMOSOMES	20
2. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES D'HISTONES	24
3. ROLES DE LA VOIE DE METHYLATION H4K20 DANS LA COMPACTION DE LA CHROMATINE EN MITOSE	27
3.1. ROLE DE PR-SET7 DANS LA COMPACTION MITOTIQUE	27
3.2. SUV4-20H2 ET COHESINES	27
3.3. LA MONO-METHYLATION H4K20 DEPEND DE L'ABSENCE D'ACETYLATION H4K16?28	
4. DECONDENSATION DE LA CHROMATINE EN SORTIE DE MITOSE	29
PARTIE 2 : REGULATION EPIGENETIQUE DES GENES DU CYCLE CELLULAIRE PAR LA VOIE DE METHYLATION H4K20 : L'EXEMPLE DE LA VOIE RB/E2F	32
1. IMPLICATION DES PROCESSUS EPIGENETIQUES DANS LA TRANSCRIPTION DES GENES CIBLES D'E2F.	32
2. ROLE DE LA VOIE H4K20 DANS LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE POUR LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES CIBLES DE E2F	35
PARTIE 3 : ROLE DE LA VOIE DE METHYLATION H4K20 DANS LA DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA REPLICATION	36
1. ROLE DE LA CHROMATINE DANS LA REPLICATION	38
1.1. ORGANISATION ET STRUCTURE CHROMATINIENNE DES ORIGINES DE REPLICATION	38
1.2. FIXATION DES PROTEINES ORCS SUR LES ORIGINES DE REPLICATION.....	39
1.3. FIXATION DU PRE-RC ET DU COMPLEXE DE PRE-INITIATION.....	40
1.4. LES PROTEINES ET MARQUES DE CHROMATINES REGULENT LA CINETIQUE D'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION	40
1.5. PR-SET7 ET LES SUV4-20H REGULENT L'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION VIA LA METHYLATION H4K20.....	42
1.6. ROLE DE LA CHROMATINE DANS L'AVANCEE DES FOURCHES DE REPLICATION	44

2. CONSERVATION DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA REPLICATION	45
2.1. RECYCLAGE DES HISTONES PARENTALES	45
2.1.1. DYNAMIQUE DES HISTONES AU NIVEAU DES FOURCHES DE REPLICATION	45
2.1.2. LES PROTEINES CHAPERONNES D'HISTONES	46
2.2. SYNTHÈSE ET INCORPORATION DES HISTONES NEOSYNTHÉTISÉES	48
2.2.1. LA SYNTHÈSE DES HISTONES EST RÉGULÉE AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE.....	48
2.2.2. INCORPORATION DES HISTONES NOUVELLEMENT SYNTHÉTISÉES	50
2.3. MATURATION ET PROPAGATION DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE	51
2.3.1. CONSERVATION DES PTM D'HISTONES.....	51
2.3.2. ÉTABLISSEMENT ET MAINTIEN DE LA CHROMATINE SILENCIEUSE	54
A. LA MATURATION DE LA CHROMATINE NECESSITE UNE MODIFICATION DES HISTONES NOUVELLEMENT SYNTHÉTISÉES APRES LEUR ASSEMBLAGE A LA CHROMATINE	54
B. PROPAGATION DE L'HÉTÉROCHROMATINE	55
ROLE DES PROTEINES ORCS.....	56
DI- ET TRI-MÉTHYLATION H4K20/SUV4-20H ET STRUCTURE DE L'HÉTÉROCHROMATINE.	57

PARTIE 4 : ROLES DE LA VOIE H4K20 DANS LES MÉCANISMES DE RÉPONSE AUX DOMMAGES ADN58

1. MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES D'HISTONES IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE AUX DOMMAGES ADN	60
2. ENZYMES DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE DÉPENDANTES DE L'ATP	61
3. RÔLE DE LA MÉTHYLATION H4K20 DANS LA RÉPARATION DES DOMMAGES ADN	62

PARTIE 5 : STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET TUMORIGÈNESE : IMPLICATIONS DE LA VOIE DE MÉTHYLATION H4K20 DANS LE CANCER66

1. MÉTHYLATION DES LYSINES ET CANCER.....	67
2. INHIBITION DE LA MÉTHYLATION DES LYSINES PAR DES MOLECULES CHIMIQUES .	68
3. IMPLICATION DE LA VOIE H4K20 ET DES ENZYMES ASSOCIÉES DANS LA TUMORIGÈNESE	69
3.1. PR-SET7 ET MONO-MÉTHYLATION H4K20 DANS LE DÉVELOPPEMENT CANCÉREUX	69
3.2. DÉRÉGULATION DE SUV4-20H ET H4K20ME2/3 DANS LES CANCERS	70
3.3. LA VOIE H4K20, UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE ?	70

OBJECTIFS DE LA THÈSE74

RESULTATS76

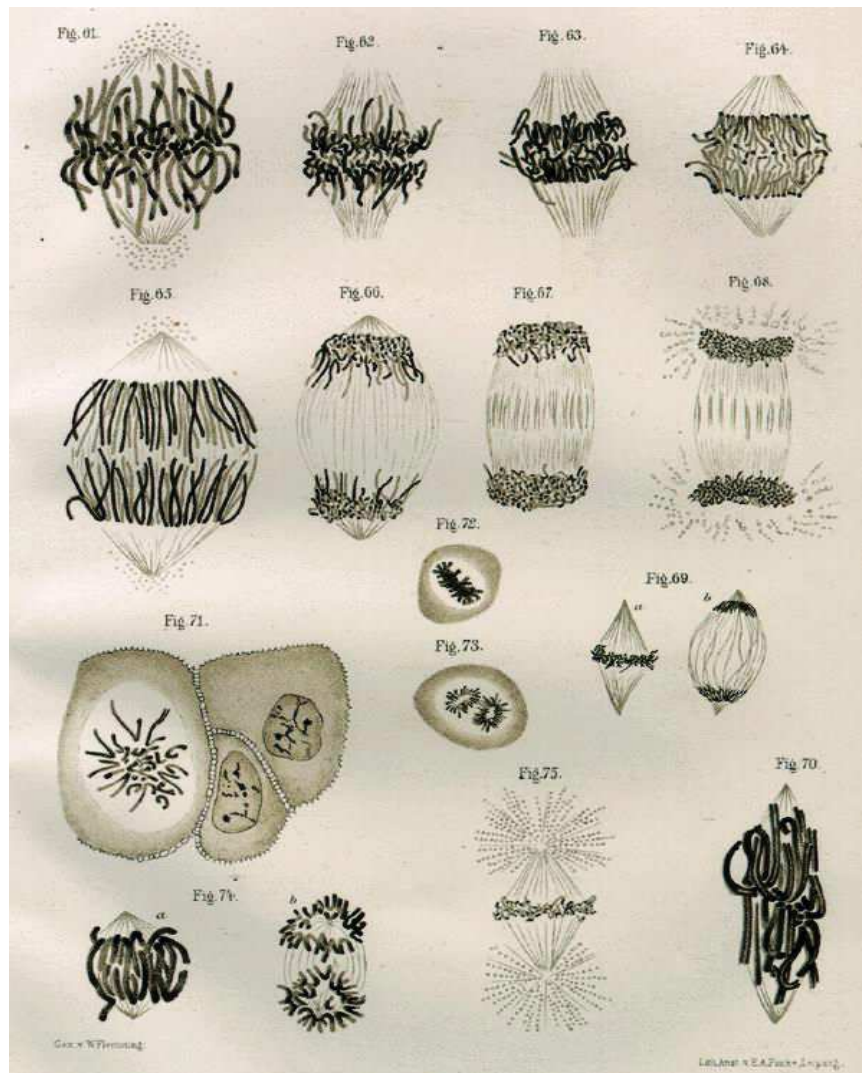
I. LA VOIE DE MÉTHYLATION H4K20 CONTRÔLE L'ACTIVATION DES ORIGINES DE RÉPLICATION DANS LES RÉGIONS HÉTÉROCHROMATINIENNES.....78

1.	ARTICLE 1: HISTONE H4K20 TRI-METHYLATION AT LATE-FIRING ORIGINS ENSURES TIMELY HETEROCHROMATIN REPLICATION	78
1.1.	CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	80
1.2.	PRINCIPAUX RESULTATS	82
II.	LA VOIE DE METHYLATION H4K20 REGULE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE .84	
1.	ARTICLE 2: CHROMATIN COMPACTION LIMITS DNA REPLICATION LICENSING TO PROMOTE GENOME STABILITY.	86
1.1.	CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	88
1.2.	PRINCIPAUX RESULTATS	89
2.	ARTICLE 3: REPLICATION COUPLED PR-SET7 DEGRADATION PRECLUDES ORCA-INDUCED HETEROCHROMATIN COMPACTION	90
2.1.	CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE	92
2.2.	PRINCIPAUX RESULTATS	93
	DONNEES COMPLEMENTAIRES	96
III.	CARACTERISATION D'INHIBITEURS DE PR-SET7 POUR UNE UTILISATION EN THERAPIE CANCEREUSE	100
1.	CONTEXTE/PROBLEMATIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS	102
1.1.	ARTICLE 4 : STRUCTURES OF NAHUOIC ACIDS B-E PRODUCED IN CULTURE BY A STREPTOMYCES SP. ISOLATED FROM A MARINE SEDIMENT AND EVIDENCE FOR THE INHIBITION OF THE HISTONE METHYL TRANSFERASE SETD8 IN HUMAN CANCER CELLS BY NAHUOIC ACID A.	106
1.2.	ARTICLE 5: THE HISTONE H4-K20 METHYLTRANSFERASE SETD8 IS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET IN MULTIPLE MYELOMA	108
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	110
1.	LE ROLE DE PR-SET7 DANS LA REPLICATION ET LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE DEPEND DE LA METHYLATION H4K20	113
1.1.	LA METHYLATION H4K20 CONTROLE L'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION	113
1.2.	LES NIVEAUX DE METHYLATION H4K20 REGULENT L'AFFINITE DES PROTEINES ORC A LA CHROMATINE	114
1.3.	METHYLATION H4K20 DANS LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE	115
2.	ROLE DE LA VOIE DE METHYLATION H4K20 DANS LA FORMATION D'HETEROCHROMATINE DERRIERE LES FOURCHES DE REPLICATION	115
2.1.	LA FONCTION DE PR-SET7 DANS LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE DEPEND DE ORCA/LRWD1	116
2.2.	IMPLICATION DE LA DEACETYLATION DES HISTONES A LA CHROMATINE NAISSANTE	118

2.3.	IMPLICATION DE L3MBTL1	119
2.4.	DEGRADATION PROTEOLYTIQUE DE PR-SET7 SUITE A UN DOMMAGE ADN LIEE A SES FONCTIONS DANS LA LA REPONSE AUX DOMMAGES ADN ET LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ?	119
3.	LIEN ENTRE LES ROLES DE LA VOIE H4K20 DANS LA REPLICATION ET LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET LE CANCER.....	120
3.1.	EST-CE QUE LA FONCTION DE PR-SET7 DANS LE CANCER DEPEND DE SON ROLE DE REGULATEUR DE LA REPLICATION ET DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ? 120	
3.2.	CAS DU MYELOME MULTIPLE	121
3.3.	ROLE DE LA PERTE DE TRI-METHYLATION H4K20 DANS LE DEVELOPPEMENT CANCEREUX	122
	ANNEXE	124
	LISTE DES ABREVIATIONS	126
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128

AVANT-PROPOS

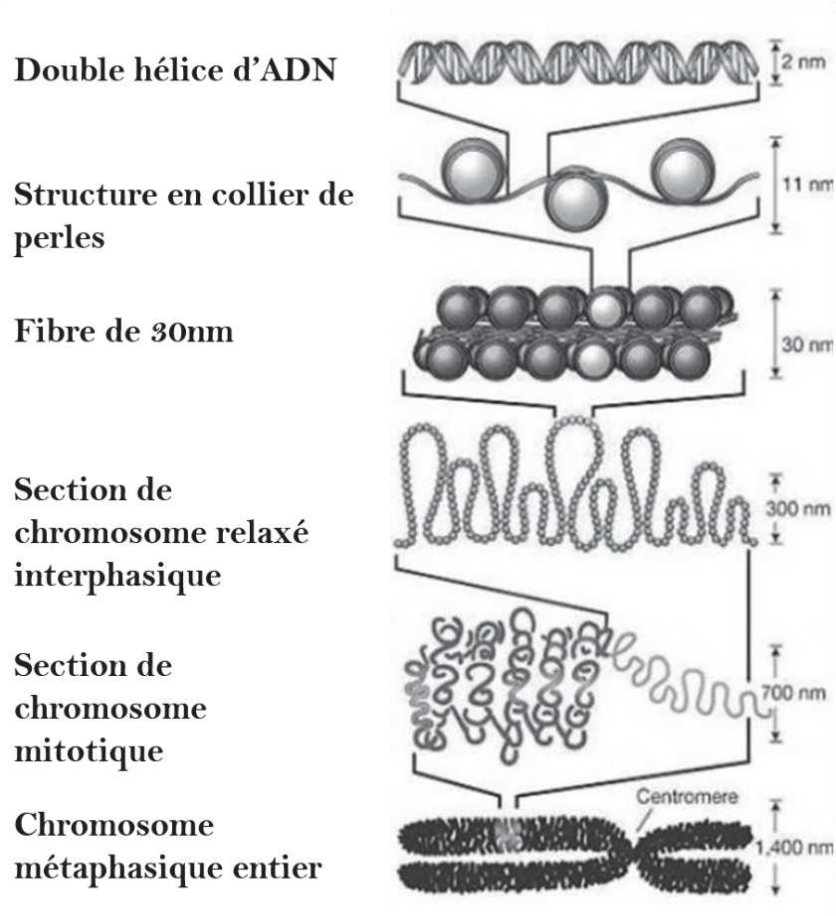
En 1882, en examinant des cellules d'embryons de salamandre au microscope, Walther Flemming observe une structure dense au sein du noyau qui réagit à la coloration par des colorants basiques comme les anilines. Il nomme cette structure chromatine, du Grec « Khroma » qui signifie « couleur ».



Dessins issus du livre de Walther Flemming « Zellsubstanz, Kern et und Zelltheilung » (substance cellulaire, noyau et division cellulaire) qui illustrent les étapes du cycle cellulaire telles qu' il les a observées en étudiant des embryons de salamandre colorés à l' anilline au microscope. (F. C. W. Vogel, Leipzig, 1882)

Aujourd'hui, on sait que dans les cellules eucaryotes, la chromatine permet l'organisation du matériel génétique, elle est composée d'ADN et de protéines. La chromatine permet l'enroulement des deux mètres de molécules d'ADN dans un noyau qui fait quelques dizaines de micromètres.

L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome qui est composé d'ADN enroulé autour d'octamères d'histones. Cette structure constitue le premier niveau de compaction de la chromatine. Les nucléosomes sont positionnés le long du génome pour former un nucléo-filament (structure en collier de perles) qui peut adopter d'autres niveaux de compaction pour résulter en un chromosome métaphasique hyper-condensé. Le concept de fibre de chromatine de 30nm est toutefois controversé puisqu'une étude a montré que cette fibre n'est pas présente dans le chromosome mitotique (Hansen, 2012).



Présentation des différents niveaux de compaction de la chromatine.

Malgré cette compaction, l'ADN doit être rapidement accessible pour permettre une interaction avec les machineries protéiques qui régulent la fonction de la chromatine. La dynamique de l'organisation de la chromatine influence toutes les fonctions du génome comme la réplication, la transcription et la réparation des dommages ADN. Elle est largement régulée par les modifications post-traductionnelles d'histones qui peuvent directement réguler la structure de la chromatine ou bien qui peuvent servir de site de liaison à des protéines effectrices. Une revue dont je suis co-première auteur avec Charlotte Grimaud résume les différentes modifications post-traductionnelles d'histones et leurs fonctions dans la structure de la chromatine (Izard et al., 2017) (Annexe 1). Les modifications post-traductionnelles des histones contribuent à générer des zones de

chromatines distinctes dans le noyau qui diffèrent par le niveau de compaction de la chromatine. Ainsi, on distingue la zone euchromatinienne, riche en gènes actifs et qui se caractérise par des marques de chromatine particulières et la zone hétérochromatinienne qui est une zone très compacte, pauvre en gènes, et qui présente les marques de chromatine H3K9me3, H4K20me3 et qui lie la protéine HP1 (Dambacher et al., 2013).

Au cours du cycle cellulaire la chromatine subit des modifications majeures en passant d'un état très compact, essentiel à la ségrégation des chromatides sœurs pendant la mitose, à un état ouvert, nécessaire à la réplication de l'ADN. L'avancée du cycle cellulaire et la transition entre les différentes phases du cycle est un mécanisme en grande partie régulé par les CDKs (Cyclin-dependent kinases) en complexe avec les Cyclines. Comme illustré

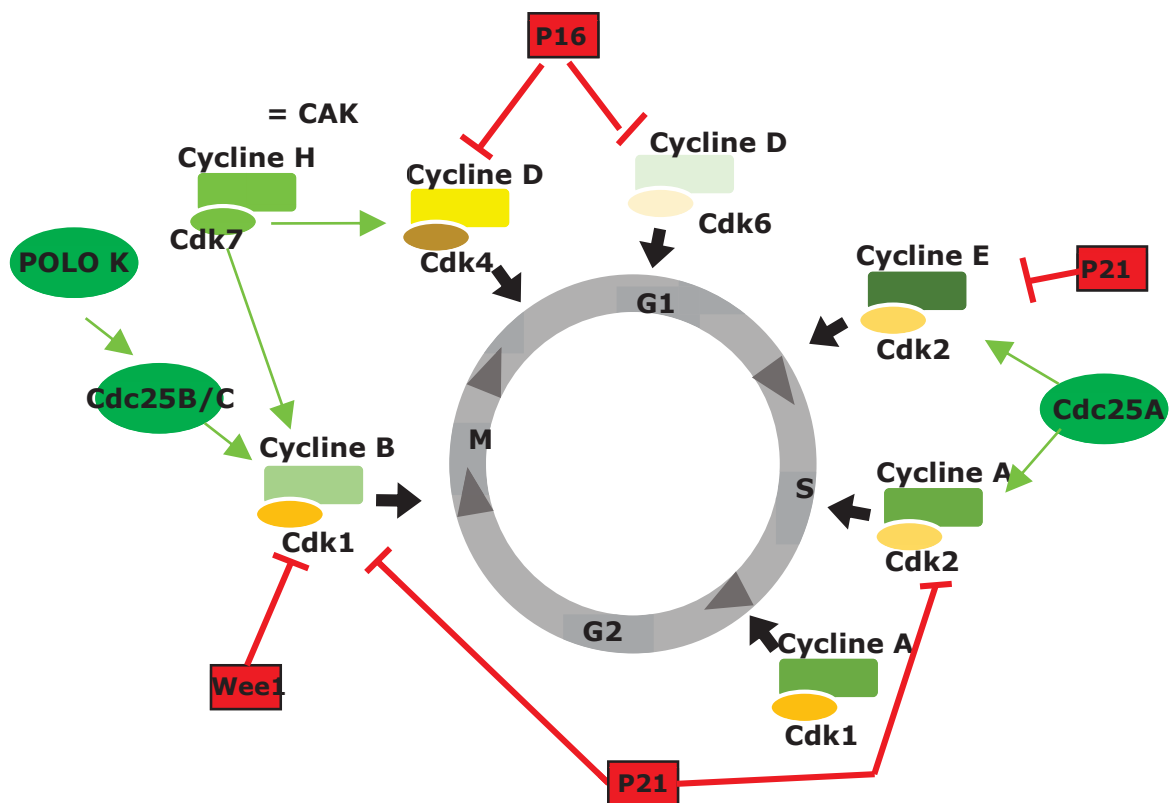


Figure 1 : Représentation schématisée de la régulation de l'avancée du cycle cellulaire par les complexes CDK-Cycline.

Les complexes CDK/Cyclines sont activés par une phosphorylation par le complexe CAK (CDK activator kinase) et par des déphosphorylations par Cdc25. Ils sont inhibés par les CKI (CDK inhibiteurs) P21 et P16 et par la kinase Wee1.

dans la Figure 1, les complexes CDK/Cyclines sont régulés par des phosphorylations et des déphosphorylations induites par différents facteurs. Toutes les étapes du cycle cellulaire sont caractérisées par un état chromatinien particulier qui permet leur bon déroulement.

Le laboratoire d'accueil a fortement participé à démontrer le rôle d'une voie de modification de la chromatine, la voie de méthylation de la lysine 20 de l'histone H4, dans le maintien de l'intégrité du génome *via* son implication dans de nombreux processus liés à la

dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire. PR-Set7 (SET domain-containing protein 7, aussi appelée Set8, Setd8 ou KMT5A pour Lysine méthyltransférase 5A) est l'unique enzyme connue pour mono-méthylé H4K20, cette mono-méthylation peut être convertie en di- et tri-méthylation par les enzymes Suv4-20h1 et Suv4-20h2 (Suppressor of variegation 4-20 homolog 1/2, KMT5B/C). La voie de méthylation H4K20 est schématisée en Figure 2. Les niveaux de méthylation H4K20 se caractérisent par une fluctuation importante au cours du cycle cellulaire causée par une dégradation spécifique de PR-Set7 au moment de la phase de réplication. Cette régulation protéolytique dépend

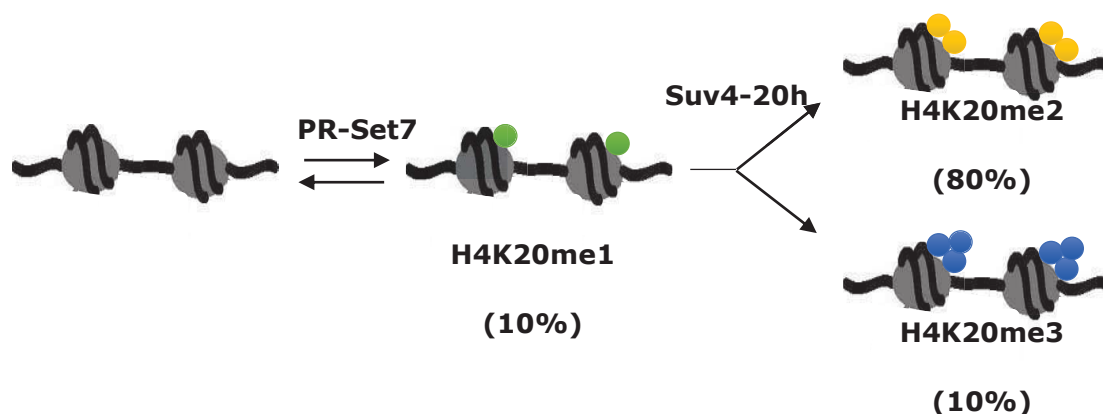


Figure 2 : Représentation schématique de la voie de méthylation H4K20.

Les abondances des différentes marques sont indiquées. La lysine 20 de l'histone H4 peut être méthylée par 3 enzymes, PR-Set7 est exclusivement une mono-méthyltransférase tandis que les Suv4-20h1 et 2 ont des activités de di- et tri-méthyltransférases. .

de l'interaction de PR-Set7 avec la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen), une protéine qui permet la processivité de l'ADN polymérase lors de la réplication, puis d'une ubiquitinylation par le complexe E3 ligase CRL4^{CDT2} et enfin d'une dégradation par le protéasome. La déplétion de PR-Set7 ou sa surexpression par mutation de son domaine PIP d'interaction avec PCNA (PCNA interacting protein) entraîne des défauts majeurs de réplication, de transcription, de compaction de la chromatine et plus généralement de progression au cours du cycle cellulaire, ce qui en fait un acteur majeur de la dynamique de la chromatine au cours du cycle.

Au cours de ma thèse, j'ai pu participer à démontrer l'implication de la tri-méthylation H4K20 dans la réplication des régions hétérochromatiniennes, ces résultats sont publiés dans un article sur lequel je suis co-première auteur (Brustel et al., 2017). De plus, des études de microscopie haute résolution m'ont permis d'élucider le rôle de la voie de méthylation H4K20 dans la structure de la chromatine, en tant que voie permettant de réguler la fixation des composants du pre-RC avant la réplication (manuscrit en cours de soumission en collaboration avec Claus S. Sorensen) et régulant aussi la maturation de la chromatine après la réplication de l'ADN (Article sous forme manuscrite, 1er auteur). De nombreuses études suggèrent également une implication de la voie H4K20 et notamment

de PR-Set7 dans la tumorigénèse. Deux articles auxquels j'ai contribué, dont un paru et un en cours de soumission (Williams et al., 2016, Herviou et al.), consistent à caractériser des inhibiteurs chimiques de PR-Set7 dans le but de déterminer l'intérêt potentiel de cibler cette enzyme pour une utilisation en thérapie cancéreuse.

Avant de présenter les résultats obtenus au cours de ma thèse, l'introduction bibliographique aura pour but de discuter des mécanismes liés au cycle cellulaire occasionnant des modifications de la structure de la chromatine, et en particulier des modifications d'histones, et de comprendre comment les changements dynamiques de la structure de la chromatine influencent toutes les étapes du cycle cellulaire. Dans un premier chapitre je discuterai de l'implication des mécanismes épigénétiques, et en particulier de la voie de méthylation H4K20, dans la division mitotique. En plus de réguler la condensation de la chromatine à travers le cycle cellulaire, la dynamique de la chromatine permet de réguler l'expression de gènes clés dans l'avancée du cycle. L'exemple de la voie RB/E2F, qui permet la transition G1/S, sera discuté dans le deuxième chapitre. La dynamique de la chromatine, et en particulier la voie H4K20, est très impliquée dans le processus de réplication, cet aspect sera discuté dans le chapitre trois. Un autre aspect de la vie cellulaire nécessitant un contrôle strict des modifications d'histones et de la structure de la chromatine concerne la réparation des dommages ADN qui est un processus complexe. Nous verrons quelle est l'implication de la voie H4K20 dans ce mécanisme au cours du chapitre quatre. Il est maintenant clairement admis que des modifications de facteurs de régulation de la structure de la chromatine *via* des mutations ou des altérations de l'expression génique peuvent accélérer la progression du cycle cellulaire et, finalement, résulter en une transformation cancéreuse. Dans le chapitre cinq je discuterai des mécanismes liant les modifications d'histone et le développement cancéreux ainsi que des récentes avancées dans le développement d'outils ciblant des voies épigénétiques impliquées dans la structure de la chromatine, et en particulier de PR-Set7. Au final, je terminerai mon manuscrit de thèse par une discussion générale des résultats que j'ai obtenus et des perspectives qui en découlent.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA DIVISION CELLULAIRE ET VOIE DE METHYLATION H4K20

Avant la mitose, le chromosome subit une phase de réplication dans le noyau et le volume nucléaire augmente pour s'adapter au doublement de la quantité d'ADN. La compaction des chromosomes au cours de la mitose permet d'assurer un bon déroulement de la ségrégation des chromosomes en deux cellules filles. Des études récentes d'imagerie permettant de quantifier cette compaction entre les deux états chromatiniens ont montré que la chromatine mitotique est deux fois plus compacte que la chromatine interphasique (Llères et al., 2009; Martin and Cardoso, 2010). Selon des données de super-résolution combinées au suivi de nucléosomes uniques, la chromatine est structurée en domaines chromatiniens compacts d'environ 160nm organisés par des protéines non histones, les cohésines et ces domaines sont conservés au cours de la mitose (Nozaki et al., 2017). Dans cette première partie je discuterai des mécanismes moléculaires responsables de la dynamique de la chromatine au moment de la mitose en abordant le rôle des protéines non-histones ainsi que des histones et de leurs modifications post-traductionnelles. Des études suggèrent une implication de la voie H4K20 et plus spécifiquement de la mono-méthylation H4K20 dans la compaction mitotique, les différentes hypothèses concernant ce mécanisme seront présentées.

1. ROLES DES PROTEINES "NON-HISTONES" DANS LA CONDENSATION DES CHROMOSOMES

L'utilisation de méthodes de « Chromosome Conformation Capture » telles que le 5C et le Hi-C dans des cellules humaines à des moments précis du cycle cellulaire ont montré que les chromosomes mitotiques présentent une structure commune partagée par de nombreux types cellulaires (Naumova et al., 2013). Les chromosomes mitotiques se compactent, entre autres, par l'introduction d'une série de boucles d'ADN intra-chromosomiques le long du chromosome (Dekker and Mirny, 2016; Liang et al., 2015). La condensation commence en début de prophase, donc avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, grâce au repliement des fibres de chromatines qui atteignent ~700nm de diamètre en fin de prophase (Kireeva et al., 2004). Cet évènement de condensation est le résultat de l'activation des Cycline B1-CDK1 puis de leur translocation dans le noyau et de l'activation par phosphorylation des condensines (Abe et al., 2011a). Les condensines sont les protéines majeures dans la condensation des chromosomes durant la mitose. Le moteur de la phase initiale de compaction est sujet à débats mais les complexes condensines pourraient jouer un rôle important puisque leur déplétion conduit à un retard de compaction mitotique (Hagstrom et al., 2002; Hudson et al., 2003).

Le complexe Condensine est un pentamère composé de deux protéines de la famille des SMC (Structural maintenance of chromosome) et de trois sous-unités non-SMC : une kleisine (NCAPH) et deux protéines à domaine HEAT (NCAPG/D). Il existe deux complexes

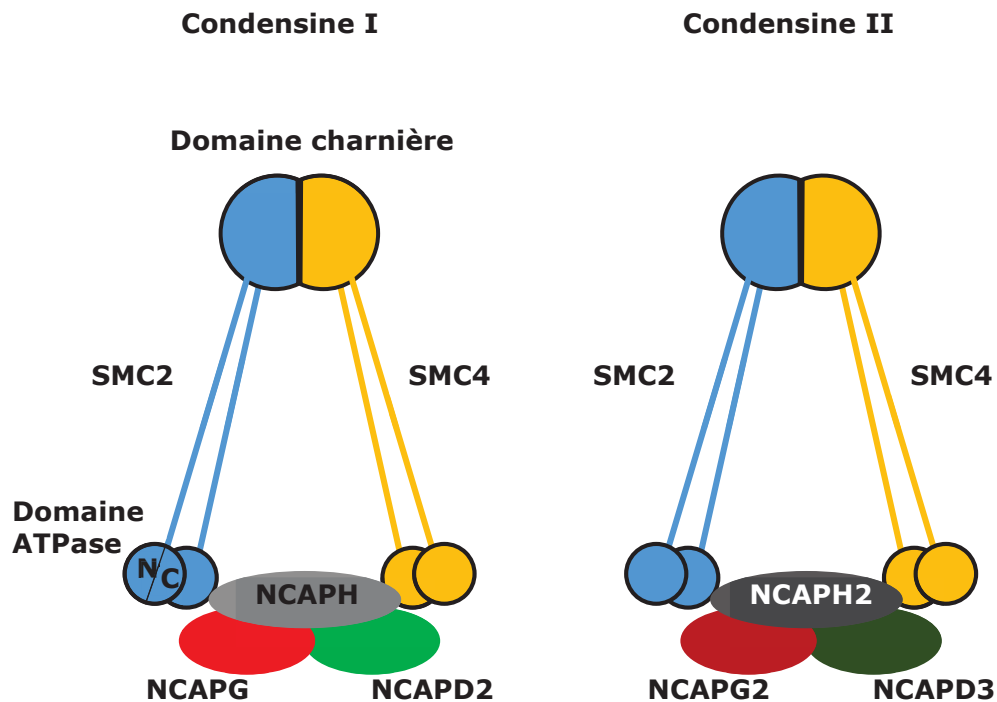


Figure 3 : Représentation schématique des complexes condensines I et II.

L'hétérodimère SMC2/SMC4 s'associe avec NCAPH, NCAPG et NCAPD2 pour former le complexe condensine I ou avec NCAPH2, NCAPG2 et NCAPD3 pour former le complexe condensine II.

condensines qui diffèrent par leurs protéines non-SMC (condensine I et condensine II), la composition en protéines SMC et non-SMC des complexes condensines I et II est schématisée en Figure 3.

Les deux protéines SMC forment une boucle antiparallèle flanquée d'un domaine ATPase et d'un domaine charnière requis pour la liaison entre les protéines SMC (pour revue voir (Kalitsis et al., 2017)). Les domaines ATPases interagissent avec la sous-unité kleisine, ainsi les deux SMC et la sous-unité kleisine forment un anneau fermé et les protéines à domaine HEAT interagissent avec le complexe *via* une interaction avec la kleisine. Le complexe ainsi formé entoure la molécule d'ADN de la même façon que les cohésines (complexes protéiques à la structure similaire aux condensines impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs, la réparation de l'ADN et la régulation transcriptionnelle). Les domaines ATPases des protéines SMC interagissent de plus entre elles suite à la fixation d'un ATP et se dissocient avec l'hydrolyse de l'ATP. Le but de ce cycle fixation/hydrolyse de l'ATP est encore peu clair, cependant des mutations du domaine ATPase ont montré que la liaison de l'ATP, mais pas son hydrolyse, est essentielle à l'association des condensines avec les chromosomes (Kinoshita et al., 2015). La façon dont les protéines SMC lient et

interagissent avec l'ADN reste toujours une question majeure. Le complexe condensine II lie la fibre de chromatine tout le long du cycle cellulaire tandis que le complexe condensine I lie les chromosomes seulement après la rupture de l'enveloppe nucléaire. Les condensines ont aussi une fonction de condensation des chromosomes en interphase (Llères et al., 2017; Zhang et al., 2016b). Les deux types de condensines contribuent à la compaction mitotique. Les événements de liaison et de relargage des cohésines et des condensines ainsi que leurs principales fonctions au cours de la division cellulaire sont schématisés en Figure 4.

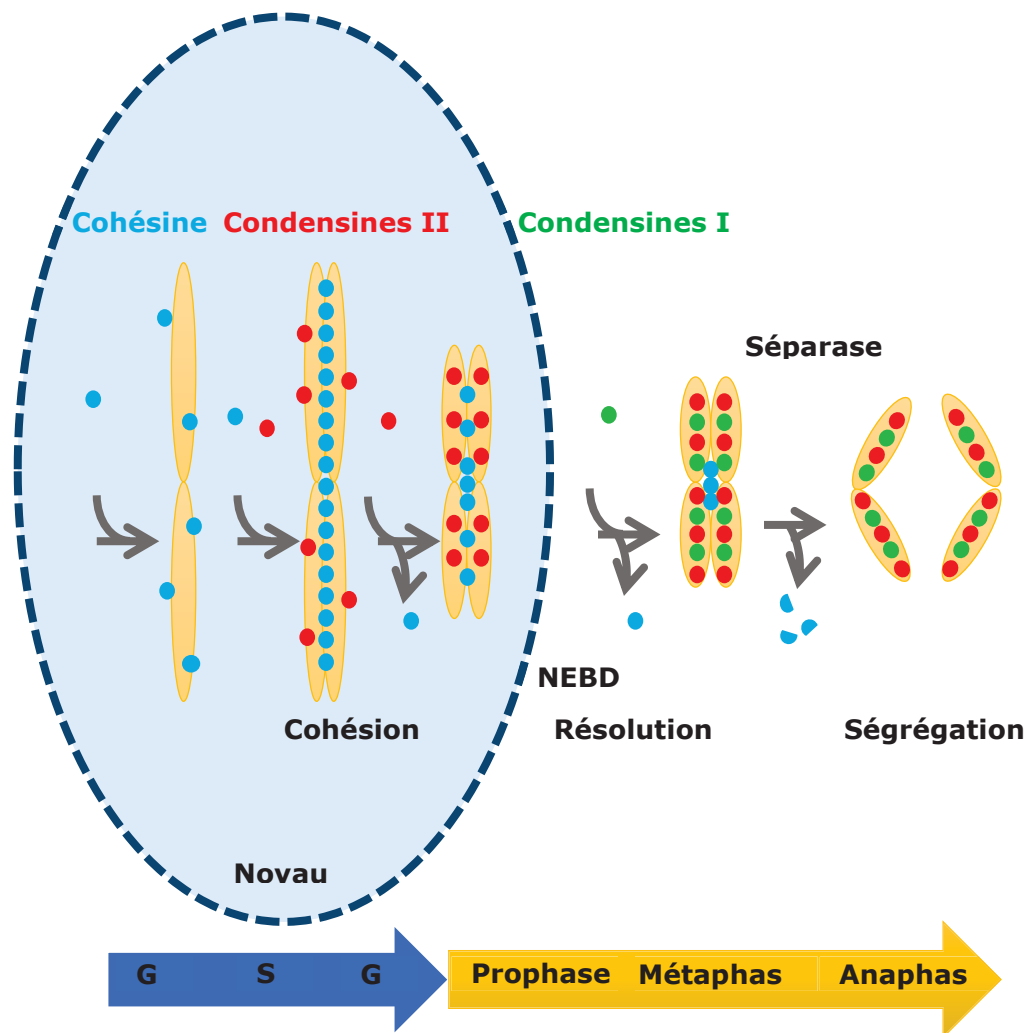


Figure 4 : Représentation schématique du rôle des condensines et des cohésines au cours du cycle cellulaire.

Les cohésines s'associent à la chromatine en G1 et commencent à assurer la cohésion des chromatides sœurs au cours de la phase S. Une fraction des condensines II s'associe aux régions dupliquées pendant la phase S et initie la résolution des chromatides sœurs. Quand les cellules entrent en prophase, la majorité des cohésines sont relarguées des bras chromosomiques, les condensines II s'associent aux chromosomes et assurent ainsi la première étape de condensation des chromosomes. Après la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD) en prométaphase, les condensines I cytoplasmiques sont dirigées aux chromosomes et facilitent la condensation. Au début de l'anaphase, la séparase clive la sous-unité klésine des cohésines permettant la séparation des chromatides sœurs.

Des études ont montré que la fixation du complexe condensine I en prométaphase nécessitait la kinase mitotique Aurora B (Lipp et al., 2007). En présence de topoisomérases de type I les Condensines vont replier la fibre de chromatine en « superboucles » qui se compactent pour former le chromosome mitotique (Hirano, 2012). La formation de boucles de chromatines à partir de la fibre de chromatine linéaire semble être la première étape de la compaction mitotique. La taille de ces boucles est imposée par la distance entre les sites de liaison de l'ADN aux cohésines et par des propriétés inhérentes aux condensines (Kschonsak and Haering, 2015).

Plus tard en mitose, la compaction axiale des bras chromosomiques requiert l'activité des condensines en combinaison avec une résolution des chromatides sœurs médiée par la topoisomerase II α et la libération des cohésines (Piskadlo and Oliveira, 2016). Les cohésines présentent une structure similaire aux complexes condensines mais diffèrent par la nature de leurs protéines SMC et non-SMC. En interphase et jusqu'à l'anaphase, les cohésines permettent la cohésion des chromatides sœurs. L'élimination totale de cohésine le long des brins d'ADN est la résultante du clivage du complexe protéique au niveau d'une de ses sous-unités suite à l'activation de l'APC (Anaphase promoting complex) par CDC20 (Cell division cycle 20), qui va entraîner la dégradation de la sécurine et la libération de la séparase, ainsi que de la phosphorylation des cohésines par la Polo Kinase 1 (Lin et al., 2016).

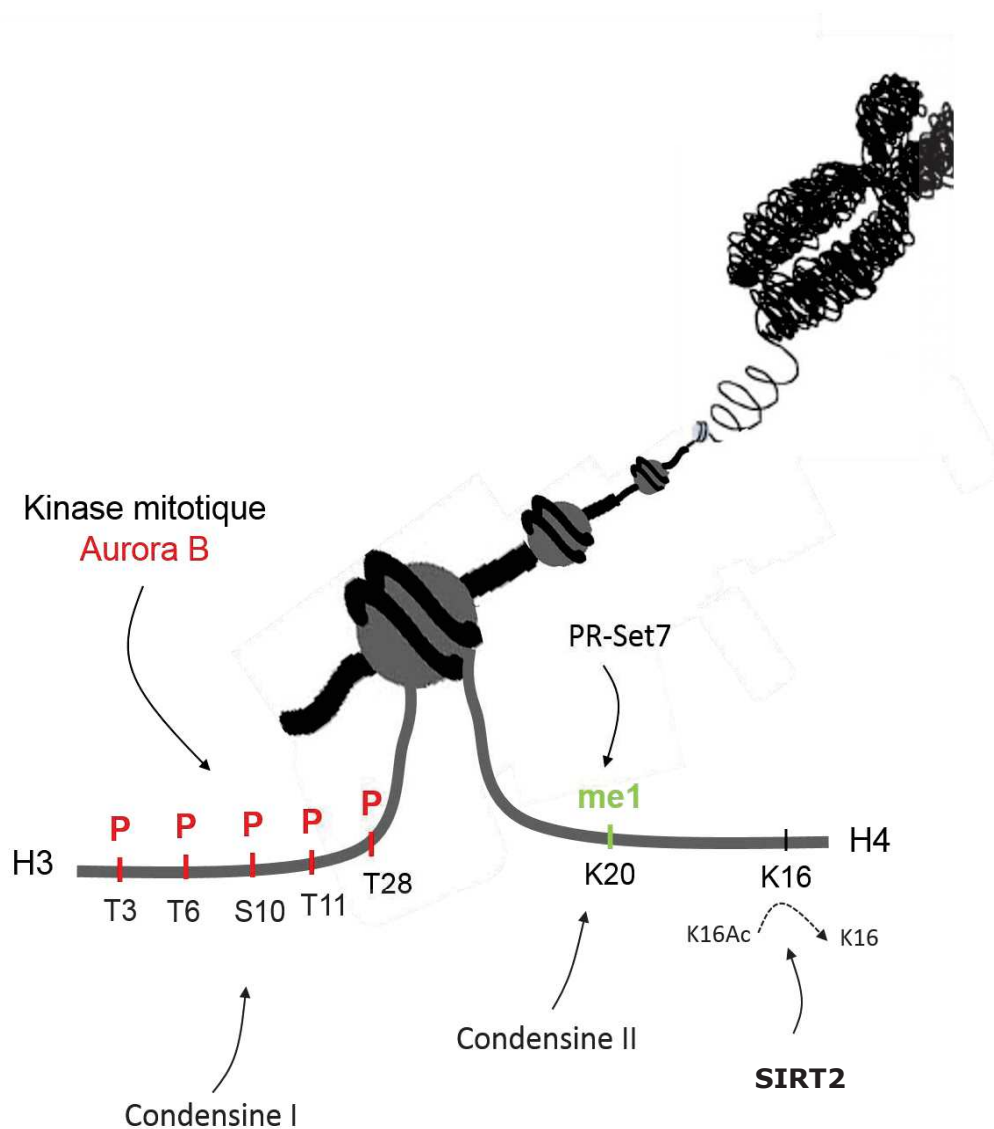
La controverse à propos des mécanismes de condensation mitotique provient du fait que la condensation a toujours lieu dans des cellules déplétées pour les condensines, avec toutefois des défauts de structure des chromosomes (Green et al., 2012). Chez la levure *S.pombe* les mutants pour les protéines SMC ne sont plus capables de condenser leurs chromosomes et de les ségréger mais restent capables de réaliser l'élongation du fuseau mitotique et la division cellulaire (Petrova et al., 2013). Des analyses de la condensation mitotique par microscopie à fluorescence révèlent une perte totale de la condensation des chromosomes (Petrova et al., 2013). Chez les animaux, la condensation est aussi affectée mais pas abolie par la perte des condensines (Fazzio and Panning, 2010; Green et al., 2012; Hirota et al., 2004). Chez les vertébrés, la condensation initiale en prophase précède le recrutement des condensines au niveau de l'axe central, ce qui suggère un état pré-condensé qui subira une deuxième étape de condensation suite à l'association des condensines (Kireeva et al., 2004). Le Knock-out de SMC2 dans des cellules de poulet DT40 (Hudson et al., 2003) ou le Knock-down par RNAi dans *C.elegans* (Hagstrom et al., 2002) affectent l'architecture du chromosome mitotique mais n'ont qu'un effet limité sur la condensation en elle-même. De façon générale, ces résultats suggèrent que d'autres facteurs que les condensines, en particulier les modifications des queues N-terminales des histones, permettent la compaction mitotique.

2. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES D'HISTONES

L'entrée en mitose s'accompagne de variations considérables du profil épigénétique de la chromatine (Oomen and Dekker, 2017), et de nombreuses études montrent que ces modifications ont un rôle direct dans la compaction mitotique. Les protéines histones constituent 60% du chromosome mitotique (Vagnarelli, 2012). Il est aujourd'hui bien connu que de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTM) d'histones accompagnent la transition de la chromatine interphasique en chromatine mitotique. La question est de savoir si ces modifications jouent un rôle dans l'organisation de la structure du chromosome mitotique. De façon générale, les modifications de la queue des histones peuvent causer des modifications locales dans la distribution des charges au sein du chromosome et ainsi conduire à des condensations ou des décondensations (Kouzarides, 2007). La structure à grande échelle des chromosomes est sensible aux variations des concentrations ioniques, ainsi des modifications comme l'acétylation ou la phosphorylation peuvent modifier les interactions entre les nucléosomes et donc favoriser ou inhiber une forme d'organisation de la chromatine. Quelle est l'implication des PTM d'histones dans la compaction de la chromatine en mitose ? La mitose est caractérisée par des modifications majeures des PTM d'histones, les principales PTM d'histones qui sont impliquées dans la mitose sont représentées dans la Figure 5.

La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 par la kinase Aurora B est un événement majeur qui corrèle avec l'entrée en mitose chez tous les organismes (Cheung et al., 2000). 4 résidus majeurs de l'histone H3 sont phosphorylés en mitose, les thréonines (T) 3 et 11 et les sérines (S) 10 et 28. Une phosphorylation de H3 trop peu importante entraîne une condensation et une ségrégation des chromosomes anormales dues à un mauvais recrutement des complexes Condensine I (Adams et al., 2001; Giet and Glover, 2001). Dans les premières phases de la mitose la phosphorylation de la thréonine 3 de l'histone H3 (H3T3) par Haspin puis de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10) par Aurora B recrute la déacétylase SIRT2 qui déacétyle la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16), entraînant une compaction de la chromatine (Sawicka and Seiser, 2014; Vaquero et al., 2006). Ce mécanisme est aussi décrit chez la levure (Wilkins et al., 2014). L'attraction entre des nucléosomes voisins est générée par la liaison de la queue de l'histone H4 avec le patch acide formé par les histones H2A-H2B du nucléosome voisin. Cette interaction est critique pour la structure de la chromatine et est bien caractérisée *in vitro* (Robinson et al., 2008). Elle est surtout présente en mitose puisqu'en interphase elle est empêchée par l'acétylation H4K16 (Robinson et al., 2008; Wilkins et al., 2014). En plus de ces modifications sur la queue N-terminale des histones, une phosphorylation de la thréonine 80 de l'histone H3 a lieu de la prophase à la transition anaphase/télophase (Hammond et al., 2014). *In vitro*, cette phosphorylation augmente l'affinité de l'histone H3 avec les histones H4 et H2B

voisines, ce qui suggère une implication de cette phosphorylation H3T80 dans la compaction mitotique (Hammond et al., 2014).



Adapté de Cheung et al., 2000 Cell

Figure 5 : Les principales modifications post-traductionnelles d'histones en mitose.

Le chromosome mitotique se caractérise par un état très phosphorylé et déacétylé. Le rôle putatif de la mono-méthylation H4K20 via un recrutement des condensines II est indiqué.

Bien que l'idée d'une modification directe de la structure de la chromatine en mitose *via* les PTM d'histones soit intéressante il faut considérer l'hypothèse que les PTM d'histones peuvent favoriser ou bloquer la liaison d'autres facteurs chromosomiques qui peuvent eux aussi réguler la condensation. Par exemple, la phosphorylation de l'histone H3, en plus de servir au recrutement des condensines, va aussi réguler la fixation de protéines au chromosome mitotique. La première démonstration d'une fonction de déplacement de

protéines chromatinienne induites pas une marque d'histone concerne la phosphorylation H3S10. En effet, le chromodomaine de HP1 (Heterochromatin protein 1) lie directement l'histone H3 di- ou tri-méthylée sur H3K9 et cette interaction est requise pour la formation d'hétérochromatine. Par ailleurs, la phosphorylation H3S10 diminue l'affinité de HP1 avec H3K9me2/3, de sorte que l'inhibition de la kinase Aurora B prévienne la dissociation de HP1 au moment de la mitose (Fischle et al., 2005). Le modèle d'un « switch » phospho/méthyl a été étendu à d'autres protéines liant H3, comme SRp20 ou ASF/SF2 qui se dissocient de la chromatine quand H3S10 est phosphorylée (Loomis et al., 2009). De même, des études suggèrent que la phosphorylation H3S28 par Aurora B pourrait entraîner la dissociation des complexes Polycomb PRC1 et PRC2 (Polycomb repressive complexes) de leurs sites de liaison H3K27me3 (Prickaerts et al., 2012). Étant donné que le complexe PRC1 possède une ubiquitine ligase pour H2AK119, la dissociation de PRC1 pourrait aussi contribuer à la diminution de l'ubiquitylation de H2A observée en mitose. Un switch phospho/méthyl a aussi lieu au niveau de la thréonine 3 et de la lysine 4 de H3. De nombreuses protéines peuvent lier la queue H3 au niveau de la lysine 4, mais dans de nombreux cas ces protéines ne peuvent pas lier l'histone H3 *in vitro* si H3T3 est phosphorylé (Gatchalian et al., 2016). À l'inverse, le retrait de marques spécifiques au moment de la mitose peut favoriser la liaison de protéines à la chromatine. C'est le cas par exemple de l'acétylation H3K9, qui, lorsqu'elle est retirée permet la phosphorylation de H3S10 par Aurora B (Duan et al., 2008; Jeong et al., 2010).

Si le rôle des modifications post-traductionnelles d'histones dans la compaction de la chromatine est plutôt bien décrit, les fonctions des PTM d'histones dans les autres événements chromatinien mitotiques sont encore mal connues. Récemment, l'équipe de Danny Reinberg a suggéré une implication de H1 dans la résolution des chromatides sœurs selon le mécanisme suivant (Krishnan et al., 2017) : l'histone H1 est présente au niveau de l'axe inter-chromatidien en début de mitose en association avec la chaperonne d'histone SET. En cours de prophase, le complexe Cycline B-CDK1 phosphoryle l'histone H1 sur le résidu S ou T en position 18 ce qui conduit à son éviction de l'axe chromosomique *via* SET et une résolution des chromatides sœurs. En plus de H1, SET est associé aux Shugoshines 1 et 2 spécifiquement au niveau des centromères. Les Shugoshines protègent les cohésines centromériques du clivage par la séparase jusqu'à la transition métaphase-anaphase, moment où elles sont dissociées par SET, permettant la dissociation des chromatides sœurs. Pour conclure, l'addition ou le retrait d'une modification d'histone peut, en plus de directement réguler la structure de la chromatine, permettre la dissociation ou l'association de protéines liant la chromatine. Les deux mécanismes concourent à la compaction mitotique en restreignant les mécanismes de maintien de la structure interphasique et en facilitant les événements nécessaires à la division cellulaire.

3. ROLES DE LA VOIE DE METHYLATION H4K20 DANS LA COMPACTION DE LA CHROMATINE EN MITOSE

3.1. ROLE DE PR-SET7 DANS LA COMPACTION MITOTIQUE

De nombreuses études ont montré que la perte ou la surexpression des enzymes de la voie de méthylation H4K20 engendrent de nombreux défauts dont, entre autres, des altérations dans la structure de la chromatine mitotique. Par exemple, la déplétion de PR-Set7 dans des cellules ES de souris ou dans des larves de *Drosophile* entraîne une décondensation de la chromatine mitotique et interphasique (Karachentsev et al., 2005; Oda et al., 2009; Sakaguchi et al., 2012). D'autres études réalisées dans des cellules humaines (Houston et al., 2008) ou dans des MEFs (Mouse embryonic fibroblasts) (Oda et al., 2009) ont montré que, dans le même sens, la déplétion de PR-Set7 qui coïncide avec une baisse de H4K20me1, conduit à une décondensation globale de la chromatine qui pourrait refléter un défaut de condensation des chromosomes en mitose. De plus, la voie H4K20 est finement régulée au cours du cycle et le niveau de H4K20me1 est le plus haut à la transition G2/M (Tardat et al., 2007). Ainsi, la mono-méthylation H4K20 médiée par PR-Set7 semble essentielle pour établir une structure de la chromatine normale. Le rôle central de la méthylation H4K20 dans la structure de la chromatine et l'importance d'une régulation fine de cette voie a été démontré en utilisant une version de PR-Set7 qui possède une mutation sur son domaine PIP qui abolit son interaction avec PCNA et donc sa dégradation en phase de réplication. La surexpression de cette enzyme mutée a des conséquences sévères sur les cellules, on observe, entre autres, une compaction anormale de la chromatine mise en évidence par la mesure de distance entre deux loci du chromosome 16 par FISH et par digestion ménagée de la chromatine à la MNase (Centore et al., 2010). La mono-méthylation H4K20 pourrait servir de site d'ancrage aux complexes condensines II (Liu et al., 2010). Les auteurs se sont donc demandé si cette compaction était la conséquence d'un recrutement anormal des condensines à la chromatine (Figure 5) (Centore et al., 2010). En effet, la surexpression d'un mutant PIP non dégradable de PR-Set7 dans des cellules en cours de phase S entraîne une augmentation du recrutement des protéines du complexe Condensine II à la chromatine mise en évidence par fractionnement biochimique (Centore et al., 2010). Ce processus semble dépendant de l'activité catalytique de PR-Set7. Ces résultats suggèrent que dans ce modèle PR-Set7 PIP dépose de la mono-méthylation H4K20 en phase S qui va servir de site d'ancrage pour le recrutement des condensines et conduit à une compaction prématurée de la chromatine. Toutefois ce mécanisme n'est pas formellement démontré.

3.2. SUV4-20H2 ET COHESINES

Les Suv4-20h ont comme substrat H4K20me1 et sont les enzymes responsables de la di-

d'hétérochromatine bien décrite (Schotta et al., 2004) mais les Suv4-20h semblent aussi avoir un rôle indépendant de leur fonction enzymatique dans la structure de la chromatine, et notamment en mitose. Pendant la mitose, l'hétérochromatine péricentromérique est importante pour faciliter la cohésion des chromatides sœurs *via* le recrutement des cohésines (Salic et al., 2004; Tang et al., 2004). Des études ont montré que les Suv4-20h2 interagissent avec des sous-unités cohésines et cette interaction est nécessaire pour la liaison des cohésines à l'hétérochromatine (Hahn et al., 2013). Suv4-20h2 s'associe avec l'hétérochromatine péricentromérique grâce à une interaction avec la protéine hétérochromatinienne HP1. Le Knock-out (KO) de Suv4-20h2 dans des cellules ES conduit à une diminution de la compaction de la chromatine et à une altération de l'organisation des chromocentres en interphase. De plus, les cellules déficientes en Suv4-20h2 présentent des défauts de ségrégation des chromosomes en mitose dus à des défauts de cohésion des chromatides sœurs. Ces résultats suggèrent que Suv4-20h2 joue un rôle crucial dans la régulation de l'architecture nucléaire, de façon indépendante de la méthylation H4K20, et permet la cohésion des chromatides sœurs et la ségrégation des chromosomes.

3.3. LA MONO-METHYLATION H4K20 DEPEND DE L'ABSENCE D'ACÉTYLATION H4K16?

Un mécanisme important dans la régulation de la dynamique de la chromatine par les modifications d'histones est que les modifications peuvent être interdépendantes. Ainsi, la modification d'un résidu peut réguler une autre modification d'histone. C'est le cas pour la méthylation H3K4 qui empêche la méthylation H3K9 (Shi et al., 2011). Ce mécanisme existe aussi en TRANS, par exemple l'ubiquitinylation H2BK123 est requise pour la méthylation H3K4 (Sun and Allis, 2002).

L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 est très bien décrite comme permettant une décondensation de la chromatine en interphase et des études suggèrent un rôle inverse de la méthylation H4K20. Certains arguments vont dans ce sens et notamment le fait que ces deux résidus ont des rôles opposés dans l'inactivation du chromosome X : l'acétylation H4K16 permet une hyper-activation de la transcription du chromosome X chez la Drosophile mâle (Turner et al., 1992), à l'inverse, H4K20me1 participe à l'inactivation du chromosome X femelle chez les mammifères (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011). On peut donc se demander si ces deux marques ne présentent pas des fonctions opposées en étant mutuellement exclusives. Cette hypothèse a été proposée par le laboratoire de D. Reinberg (Nishioka et al., 2002). Leurs données suggèrent une interaction négative entre ces deux marques. De plus, les niveaux de ces deux marques sont inversement corrélées au cours du cycle cellulaire (Rice et al., 2002; Vaquero et al., 2006). Cependant, des données vont aussi à l'encontre de cette hypothèse, et notamment le fait que l'on retrouve de la mono-méthylation H4K20 sur les promoteurs de gènes actifs en même temps que de l'acétylation

H4K16 (Talasz et al., 2005) et que des analyses de spectrométrie ont montré une acétylation H4K16 sur des histones présentant de la di-méthylation H4K20 (Pesavento et al., 2008). Ces deux marques coexistent aussi au cours de la réponse aux dommages ADN (Hunt et al., 2013).

L'exclusion mutuelle des marques H4K20me1 et H4K16Ac ainsi que la fonction de liaison de H4K20me1 aux condensines II suggèrerait un modèle en deux étapes de compaction de la chromatine en mitose où H4K20me1 limite l'acétylation H4 et recrute le complexe Condensine II. S'en suit une phosphorylation H3S10 par Aurora B afin d'éjecter les protéines liées à H3K9 et de recruter le complexe Condensine I en début de métaphase (Ono et al., 2003). Toutefois, le KO conditionnel de PR-Set7 dans des cellules ES de souris au moment de la phase de réplication entraîne une diminution de H4K20me1 mais ne provoque pas de défauts de condensation au cours de la mitose suivante (Oda et al., 2009). Les cellules doivent avoir passé une mitose sans PR-Set7 pour commencer à présenter des défauts de condensation (Oda et al., 2009), ce qui va à l'encontre du modèle proposé.

Si de nombreuses études montrent que des modifications post-traductionnelles d'histones régulent la fixation des complexes condensines et que donc les condensines et les PTM d'histones concourent à l'assemblage du chromosome mitotique, une étude très récente a remis en cause ce paradigme. Ce travail a consisté à évaluer l'importance des nucléosomes dans la formation du chromosome mitotique en utilisant des extraits mitotiques d'œufs de xénope et des noyaux de spermatozoïdes de souris pour reconstituer *in vitro* le processus de structuration de la chromatine en chromatides mitotiques (Shintomi et al., 2017). De façon très intéressante, dans leurs expériences la déplétion en nucléosomes n'abolit pas la compaction de la chromatine en chromatides mitotiques. Les chromatides présentent cependant quelques défauts structurels et une altération dans la localisation des complexes condensines. Il serait intéressant de comprendre comment l'interaction fonctionnelle entre les condensines et les nucléosomes permet l'organisation du chromosome mitotique à un niveau mécanistique.

4. DECONDENSATION DE LA CHROMATINE EN SORTIE DE MITOSE

En milieu de mitose, Haspin et Aurora B sont dissociés des chromosomes et sont recrutés aux centromères et leur concentration sur les chromosomes diminue (Dai et al., 2006). Par conséquent, les niveaux de H3S10P et H3T3P diminuent graduellement à partir de la transition métaphase/anaphase. Malgré la réduction de phosphorylation H3, les chromosomes restent condensés jusqu'à la télophase. A la fin de l'anaphase et lors de la télophase, le chromosome mitotique se décondense pour retrouver sa structure interphasique. La décondensation n'est pas une simple inversion des processus ayant conduit à la compaction mitotique. Alors que l'entrée en mitose nécessite des kinases mitotiques, la sortie de mitose requiert l'inactivation des kinases et la réversion des

phosphorylations mitotiques par les phosphatases PP1 (protéine phosphatase 1) et PP2A (protéine phosphatase 2A). Ainsi la déplétion de ces phosphatases ou de ses sous-unités B55 α ou R1A retarde la sortie de mitose (Hégarat et al., 2016). Mais l'implication de ces déphosphorylations dans la décondensation mitotique est encore peu claire. PP1g est responsable de la déphosphorylation des résidus Thr23, Ser10 et Ser28 de l'histone H3 (Qian et al., 2011), ainsi il est tentant de penser que ces déphosphorylations permettent la réacétylation H4K16 et la décondensation des chromosomes. PP1g est ciblé au chromosome en anaphase par sa sous-unité Repo-man (Trinkle-Mulcahy et al., 2006) et la déplétion de Repo-Man altère la reformation de l'enveloppe nucléaire mais n'a pas de conséquence visible sur la décondensation de la chromatine (Vagnarelli et al., 2011). PP1g est aussi recruté au niveau des chromosomes en cours de décondensation par Ki-67 (Booth et al., 2014), qui pourrait dans ce cas compenser la perte de Repo-man. PP1 α est recruté plus tard, juste avant la reformation de l'enveloppe nucléaire par sa sous-unité PNUTS. Des études suggèrent un rôle de PP1 α dans la décondensation mitotique mais le mécanisme reste encore peu clair (Landsverk et al., 2005).

Dans les cellules animales, la sortie de mitose nécessite donc l'inactivation des kinases mitotiques, la dissociation d'Aurora B des chromosomes et l'activation de plusieurs phosphatases conduisant à la réversion de phosphorylations mitotiques sur de nombreux substrats. Toutefois, peu de choses sont connues quant à l'implication de ces événements dans la décondensation mitotique qui permettra à la chromatine d'être apte à être transcrite et répliquée. Pour étudier les facteurs nécessaires à la décondensation en sortie de mitose, une approche intéressante mise au point par Magalska *et al.*, a consisté à utiliser un système *in vitro* qui récapitule la décondensation mitotique (Magalska et al., 2014). Pour cela, de la chromatine mitotique purifiée de cellules HeLa est mise en contact avec un extrait cellulaire d'œufs de xénope post-mitotiques et la décondensation de la chromatine et les facteurs impliqués dans cette décondensation sont étudiés (Magalska et al., 2014). Ces expériences ont permis de montrer que la décondensation de la chromatine requiert de l'énergie sous forme d'ATP et de GTP, suggérant que la décondensation est un processus actif et pas seulement une relaxation de la chromatine causée par la dissociation de facteurs de condensation. Cela est cohérent avec le fait que la décondensation est dépendante de la présence de facteurs présents dans les œufs de xénope (Magalska et al., 2014). La dépendance en ATP peut s'expliquer par le fait que la dissociation d'Aurora B nécessite la protéine ATPase p97/VCP (p97/ATP-driven chaperone valosin-containing protein) (Ramadan et al., 2007). Les travaux de Magalska et al., ont permis d'identifier un autre complexe ATPase impliqué dans la décondensation, le complexe RuvB-like 1/2 (Magalska et al., 2014). En plus de ses implications dans de nombreux processus cellulaires, RuvB-like 1/2 est un composant de plusieurs complexes de remodelage de la chromatine dépendantes de l'ATP en interphase (Jónsson et al., 2001), suggérant qu'il pourrait agir dès la fin de la mitose pour retrouver une structure interphasique.

Cependant, le complexe seul n'est pas suffisant pour permettre la décondensation de la chromatine, ce qui implique que d'autres facteurs soient impliqués.

PARTIE 2 : REGULATION EPIGENETIQUE DES GENES DU CYCLE CELLULAIRE PAR LA VOIE DE METHYLATION H4K20 : L'EXEMPLE DE LA VOIE RB/E2F

1. IMPLICATION DES PROCESSUS EPIGENETIQUES DANS LA TRANSCRIPTION DES GENES CIBLES D'E2F.

Si la mitose s'accompagne de modifications globales de la structure de la chromatine, l'avancée du cycle cellulaire fait aussi intervenir des modifications locales de la chromatine. Ainsi, la méthylation de l'ADN, la méthylation et la déacétylation des histones vont affecter la transcription de gènes clés impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire.

Un exemple de cette régulation du cycle cellulaire par des mécanismes épigénétiques concerne la voie RB/E2F qui contrôle la transition entre la phase G1 et la phase S dans les cellules en prolifération. RB (Retinoblastoma protein) possède une activité antiproliférative en inhibant le facteur de transcription E2F grâce à une interaction directe (Hiebert et al., 1992). Les protéines E2F contrôlent la transition G1/S en régulant la transcription d'une famille de gènes (famille de gènes cibles de E2F) nécessaires pour la synthèse de l'ADN ou l'entrée en phase S (DeGregori et al., 1995). RB est régulé par phosphorylation : en G1 précoce RB est faiblement phosphorylé et inhibe l'activité de E2F, RB est progressivement phosphorylé en cours de G1 par les complexes CDK-Cyclines ce qui conduit à une perte de l'affinité de RB pour E2F, une activation de E2F et la transcription des gènes cibles de E2F permettant la transition G1/S (Hatakeyama and Weinberg, 1995).

Un second mécanisme de répression de l'expression des gènes cibles d'E2F par RB, outre l'interaction directe entre RB et E2F, implique le recrutement de corépresseurs de la transcription ou de facteurs de remodelage de la chromatine au niveau des promoteurs. Ces processus sont résumés en Figure 6 : RB recrute les histones déacétylases HDAC1, HDAC2 et p130 (Brehm et al., 1998) de sorte que l'acétylation de H4 sur les promoteurs des gènes cibles de E2F varie au cours du cycle cellulaire (Takahashi et al., 2000). HDAC1 interagit directement avec ces promoteurs en G1 et est relargué à la transition G1/S (Ferreira et al., 2001). La diminution de l'acétylation des histones consécutive au recrutement des HDAC inhibe la transcription des gènes cibles d'E2F. RB recrute aussi BRG1 (brahma homolog 1) (Strober et al., 1996) ou SNF2 (Sucrose non fermentation 2), deux membres du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable). RB peut former un complexe avec HDAC1 et BRG1 ou seulement avec BRG1 (Zhang et al., 2000), il est possible que ces différents complexes régulent la répression de différents gènes. Un autre facteur épigénétique recruté par RB avant la phase de réplication est la méthyltransférase d'ADN DNMT1 (Robertson et al., 2000) qui inhibe la transcription induite par E2F et s'associe avec HDAC *in vivo* (Fuks et al., 2000). Toutefois, la nécessité de l'activité catalytique de DNMT1 n'est pas très claire mais une

hypothèse est que la méthylation de l'ADN par DNMT1 empêche la liaison de E2F aux promoteurs (Campanero et al., 2000). Cela corrèle avec le fait que de nombreuses études ont montré que l'ADN méthylé recrute des HDACs pour déacétyler les histones, résultant en une répression de la transcription (Fuks et al., 2000; Ling et al., 2004; Rountree et al., 2000). RB recrute aussi la méthyltransférase de H3K9 Suv39h dans les cellules en différenciation (Ait-Si-Ali et al., 2004). Suv39h dépose alors de la méthylation H3K9 qui sera reconnue par la protéine hétérochromatinienne HP1. Suv39h est une protéine péri-centromérique et il est encore peu clair de savoir comment Suv39h, *via* la méthylation H3K9me3, peut réguler la transcription de gènes euchromatiniens. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que HP1 est recruté aux promoteurs de gènes nécessaires à la réplication au cours de la différenciation cellulaire (Ait-Si-Ali et al., 2004) créant une hétérochromatinisation locale de la chromatine. Ainsi, l'inhibition de la transcription des gènes cibles de E2F dans les cellules en différenciation pourrait avoir lieu suite à la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs ce qui entrainerait un transfert des gènes vers le compartiment hétérochromatinien. La protéine à domaine MBT L3MBTL1 (Lethal(3) malignant brain tumor-like protein 1) joue aussi un rôle dans l'inhibition de la transcription des gènes cibles d'E2F. L3MBT interagit avec l'histone H3, l'histone H4 et le variant H1 sur des marques de chromatine spécifiques. L3MBT peut reconnaître ces marques de façon simultanée sur plusieurs nucléosomes, ce qui lui confère la capacité de compacter les nucléosomes *in vitro* (Trojer et al., 2007). L3MBTL1 s'associe avec la protéine HP1 γ et RB (Trojer et al., 2007). De plus, la protéine l(3)mbt de *Drosophila* a été identifiée dans un criblage par RNAi « genome wide » des gènes requis pour la répression des gènes cibles de E2F (Lu et al., 2007). A l'inverse, à la fin de la phase G1 et pour permettre l'entrée en phase de réplication, le facteur E2F se lie aux promoteurs de ses gènes cibles et peut recruter des acétylases d'histones comme Tip60, pour promouvoir l'expression génique (Taubert et al., 2004).

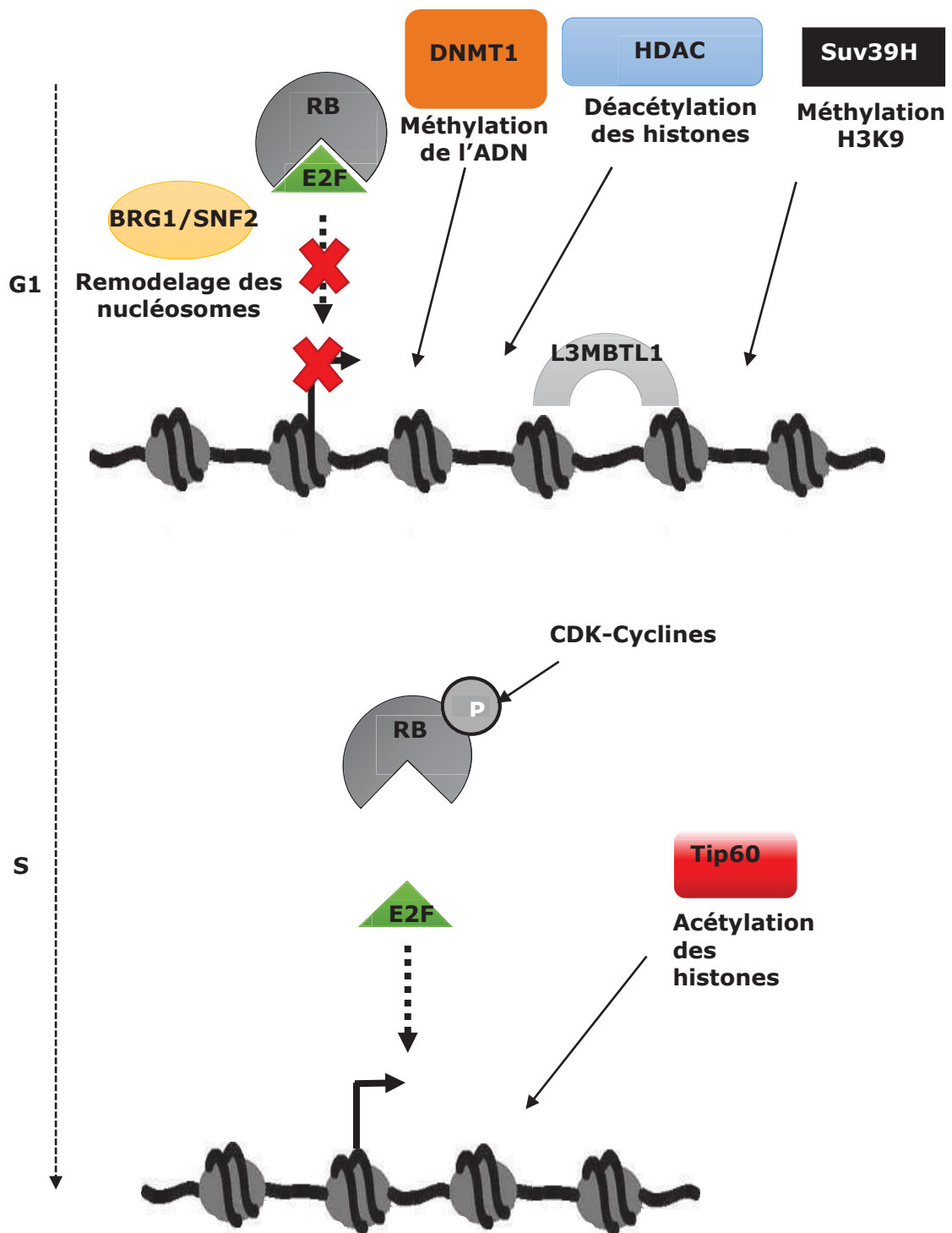


Figure 6 : Mécanismes épigénétiques régulant la transition G1/S via la modulation de l'expression des gènes cibles de E2F.

2. ROLE DE LA VOIE H4K20 DANS LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE POUR LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES GENES CIBLES DE E2F

Le rôle de la méthylation H4K20 dans la régulation transcriptionnelle est contradictoire, les différentes études réalisées suggèrent un rôle à la fois activateur et répresseur de la transcription (Beck et al., 2012a; van Nuland and Gozani, 2016). Des analyses gènes-spécifiques et des études d'immunoprécipitation de chromatine sur le génome entier ont montré que la mono-méthylation H4K20 est préférentiellement présente sur les gènes actifs (Barski et al., 2007; Beck et al., 2012a; Karlič et al., 2010; Li et al., 2011; Wakabayashi et al., 2009). A l'inverse, des analyses de d'immunoprécipitation de chromatine (ChiP) sur des gènes spécifiques ont montré que la méthylation H4K20 semble être corrélée à une répression de la transcription (Abbas et al., 2010; Congdon et al., 2010; Kalakonda et al., 2008; Karachentsev et al., 2005; Liu et al., 2010).

De façon intéressante, le rôle de répression de la transcription médiée par la H4K20me1 implique, entre autre, une reconnaissance par la protéine L3MBTL1 (Kalakonda et al., 2008). L3MBTL1 lie H4K20me1 *via* son domaine MBT et promeut une compaction locale de la chromatine. Le mécanisme de génération de compaction de la chromatine médié par L3MBTL1 résulte du fait que L3MBTL1 peut lier deux modifications d'histones de façon simultanée, sur les histones H3 (H3K4me1) , H4 (H4K20me1) mais aussi sur l'histone « linker » H1b (H1bK26me1/2), et favorise donc un rapprochement entre les nucléosomes voisins ou entre les nucléosomes et H1 (Trojer et al., 2007). Comme mentionné plus haut, L3MBTL1 est notamment impliqué dans la répression de la transcription de gènes cibles d'E2F avant l'entrée en phase de réplication. Pour permettre la transition G1/S, un des mécanismes de contrôle implique une déméthylation de H4K20me1 par PHF8 (PHD finger protein 8) sur les promoteurs de gènes cibles de E2F (Liu et al., 2010). Dans le même sens, la surexpression d'un mutant du domaine PIP non dégradable de PR-Set7 conduit à une stabilisation de la méthylation H4K20 et une inhibition de l'expression de gènes cibles de E2F comme la cycline E2, la cycline A2, CDC25A, la géminine, MCM7 (Mini-chromosome maintenance7) et CDT1 (CDC10 dependent transcript 1) (Abbas et al., 2010).

L'existence d'une hétérogénéité du rôle de la voie H4K20 dans la transcription, avec un rôle à la fois activateur et répresseur (Beck et al., 2012a; van Nuland and Gozani, 2016), suggère que celui-ci est soumis au contexte génomique et cellulaire *via* par exemple une interférence par les nucléosomes voisins portant de l'acétylation H4K16 qui pourraient affecter la fonction de H4K20me1 (Beck et al., 2012a).

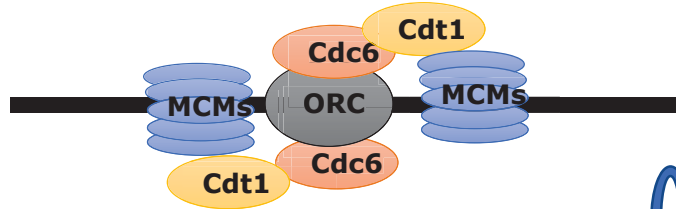
PARTIE 3 : ROLE DE LA VOIE DE METHYLATION H4K20 DANS LA DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA REPLICATION

Chez tous les eucaryotes, la réplication de l'ADN commence au niveau de sites précis sur le génome. Ces sites sont appelés origines de réplication et sont définis par la liaison du complexe de reconnaissance des origines ORC (Origin recognition complex) en fin de mitose. En fin de G1, CDT1 et CDC6 sont recrutés au niveau des ORC, permettant le recrutement des protéines hélicases MCM (mini chromosome maintenance) pour former le complexe de pré réplication pre-RC (Figure 7). Les MCMs fixées à la chromatine sont sous une forme inactive en double hémère qui encercle l'ADN double brin. L'activation des origines de réplication implique la dissociation du double hexamère en deux hexamères d'MCM actifs qui forment les deux réplisomes, permettant l'ouverture de l'ADN et l'activation des deux fourches de réplication de part et d'autre de l'origine de réplication. Cette étape d'activation des MCMs implique leur phosphorylation par DDK (Dbf4-dependent kinase) et les CDKs, cette phosphorylation permet le recrutement du complexe CMG (CDC45, MCM, GINS) participant à la formation du complexe de pré-initiation, puis le recrutement de la polymérase α pour former le réplisome (Diffley, 2011). En phase S les protéines CDC6 et CDT1 sont inactivées grâce à la geminine (Wohlschlegel et al., 2000) ou à une phosphorylation par CDK2 (Liu et al., 2004), cette inhibition permet d'éviter une réactivation des mêmes origines de réplication plusieurs fois au cours du même cycle cellulaire et ainsi d'éviter le phénomène de re-réplication (Li and Blow, 2005).

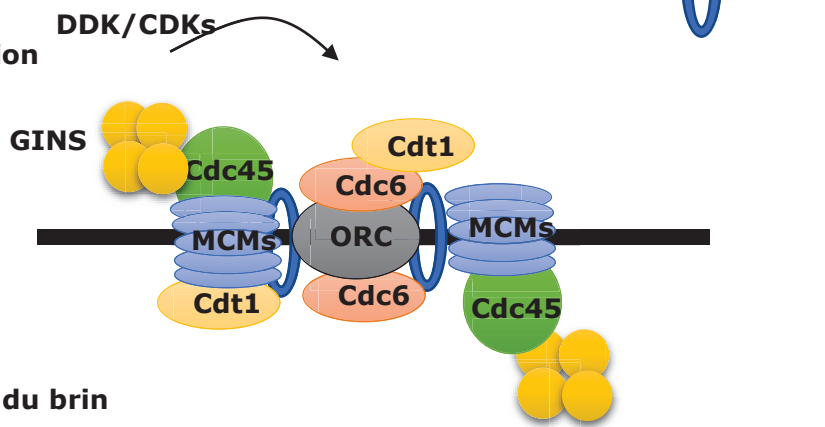
Fin de mitose



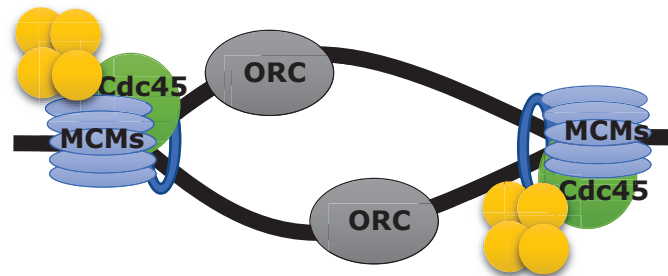
Pre-RC, G1



Pre-initiation



Ouverture du brin d'ADN



Début de la synthèse d'ADN

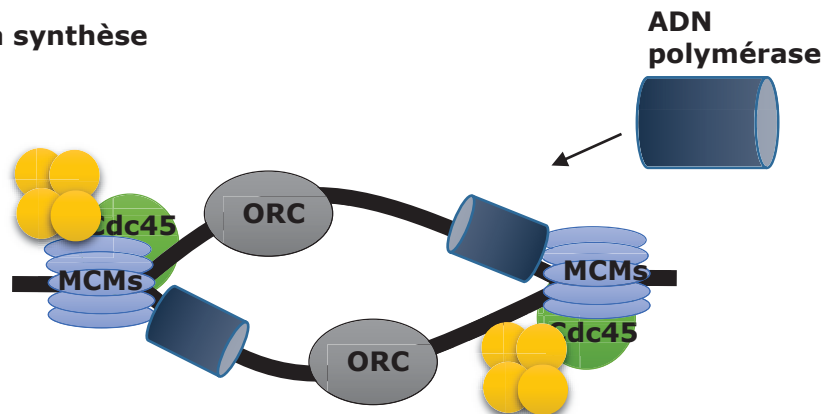


Figure 7 : Représentation schématique des étapes d'initiation de la réplication de l'ADN

1. ROLE DE LA CHROMATINE DANS LA REPLICATION

1.1. ORGANISATION ET STRUCTURE CHROMATINIENNE DES ORIGINES DE REPLICATION

Les origines sont organisées en clusters d'origines (environ 5-10 origines par cluster) qui s'activent simultanément. Ces clusters forment des foyers de réplication et des études ont montré que l'organisation tridimensionnelle de ces foyers de réplication était assurée par les cohésines qui interagissent avec les protéines MCMs (Guillou et al., 2010). Ainsi, une diminution du niveau de cohésine par siRNA ralentit la phase de réplication, on observe ainsi une diminution du nombre de foyers de réplication et par conséquent une augmentation de la taille des boucles de chromatine qui correspondent au réplicon (Guillou et al., 2010). Cette étude est modélisée en Figure 8. L'association des cohésines avec les origines de réplication est toutefois indépendante de la fixation du pre-RC et les origines de réplication semblent être des sites préférentiels de fixation des cohésines.

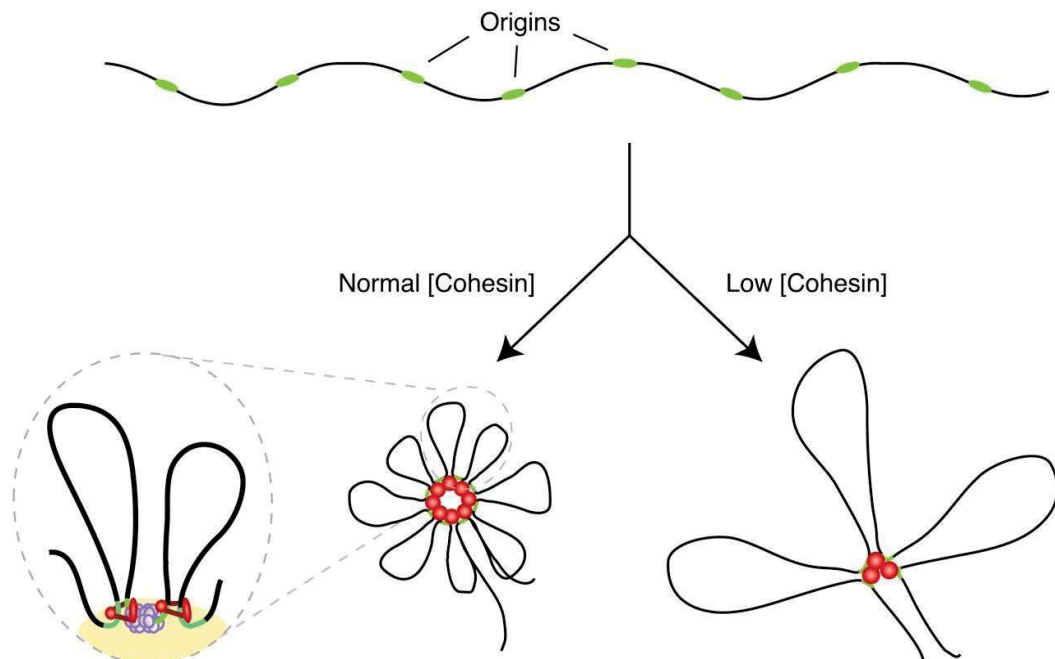


Figure 8 : Rôle des cohésines dans l'architecture des foyers de réplication.

Modèle développé par Guillou et al., : Les origines de réplication en vert sont groupées dans une structure « en rosette » par l'action des cohésines (en rouge). La perte des cohésines déstabilise cette structure résultant en des boucles moins nombreuses et plus longues.

Chez les mammifères, il n'existe pas de séquence consensus permettant de définir une origine de réplication. Chez la levure, des études génomiques à grande échelle ont établi que les origines de réplication semblaient riches en AT, à l'inverse des métazoaires et des plantes chez lesquels elles semblent plutôt enrichies en GC (Leonard and Méchali, 2013). Cependant, la séquence à elle seule n'est pas suffisante pour définir une origine de

réplication. Les origines de réplication se situent toutefois préférentiellement dans des régions de chromatine ouvertes à proximité de promoteurs (Cadoret et al., 2008; Cayrou et al., 2011). Des études ont montré, par ailleurs, que l'environnement chromatinien des origines de réplication présentait des modifications épigénétiques caractéristiques qui pourraient participer au positionnement des origines, il s'agit de régions pauvres en nucléosomes mais enrichies en variants H3.3 et H2AZ (Leonard and Méchali, 2013). Une étude de 2014 réalisée dans plusieurs types cellulaires (cellules souches embryonnaires humaines hESCs, fibroblastes primaires et lignées cancéreuses) a montré par séquençage des régions répliquées (BrdU-seq), que la majorité des origines étaient enrichies au niveau de l'euchromatine et des séquences répétées (Li et al., 2014). De plus, les différentes lignées possédaient des origines communes mais une fraction des origines était type cellulaire spécifique et associée à l'expression de gènes spécifiques des différents types cellulaires. Une corrélation avec les données épigénomiques a montré, de façon intéressante, que les origines partagées par les différents types cellulaires étaient associées dans les hESCs avec de l'acétylation H3K18 et H3K56 et de la mono-méthylation H4K20, démontrant l'existence d'une signature épigénétique des origines de réplication actives caractéristique des hESCs (Li et al., 2014).

1.2. FIXATION DES PROTEINES ORCS SUR LES ORIGINES DE REPLICATION

Le recrutement des ORCs a lieu de façon globale sur le génome, c'est la première étape de la sélection des origines de réplication (Miotto et al., 2016). La chromatine joue un rôle important dans la fixation des protéines ORCs en limitant leur fixation non spécifique à la chromatine (Kurat et al., 2017). En effet, les protéines ORCs ont une affinité non spécifique pour l'ADN (Vashee et al., 2003). Le positionnement des protéines ORC est fortement régulé par les PTM d'histones, par exemple ORC2 a une affinité pour la marque H3K4me2 et lie préférentiellement la chromatine ouverte (MacAlpine et al., 2010; Miotto et al., 2016). Chez la Drosophile, le complexe SAGA qui possède une activité acétyltransférase (par GCN5) et le facteur de remodelage de la chromatine Brahma sont recrutés par la protéine Su(Hw) et contribuent à créer un état chromatinien ouvert favorable à la fixation des ORC (Vorobyeva et al., 2013). Ainsi, le recrutement artificiel de Su(Hw) est suffisant pour entraîner la liaison de SAGA, Brahma puis des ORCs (Vorobyeva et al., 2013). Toutefois, ce mécanisme est responsable du recrutement des ORCs seulement sur une faible fraction des origines de réplication situées dans des régions inactives (6%), suggérant que de nombreux facteurs régulent la fixation des ORCs. Les protéines ORCs peuvent lier l'hétérochromatine grâce à d'autres facteurs chromatinien comme la protéine hétérochromatinienne HP1, la protéine HMGA1a (high mobility group protein) ou ORCA/LRWD1 (ORC associated, Leucine-rich repeats and WD40 repeat domain containing protein 1) (Prasanth et al., 2010; Shen et al., 2010; Thomae et al., 2008). ORCA/LRWD1 a une affinité pour les marques hétérochromatiniennes H3K9me3, H3K27me3 et

H4K20me3 (Giri and Prasanth, 2016; Vermeulen et al., 2010; Wang et al., 2017). Les ORCs ont aussi des fonctions indépendantes des origines de réplication dans la formation de l'hétérochromatine (Giri et al., 2015; Prasanth et al., 2004). Ainsi, il est difficile de déterminer si le recrutement des ORCs à la chromatine permet seulement une régulation dans le choix des origines de réplication ou si ce recrutement participe au contrôle de l'organisation de la chromatine. Le recrutement des ORCs à la chromatine par LRWD1, HP1 et HMGA1a favorise la formation du pre-RC et l'activité des origines, conduisant à l'hypothèse que ces protéines pourraient faciliter la liaison des ORCs pour la formation des origines au niveau de l'hétérochromatine (Wang et al., 2017).

1.3. FIXATION DU PRE-RC ET DU COMPLEXE DE PRE-INITIATION

Chez les mammifères le facteur de remodelage de la chromatine SNF2H et l'acétyl transférase HBO1 (Histone acetyltransferase binding to ORC1) permettent le recrutement des MCM (Miotto and Struhl, 2008; Sugimoto et al., 2011; Wong et al., 2010). HBO1 acétyle les lysines 5, 8 et 12 de l'histone H4 et interagit avec ORC1 (Iizuka and Stillman, 1999) mais aussi avec d'autres composants du pre-RC (Burke et al., 2001; Iizuka et al., 2006). Il est recruté aux origines grâce à une interaction avec CDT1 (Miotto and Struhl, 2008) ce qui résulte en une augmentation locale de l'acétylation au niveau des origines (Miotto and Struhl, 2010). L'assemblage du pre-RC est donc aussi influencé par l'état chromatinien car ces processus requièrent une ouverture locale de la chromatine. Ainsi, les modifications d'histones ont un rôle critique à la fois dans le positionnement des origines de réplication que dans leur potentialisation *via* la formation du pre-RC. Le démarrage des fourches de réplication nécessite une réorganisation locale de la chromatine en un état moins condensé. De façon intéressante, le ciblage artificiel de CDC45 sur un site chromosomique conduit à une décondensation indépendante de la synthèse d'ADN (Kuipers et al., 2011). De plus, une étude réalisée chez *c.elegans* a montré que le complexe CMG (CDC45, MCM, GINS) entraîne le relargage complexes des condensines I de la chromatine et participe à décondenser la chromatine (Sonneville et al., 2015). Un autre mécanisme pouvant jouer un rôle dans la déstructuration de la chromatine implique une phosphorylation de l'histone H1 par le complexe réplicatif Cycline A-CDK2 (Thomson et al., 2010). En effet la phosphorylation de H1 mène à une augmentation de sa mobilité et à une décompaction de la chromatine (Halmer and Gruss, 1996). Le complexe Cycline A-CDK2 est recruté au niveau des sites de réplication grâce à une interaction avec PCNA et MCM7 (Cardoso et al., 1993; Chibazakura et al., 2011; Koundrioukoff et al., 2000).

1.4. LES PROTEINES ET MARQUES DE CHROMATINES REGULENT LA CINETIQUE D'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION

Il existe une régulation temporelle et spatiale de l'activation des origines de réplication. La première observation de l'existence d'une cinétique d'activation des origines de réplication

a eu lieu dans les années 1970 par des expériences d'incorporation de Bromodeoxyridine (BrdU) (Latt, 1975). Ainsi, les régions chromosomiques présentant un signal BrdU formaient des bandes au lieu d'être dispersées sur le chromosome, il s'agissait donc de régions qui se répliquaient de façon simultanée. De plus, des études comparatives ont montré que ces zones se répliquant simultanément correspondent avec le marquage Giemsa pour lequel les bandes noires G représentent les régions se répliquant tardivement (Holmquist, 1988). Ainsi, les chromosomes sont organisés en sous-unités distinctes, chacune possédant sa propre structure et cinétique de réplication.

Ce contrôle de l'activation des origines de réplication est largement dû au fait que la phase de recrutement du pre-RC et la phase de réplication sont séparées dans le temps et sont finement régulées à travers de nombreuses étapes. Une fois que des origines sont activées, le recrutement du pre-RC sur ces mêmes origines est inhibé jusqu'à la prochaine mitose (Siddiqui et al., 2013). Seulement 10% des origines sur lesquelles le pre-RC s'est fixé seront utilisées au cours de la phase S. Les origines dites « dormantes » pourront être utilisées en cas de ralentissement des fourches de réplication (Ge and Blow, 2010; Woodward et al., 2006), il s'agit d'un processus de contrôle en cas de stress réplicatif. Toutefois, les facteurs déterminants l'activation ou non d'une origine de réplication, ainsi que sa cinétique d'activation, sont encore mal connus. La cinétique d'activation des origines de réplication est type cellulaire spécifique et est largement connectée à la régulation de la structure de la chromatine.

Ainsi, des analyses génomiques de la cinétique de réplication ont montré que les régions qui se répliquent tôt au cours de la phase S sont des régions actives riches en gènes (Dellino et al., 2013; Rhind and Gilbert, 2013). A l'inverse, les régions se répliquant tardivement sont des régions chromosomiques correspondant à l'hétérochromatine (Farkash-Amar and Simon, 2010; Goren and Cedar, 2003). Cette cinétique d'activation des origines de réplication dépend de la présence et de l'accessibilité de facteurs d'initiation de la réplication à la chromatine (Alberts et al., 2002). Cette accessibilité est elle-même régulée par les modifications d'histones et en particulier par l'acétylation. La première étude ayant démontré que la cinétique de réplication était liée à une modification d'histone au niveau de l'origine de réplication a consisté à montrer, chez la levure, que l'acétylation forcée d'histones situées au niveau d'origines tardives avait pour effet une activation prématurée de ces origines. A l'inverse, la diminution de l'acétylation au niveau d'une origine précoce retardait son activation (Vogelauer et al., 2002). Chez l'animal, le gène de la globine possède une origine de réplication et est largement acétylé dans les cellules érythroïdes dans lesquelles il se réplique précocement, la même origine est déacétylée dans les cellules non-érythroïdes et sa réplication est tardive (Goren et al., 2008). Le ciblage d'une histone acétyltransférase (HAT) vers un transgène contenant tout le locus globine entraîne une réplication prématurée du locus dans des cellules non érythroïdes de

souris. A l'inverse, la déacétylation forcée *in vivo* du locus conduit à un retard de réplication du locus dans des cellules érythroïdes (Goren et al., 2008).

De façon intéressante, le contrôle de la cinétique de réplication semble aussi impliquer des facteurs du point de contrôle de dommages ADN (Leonard and Méchali, 2013; Shechter et al., 2004). Par exemple, la protéine associée aux télomères RIF1, suite à une activation par les kinases ATM/ATR (ataxia telangiectasia mutated/ ataxia telangiectasia and Rad3 related) en réponse à un dommage ADN, retarde l'activation du complexe de pre-initiation et l'activation des origines en limitant l'accessibilité de la chromatine pour CDC7 aux régions « mid » (Cornacchia et al., 2012; Yamazaki et al., 2012). Ce mécanisme permet de ralentir le cycle cellulaire en réponse à un dommage ADN. Un autre facteur impliqué dans la réponse aux dommages ADN et dans la cinétique de réplication est la polymérase θ (Fernandez-Vidal et al., 2014; Higgins et al., 2010). Pol θ s'associe à la chromatine en début de phase G1 et interagit avec ORC2 et ORC4 (Fernandez-Vidal et al., 2014). La déplétion de Pol θ augmente la quantité de MCMs à la chromatine et résulte en une altération du timing de réplication de certaines régions de chromatine. La surexpression de Pol θ , quant à elle, retarde la réplication d'un subset de domaines chromatiniens. Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel, de façon similaire à RIF1, Pol θ lie les protéines ORC sur une partie des origines tardives en G1 et inhibe le recrutement des MCM pour empêcher une réplication précoce. Quand Pol θ est déplétée, on observe une augmentation de la liaison des MCMs à ces origines et une réplication précoce (Fernandez-Vidal et al., 2014)

1.5. PR-SET7 ET LES SUV4-20H REGULENT L'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION VIA LA METHYLATION H4K20

Les facteurs chromatiniens responsables de la spécification d'une séquence d'ADN en origine de réplication sont encore mal connus. Avant mon arrivée le laboratoire d'accueil avait montré par des expériences d'immunofluorescence qu'en présence d'un inhibiteur du protéasome (MG132), PR-Set7 formait des foyers dans le noyau qui colocalisent avec les sites de synthèse d'ADN détectés grâce à un « pulse » court de BrdU (Tardat et al., 2007). Ce résultat indique une implication probable de PR-Set7 dans le processus de réplication. Cette hypothèse a été appuyée par le fait qu'une déplétion de PR-Set7 par infection rétrovirale d'un shRNA dirigé contre PR-Set7 dans des cellules U2OS conduit à une accumulation des cellules en début de phase S, à l'apparition de cassures de l'ADN, à un ralentissement des fourches de réplication ainsi qu'à l'activation du point de contrôle de réponse aux dommages ADN (Tardat et al., 2007). Ces résultats suggèrent que PR-Set7 est nécessaire à la réalisation adéquate de la réplication. La déplétion de l'enzyme conduit à une forte diminution des niveaux de mono- et de tri-méthylation H4K20. Qui plus est, la surexpression d'une forme résistante au shRNA de PR-Set7 mutée sur le domaine catalytique SET dans des cellules traitées avec le shRNA ne permet pas de sauver le

phénotype de défauts de réplication. Pour conclure tous ces résultats indiquent que la méthylation H4K20 est très probablement essentielle pour le déroulement de la réplication de l'ADN et pour l'intégrité du génome.

Cela est cohérent avec le fait que certaines origines de réplication présentent de la mono-méthylation H4K20 et que le ciblage de PR-Set7 vers un locus génomique spécifique entraîne un recrutement des protéines du pre-RC (Tardat et al., 2010). L'équipe a aussi montré que la dégradation de PR-Set7 au moment de la phase de réplication empêche la réapparition de la mono-méthylation H4K20 au niveau des origines et la réactivation des origines de réplication (Tardat et al., 2010). Ainsi, la surexpression d'un mutant non dégradé de PR-Set7 conduit à une réactivation anormale des origines de réplication et une re-réplication de l'ADN. Ce travail a donc permis de démontrer le rôle important joué par PR-Set7 et la mono-méthylation H4K20 dans les événements chromatinien régulant l'activation des origines de réplication.

Plus récemment un travail de l'équipe de Danny Reinberg a permis de montrer comment PR-Set7 permettait d'activer le « licensing » des origines de réplication de manière dépendante des Suv4-20h (Beck et al., 2012b). Ainsi, la re-réplication induite par la déplétion du complexe de dégradation CRL4^{CDT2} est sauvée suite à la déplétion de PR-Set7 et de façon intéressante, dans leurs expériences, la déplétion de CRL4^{CDT2} ou la surexpression du mutant PIP de PR-Set7 entraîne une augmentation du niveau de H4K20me₃, suggérant une implication de la tri-méthylation H4K20 dans la re-réplication. En accord avec ce postulat, les défauts de cycle cellulaire et les dommages ADN observés suite à la surexpression de PR-Set7^{PIPMUT} sont dépendants de la présence des Suv4-20h. De plus, le ciblage de PR-Set7 vers un locus génomique grâce au système UAS-GAL4 conduit à une augmentation locale du niveau de H4K20me₃ et une augmentation du recrutement d'ORC1 et d'ORCA/LRWD1 alors que la déplétion des Suv4-20h1 diminue ce recrutement. Une autre étude avait montré qu'ORC1 lie spécifiquement la marque H4K20me₂ grâce à un site spécifique sur son domaine BAH et que l'abolissement spécifique de cette interaction perturbe le recrutement d'ORC1 au niveau d'origines de réplication (Kuo et al., 2012). En conclusion, PR-Set7 permettrait une modulation de l'environnement chromatinien entraînant l'activation de la réplication *via* l'action des Suv4-20h.

Il est encore peu clair de savoir quelle enzyme (Suv4-20h1 ou 2) est responsable de la di- ou de la tri-méthylation. *In vivo* les deux enzymes peuvent convertir la mono- en di- et tri-méthylation H4K20. Ainsi, la perte des deux enzymes entraîne une augmentation du niveau de H4K20me₁ qui n'est pas convertie en di- et tri-méthylation (Schotta et al., 2008). Malgré le rôle des Suv4-20h dans la réplication, les cellules MEFs dérivées de souris KO pour les Suv4-20h et donc ne présentant pas de H4K20me_{2/3} sont viables et montrent seulement un léger retard de réplication (Schotta et al., 2008), suggérant que l'implication des différentes enzymes H4K20 dans le contrôle de la réplication de l'ADN est plus complexe que ce qui a été décrit dans les différentes études. De plus, les Drosophiles

possédant une mutation de la lysine 20 en alanine et donc déplétées pour la méthylation H4K20 ne présentent pas de défaut de cycle cellulaire au cours du développement (McKay et al., 2015), ce qui nous pousse à nous poser la question du réel rôle biologique de la méthylation H4K20 chez les mammifères.

1.6. ROLE DE LA CHROMATINE DANS L'AVANCEE DES FOURCHES DE REPLICATION

Chez les eucaryotes, la réplication de l'ADN organisé en chromatine est très efficace et la fourche de réplication progresse à une vitesse de 1 à 2 kb par minute *in vivo* (Sekedat et al., 2010). Toutefois, des études *in vitro* ont montré que les nucléosomes forment un obstacle pour le réplisome (Chang et al., 2016; Devbhandari et al., 2017), quels sont donc les mécanismes et les protéines de la chromatine permettant la réplication efficace ? Le réplisome du bactériophage T4 peut répliquer l'ADN de façon indépendante, sans facteurs extérieurs (Bonne-Andrea et al., 1990). De nombreux arguments indiquent que, chez les eucaryotes, des facteurs chromatiniens participent au processus de réplication (Alabert and Groth, 2012). Les protéines chaperonnes d'histones, qui sont impliquées dans le transport des histones, pourraient jouer un rôle important. Dans ce sens, la chaperonne FACT (Facilitating chromatin transcription complex) interagit avec le complexe CMG et l'ADN polymérase α (Gambus et al., 2006; Orphanides et al., 1999; Reinberg and Sims, 2006; Wittmeyer and Formosa, 1997). De plus, FACT est essentiel pour la réplication dans des extraits d'œufs de xénope (Okuhara et al., 1999) et la déplétion de FACT dans des cellules DT40 de poulet conduit à un ralentissement de la fourche (Abe et al., 2011b). L'autre chaperonne impliquée est ASF1 (Anti-silencing function protein 1), qui interagit avec les MCM *via* les histones H3-H4 dans les cellules humaines et dont la déplétion inhibe la progression du réplisome (Groth et al., 2007).

Dans une étude récente, des auteurs ont reconstitué un système de réplication de levure *in vitro* et ont analysé la vitesse de réplication en fonction de la présence ou de l'absence de nombreux facteurs chromatiniens (Kurat et al., 2017). De nombreux facteurs sont requis pour permettre une vitesse de réplication comparable à la vitesse de réplication *in vivo*. Le rôle de FACT dans ce processus a donc pu être redémontré, et les auteurs ont aussi montré l'importance de la protéine associée à FACT, Nhp6, qui permet l'ouverture de la chromatine (Valieva et al., 2016). Les protéines de remodelage INO80, ISW1A et les acétyltransférases GCN5 (General control of amino acid synthesis protein 5-like 2) et Esa1 sont aussi impliquées (Kurat et al., 2017). La chaperonne NAP1 (Nucleosome assembly protein 1-like 1-A) facilite aussi la progression du réplisome à travers la chromatine (Devbhandari et al., 2017). Des protéines associées au réplisome comme Mrs1, Csm3/Tof1 et PCNA sont nécessaires pour une vitesse de synthèse du brin précoce par Pol ϵ (Yeeles et al., 2017). De nombreux facteurs chromatiniens compensent donc la présence de chromatine, qui constitue une barrière à la réplication, en modifiant sa structure pour

permettre l'avancée de la fourche. Les mécanismes exacts permettant cette stimulation de la vitesse de réplication sont encore mal connus mais impliquent sûrement une prise en charge des nucléosomes parentaux par les chaperonnes.

L'état de la chromatine pré-réplivative régule aussi l'avancée de la fourche de réplication. Chez la levure, les régions autour des origines de réplication présentent de la mono-ubiquitinylation sur la lysine 123 de l'histone H2B, cette marque facilite l'assemblage ou la stabilité des nucléosomes nouvellement synthétisés après la réplication de l'ADN et semble importante pour la stabilité du réplisome (Trujillo and Osley, 2012). Chez les mammifères la déplétion de la ligase RNF20/40 responsable de l'ubiquitinylation H2B entraîne un stress répliatif et une instabilité génomique (Chernikova et al., 2012) mais la fonction de cette marque de chromatine dans l'avancée de la réplication du génome eucaryote n'a pas été démontrée.

2. CONSERVATION DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA REPLICATION

Au cours de la réplication, au niveau du nucléosome, deux processus ont lieu de façon concomitante : (1) l'interruption transitoire de l'interaction histones-ADN au niveau de la chromatine pré-réplivative couplée au transfert des histones sur le double brin d'ADN naissant. Il s'agit du processus de recyclage des histones parentaux. Deuxièmement, (2) le dépôt d'histones nouvellement synthétisées. La ségrégation des histones parentales et l'assemblage de la chromatine *de novo* a lieu sur tout le génome après chaque passage par une phase de réplication. Ainsi, la régulation de ces deux voies est un processus clé dans la capacité des cellules en prolifération à propager ou modifier leur état chromatinien.

Une question majeure est de comprendre comment les marques épigénétiques sont répliquées et donc de savoir comment les octamères d'histones se désassemblent de la chromatine puis sont transférées et réassemblées sur l'ADN répliqué. En effet, ces processus sont nécessaires à la conservation de la structure de la chromatine au cours du cycle, qui est un enjeu important pour le maintien de l'intégrité génomique (Alabert and Groth, 2012; Almouzni and Cedar, 2016). Il est important de comprendre comment ce processus de recyclage s'articule avec la synthèse et le dépôt d'histones qui possèdent leurs propres modifications chimiques. Ainsi, comment la mémoire épigénétique médiée par le recyclage est-elle transmise aux histones *de novo* afin d'assurer une structure de la chromatine naissante homogène ?

2.1. RECYCLAGE DES HISTONES PARENTALES

2.1.1. DYNAMIQUE DES HISTONES AU NIVEAU DES FOURCHES DE REPLICATION

L'ADN est répliqué grâce à un mécanisme semi-conservatif au cours duquel l'information est copiée à partir d'une matrice. En revanche, le passage de la fourche de réplication rompt l'interaction des histones modifiées avec l'ADN et leurs modifications doivent donc être correctement réassemblées sur l'ADN post-répliatif derrière les fourches et cela sans matrice. En dehors de la phase de réplication, l'échange de H3 et H4 est minimal par rapport à l'échange de H2A et de H2B (Kimura and Cook, 2001), les histones H3 et H4 sont donc les histones permettant la transmission de l'information épigénétique au cours du cycle cellulaire. Les chaperonnes d'histones ont un rôle clé dans la reformation de la chromatine en agissant comme des acceptrices et des donneuses d'histones au moment du désassemblage et du réassemblage des nucléosomes.

Des études ont montré que de 1 à 2 nucléosomes étaient déstabilisés et éjectés de la chromatine devant les fourches (Gasser et al., 1996). Est-ce que cette éjection des nucléosomes est nécessaire au passage des fourches ou bien est-ce que le passage des fourches permet la déstabilisation des nucléosomes ? Le fait que la réplication du mini-chromosome SV40 (Simian virus 40) cross-linké avec ses nucléosomes puisse encore avoir lieu dans des extraits de cellules humaines suggère que la dissociation des octamères d'histones n'est pas un prérequis pour le passage de la fourche (Vestner et al., 2000). Toutefois, des études ont montré que la disruption des nucléosomes au cours de la réplication peut être due à l'avancée de la fourche de réplication, par exemple, grâce à la progression des hélicases répliatives (Ramsperger and Stahl, 1995). Cette hypothèse est corroborée par le fait que l'hélicase MCM2 possède un site de liaison avec l'histone H3 (Ishimi et al., 1998). Les histones parentales sont ensuite ségréguées des deux côtés de la fourche de réplication. La duplication de l'organisation de la chromatine est donc un processus en trois étapes : éjection des histones parentales, transfert, puis dépôt *de novo*. Ces événements ne sont pas indépendants les uns des autres mais coordonnés en un continuum essentiel pour la préservation de la stabilité génétique et de l'organisation de la chromatine.

2.1.2. LES PROTEINES CHAPERONNES D'HISTONES

Les chaperonnes d'histones sont des protéines liant les histones impliquées dans le stockage, le transport, le dépôt et le retrait des histones au cours du processus de recyclage des histones parentales (Hammond et al., 2017). La première chaperonne impliquée dans la réplication de l'ADN identifiée et celle dont la fonction est la plus décrite est CAF-1 (Chromatin assembly factor 1, Smith and Stillman, 1989). Le complexe CAF-1 contient 3 sous-unités (p150, p60 et RbAp48 chez les mammifères). CAF-1 lie la chromatine au niveau des fourches grâce à son domaine d'interaction avec PCNA et permet ainsi la coordination entre le dépôt d'histones H3-H4 et l'avancée de la réplication (Figure 9). Le KO de CAF-1 est létal chez la souris (Houlard et al., 2006) et la Drosophile (Song et al., 2007). Sa déplétion altère l'avancée de la réplication dans les cellules humaines (Hoek

and Stillman, 2003). Une autre chaperonne impliquée dans le couplage de la réplication et du recyclage des histones est ASF1, qui semble plutôt être une protéine nécessaire pour le transfert d'histones H3-H4 à CAF-1 grâce à une interaction directe entre ASF1 et les histones (English et al., 2006) et entre les deux chaperonnes (Tyler et al., 2001). De façon intéressante, la déplétion de ASF-1 dans des cellules humaines conduit à un défaut d'ouverture de l'ADN au niveau des fourches et une perte de la capacité à éjecter les nucléosomes devant les fourches (Groth et al., 2007). De plus, des histones possédant des PTM parentales sont détectées en association avec ASF1 (Groth et al., 2007), suggérant qu'ASF-1 agit comme un accepteur des dimères H3-H4 recyclés (Figure 9). Ainsi, le mécanisme de disruption des nucléosomes est finement coordonné avec l'ouverture du brin d'ADN au niveau de la fourche.

D'autres chaperonnes sont décrites comme participant à ce processus de recyclage : NASP, NAP1 et FACT (Abe et al., 2011b; Burgess and Zhang, 2013). Le modèle avancé est que les histones H3-H4 sont fournies aux protéines chaperonnes sous forme de dimères, une fois incorporées à la chromatine deux dimères s'associent ensuite pour reformer des tétramères. Les chaperonnes NAP1 et FACT permettent l'incorporation de deux dimères H2A-H2B sur la chromatine naissante, conduisant à la reformation d'un nucléosome complet. Toutefois, l'incorporation de H2A-HB n'est pas directement liée à la réplication puisqu'un échange permanent d'H2A-H2B a lieu en dehors de la phase de réplication (Kimura and Cook, 2001). Les complexes FACT et NAP1 agissent aussi bien pendant la réplication que pendant la transcription ou la réparation des dommages ADN (Hammond et al., 2017).

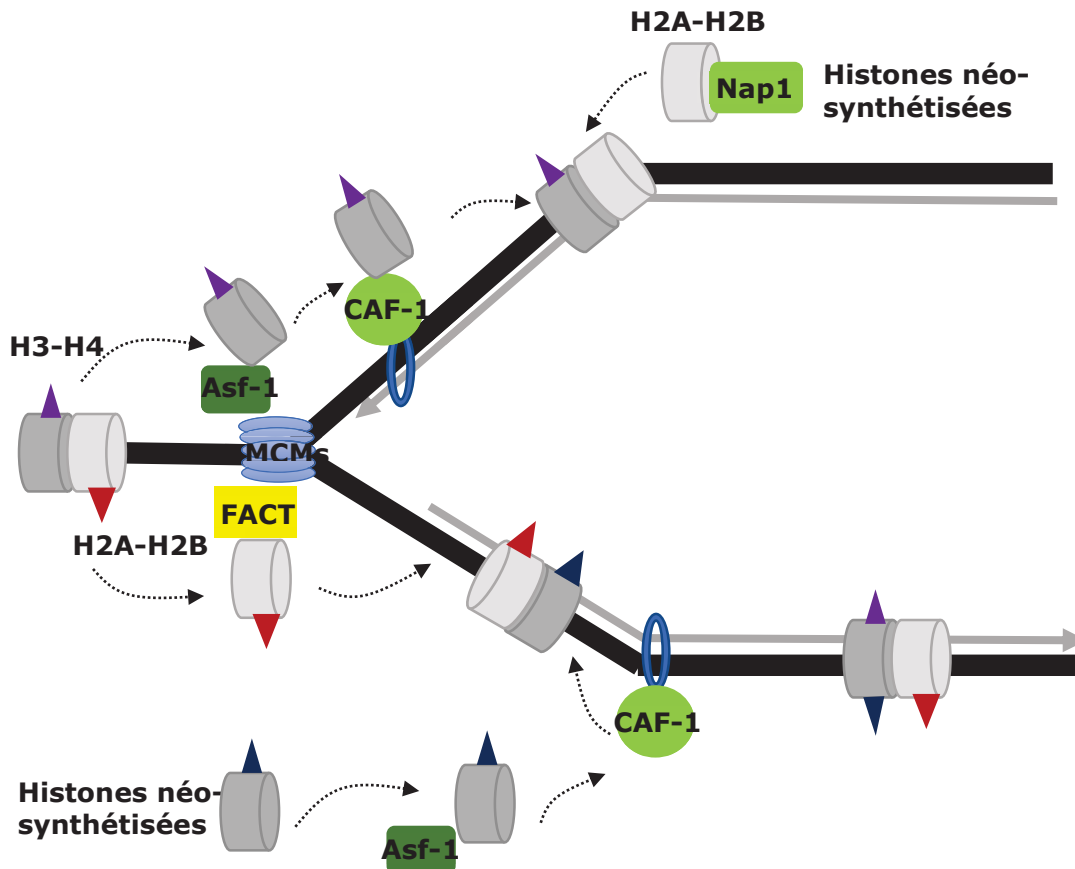


Figure 9 : Protéines chaperonnes et dynamique des histones.

Les chaperonnes Asf1 et FACT sont dirigées à la chromatine grâce à une interaction avec le complexe MCM et permettent le recyclage des histones parentales H3-H4 et H2A-H2B respectivement. Asf1 dirige aussi les histones H3-H4 parentales sous forme de dimères vers CAF-1. CAF-1 est recruté au niveau de la fourche via PCNA **et dépose les histones H3-H4 sous forme de tétramères.** Asf1 permet aussi l'incorporation des histones H3-H4 néo-synthétisées. Les histones H2A-H2B néo-synthétisées sont dirigées par Nap1. Adapté de Almouzni et Cedar, 2016 .

2.2. SYNTHÈSE ET INCORPORATION DES HISTONES NEOSYNTHÉTISÉES

2.2.1. LA SYNTHÈSE DES HISTONES EST RÉGULÉE AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE

Si une partie des histones de la chromatine naissante provient du processus de recyclage, la quantité d'histones à la chromatine doit être doublée au cours de la phase de réplication, ce qui implique que des nouvelles protéines histones soient synthétisées. Les histones canoniques sont transcrites spécifiquement au moment de la phase de réplication, permettant en partie l'approvisionnement en nouvelles histones nécessaires à l'assemblage des nucléosomes sur la chromatine naissante. Les niveaux d'histones sont régulés par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Ces régulations sont cruciales pour répondre à la demande en histone en phase de réplication et éviter des carences ou des

excès d'histones qui peuvent conduire à des altérations dans le processus de réplication, de transcription ou à des dommages ADN (Singh et al., 2010).

Chez les animaux, les histones canoniques sont codées par une famille de gènes présents en plusieurs copies et organisés en clusters de gènes (Marzluff et al., 2002). Les gènes histones sont transcrits par l'ARN polymérase II. De façon intéressante, ils ne possèdent pas d'introns et codent pour des ARNm non polyadénylés mais qui se terminent par une structure conservée en épingle à cheveux (Marzluff, 1992). Après un mécanisme de maturation complexe et impliquant des facteurs spécifiques (Dominski and Marzluff, 1999), les ARNm matures sont exportés du noyau vers le cytoplasme où ils sont traduits avant de regagner le noyau (Erkmann et al., 2005; Schodhetman and Perry, 1972). A la fin de la phase de réplication les ARNm d'histones sont dégradés par un système encore peu clair mais qui est dépendant de la fin de la réplication (Koseoglu et al., 2010).

Le contrôle temporel de l'expression des histones est assuré par la régulation au cours du cycle cellulaire de facteurs importants pour l'expression des histones, comme le régulateur de la transcription spécifique des histones NPAT (nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus) (DeRan et al., 2008) ou HBP (hairpin binding protein) (Sánchez and Marzluff, 2002), une protéine nécessaire à la maturation et au transport des ARNm histones. L'activité de NPAT est contrôlée par le complexe Cycline E-CDK2, limitant son activité à la phase de réplication (Zhao et al., 2000). HBP s'accumule en fin de phase G1 et est rapidement dégradée par le protéasome en fin de phase S suite à des phosphorylations par le complexe Cycline A-CDK1 et par CK2 (Djakbarova et al., 2014). Ces mécanismes de régulation limitent donc les étapes dépendantes de HBP à la phase de réplication. La dégradation des ARNm d'histones combinée à un arrêt de la transcription résultent en une interruption de la synthèse d'histones à la fin de la phase de réplication.

A l'inverse des histones canoniques, les variants d'histones ne présentent pas de régulation spécifique à la réplication. L'histone H3.3 par exemple, est exprimée tout le long du cycle cellulaire (Szenker et al., 2011). CENP-A, le variant H3 présent dans les régions centromériques, a un pic d'expression en phase G2 (Szenker et al., 2011).

Un autre mécanisme liant la voie de méthylation H4K20 et la structure de la chromatine implique une régulation transcriptionnelle des gènes histones par PR-Set7. Ainsi, Anindya Dutta et son équipe ont montré que la surexpression de la protéine PR-Set7 au cours du cycle cellulaire par mutation de son domaine PIP entraînait une diminution de la quantité d'ARNm et de protéines des cinq histones canoniques (Abbas et al., 2010). De façon plus spécifique, dans cette étude, la surexpression de PR-Set7^{PIPMUT} entraîne une accumulation de H4K20me3 sur les promoteurs de certains gènes histones et une perte de la quantité de ces protéines. Une conséquence de la perte des histones est une décondensation tardive de la chromatine et une dérégulation de l'expression génique de gènes cibles de E2F, comme c'est le cas lorsqu'on déplete l'histone H1 (Fan et al., 2005). Ce mécanisme lie la

voie de méthylation H4K20 avec le contrôle de l'avancée du cycle cellulaire *via* une régulation de la structure de la chromatine. Cependant, ce résultat semble contradictoire avec la compaction prématurée de la chromatine observée après surexpression du mutant PR-Set7^{PIPMUT} dans l'étude de L.Zou (Centore et al., 2010). Il faut noter que dans l'article d'Anindya Dutta, la décompaction observée est un phénotype plus tardif qui est lié à une activation du point de contrôle G2/M et à une re-réplication, qui pourrait expliquer la décompaction observée possiblement due à une carence en histone.

2.2.2. INCORPORATION DES HISTONES NOUVELLEMENT SYNTHETISEES

Le processus d'assemblage de la chromatine commence dans le cytoplasme où les ARNm histones sont traduits. L'analyse des histones cytoplasmiques a montré que les histones H4 et H3 étaient rapidement acétylées après leur synthèse (Ruiz-Carrillo et al., 1975; Sobel et al., 1994; Sterner and Berger, 2000). L'acétylation H4 sur les lysines 5 et 12 par HAT1 en particulier, est une marque caractéristique des histones nouvellement synthétisées au moment de la réplication chez de nombreux eucaryotes (Sobel et al., 1995). 5 résidus de la queue N-terminale de H3 peuvent être acétylés : K9, 14, 18, 23 et 27 mais le profil d'acétylation est variable entre les organismes. Chez les mammifères, des recherches sont encore nécessaires concernant l'acétylation H3K56. Cette acétylation a lieu non pas sur la queue N-terminale mais dans le cœur de la particule histone, au niveau du point de contact avec l'ADN, suggérant que cette modification pourrait directement réguler l'interaction entre l'histone H3 et l'ADN (Ge et al., 2013). L'acétylation H3K56 des histones nouvellement synthétisées augmente l'affinité de CAF-1 pour H3 et ainsi stimule la capacité de CAF-1 à assembler la chromatine (Li et al., 2008). Le cœur d'histone H4 peut aussi être acétylé sur la lysine 91, cette modification a un rôle dans la formation des octamères d'histones et dans la réponse aux dommages ADN (Yan et al., 2009; Ye et al., 2005). La chromatine naissante est donc fortement acétylée, cet état chromatinien particulier permet une ouverture de la chromatine compatible avec les processus de réparation de l'ADN, de recrutement de facteurs de transcription et donc d'activation de la transcription. Dans les cellules humaines, l'acétylation de la chromatine naissante permet aussi de réduire le dépôt d'histone H1 et donc d'empêcher la compaction de la chromatine (Perry and Annunziato, 1991). Des études ont montré que les histones pouvaient, en plus de l'acétylation, subir des méthylations avant le dépôt à la chromatine. L'histone H3 canonique présente, en effet, de la mono-méthylation H3K9. La marque H3K9me1 dépend de la présence de la méthyltransférase SETDB1 (SET domain bifurcated 1) en association avec CAF-1 (Loyola et al., 2009).

L'acétylation des histones nouvellement synthétisées est fortement liée au timing de réplication (Zhang et al., 2002). En effet, il existe un différentiel entre les régions précoces, ouvertes et actives et qui donc doivent être acétylées, et les régions tardives, compactes et déacétylées. Des études ont montré qu'il y avait une régulation de l'acétylation par le

timing de réplication de la chromatine (Zhang et al., 2002). Ces expériences ont consisté à micro-injecter un plasmide rapporteur dans le noyau de cellules en phase S précoce ou tardive. Le plasmide injecté dans le noyau en phase S précoce est rapidement empaqueté dans une structure chromatinienne présentant des histones acétylées. Le même plasmide est assemblé avec des histones déacétylées dans un noyau en phase S tardive (Zhang et al., 2002). Dans le cas où l'ADN est déjà dans une structure chromatinienne déacétylée, celle-ci devient acétylée quand il subit une réplication précoce. A l'inverse, si l'ADN présente des histones acétylées, celles-ci deviennent déacétylées après une réplication tardive (Lande-Diner et al., 2009). Ces travaux suggèrent que les différentes régions d'ADN sont empaquetées dans une structure chromatinienne dépendante de son timing de réplication. L'ADN répliqué précocement présente des nucléosomes acétylés alors que les régions tardives présentent des nucléosomes déacétylés. On peut toutefois se demander si ce processus implique une incorporation d'histones différenciellement acétylés entre la phase S précoce et tardive ou si il fait appel à un processus de maturation qui va spécifiquement déacétyler les régions tardives hétérochromatiniennes ?

2.3. MATURATION ET PROPAGATION DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE

Après la réplication, l'organisation générale de la chromatine doit être rétablie. Les histones permettant de reformer la fibre de chromatine derrière les fourches ont donc une origine double, elles peuvent être issues de la déstructuration de la chromatine devant les fourches ou bien d'une synthèse *de novo* au moment de la phase S. Le processus de maturation nécessite une conservation des modifications d'histones parentales puis le retrait des acétylations spécifiques de la phase S au niveau des régions silencieuses permettant l'établissement et la propagation de la structure hétérochromatinienne.

2.3.1. CONSERVATION DES PTM D'HISTONES

Le recyclage des histones parentales ainsi que la synthèse d'histones de novo fournissent un pool d'histones qui vont former la chromatine post-répllicative. Les mécanismes régulant la proportion d'histones issues de l'une ou de l'autre voie à un locus donné sont encore mal connus et on peut imaginer l'existence d'une spécificité associée à un domaine chromatinien.

Les histones parentales sont transférées sur le brin précoce et sur le brin tardif dès le moment où assez d'ADN a été répliqué pour permettre l'assemblage des nucléosomes. La façon dont les histones parentales sont distribuées sur l'ADN naissant détermine le degré de conservation des marques d'histones. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'incorporation des histones parentales dans la chromatine naissante. Un modèle établi est que la distribution des histones parentales et néo-synthétisées se fait de façon aléatoire, ce modèle ainsi que les suivants évoqués plus loin dans le texte sont illustrés

Figure 10. Afin d'éviter la dilution des marques d'histones, la maintenance des modifications est assurée en utilisant les nucléosomes voisins comme matrices. Les marques parentales sur la chromatine naissante sont reconnues par des protéines effectrices qui à leur tour recrutent des protéines de modification de la chromatine. C'est le cas par exemple pour la modification H3K9me3 qui est reconnue par la protéine HP1 qui recrute l'enzyme Suv39h pour favoriser la remise en place de cette marque sur la chromatine néo-synthétisée (Saksouk et al., 2015).

Un second modèle de distribution des histones parentales est la distribution selon un modèle semi-conservatif (Figure 10-B). Ce modèle implique une distribution des dimères H3-H4 parentaux de façon équivalente sur les deux chromatides filles. Les nucléosomes sont ensuite reconstitués grâce à l'ajout de dimères H3-H4 néo-synthétisés. Les dimères H3-H4 parentaux serviront alors de matrice pour recopier l'information épigénétique au sein du même nucléosome. Cependant, les deux brins n'étant pas répliqués simultanément il est difficile de concevoir que les histones parentales puissent ségréger de façon ordonnée entre les deux brins.

Enfin, le dernier modèle envisagé est une distribution asymétrique des histones parentales entre les deux chromatides filles (Figure 10-C). Dans ce cas, l'information épigénétique sera recopiée d'une chromatide à l'autre. Ce mode de conservation des PTM d'histones implique l'instauration d'une grande variabilité sur la molécule d'ADN, avec un brin qui ne possède pas de modifications épigénétiques préexistantes, ce qui pourrait permettre une plasticité génomique importante.

On peut imaginer que ces trois mécanismes ne sont pas entièrement exclusifs mais qu'ils coopèrent à eux trois et que l'un ou l'autre des mécanismes pourrait être le plus utilisé selon le contexte.

Après recyclage des histones parentales et incorporation des histones néo-synthétisées la chromatine naissante subit un processus de maturation. Ce processus de maturation peut être quantifié dans le temps en utilisant une technique de mesure de la sensibilité aux nucléases. Ainsi, pour que la chromatine naissante qui est sensible à la digestion par les nucléases devienne mature et insensible aux nucléases il faudra de 10 à 20 minutes (Levy and Jakob, 1978; Worcel et al., 1978). Etant donné la vitesse de réplication, la maturation est donc complète environ 40 kb ou 200 nucléosomes derrière les fourches. Les modifications épigénétiques ne sont toutefois pas totalement restaurées en 20 minutes mais des mécanismes de retrait ou d'ajout de marques d'histones, de méthylation de l'ADN ou de remodelage des nucléosomes ont lieu sur la chromatine naissante et ces processus sont finement régulés par la machinerie de réplication (Alabert et al., 2015). La protéine PCNA par exemple, recrute plusieurs facteurs de modification de la chromatine et donc lie l'assemblage et la maturation de la chromatine avec la réplication.

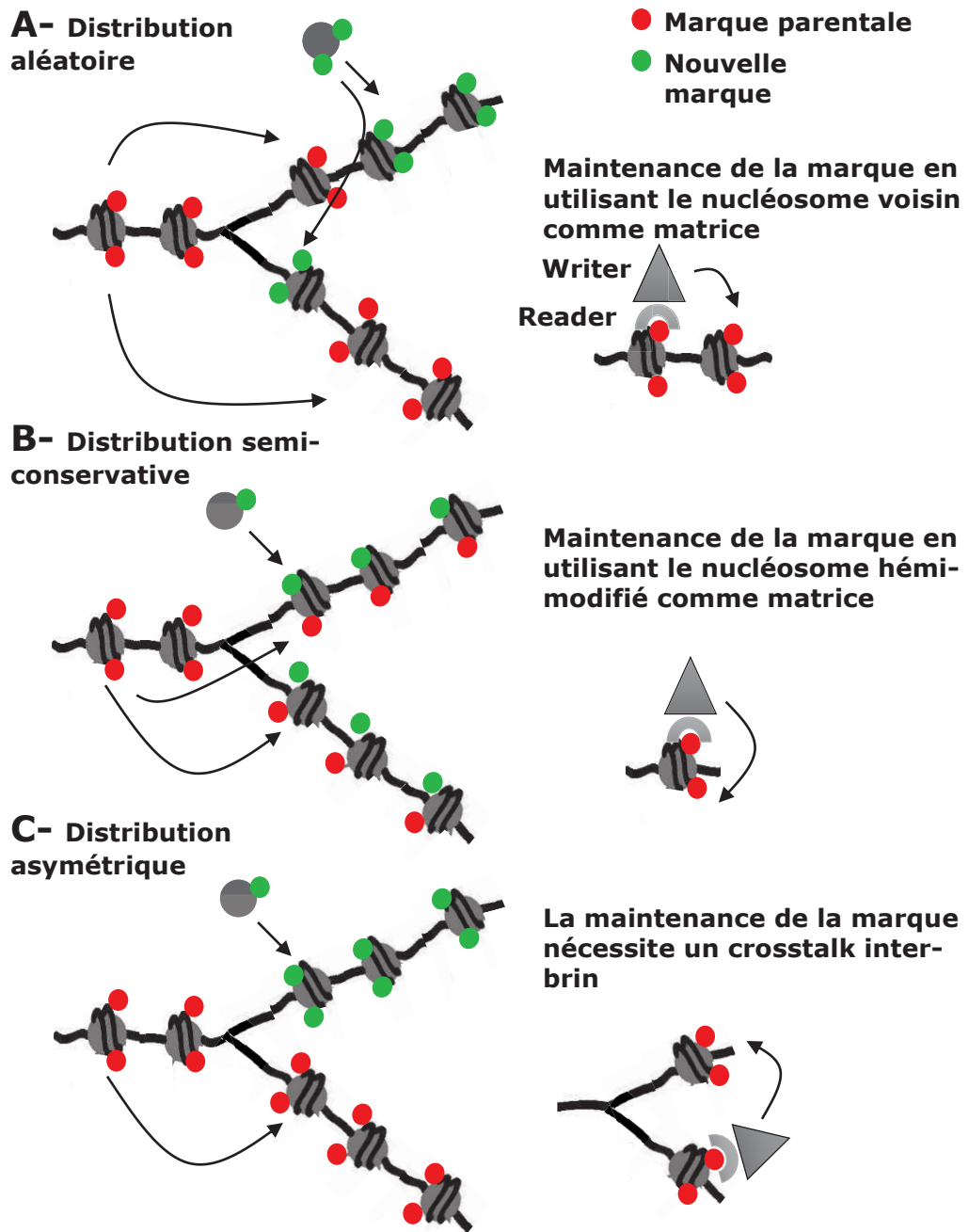


Figure 10 : Représentation schématique des 3 modèles de distribution des histones parentales. Dans les 3 cas le rétablissement des marques d’histones sur le brin néosynthétisé est assuré par un mécanisme qui implique qu’une protéine reader reconnaisse la marque parentale puis recrute une protéine writer qui déposera la même marque sur les histones néosynthétisés voisins Adapté de Probst *et al.*, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2009

2.3.2. ETABLISSEMENT ET MAINTIEN DE LA CHROMATINE SILENCIEUSE

A. LA MATURATION DE LA CHROMATINE NECESSITE UNE MODIFICATION DES HISTONES NOUVELLEMENT SYNTHETISEES APRES LEUR ASSEMBLAGE A LA CHROMATINE

Les domaines hétérochromatiniens sont des régions silencieuses enrichies en séquences répétées et en éléments transposables. Au cours de la phase de réplication, les principales marques qui caractérisent l'hétérochromatine sont altérées. La chromatine silencieuse des eucaryotes partage des nombreuses propriétés, dont leur mode de transmission. Différents mécanismes permettent la maintenance de l'hétérochromatine (schématisés en Figure 11). L'hétérochromatine est caractérisée par des marques de méthylation, comme H3K9me3, H4K20me3, H3K27me3, et est enrichie en HP1.

Le processus de maturation de la chromatine naissante nécessite un retrait des marques d'acétylation dans les régions hétérochromatiniennes afin de restaurer la structure chromatinienne parentale. Ainsi, un défaut dans le retrait de ces acétylations compromet l'organisation de la chromatine silencieuse entraînant des défauts chromosomiques importants (Taddei et al., 2001). La déacétylation et donc la maturation de la chromatine sont aussi requises pour la progression et la stabilité des fourches de réplication (Bhaskara et al., 2010; Conti et al., 2010). Des expériences d'iPOND (Isolation of Proteins On Nascent DNA) ont montré que HDAC1, HDAC2 et HDAC3 étaient présentes au niveau de la chromatine naissante (Sirbu et al., 2011). Le recrutement des HDACs est assuré par PCNA (Milutinovic et al., 2002) et par le complexe de remodelage de la chromatine SMARCD1 (SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1) qui est aussi impliqué dans la maturation de la chromatine par son activité de stimulation de la méthylation H3K9 (Rowbotham et al., 2011). Dans les cellules humaines, le traitement à court terme avec un inhibiteur de HDAC ou la déplétion de HDAC3 avec un siRNA ralentit la fourche de réplication (Conti et al., 2010). Dans des cellules embryonnaires de souris (MEFs), le KO conditionnel de HDAC3 entraîne une accumulation des marques d'acétylation sur la chromatine naissante corrélée avec des dommages ADN au moment de la réplication, et, quand le KO est généré spécifiquement dans le foie, le développement d'un carcinome hépatocellulaire consécutif à une instabilité génomique (Bhaskara et al., 2010). La cinétique de retrait de ces marques d'acétylation diffère en fonction des régions du génome. Ainsi, une étude a montré que les acétylations H4K5 et H4K12 sont retirées en environ 20 à 60 minutes après le réassemblage de l'hétérochromatine (Taddei et al., 1999). Par ailleurs, le pré-dépôt de H3K9me1 sur les histones néo-synthétisées pourrait servir de substrat aux Suv39h pour générer de la di- et de la tri-méthylation H3K9 au cours du processus de maturation de la chromatine (Alabert and Groth, 2012). L'action combinée des enzymes modifiant les histones avant et après le dépôt détermine donc la structure de la chromatine naissante

Des systèmes d'assemblage de la chromatine *in vitro* à partir d'extraits de Drosophiles ont suggéré que les déacétylations H4K5 et K12 pourraient être en partie dépendantes de la mono-méthylation H4K20 (Scharf et al., 2009). Ce mécanisme implique un recrutement des déacétylases sur H4K20me1 grâce à une interaction avec L3MBT. Cette étude nous pousse à questionner l'implication de cette voie de méthylation dans le processus de maturation de la chromatine.

B. PROPAGATION DE L'HÉTÉROCHROMATINE

La chaperonne d'histone CAF-1 forme un complexe avec SETDB1 qui catalyse H3K9me1 sur les histones solubles et avec HP1 (Loyola et al., 2009) (Figure 11). Les enzymes PRDM3 et PRDM16 sont aussi impliquées dans la mono-méthylation H3K9 des histones solubles (Pinheiro et al., 2012). Le dépôt d'histones de novo H3-H4 présentant H3H9me1 est le substrat préférentiel des Suv39h pour générer H3K9me3 (Loyola et al., 2009). La formation d'un complexe entre les quatre HKMTs (Histone lysine méthyl transférase) H3K9 (G9a, Suv39h, GLP (G9a-like protein) et SETDB1) assure ensuite la maintenance de la méthylation H3K9 (Fritsch et al., 2010). Les histones parentales recyclées présentant H3K9me3 recrutent HP1 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001) qui recrutera par la suite Suv39h permettant la propagation de l'hétérochromatine (Maison et al., 2011). Un mécanisme similaire a lieu avec la marque H3K27me3, spécifique de l'hétérochromatine facultative, qui est déposée par EZH2 (du complexe PRC2) et est reconnue par la protéine effectrice Pc (du complexe PRC1). La tri-méthylation H3K27 est aussi impliquée dans la stabilisation de HP1 α à l'hétérochromatine (Boros et al., 2014). Une étude suggère que H3K56me3 est aussi une marque d'hétérochromatine qui colocalise avec H3K9me3 (Jack et al., 2013) mais le rôle et le mécanisme de maintenance de cette marque sont encore mal connus (Alabert et al., 2015; Rowlands et al., 2017). Le complexe de remodelage de la chromatine WICH (WSTF-ISWI) semble aussi impliqué dans ce processus puisque sa déplétion entraîne une heterochromatinisation de la chromatine naissante anormale (Poot et al., 2004). Une hypothèse qui a été avancée concernant la fonction de ce complexe dans ce processus est que le complexe WICH empêche la reformation trop rapide de la fibre de chromatine de 30nm après le passage de la fourche et ainsi maintient la chromatine dans un état permissif pour la liaison de facteurs de maturation (Poot et al., 2005).

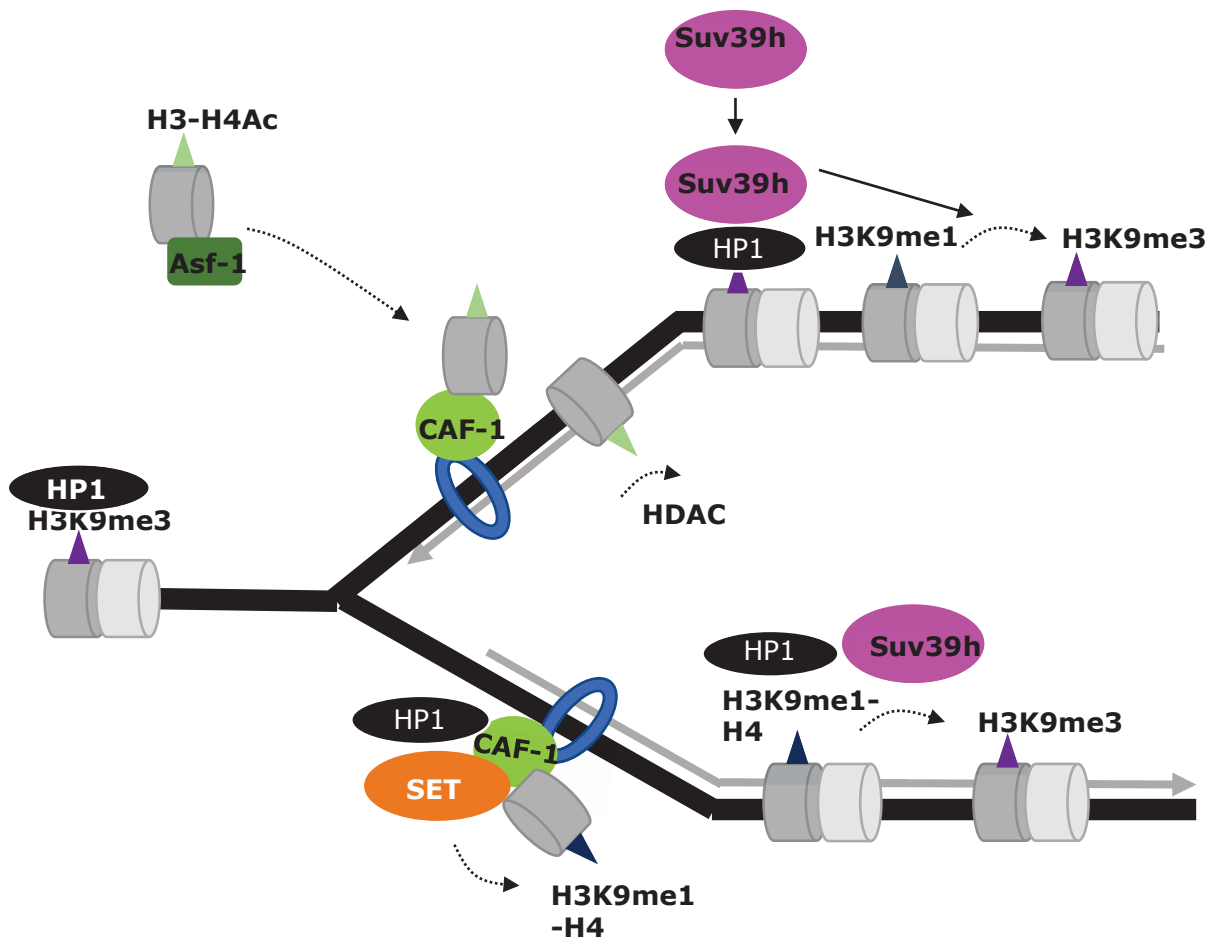


Figure 11: Modèle du mécanisme de maintien de l'hétérochromatine péricentromérique constitutive au cours de la réplication chez les mammifères.

Des boucles de régulation permettent la maintenance des PTM d'histones répressives comme H3K9me3 ou H3K27me3. HP1 α (reader) lie H3K9me3 grâce à son chromodomaine et recrute la méthyltransférase Suv39h (writer). Suv39h convertit ensuite H3K9me1 en H3K9me3 sur les nucléosomes nouvellement assemblés. Ces nucléosomes H3K9me3 sont ensuite un site de fixation pour HP1 α . CAF-1 forme un complexe avec HP1 α et avec SETDB1 et est dirigé à la chromatine via PCNA. Adapté de Cedar et Almouzni, 2016.

ROLE DES PROTEINES ORCS

En plus de leur rôle dans la mise en place des origines de réplication, les protéines ORC jouent un rôle important dans le maintien de l'hétérochromatine. Chez la levure, ORC interagit avec Swi6 (HP1) (Matsuda et al., 2007), la protéine ORC2 de *Drosophila* interagit aussi avec HP1 (Pak et al., 1997). De même, chez les humains, ORC2 lie HP1 α et HP1 β en G1 et en début de phase S (Prasanth et al., 2004) et colocalise avec HP1 à la chromatine péricentromérique. La déplétion de ORC2 affecte la localisation de HP1 mais pas le niveau de H3K9me3 (Prasanth et al., 2010), suggérant que l'association de HP1 à l'hétérochromatine dépend de H3K9me3 et de ORC. De plus, ORC2 est requis pour le « silencing » des gènes Xi du chromosome X inactif et pour l'association de HP1 α aux gènes

Xi (Chan et al., 2011). Ainsi, ORC2, et possiblement d'autres sous-unités ORC, est impliqué dans la formation et la maintenance de l'hétérochromatine constitutive et facultative.

ORCA/LRWD1 permet le recrutement protéines ORC au niveau des origines (Shen et al., 2010) et est aussi localisé au niveau des foyers d'hétérochromatine (Shen et al., 2010). ORCA/LRWD1 lie spécifiquement les nucléosomes présentant des marques H3K9me3 (Giri et al., 2015), H4K20me3 et H3K27me3 (Bartke et al., 2010; Vermeulen et al., 2010), suggérant que ORC et ORCA/LRWD1 pourraient être en partie recrutés au niveau des foyers d'hétérochromatine grâce à une interaction avec des marques d'histones répressives. En effet, ORCA/LRWD1 lie la marque H3K9me3 et permet la formation et la maintenance du complexe contenant les KMTs H3K9 qui est impliqué dans la formation de l'hétérochromatine post-réplivative (Giri et al., 2015). ORCA/LRWD1 lie aussi les marques hétérochromatiniennes H3K27me3 et H4K20me3 ainsi que les méthyltransférases responsables de ces marques pour réguler la structure de l'hétérochromatine par un mécanisme encore peu clair (Giri and Prasanth, 2016).

DI- ET TRI-METHYLATION H4K20/SUV4-20H ET STRUCTURE DE L'HETEROCHROMATINE

Bien que les Suv4-20h soient nommés comme des supprimeurs de variégation, la fonction de la marque H4K20me3 dans la répression de gènes est peu connue et a beaucoup été sujet à discussion (Sakaguchi et al., 2008). Si les protéines Suv4-20h ne sont pas impliquées dans la répression génique quel est leur rôle dans l'hétérochromatine ? L'hétérochromatine péricentromérique est fortement enrichie en di- et tri-méthylation H4K20, mais la fonction de ces marques dans la structure de l'hétérochromatine est peu claire. La triméthylation H3K9 est requise pour la conversion de la mono-méthylation H4K20 et di- et triméthylation par les Suv4-20h qui interagissent avec les protéines HP1, suggérant que HP1 permet le recrutement des enzymes Suv4-20h à l'hétérochromatine (Schotta et al., 2004). De plus, la tri-méthylation H4K20 est reconnue par la protéine ORCA/LRWD1, impliquée dans la structure de l'hétérochromatine. Comme mentionné plus haut, ORCA/LRWD1 interagit avec Suv4-20h2, grâce à son domaine WD40 (Giri and Prasanth, 2016).

PARTIE 4 : ROLES DE LA VOIE H4K20 DANS LES MECANISMES DE REPONSE AUX DOMMAGES ADN

La dynamique de la chromatine va également jouer un rôle important dans les mécanismes de réponse aux dommages ADN au cours du cycle cellulaire (Nair et al., 2017). Afin de maintenir l'information génétique, les cellules doivent réparer les lésions ADN qui menacent l'intégrité du génome. Les dommages ADN peuvent être causés par des événements endogènes ou exogènes à toutes les étapes du cycle cellulaire et la réponse utilisée pour remédier à ces dommages ADN dépend de la phase du cycle cellulaire à laquelle ils ont lieu. La source endogène de dommages ADN est liée au processus de réplication lui-même, *via* une erreur de nucléotide, la production de molécules réactives comme les ROS ou par des processus de recombinaison. Les sources exogènes sont les radiations (ultra-violetes et radiations ionisantes) ou les substances chimiques. Toutes ces sources de dommages ADN peuvent générer des cassures doubles brins, simple brin, des excisions de nucléotides ou des liaisons covalentes ADN-protéines.

Les cellules possèdent différents systèmes de réparation de l'ADN (DDR) pour répondre aux différents dommages en fonction du type et de l'importance du dommage : la réparation des mésappariements d'ADN, la réparation par excision de nucléotide, la réparation par excision de base, la re-ligation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour non-homologous end joining), et la recombinaison homologue (HR). Les cassures doubles brins de l'ADN (DSBs) sont les lésions ADN les plus dangereuses et nécessitent les voies de réparation de l'ADN NHEJ ou HR dont le mécanisme est schématisé en Figure 12 (Hühn et al., 2013). L'association de l'hétérodimère Ku70/80 au niveau de la DSB favorise la voie NHEJ *via* le recrutement de DNA-PKcs. Les extrémités ADN sont prises en charge par l'activité nucléolytique d'Artemis puis sont reliées par le complexe Lig4/XLF/XRCC4. Le recrutement de MRN (MRE11–Rad50–NBS1) au niveau des DSBs favorise à l'inverse la recombinaison homologue grâce à une résection des DSBs en association avec CtIP et BRCA1 (Breast Cancer 1). 53BP1 (p53-Binding protein 1) antagonise l'activité de BRCA1 et favorise la voie NHEJ. RPA (Replication protein A) s'associe ensuite à l'ADN simple brin, ce qui stimule l'activité d'ATR, puis se dissocie grâce à Rad51, BRCA2 et PALB2. Rad51 forme par la suite des filaments nucléoprotéiques permettant la formation d'une double jonction de Holliday qui sera prise en charge par les résolvas, puis par les ligases, conduisant à la réparation complète de la cassure (Rodgers and McVey, 2016). La reconnaissance et la réparation des DSBs nécessitent une dynamique de la chromatine qui va subir une ouverture, un désassemblage, un réassemblage et une recompaction qui implique des chaperonnes d'histones. Le contrôle de cette dynamique de la chromatine se fait *via* des modifications d'histones et des enzymes de remodelage de la chromatine dépendantes de l'ATP.

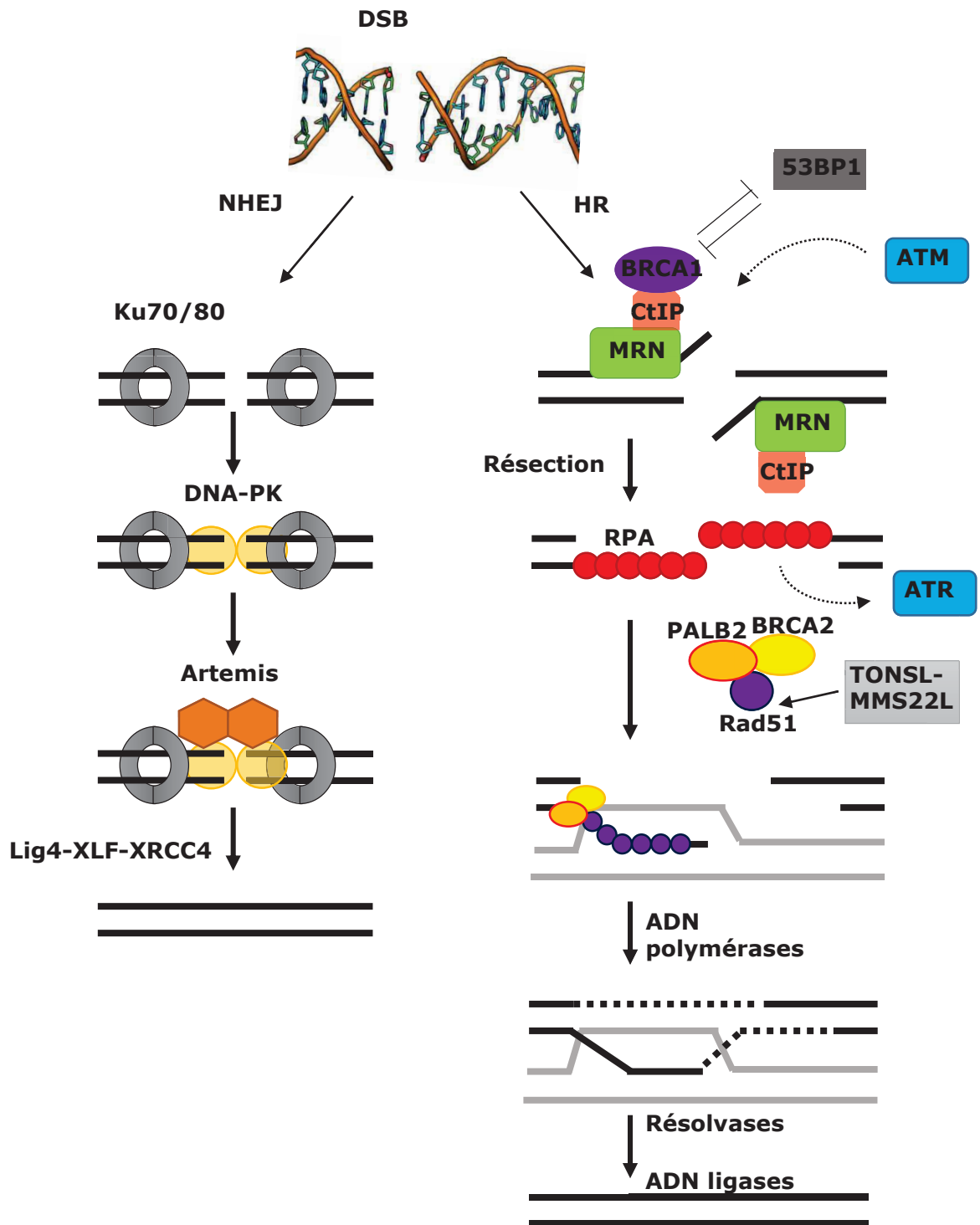


Figure 12 : Systèmes de réparation des DSB.

Les DSBs sont réparées par deux mécanismes : NHEJ qui est majoritaire en phase G1 et HR en phase S et en début de phase G2. Adapté de Hühn et al., 2013

1. MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES D'HISTONES IMPLIQUÉES DANS LA REPONSE AUX DOMMAGES ADN

La création de DSB active un complexe de réponse aux dommages ADN qui permet le repérage de la lésion puis l'accomplissement de nombreux processus résultant en une réparation, un arrêt du cycle ou l'apoptose en fonction de la nature de la lésion et de la phase du cycle cellulaire. La création de DSBs induit de nombreuses modifications d'histones. La réponse aux dommages ADN (DDR) par recombinaison homologue est initiée par l'accumulation du complexe MRN au niveau du site de cassure qui recrute puis active la kinase ATM. ATM possède de nombreux substrats dont le variant d'histone H2AX. La phosphorylation d'une sérine conservée sur H2AX est la marque d'histone la plus décrite dans le contexte de la réparation des dommages ADN. Elle a lieu sur les histones mammifères (sur la Sérine 139) mais aussi chez la levure (S129). La phosphorylation H2AX (appelée γ -H2AX, ou γ -H2A chez la levure et γ -H2Av chez la Drosophile) est un site de liaison pour la protéine MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) qui permet le recrutement de protéines de réparation et contrôle le point de contrôle d'arrêt du cycle cellulaire en réponse à un dommage ADN (Stucki et al., 2005; Xie et al., 2007). Cette phosphorylation coordonne ainsi les processus d'arrêt du cycle cellulaire et de réparation des dommages (Figure 13). Chez les mammifères cette modification a lieu sur environ une mégabase autour de la lésion (Iacovoni et al., 2010; Massip et al., 2010; Rogakou et al., 1999).

Les dommages ADN conduisent à l'augmentation locale d'acétylation des histones qui entraînent une relaxation de la chromatine et semblent essentielles pour le processus de réparation (Ikura et al., 2015; Sharma et al., 2010). La DDR nécessite ainsi les HAT Tip60, p300, MOF (Males-absent on the first protein) et GCN5 mais il est encore peu clair de savoir si ces acétylations agissent en favorisant la liaison d'autres facteurs de réparation ou en favorisant le réassemblage de la chromatine après la réparation (Chen et al., 2008). L'acétylation H4K16 par l'acétyltransférase MOF ouvre la chromatine et favorise la liaison de MDC1 aux domaines γ -H2AX (Li and Dou, 2010; Sharma et al., 2010). γ -H2AX recrute aussi les protéines de réparation 53BP1 et BRCA1 mais aussi l'histone acétyltransférase GCN5 qui permet l'acétylation H3 et le recrutement de SWI/SNF (Lee et al., 2010). Un autre mécanisme épigénétique impliqué dans la réponse aux dommages ADN implique une déacétylation H3K9Ac par SIRT6 qui stabilise la kinase dépendante de l'ADN DNA-Pkcs au niveau des lésions (McCord et al., 2009). L'ubiquitinylation des histones joue aussi un rôle majeur dans la dynamique de la chromatine en réponse aux dommages ADN. Par exemple, la mono-ubiquitinylation H2B déposée par RNF20 au niveau des DSBs facilite l'accès de protéines comme Rad51, BRCA1 ou CtIP à la chromatine (Price and D'Andrea, 2013). 53BP1 peut lier l'histone H2A ubiquitinylée par RNF168 au niveau des DSBs. L'ubiquitinylation H4, H3 et H2A augmente après irradiation UV et réduit la stabilité des

nucléosomes pour faciliter l'assemblage de complexes de réparation (Wang et al., 2006;

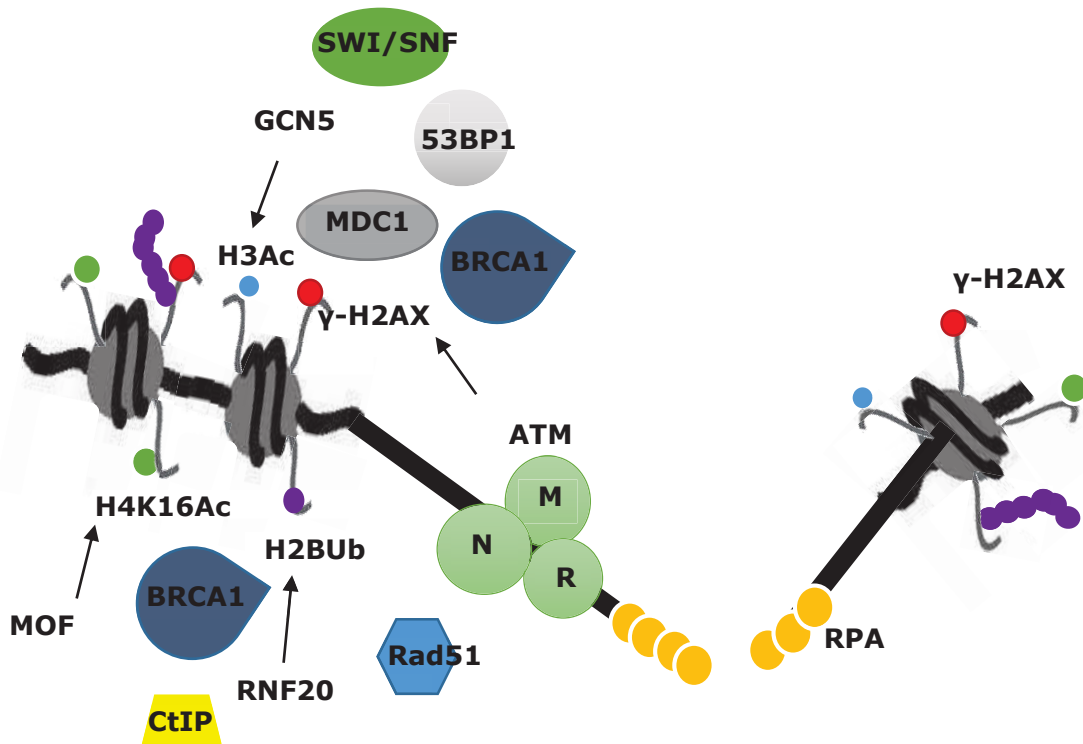


Figure 13 : Modifications post-traductionnelles d'histones au niveau des DSBs.

Zhu and Wani, 2010).

2. ENZYMES DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE DEPENDANTES DE L'ATP

La réponse aux dommages ADN implique aussi des protéines de remodelage de la chromatine dépendantes de l'ATP (Lans et al., 2012). Ces protéines sont recrutées au niveau des DSBs et permettent de déstabiliser et de retirer les nucléosomes proches de la lésion et ainsi facilitent le recrutement et l'activité des protéines de réparation. Ce mécanisme a été montré entre autre chez la levure (Shim et al., 2005) chez laquelle il implique le complexe de réparation MRE11/Rad50/XRS2 (MRE11/Rad20/NBS1 chez les mammifères). Le complexe INO80 est recruté *via* la modification γ -H2A.X et permet la DDR en remodelant la chromatine et en permettant le recrutement de protéines de réparation nécessaires à la résection des extrémités d'ADN au cours de la recombinaison homologue (Chambers and Downs, 2012; Lademann et al., 2017). Ce complexe est impliqué dans la réparation par recombinaison homologue en coopération avec d'autres complexes de remodelage comme SWI/SNF, hSNFH2 (Costelloe et al., 2012) ou la protéine CHD4 du complexe NuRD (Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013). De plus, le complexe de

remodelage p400 permet l'incorporation du variant d'histone H2AZ au niveau des DSBs (Xu et al., 2012).

Le recrutement des protéines de remodelage de la chromatine au niveau des lésions est largement régulé par les modifications post-traductionnelles d'histones. Par exemple, en réponse à un dommage ADN, les enzymes PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase) déposent des unités ADP-ribose sur les histones proches du site de lésion (Messner and Hottiger, 2011), ce qui permettrait aux protéines Polycomb MEL-18 (du complexe PRC1) ou aux protéines MTA1 et CHD4 du complexe de remodelage NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex) d'être recrutées à la chromatine et de réguler la réponse aux dommages ADN (Messner and Hottiger, 2011). Ce mécanisme est notamment utilisé au moment de la réplication où PARP-1 est nécessaire pour réguler l'avancée de la fourche, réparer les dommages et éviter un stress réplicatif (Sugimura et al., 2008). Récemment, un autre mécanisme de recrutement du complexe de remodelage NuRD a été révélé et implique une déméthylation de H3K4me3 par KDM5A (Lysine deméthylase 5A) (Gong et al., 2017).

Ainsi, de nombreuses enzymes de remodelage de la chromatine dépendantes de l'ATP sont recrutées au niveau des DSBs pour faciliter la DDR en modifiant la position des nucléosomes et/ou en recrutant des protéines de réparation.

3. ROLE DE LA METHYLATION H4K20 DANS LA REPARATION DES DOMMAGES ADN

Une autre fonction connue de la voie H4K20 dans le maintien de l'intégrité génomique concerne la reconnaissance et la réparation des dommages ADN. L'équipe de Danny Reinberg a montré que PR-Set7 s'accumule rapidement au niveau des DSBs grâce à une interaction avec PCNA, entraînant une augmentation de H4K20me1 (Oda et al., 2010). De nombreuses études ont montré que la di-méthylation H4K20 résultant de l'activité de PR-Set7 et des Suv4-20h était un site de liaison de forte affinité pour 53BP1 (p53 binding protein 1) *via* son domaine en tandem Tudor (Botuyan et al., 2006; Greeson et al., 2008). 53BP1 reconnaît aussi H4K20me1 mais avec une moins bonne efficacité (Botuyan et al., 2006; Jørgensen et al., 2013). Ainsi, la mutation des enzymes Suv4-20h dans des MEFs entraîne un retard dans le recrutement de 53BP1 après irradiation (Schotta et al., 2008). Des études de spectrométrie de masse dans des cellules en prolifération ont identifié la di-méthylation H4K20 comme étant le niveau de méthylation H4K20 le plus abondant puisqu'elle est retrouvée sur ~80% des protéines H4 (Young et al., 2009).

La re-ligation par jonction d'extrémités non homologues NHEJ est indépendante d'une matrice d'ADN et est donc la voie agissant préférentiellement au moment de la phase G1, quand le génome n'est pas encore répliqué. La réparation par recombinaison homologue HR avec la chromatide sœur agit en phase de réplication et en phase G2 (Ceccaldi et al.,

2016; Shibata, 2017). Malgré la mutagénicité du système NHEJ c'est un système de réparation nécessaire car il est très rapide et empêche les phénomènes de translocation (Lieber, 2010). La résection de l'extrémité d'ADN est un prérequis pour la réparation HR et le choix entre les deux systèmes de réparation à un moment du cycle où les deux systèmes sont envisageables est en partie déterminé par la présence de 53BP1 (Daley and Sung, 2014). 53BP1 limite la résection des extrémités d'ADN *via* son accumulation au niveau des DSBs et le recrutement de nombreuses protéines effectrices, et donc influe sur le choix de la voie de réparation en favorisant une réparation NHEJ (Daley and Sung, 2014; Zimmermann and de Lange, 2014). Ainsi, l'accumulation de 53BP1 au niveau des foyers induits par les radiations ionisantes est inversement proportionnelle à l'activité de résection des extrémités d'ADN (Ochs et al., 2016), suggérant que la quantité de 53BP1 à la chromatine doit être finement régulée au moment de la phase de réplication. De fait, on peut penser qu'une quantité trop importante de 53BP1 limiterait la réparation HR et donc favoriserait la création de mutations *via* la réparation NHEJ. Différentes hypothèses existent concernant le système de reconnaissance de 53BP1 avec H4K20me2 : ou bien la marque devient plus accessible à proximité des DSBs (Acs et al., 2011; Mallette et al., 2012), ou bien le niveau de la marque augmente suite à un dommage ADN (Pei et al., 2011; Tuzon et al., 2014). Une étude récente basée sur l'observation au microscope de cellules dans des phases spécifiques du cycle cellulaire a montré que plus les cellules progressent en phase de réplication moins 53BP1 est capable de s'accumuler au niveau des DSBs (Pellegrino et al., 2017). Ce phénomène pourrait être lié à la dilution de la marque H4K20me2 lorsque les cellules répliquent leur génome. Ainsi, une maturation prématurée de la chromatine (et donc un rétablissement plus rapide de H4K20me2) peut restaurer l'accumulation de 53BP1 sur la chromatine répliquée. L'association de 53BP1 à la chromatine *via* H4K20me2 permet donc de distinguer les DSBs situées au niveau de l'ADN pré- de post-répliqué, permettant d'orienter le choix de voie de réparation en fonction de la disponibilité d'une matrice ADN (Pellegrino et al., 2017).

La dilution de la méthylation H4K20 au cours de la réplication implique l'apparition de lysine 20 non méthylée (H4K20me0) sur les histones néo-synthétisées. Une autre fonction de la voie H4K20 dans le choix de voie de réponse aux dommages ADN implique une reconnaissance de cette lysine non méthylée par le complexe de réparation des dommages ADN associés à la réplication TONSL-MMS22L (Saredi et al., 2016). Cette reconnaissance permet à TONSL de se lier sur les lésions ADN spécifiquement sur la chromatine post-répliquative qui présente H4K20me0. TONSL assure ensuite la liaison de Rad51 et l'accomplissement de la DDR par la voie HR. Ainsi, sur la chromatine pré-répliquative, les histones parentales présentant H4K20me2 permettent le recrutement de 53BP1 et la voie NHEJ. Lorsque les cellules répliquent leur génome la quantité de H4K20me2 diminue, ce qui réduit la liaison de 53BP1, et de la lysine 20 non méthylée apparaît, ce qui favorise la voie HR. Ce mécanisme est illustré en Figure 14.

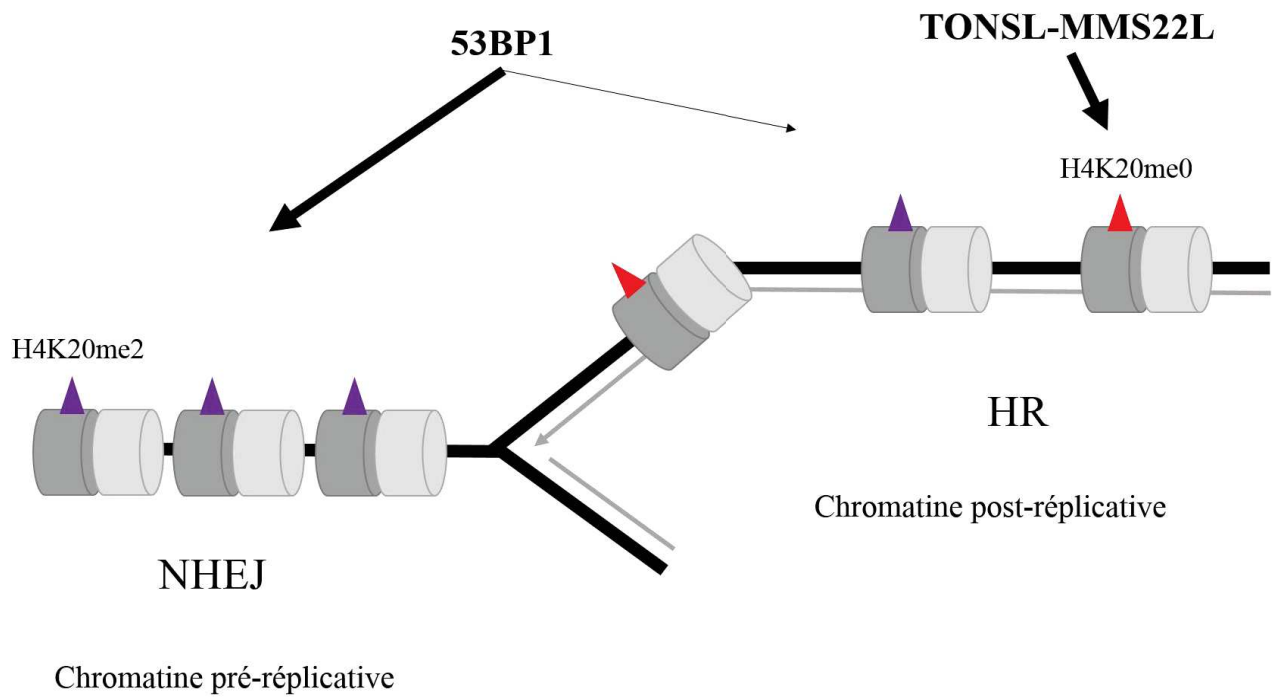


Figure 14 : le niveau de méthylation H4K20 différencie la chromatine pré- et post-réplivative et détermine la voie de réponse aux dommages ADN qui sera utilisée.

PARTIE 5 : STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET TUMORIGENESE : IMPLICATIONS DE LA VOIE DE METHYLATION H4K20 DANS LE CANCER

Le développement cancéreux est un processus complexe qui implique à la fois des modifications génétiques et épigénétiques. Les mutations génétiques dans des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur sont généralement considérées comme étant l'évènement majeur conduisant au développement cancéreux car ces gènes peuvent directement réguler la croissance cellulaire. En outre, des études ont montré que des modifications de facteurs épigénétiques *via* des mutations ou des altérations de l'expression génique peuvent contribuer au développement tumoral (Kanwal and Gupta, 2012). L'expression anormale d'enzymes de remodelage et de modifications de la chromatine peut conférer aux cellules cancéreuses la capacité de reprogrammer leur génome et par là même, de maintenir ou d'exacerber leurs caractéristiques de cellules transformées. Ainsi, les altérations génétiques ou épigénétiques présentes dans les cellules cancéreuses peuvent aboutir à des modifications de la structure de la chromatine qui peuvent, en altérant la quantité ou la qualité de l'expression de gènes, promouvoir le développement cancéreux. Des études de séquençage nouvelle génération ont montré que 50% des tumeurs présentaient des mutations dans des enzymes qui modulent l'organisation de la chromatine (Jones et al., 2016). Les cellules tumorales sont non seulement activées par des altérations génétiques et épigénétiques, mais utilisent aussi des processus épigénétiques pour résister à la chimiothérapie et à la surveillance immunitaire. Ainsi de nombreuses recherches consistent à trouver de nouvelles molécules capables de cibler de voies épigénétiques pour le traitement du cancer.

Des défauts dans la régulation de la condensation ou de la décondensation de la chromatine conduisent à des dommages ADN et des modifications de l'expression de gènes qui contribuent à l'instabilité génomique (Putiri and Robertson, 2010). L'instabilité génomique est une caractéristique associée à de nombreux syndromes pathologiques, dont le cancer (Negrini et al., 2010). Ces défauts de régulation de la condensation peuvent par exemple être dus à des mutations dans des gènes codant pour les enzymes de méthylation de l'ADN. En outre, une dérégulation dans la position ou le niveau d'une PTM d'histone médiée par un déséquilibre dans le niveau ou l'activité des enzymes responsables du dépôt ou du retrait des PTM peut conduire à une altération de la structure de la chromatine et favoriser ou influencer sur le développement du cancer. De nombreuses modifications d'histone ont été décrites comme étant dérégulées dans les cancers mais il existe très peu d'études décrivant les mécanismes moléculaires spécifiques des cellules cancéreuses mis en jeu lors d'une dérégulation des PTM d'histones. Trois évènements épigénétiques conduisant au développement cancéreux ont été bien décrits, il s'agit de la régulation de l'acétylation et de la méthylation de l'ADN et des histones. Dans la suite de cette introduction je discuterai

spécifiquement de la méthylation des lysines et du lien avec le développement cancéreux ainsi que des avancées dans le développement d'inhibiteurs de ces voies. Par la suite je résumerai les différentes études qui ont conduit à l'hypothèse d'une implication de la voie de méthylation H4K20 dans le cancer.

1. METHYLATION DES LYSINES ET CANCER

Concernant la méthylation des lysines, de nombreuses HKMT sont impliquées dans le développement de tumeurs. Par exemple, dans la leucémie aigüe, la méthyltransférase MLL spécifique de H3K4 est réarrangée pour générer une protéine de fusion avec plusieurs partenaires (AF4, AF9, ENL, AF10, AF6, CREB). Ces réarrangements peuvent résulter en une perte de l'activité enzymatique de l'enzyme (Muntean and Hess, 2012) et en la création de protéines de fusions oncogéniques (Muntean and Hess, 2012; Winters and Bernt, 2017). MLL présente de plus des mutations activatrices dans le carcinome du poumon à petites cellules et le carcinome de la vessie (Gui et al., 2011; Peifer et al., 2012; Wu et al., 2016). En outre, des altérations dans le profil des marques H3K9 et H3K27 sont liées à des anomalies de la répression de gènes dans de nombreux cancers (Nguyen et al., 2002; Valk-Lingbeek et al., 2004). Une mutation activatrice dans le gène codant EZH2 responsable de la méthylation H3K27, a été identifiée dans le lymphome à grandes cellules B, le lymphome folliculaire et le cancer de l'œsophage, et EZH2 est un facteur de très mauvais pronostic dans le cancer de la prostate (Kim and Roberts, 2016). En outre, la surexpression de la méthyltransférase SETDB2 responsable de la méthylation H3K9 contribue à la progression du cancer gastrique (Nishikawaji et al., 2016). Un autre exemple d'une implication d'une dérégulation de la méthylation des lysines dans le cancer concerne les protéines à domaines SET et MYND (SMYDs). SMYD3 et SMYD2 ont été initialement décrites comme ayant une activité de méthylation de H3K4 et H4K20 et de H3K4 et H3K36 respectivement (Brown et al., 2006; Foreman et al., 2011; Hamamoto et al., 2004). Toutefois, une autre étude a montré que la surexpression ou la déplétion de SMYD3 n'altère pas les niveaux de méthylation H3K4 et H4K20 et que SMYD3 méthyle spécifiquement H4K5 (Aller et al., 2012). SMYD3 et SMYD2 sont largement surexprimés dans diverses tumeurs et d'après des études fonctionnelles dans des lignées cellulaires et des modèles animaux ces protéines jouent un rôle clé dans la genèse de la tumeur, la progression et la métastase, (Aller et al., 2012; Komatsu et al., 2009; Reynoird et al., 2016; Sakamoto et al., 2014). Toutefois les mécanismes moléculaires par lesquels SMYD3 et SMYD2 contribuent au développement du cancer sont peu clairs. Des études récentes ont démontré que leurs fonctions pathogéniques impliqueraient la méthylation de lysines sur des substrats non-histones comme MAP3K2 ou la chaperonne HSP90 (Abu-Farha et al., 2011; Mazur et al., 2014; Reynoird et al., 2016) mais des recherches sont encore nécessaires pour exclure l'implication d'une méthylation des histones dans la fonction des protéines SMYD dans le processus cancéreux.

De façon globale l'ensemble de ces études montre que les lysines méthyltransférases sont des cibles de choix dans le traitement du cancer. La partie qui suit discutera succinctement de l'avancée de la recherche dans le domaine du développement d'inhibiteurs chimiques des KMTs.

2. INHIBITION DE LA METHYLATION DES LYSINES PAR DES MOLECULES CHIMIQUES

L'inhibition des KMTs peut se faire par des analogues de la S-adenosyl methionine (SAM) tels que la méthylthio-adénosine, la S-adénosyl-homocystéine (SAH) ou la sinéfungine, cependant ces molécules ne ciblent pas seulement les KMT mais également d'autres enzymes qui utilisent le SAM telles que les ADN méthyltransférases (Li et al., 2012). Un autre exemple d'inhibiteur d'une HKMT est le Tazemetostat qui inhibe très efficacement et spécifiquement EZH2 (Campbell et al., 2015; Garapaty-Rao et al., 2013; Knutson et al., 2014) en agissant comme un compétiteur de EZH2 pour le S-adénosyl méthionine et supprimant ainsi son activité enzymatique. Le Tazemetostat présente une efficacité anticancéreuse *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de tumeur rhabdoïde (Knutson et al., 2013). Il a récemment fait l'objet d'études cliniques et précliniques pour le lymphome lymphatique à grande cellule diffuse (Chiappella et al., 2017) et le carcinome ovarien (Chan-Penebre et al., 2017) et est très efficace. La Chaétocine inhibe Suv39h et plus faiblement d'autres HKMT apparentées comme G9a selon le même mécanisme (Kaniskan and Jin, 2015). La Chaétocine exerce des propriétés anti-tumorales dans le myélome multiple et le mélanome *via* l'induction d'un stress oxydatif (Han et al., 2017; Isham et al., 2007). Cependant, le rôle de Suv39h1 dans le mécanisme de mort induit par la chaétocine n'a pas encore été élucidé. Concernant SMYD3, une nouvelle série de petites molécules inhibitrices a été identifiée grâce au criblage d'une librairie d'HMT. Deux composés, le sulfonamide et le sulfamide inhibent SMYD3 *in vitro*. Le sulfonamide présente une bonne biodisponibilité après administration par voie orale chez la souris ce qui le rend intéressant pour des études *in vivo* (Mitchell et al., 2016).

Ces inhibiteurs fonctionnent toutefois dans des cancers bien définis génétiquement dans lesquels on observe une surexpression ou une mutation des méthyltransférases. Dans l'objectif de développer des thérapies ciblées pour le cancer qui prennent en compte les altérations épigénétiques présentes dans les tumeurs, il est important de développer des inhibiteurs chimiques capables de cibler toutes les voies épigénétiques impliquées dans le développement cancéreux. Il s'agit donc dans un premier temps de comprendre les fonctions des voies épigénétiques dans la prolifération cellulaire puis d'évaluer l'impact de modifications de la voie dans le développement cancéreux pour, enfin, développer des outils chimiques efficaces et ciblés.

Dans ce contexte, notre laboratoire s'intéresse au rôle de la voie de méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 dans le cancer. Dans le chapitre suivant j'aborderai les différentes études qui ont suggéré une implication de cette voie dans la tumorigénèse et discuterai de l'intérêt d'une inhibition de cette voie dans le traitement du cancer.

3. IMPLICATION DE LA VOIE H4K20 ET DES ENZYMES ASSOCIEES DANS LA TUMORIGENESE

3.1. PR-SET7 ET MONO-METHYLATION H4K20 DANS LE DEVELOPPEMENT CANCEREUX

Les fonctions de PR-Set7 en font un acteur clé dans le maintien de l'intégrité génomique et de nombreuses études suggèrent l'existence d'un lien entre une dérégulation de la voie H4K20 et des enzymes PR-Set7 et Suv4-20h dans les cancers. De façon globale, PR-Set7 est retrouvé comme étant surexprimé dans de nombreux cancers comme le cancer du rein, le carcinome pulmonaire, la leucémie myéloïde, le carcinome hépatocellulaire, et le cancer du pancréas (Takawa et al., 2012). En plus de méthyler H4K20, PR-Set7 possède d'autres substrats non-histones comme p53, Numb et PCNA. PR-Set7 mono-méthyle p53 sur la lysine 382 et cette méthylation empêche la transcription dépendante de p53 dans les cellules cancéreuses (Shi et al., 2007). La voie apoptotique médiée par p53 est aussi régulée par PR-Set7 *via* une méthylation de Numb, une protéine qui forme un complexe avec p53 et la ligase MDM2 (Dhami et al., 2013). Numb favorise l'apoptose de façon dépendante à p53 et la méthylation de Numb par PR-Set7 abolit l'interaction Numb/p53 et résulte en une ubiquitinylation et une dégradation de p53 et abolit sa fonction apoptotique (Dhami et al., 2013). PR-Set7 méthyle aussi la lysine 248 de PCNA, ce qui stabilise PCNA en inhibant sa polyubiquitinylation (Takawa et al., 2012). Il existe une corrélation claire entre l'expression de PCNA et de PR-Set7 dans des tissus cancéreux (Takawa et al., 2012). PCNA est un marqueur de la progression cancéreuse et est marqueur de mauvais pronostic pour les patients (Yin et al., 2017) et donc la stabilisation de PCNA par PR-Set7 pourrait favoriser la tumorigénèse. Concernant l'implication de la fonction de méthylation H4K20 de PR-Set7 dans la tumorigénèse, une seule fonction a été décrite comme étant directement liée au processus cancéreux. Il s'agit de la régulation de la transcription par la mono-méthylation H4K20. Ainsi, PR-Set7 est impliqué dans l'invasion et la métastase *via* son interaction avec le régulateur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) TWIST (Yang et al., 2012). Les deux protéines TWIST et PR-Set7 sont interdépendantes pour favoriser l'EMT *via* une augmentation de l'expression de la N-cadherine et une diminution de l'expression d'E-cadherine médiée par une mono-méthylation H4K20 des promoteurs. Dans cette étude les auteurs ont pu montrer le rôle double de la méthylation H4K20 sur l'expression génique. En effet, les deux promoteurs possèdent de la H4K20me1 mais dans un cas elle conduit à une augmentation et dans un autre cas elle conduit à une

inhibition de l'expression génique. PR-Set7 interagit aussi avec le récepteur aux androgènes (AR) et cette interaction ainsi que la H4K20me1 au niveau des promoteurs sont nécessaires pour l'activation de la transcription de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) médiée par AR (Yao et al., 2014).

3.2. DEREGLATION DE SUV4-20H ET H4K20ME2/3 DANS LES CANCERS

La perte de H4K20me3 est considérée comme une caractéristique des cellules cancéreuses humaines et est un potentiel marqueur pronostic dans de nombreux cancers (Behbahani et al., 2012; Broeck et al., 2008; Fraga et al., 2005; Yokoyama et al., 2014). La perte de H4K20me3 a notamment été observée dans des modèles animaux de cancers du sein (Kovalchuk et al., 2007) et le niveau de H4K20me3 est diminué dans les lignées dérivées de cancers du sein par rapport aux lignées dérivées de cellules épithéliales mammaires saines (Tryndyak et al., 2006). Toutefois, une étude a montré que H4K20me3 était fortement présent dans certaines tumeurs mammaires (Elsheikh et al., 2009). Ainsi, l'implication du niveau de H4K20me3 dans les cancers est mal connue et la significativité clinique de la baisse de H4K20me3 n'est pas claire. Est-ce que le niveau de H4K20me3 est associé au développement cancéreux ou est-ce que c'est un marqueur pronostic indépendant ? Une étude a montré que la perte de H4K20me3 était associée à une augmentation de la capacité invasive des cellules (Yokoyama et al., 2014). En outre, le phénotype de stimulation de l'invasion associé à la perte de H4K20me3 est dû à une augmentation de l'expression de la tensine-3 qui est impliquée dans la migration cellulaire (Shinchi et al., 2015). Ainsi, la surexpression de Suv4-20h2 permet de supprimer l'invasion *in vitro*.

3.3. LA VOIE H4K20, UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ?

Dans le cadre de l'étude du statut et de la fonction de PR-Set7 dans les cancers, beaucoup d'études ont montré que l'inhibition de cette enzyme pourrait donc avoir un effet thérapeutique intéressant pour le traitement du cancer. Par exemple, la déplétion de PR-Set7 dans des cellules cancéreuses a pour effet de stimuler l'apoptose médiée par Numb *via* une stimulation de l'interaction Numb-p53. La réduction ou la perte de la méthylation de PCNA médiée par PR-Set7 supprime la croissance des cellules cancéreuses en retardant la maturation des fragments d'Okazaki et en ralentissant la réplication de l'ADN (Takawa et al., 2012). De plus, la diminution de l'expression de PR-Set7 par un shRNA dans des cellules cancéreuses mammaires supprime de plus l'invasion et le développement de métastases pulmonaires dans un modèle de souris orthotopiques (Yang et al., 2012). Dans une autre étude, l'utilisation d'un microRNA dirigé contre PR-Set7 (miR-7) a eu le même effet d'inhibition de l'EMT et de l'invasion de cellules cancéreuses mammaires (Yu et al., 2013). De même, le miR-127-3p qui cible PR-Set7 agit comme un suppresseur de tumeur dans les tissus et les lignées d'ostéosarcome de façon dépendante de la perte de PR-Set7

et la surexpression de PR-Set7 supprime l'effet du miRNA sur la migration et l'invasion (Zhang et al., 2016a). De façon intéressante, le polymorphisme nucléotidique (SNP) rs16917496 T>C au niveau du site de liaison à la région 3'UTR de l'ARNm de PR-Set7 du miRNA-502 module l'expression de PR-Set7 et contribue à la susceptibilité au cancer de l'ovaire et du sein et à la survie de patients atteints de cancers du poumon à petites cellules et de carcinomes hépatocellulaires (DING et al., 2012; Guo et al., 2012; Song et al., 2009; Wang et al., 2012).

PR-Set7 est donc une cible thérapeutique de choix pour le traitement du cancer, toutefois, seulement quelques composés inhibiteurs de PR-Set7 ont été décrits (Milite et al., 2016). Les premiers, découverts par Reinberg et son équipe, sont l'acide H et la thymolphthaléine (Reinberg et al., 2007). Les deux composés ont été découverts à partir d'un criblage d'une librairie de composés chimiques pour l'inhibition de plusieurs KMT et RMT. Les deux composés présentent un IC₅₀ assez faible contre PR-Set7 (3.8µM pour l'acide H et 9µM pour la thymolphthaléine) mais inhibent aussi EZH2 avec des IC₅₀ de 3 et 25.2 µM respectivement. Au niveau cellulaire, l'acide H ne rentre pas dans les cellules et la thymolphthaléine induit une réduction de la viabilité de cellules Hela dépendante de la concentration en composé ainsi qu'une accumulation en mitose et une diminution du niveau H4K20me1 sans affecter les autres marques de méthylation (Milite et al., 2016). Le mécanisme d'inhibition semble impliquer un changement conformationnel du domaine SET de PR-Set7 qui interfère avec la liaison au substrat ou avec la réaction enzymatique (Girish et al., 2016). Un autre composé a ensuite été décrit par Kodama et al., (Kodama et al., 2010), identifié à partir d'un criblage virtuel, l'EBI-099 inhibe PR-Set7 avec un IC₅₀ de 4.7 µM et montre des effets antiprolifératifs dans des cellules de leucémie myéloïde. Une autre étude a permis d'identifier des inhibiteurs de PR-Set7 (Cheng et al., 2011; Mai et al., 2008), deux inhibiteurs sont spécifiques de PR-Set7 (MC1946 et MC1948) et deux autres inhibent PR-Set7 et EZH2 (MC1947 and MC2569). Les composés réduisent le niveau H4K20me1 dans des cellules U937 après 24h de traitement à 50 µM. Le composé MC1947 induit une mort cellulaire massive et une différenciation en granulocytes (Valente et al., 2012). En 2014, Luo et al., ont identifié trois inhibiteurs de PR-Set7 à partir du criblage d'une banque de 5000 composés commerciaux (Blum et al., 2014). Les trois composés SPS8I1, 2 et 3 ont des IC₅₀ contre PR-Set7 de 0.21, 0.50, et 0.70µM respectivement. SPS8I1 semble être l'inhibiteur le plus puissant et le plus spécifique puisqu'à une concentration correspondant à l'IC₅₀ d'inhibition de PR-Set7 il n'est pas capable d'inhiber d'autres enzymes. Les mécanismes d'inhibition sont différents en fonction des composés, l'inhibition est dépendante du substrat pour SPS8I1, indépendante du substrat et du cofacteur SAM pour SPS8I2 et dépendante du substrat et du SAM pour SPS8I3 (Blum et al., 2014). Les composés réduisent H4K20me1 dans des cellules 293T sans affecter les marques H4K20me2/3 et H3K9me. Ils entraînent aussi un arrêt du cycle cellulaire similaire à la perte de l'enzyme. Toutefois, les composés ne sont pas sélectifs et inhibent d'autres

méthyltransférases (SPS8I1 inhibe SMYD2 et SPS8I3 inhibe PRMT3 et SETD2), et ont aussi des effets hors-cibles (inhibition de CDC25 pour SPS8I1; inhibition des cyclin-dépendent kinases 4 et 2 (CDK4/2) pour SPS8I2; et inhibition de la protéine tyrosine phosphatase PTB1B pour SPS8I3). Les mêmes auteurs ont récemment développé et breveté des dérivés de la naphthaquinone (LUO et al., 2015), les plus actifs inhibent PR-Set7 avec une IC₅₀ inférieure à 5 µM mais inhibent aussi d'autres KMTs (SETD2, SETDB1, GLP, G9a, SMYD2, SMYD3, MLL1 et SETD7) et des PRMTs (PRMT1, PRMT3, CARM1, PRMT8). Le développement ou l'identification d'inhibiteurs chimiques de PR-Set7 qui soient spécifiques et fonctionnent à une concentration assez basse est donc un défi majeur dans le domaine de la recherche en thérapie cancéreuse.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'ensemble des données présentées dans cette introduction bibliographique démontre la forte implication de la voie de méthylation H4K20 dans les mécanismes liés à la dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire. C'est en effet une voie de signalisation complexe, impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la transcription, la réplication et la réparation des dommages ADN. C'est aussi une voie finement régulée au cours du cycle cellulaire, elle joue ainsi des fonctions spécifiques à certaines phases du cycle et sa régulation est nécessaire au maintien de l'intégrité génomique.

De façon plus spécifique, l'enzyme PR-Set7 est impliquée dans le processus de réplication de l'ADN possiblement *via* le dépôt de mono-méthylation H4K20 (Tardat et al., 2007, 2010) qui sera convertie en tri-méthylation H4K20 (Beck et al., 2012b). Elle est aussi impliquée dans la régulation de la structure de la chromatine : en mitose grâce à la mono-méthylation H4K20 (Centore et al., 2010), et *via* la marque H4K20me3 qui est spécifique de l'hétérochromatine (Schotta et al., 2004). En outre, la marque H4K20me3 est reconnue par ORCA/LRWD1, une protéine qui faciliterait le recrutement des ORC sur les origines de réplication (Shen et al., 2010). ORCA/LRWD1 semble aussi favoriser la formation d'hétérochromatine en s'associant aux marques répressives H4K20me3, H3K9me3 et H3K27me3 et en régulant leur dépôt grâce à une interaction avec les enzymes responsables de ces marques (Giri and Prasanth, 2016). Nous ne savons pas précisément comment PR-Set7 exerce ces deux fonctions de régulation de la réplication et de la structure de la chromatine, si elles sont indépendantes l'une de l'autre, et quel est le rôle éventuel des marques de méthylation H4K20 dans ces deux processus. On peut ainsi se demander :

- Si ces deux fonctions cellulaires ne sont pas liées par la conversion de la mono-méthylation en tri-méthylation H4K20 par les Suv4-20h qui sera reconnue par la protéine ORCA/LRWD1, à la fois pour réguler la structure de la chromatine mais aussi la réplication.
- Est-ce que son rôle dans la compaction régule l'activation de la réplication de l'ADN, notamment au niveau de l'hétérochromatine, *via* la fixation d'ORCA/LRWD1 ?

L'instabilité génétique induite par des défauts de réplication et/ou des altérations dans la structure de la chromatine est un élément qui peut favoriser la tumorigénèse. Il est donc tentant d'imaginer qu'une activité anormale de PR-Set7 pourrait justement favoriser cette instabilité génétique en modifiant le programme de réplication et l'architecture de la chromatine dans les cellules. L'étude des mécanismes qui établissent et régulent les fonctions de PR-Set7 et de la méthylation H4K20 dans les cellules normales et cancéreuses est donc aussi d'une grande importance.

L'objectif de ma thèse a dans un premier temps consisté à caractériser plus précisément la fonction de la voie H4K20 dans le processus de réplication de l'ADN (Article 1) et dans la structure de la chromatine (Articles 2 et 3) et à déterminer le rôle de la méthylation H4K20 dans ces deux processus. Il s'est ensuite agi de déterminer si l'inhibition de l'activité de PR-Set7 par des molécules chimiques peut avoir un intérêt thérapeutique (Articles 4 et 5).

RESULTATS

I. LA VOIE DE METHYLATION H4K20 CONTROLE L'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION DANS LES REGIONS HETEROCHROMATINIENNES

1. ARTICLE 1: HISTONE H4K20 TRI-METHYLATION AT LATE-FIRING ORIGINS ENSURES TIMELY HETEROCHROMATIN REPLICATION

Julien Brustel*, Nina Kirstein*, Fanny Izard*, Charlotte Grimaud, Paulina Prorok, Christelle Cayrou, Gunnar Schotta, Alhassan F Abdelsamie, Jérôme Déjardin, Marcel Méchali, Giuseppe Baldacci, Claude Sardet, Jean-Charles Cadoret, Aloys Schepers, Eric Julien.

* Equal contribution

EMBO Journal, 2017

1.1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

Au moment de mon arrivée dans le laboratoire d'accueil, le rôle de PR-Set7 dans le processus de réplication, et plus particulièrement dans l'activation des origines de réplication, avait pu être démontré. Pour cela, l'équipe avait dans un premier temps montré que PR-Set7 est dégradé au moment de la phase S par un mécanisme qui implique son association avec le facteur de processivité PCNA (Tardat et al., 2010). Cette interaction nécessite le domaine d'interaction avec PCNA (PIP) de PR-Set7 et provoque la reconnaissance de PR-Set7 par le complexe E3 ligase CRL4^{CDT2} puis sa dégradation par le protéasome. Des expériences de ChIP-qPCR ont mis en évidence que la marque H4K20me1 est présente au niveau de certaines origines de réplication lors de la formation du pre-RC et qu'elle disparaît au moment de la phase S. La mutation de deux acides aminés (FY-AA) du domaine PIP de PR-Set7 conduit à une stabilisation de la protéine et un phénotype de re-réplication qui est associé à un maintien de H4K20me1, notamment au niveau des origines. Il apparaissait donc que H4K20me1 pourrait être une marque épigénétique des origines de réplication qui doit être effacée lors de la phase S pour empêcher la réactivation des origines. De plus, des approches de ciblage de PR-Set7 vers un locus génomique grâce à un système UAS-GAL4, et d'immunoprécipitation de chromatine (Tardat et al., 2010), ont montré que la liaison de PR-Set7 provoque une augmentation de H4K20me1 et, de façon concomitante, un recrutement de protéines du pre-RC (MCM2-5, ORC1), suggérant que PR-Set7 pourrait provoquer la formation artificielle d'une origine de réplication sur ces séquences UAS. Ainsi, PR-Set7, *via* H4K20me1, crée un environnement chromatinien favorable à l'assemblage du pre-RC et sa dégradation en phase S est requise pour empêcher la réactivation des origines.

En outre, comme déjà mentionné en introduction, le phénotype de re-réplication induit par PR-Set7^{PIPMUT} dépend de la présence des enzymes Suv4-20h1, (Beck et al., 2012b). De plus, ORC interagit avec la marque H4K20me2/3 *in vitro* (Beck et al., 2012b; Kuo et al., 2012; Oda et al., 2010; Vermeulen et al., 2010). Il a donc été proposé que la fonction de PR-Set7 dans l'activation des origines de réplication requière une conversion de H4K20me1 en H4K20me2/3 par les Suv4-20h. Toutefois, le phénotype de KO des Suv4-20h est faible par rapport au KO de PR-Set7 et les fibroblastes dérivées de souris Suv4-20h^{-/-} sont viables et présentent seulement un retard en phase S (Schotta et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que les différentes enzymes de la voie participent au processus de réplication. Toutefois, plusieurs questions se posent : quelle est la responsabilité précise de chacune de ces enzymes dans ce processus ? On peut ainsi se demander si les différentes enzymes ne participeraient pas à la réplication de régions différentes sur le génome, ce qui pourrait expliquer la complexité des phénotypes observés dans les différentes études. En effet, il est encore peu clair de savoir si cette fonction de PR-Set7 d'activation des origines de réplication *via* le recrutement du pre-RC sur la mono-

méthylation H4K20 est utilisée de façon globale sur le génome ou si elle concerne des origines situées dans des régions génomiques particulières.

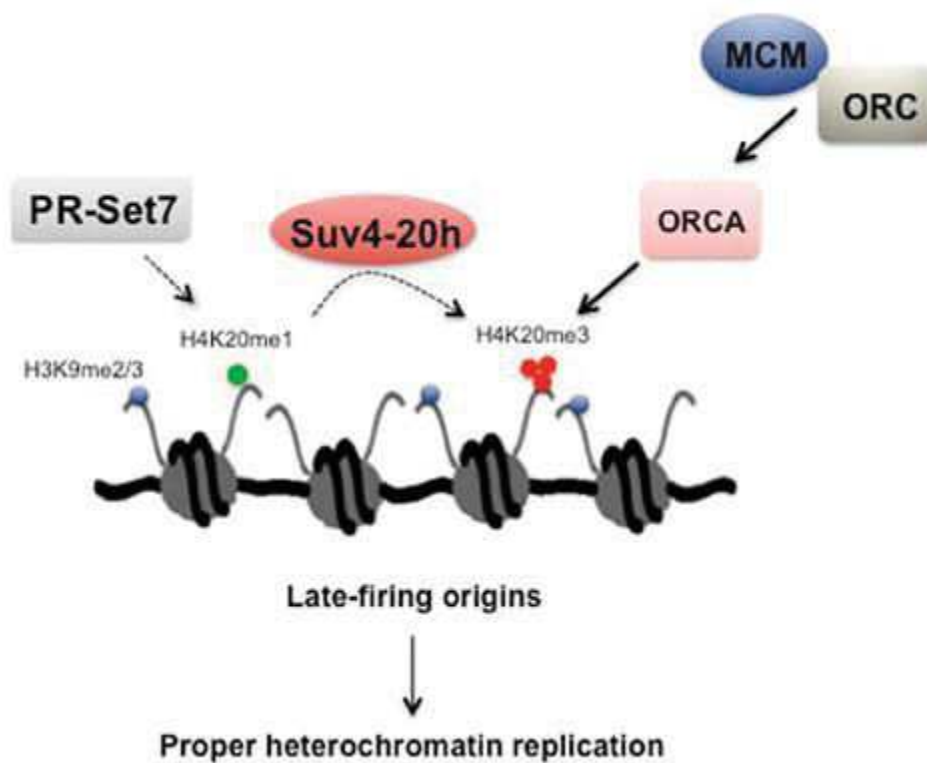
Pour clarifier toutes ces questions, la première partie de ma thèse a consisté à réaliser des expériences dans le but de clarifier les fonctions des différents niveaux de méthylation H4K20 et des enzymes associées dans la réplication (Article 1, Brustel et al., 2017).

1.2. PRINCIPAUX RESULTATS

La perte de l'enzyme PR-Set7 entraîne des défauts dans l'activation des origines de réplication et dans la progression à travers la phase S dans de nombreux types cellulaires, qui coïncident avec une diminution de la méthylation H4K20 (Brustel et al., 2011; Jørgensen et al., 2007; Tardat et al., 2007, 2010). Quelle est toutefois l'implication de la méthylation H4K20 dans les défauts observés ? Pour répondre à cette question, qui est finalement de savoir si la fonction de PR-Set7 dans la réplication dépend de la méthylation de H4K20, j'ai utilisé un système permettant de remplacer, dans des cellules U2OS, les histones H4 par des histones FLAG possédant une mutation K20A qui les rend non méthylables. La surexpression de ces histones (H4WT-Flag ou H4K20A-Flag) par infection rétrovirale conduit à une diminution de la quantité d'histones endogènes dans nos cellules et, ainsi, la surexpression de H4K20A-FLAG conduit à une diminution globale des 3 niveaux de méthylation (Figure 1-B). Des analyses par cytométrie de flux ont montré que les cellules qui possédaient une forte quantité de H4K20A-FLAG présentaient une accumulation en phase S, comme c'est le cas lorsqu'on déplete l'enzyme PR-Set7 (Figure 1-C). De plus, le phénotype de re-réplication induit par la surexpression d'un mutant PIP non dégradé de PR-Set7 est réduit dans des cellules exprimant H4K20A (Figure 1-D). Ces résultats démontrent l'incapacité des cellules H4K20A à réaliser une réplication correcte due à la diminution de H4K20me et suggèrent que H4K20 est le substrat principal de PR-Set7 dans sa fonction de contrôle de l'activation des origines de réplication.

Est-ce que PR-Set7 et la mono-méthylation K20 sont capables, par eux-mêmes, de former une origine de réplication fonctionnelle ? Cela coïnciderait avec le fait que la méthylation H4K20 stimule la capacité des protéines ORCs à lier H4 *in vitro* (Oda et al., 2010; Vermeulen et al., 2010). La réponse à cette question a été apportée par l'utilisation d'épisomes dérivés du virus d'Epstein-Barr, en collaboration avec l'équipe d'Aloys Scheppers (Munich, Allemagne). L'adressage artificiel de PR-Set7 sur cet épisode au niveau d'une origine de réplication dans des cellules humaines entraîne une augmentation : de la marque H4K20me1 qui est convertie ensuite en H4K20me2/3, de l'efficacité de réplication du réplisome et de la liaison des protéines MCM2-7 (Figure 2). Toutefois, cette stimulation est dépendante de la présence préalable d'une séquence d'ADN favorable à la formation d'une origine de réplication. Cela suggère que la méthylation H4K20 induite par PR-Set7 stimule le « licensing » et l'activité de réplication au niveau d'origines prédéfinies par des séquences d'ADN. Nous avons par ailleurs montré, en utilisant un inhibiteur spécifique des enzymes Suv4-20h, que cette activité de stimulation des origines de réplication était dépendante de la conversion de H4K20me1 en H4K20me2/3 (Figure 3). Quelle est la fonction spécifique des Suv4-20h dans l'activation des origines de réplication ? Nous nous sommes demandé si l'activité de stimulation des origines des Suv4-20h était globale ou bien concernait seulement certaines régions du génome. Des expériences d'analyse genome-wide de la cinétique de réplication et de ChIP-qPCR de cellules KO

inductibles pour les Suv4-20h ont montré que l'activité des Suv4-20h était requise au niveau des régions hétérochromatiniennes qui se répliquent tardivement et que H4K20me3 était nécessaire pour le timing de répliation correct d'un groupe d'origines de répliation tardives situées dans l'hétérochromatine (Figure 4/5). Cette activité de stimulation des origines nécessite la liaison d'ORCA/LRWD1 sur H4K20me3 (Figure 6). De façon générale, et comme illustré sur la Figure ci-dessous, nous avons pu montrer que la répliation coordonnée de régions d'hétérochromatine dans des cellules mammifères dépend de l'activité de PR-Set7 et des Suv4-20h pour générer de la tri-méthylation H4K20 qui va servir de site de liaison à ORCA/LRWD1 sur un subset d'origines tardives permettant une stimulation de l'activation et de l'efficacité de ces origines.



D'après Brustel *et al.*, 2017.



Histone H4K20 tri-methylation at late-firing origins ensures timely heterochromatin replication

Julien Brustel^{1,2,†}, Nina Kirstein^{3,†}, Fanny Izard^{1,2,†}, Charlotte Grimaud^{1,2}, Paulina Prorok⁴, Christelle Cayrou⁴, Gunnar Schotta⁵ , Alhassan F Abdelsamie³, Jérôme Déjardin⁴, Marcel Méchali⁴, Giuseppe Baldacci⁶, Claude Sardet^{1,2}, Jean-Charles Cadoret^{6,*} , Aloys Schepers^{3,‡,§,**} & Eric Julien^{1,2,‡,***}

Abstract

Among other targets, the protein lysine methyltransferase PR-Set7 induces histone H4 lysine 20 monomethylation (H4K20me1), which is the substrate for further methylation by the Suv4-20h methyltransferase. Although these enzymes have been implicated in control of replication origins, the specific contribution of H4K20 methylation to DNA replication remains unclear. Here, we show that H4K20 mutation in mammalian cells, unlike in *Drosophila*, partially impairs S-phase progression and protects from DNA re-replication induced by stabilization of PR-Set7. Using Epstein-Barr virus-derived episomes, we further demonstrate that conversion of H4K20me1 to higher H4K20me2/3 states by Suv4-20h is not sufficient to define an efficient origin *per se*, but rather serves as an enhancer for MCM2-7 helicase loading and replication activation at defined origins. Consistent with this, we find that Suv4-20h-mediated H4K20 tri-methylation (H4K20me3) is required to sustain the licensing and activity of a subset of ORCA/LRWD1-associated origins, which ensure proper replication timing of late-replicating heterochromatin domains. Altogether, these results reveal Suv4-20h-mediated H4K20 tri-methylation as a critical determinant in the selection of active replication initiation sites in heterochromatin regions of mammalian genomes.

Keywords DNA replication origins; heterochromatin; histone H4K20 methylation

Subject Categories Chromatin, Epigenetics, Genomics & Functional Genomics; DNA Replication, Repair & Recombination

DOI 10.15252/emboj.201796541 | Received 16 January 2017 | Revised 19 June 2017 | Accepted 7 July 2017

Introduction

Eukaryotic DNA replication is initiated at thousands of chromosomal sites, known as replication origins, which are scattered along the genome and activated in a well-defined order during S-phase (Rhind & Gilbert, 2013; Renard-Guillet *et al*, 2014). To ensure that replication origins are activated only once per cell cycle, the initiation of replication is separated into three tightly regulated steps (Remus & Diffley, 2009; Ding & MacAlpine, 2011; Leonard & Méchali, 2013). First, origins are selected by the binding of the hexameric origin recognition complex (ORC), as cells exit mitosis. In a second step termed “replication licensing”, ORC serves as a scaffold for the subsequent association of CDC6 and CDT1, which together coordinate the loading of the MCM2-7 complex on chromatin to form the pre-replication complex (pre-RC) (Siddiqui *et al*, 2013). Finally, in S-phase, CDK and DDK kinases trigger pre-RC activation, resulting in the association of additional components and establishment of active replication forks (Bell & Botchan, 2013). Once origins have fired, the recruitment of pre-RC components on chromatin is inhibited until the onset of the following mitosis (Arias & Walter, 2007). Importantly, to provide a backup system when cells undergo replication stress, a large excess of origins is licensed during G1-phase and only a fraction of them are transformed in active replication initiation sites during S-phase (Blow *et al*, 2011). To date, the mechanisms that dictate whether an origin will be active or not in unperturbed S-phase are unclear.

Although metazoan replication origins tend to be enriched in GC-rich sequences and G4 quadruplex structures, they do not share a clear consensus sequence (Besnard *et al*, 2012; Fragkos *et al*, 2015; Prioleau & MacAlpine, 2016). Chromatin features, such as nucleosome positioning and histone modifications, are also involved in the selection of replication initiation sites (Smith and Aladjem,

1 Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194, Institut Régional du Cancer (ICM), Montpellier, France

2 University of Montpellier, Montpellier, France

3 Research Unit Gene Vectors, Helmholtz Zentrum München, Munich, Germany

4 Institute of Human Genetics (IGH), CNRS, Montpellier, France

5 Biomedical Center Munich, Planegg-Martinsried, Germany

6 Institut Jacques Monod, UMR7592, CNRS and University Paris-Diderot, Paris, France

*Corresponding author. Tel: +33 1 57 27 80 74; E-mail: jean-charles.cadoret@ijm.fr

**Corresponding author. Tel: +49 89 31871509; E-mail: schepers@helmholtz-muenchen.de

***Corresponding author. Tel: +33 4 67 61 45 14; E-mail: eric.julien@inserm.fr

†These authors contributed equally to this work as first authors

‡These authors contributed equally to this work as senior authors

§Present address: Helmholtz Zentrum München, Institute for Diabetes and Obesity, Monoclonal Antibody Facility, Neuherberg, Germany

2014). Hence, origin activation follows a spatiotemporal program that is highly connected to the regulation of chromatin states, with origins in transcriptionally active chromatin firing earlier than those in repressed chromatin (McGuffee *et al*, 2013; Pope & Gilbert, 2013; Pope *et al*, 2014; Fragkos *et al*, 2015). Typically, early-firing origins are characterized by their proximity to a combination of activating chromatin marks, including acetylation of histone H3 and H4 tails and methylation at lysines (K) 4 and 79 of histone H3 (Picard *et al*, 2014; Cayrou *et al*, 2015; Smith *et al*, 2016). In contrast, little is known about chromatin modifications that control the formation and activity of late origins in heterochromatin regions.

Lysine 20 of histone H4 (H4K20) is the major methylated residue on the H4 tail that can exist as mono (H4K20me1)-, di (H4K20me2)-, or tri-methylation (H4K20me3) (Brustel *et al*, 2011; Jørgensen *et al*, 2013). While H4K20me2 is the predominant H4K20 methyl state found in 80% of total histone H4, H4K20me1 and H4K20me3 are less abundant and typically enriched in transcriptionally active and silent chromatin, respectively (Beck *et al*, 2012a). Recently, biochemical analysis performed with histone peptides revealed that H4K20me2 and H4K20me3 might serve as binding sites for mammalian ORC1 and its cofactors (Oda *et al*, 2010; Vermeulen *et al*, 2010; Beck *et al*, 2012b; Kuo *et al*, 2012), suggesting a potential role of these two histone marks in replication origin selection and activity. Consistent with this hypothesis, artificial recruitment of the H4K20me1 methyltransferase PR-Set7 (also known as SET8, SETD8, and KMT5A) at a specific locus can induce the recruitment of several ORC components in a manner depending on the presence of Suv4-20h1/h2 (also known as KMT5B and KMT5C), the enzymes that catalyze H4K20me2/3 from H4K20me1 (Schotta *et al*, 2008; Beck *et al*, 2012b). In addition, PR-Set7 is targeted for proteasome degradation during S-phase by the PCNA-CRL4^{cdt2} ubiquitin complex and failure to degrade PR-Set7 triggers DNA re-replication in Suv4-20h1-expressing cells (Tardat *et al*, 2010; Beck *et al*, 2012b). However, it remains unclear whether these enzymes have a broad role in the regulation of DNA replication origins or restrained to specific genomic regions. Furthermore, several puzzles remain including the fact that loss of Suv4-20h and H4K20me2/3 only leads to a partial reduction in cell growth during mouse development (Schotta *et al*, 2008). Likewise, H4K20 methylation is not essential for DNA replication initiation in *Drosophila* cells (McKay *et al*, 2015; Li *et al*, 2016) and H4K20 enzymes have also non-histone substrates (Takawa *et al*, 2012), which also question on the role, if any, of H4K20 methylation in the control of DNA replication origins.

In order to clarify these issues, we have investigated further the functions of H4K20 methylation and the associated H4K20 enzymes in the regulation of DNA replication. By expressing a histone H4

mutant unable to undergo methylation on lysine 20, we first provide evidence that unlike *Drosophila*, H4K20 methylation states are mandatory for proper DNA replication and contribute to DNA re-replication induced by PR-Set7 stabilization in mammalian cells. Although facilitating ORC recruitment on chromatin, we show that the conversion of H4K20me1 to higher H4K20me states is not sufficient to define an efficient origin *per se* but rather serves as an enhancer for MCM2-7 loading and replication activation at defined origins. In line with this, we reveal that Suv4-20h-mediated H4K20me3 stimulates the binding of ORCA-associated protein LRWD1/ORCA and pre-RC complex at a subset of late-firing origins, which is essential for the timely replication of heterochromatin during late S-phase.

Results

H4K20 methylation is critical for S-phase progression and PR-Set7 replication licensing functions

As shown in human U2OS cells (Appendix Fig S1), loss of mammalian PR-Set7 results in improper S-phase progression, which is in part attributed to defects in replication origin activity (Jørgensen *et al*, 2007; Tardat *et al*, 2007). To provide evidence that this S-phase phenotype is directly caused by a decrease in the levels of H4K20 methylation rather than defects in the methylation of other PR-Set7 targets, we examined the cell cycle of human U2OS cells transduced with a high titer of retroviral vectors encoding a FLAG-tagged histone H4^{K20A} mutant carrying a lysine to alanine substitution at position 20 (K20A). Cells transduced with a virus encoding a FLAG-tagged wild-type histone H4^{WT} were used as controls. As shown in Fig 1A and B, immunoblot analysis showed that both FLAG-tagged H4^{WT} and H4^{K20A} proteins were expressed at similar levels and were efficiently incorporated into chromatin 3 days after retroviral infection (Fig 1A, lanes 3 and 6), thereby leading to the replacement of half of the pool of the endogenous histone H4 (Fig 1B, top panel). Incorporation of FLAG-H4^{K20A} mutant into chromatin slightly increased PR-Set7 levels but led to a specific decrease in the global levels of the three methylated H4K20 states, with a stronger reduction for H4K20me1 and H4K20me3 (Fig 1B). Cell-cycle profiles of FLAG-H4^{WT} and FLAG-H4^{K20A} cells were then analyzed the same day by measuring the DNA content according to low (gate 1) and high (gate 2) levels of FLAG-H4 expression (Fig 1C; gates 1 and 2, respectively). We noticed that the amount of cells with the highest levels of H4^{K20A} (i.e., with the strongest decrease in H4K20me) was low compared to FLAG-H4^{WT}

Figure 1. H4K20 mutation affects S-phase progression and prevents DNA re-replication induced by PR-Set7 stabilization.

- A Immunoblot analysis of histone H4 and FLAG-tagged histone H4 protein levels in FLAG-H4^{WT} and FLAG-H4^{K20A} U2OS cells and subjected to biochemical fractionation: Cytosolic (S1) and nuclear (S2) are soluble supernatants and P3 is the chromatin-enriched fraction. MEK1 was used as a control of soluble components and HCF-1 protein was used for control of chromatin fraction.
- B Immunoblot analysis of PR-Set7 and the levels of acetylation and methylation of endogenous H4 and FLAG-tagged H4 in FLAG-H4^{WT} and FLAG-H4^{K20A} U2OS cells.
- C FACS analysis of DNA content and FLAG signal in FLAG-H4^{WT} or FLAG-H4^{K20A} cells. DNA content was analyzed according to the low (gate 1) and high (gate 2) levels of FLAG-tagged histone H4 proteins.
- D FACS analysis of DNA content in cells expressing similar levels (gate 1) of FLAG-tagged histone H4^{WT} and H4^{K20A} upon expression of the PR-Set7^{PIPmut} and PR-Set7^{PIPmut+SETmut} mutants. Quantitation of re-replicating parental (No FLAG), FLAG-H4^{WT}, and H4^{K20A} cells upon PR-Set7^{PIPmut} expression. Data are means \pm SD, $n = 3$. (*) Statistical significance with $P < 0.05$ (t-test).

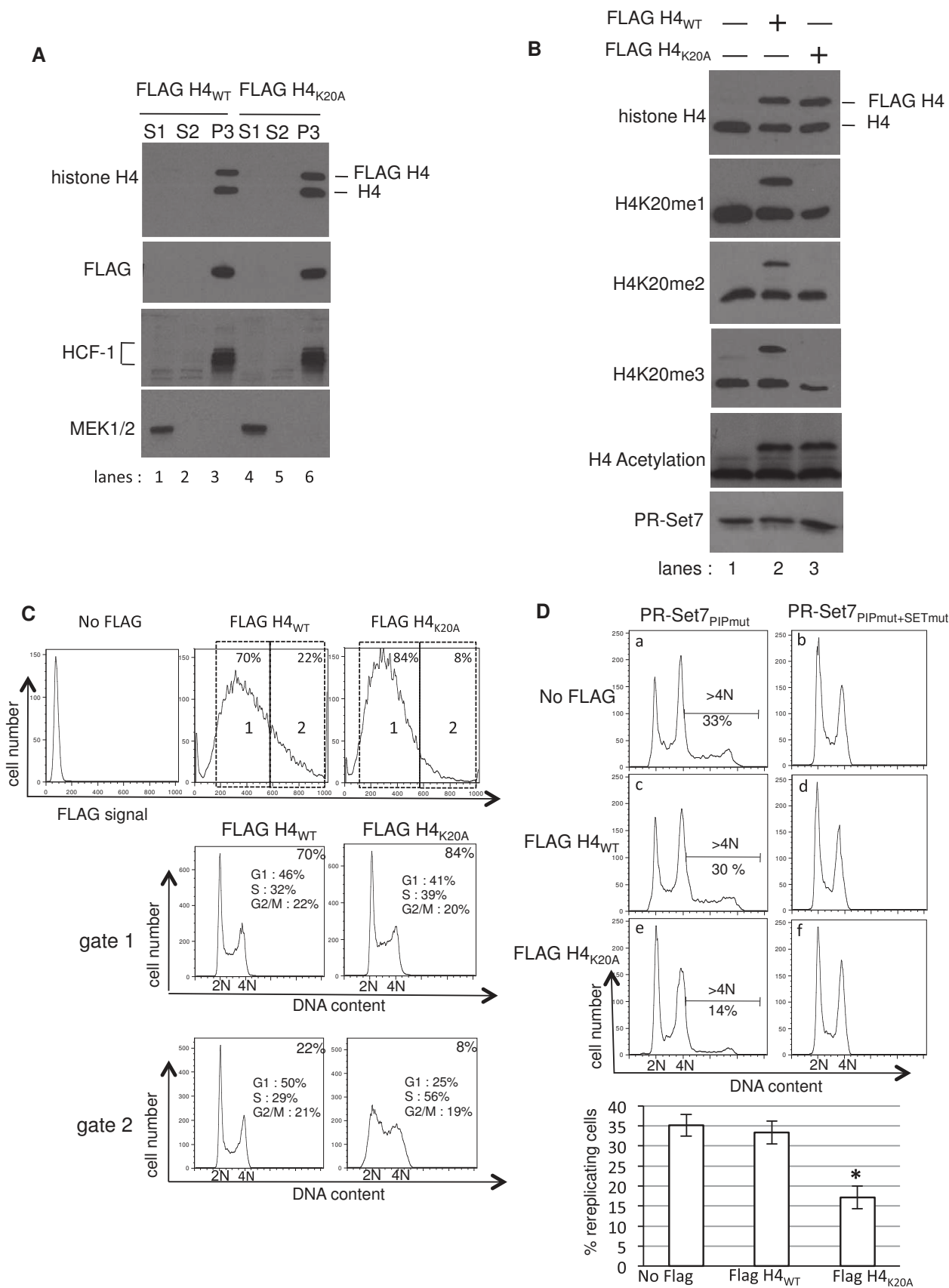


Figure 1.

cells (Fig 1C, upper panels, compare gates 1 and 2), suggesting that the H4K20A mutation is relatively toxic. Conspicuously, whereas cells with low levels of H4^{K20A} displayed a cell-cycle profile similar to FLAG-H4^{WT} cells (Fig 1C, gates 1), cells expressing high levels of FLAG-H4^{K20A} accumulate in S-phase, suggesting that they fail to complete DNA replication as previously described in PR-Set7-depleted cells (Tardat *et al*, 2007; Appendix Fig S1).

Our results suggest that appropriate H4K20 methylation levels may be required for PR-Set7 functions in the licensing of replication origins. To verify this, we measured by FACS the levels of re-replication induced by the proteolytic-resistant PR-Set7^{PIPmut} mutant in cell populations expressing similar and non-deleterious levels of FLAG-tagged H4^{WT} or FLAG-tagged H4^{K20A}, 3 days before infection with retrovirus encoding PR-Set7^{PIPmut} mutant (Fig 1C, gate 1). PR-Set7^{PIPmut} contains mutations in the PCNA binding domain that inhibit CRL4^{cdt2}-mediated degradation and induce PR-Set7 stabilization (Tardat *et al*, 2010; Beck *et al*, 2012b). The resulting re-replication phenotype is caused by repeated PR-Set7-induced replication origin licensing (Tardat *et al*, 2010), which can be observed by the appearance of cells with DNA content greater than 4N, 2 days after PR-Set7^{PIPmut} expression (Fig 1D, panel a). As shown in Fig 1D, expression of the PR-Set7^{PIPmut}, but not of the catalytic inactive PR-Set7^{PIPmut + SETmut} mutant, caused the appearance of ~30% of re-replicated cells in both parental and FLAG-tagged H4^{WT} cells (Fig 1D, compare panels a–d). In contrast, the level of re-replication upon PR-Set7^{PIPmut} expression was greatly reduced in FLAG-tagged H4^{K20A} cells (Fig 1D, panels e–f) correlating with the reduced amount of H4K20 residues in these cells. These results provide the evidence that H4K20 methylation is indeed a critical downstream effector of PR-Set7 replication licensing functions.

H4K20 methylation is an enhancer of origin efficiency

K20 methylation enhances histone H4 interaction with ORC *in vitro* (Beck *et al*, 2012b), suggesting that this histone mark might be sufficient to induce DNA replication at specific loci *in vivo*. To test this possibility, we examined the impact of H4K20 methylation on the replication of Epstein–Barr virus-derived (EBV) episomes from origin DNA sequences that involve cellular pre-RC complex for licensing. As illustrated in Fig 2A, the replication and stability of EBV episomes require the binding of the EBV-encoded protein EBNA1 to two DNA elements: (i) the family of repeats (FR) element that ensures the segregation and stability of episomes during cell division and (ii) the dyad symmetry (DS) element that serves as replication origin in human cells by co-recruiting ORC to this DNA sequence (Hammerschmidt & Sugden, 2013). To assess whether PR-Set7-induced H4K20 methylation on chromatin induces origin activity by its own, a GAL4-binding UAS sequence was introduced

into a DS-deleted EBV plasmid named FR-UAS, which is incompetent for replication but not for EBNA1-mediated segregation. We then examined the rescue of the replication competence of this plasmid in HEK293 cells stably expressing EBNA1 and either GAL4 DNA-binding domain (GAL4), the wild-type GAL4-PR-Set7^{WT}, or the methylase-deficient GAL4-PR-Set7^{SETmut} fusion proteins (Fig EV1A). HEK293 cell line was chosen because it is suitable for transfection and EBV episome replication (Gerhardt *et al*, 2006). As observed previously (Beck *et al*, 2012b), quantitative chromatin immunoprecipitation (ChIP-qPCR) showed that GAL4-PR-Set7 binding at the UAS site, but not of the GAL4 or GAL4-PR-Set7^{SETmut} proteins, led to a local increase in H4K20me1 followed by its conversion to higher H4K20me3 states, as indicated by the appearance of high H4K20me3 enrichment at this locus (Fig EV1B). To measure episome replication efficiency, low molecular weight DNA was harvested 6 days after plasmid transfection and the number of replicated episomes was quantified by bacterial transformation after DpnI digestion to eliminate the bacterial-derived plasmids initially transfected into GAL4 cell lines. The results are shown in Fig 2B. As controls, similar experiments were performed with the wild-type FR-DS plasmid and the FR-ORI^{RDH} plasmid (Fig 2A), which contains the 300-bp ORC-binding DNA fragment of the human replication origin (ORI^{RDH}) of the *RDH* gene instead of the DS element (Gerhardt *et al*, 2006). The results are shown in Fig 2B. Compared to the FR-DS plasmid, the FR-ORI^{RDH} plasmid displayed a low replication competence in all cell lines (Fig 2B), which is representative of the low efficiency of short mammalian origin DNA sequences to define an origin by their own (Gerhardt *et al*, 2006). We noticed that the replication of the FR-UAS plasmid was almost undetectable in GAL4 and GAL4-PR-Set7^{SETmut} cells but not in GAL4-PR-Set7-expressing cells, where this plasmid exhibited a low replication similar to that of the FR-ORI^{RDH} plasmid (Fig 2B). These results indicate that a local increase in H4K20 methylation, as observed with mammalian DNA sequences, is not sufficient to define a fully competent origin of replication.

Since origin efficiency might depend on the presence of multiple origin determinants (Méchalí *et al*, 2013; Valton *et al*, 2014), we next examined the effect of inducing H4K20 methylation in the vicinity of the ORI^{RDH} origin. For this, we created the FR-UAS-ORI^{RDH} plasmid (Fig 2A) and tested the replication competence of this plasmid as described above. As shown in Fig 2D, the ORI^{RDH} efficiency in FR-UAS-ORI^{RDH} plasmid was fourfold increased in GAL4-PR-Set7 cells, whereas it remained unchanged in GAL4 and GAL4-PR-Set7^{SETmut} cells (Fig 2C). ChIP-qPCR analysis showed that this stimulation of ORI^{RDH} activity GAL4-PR-Set7 cells was associated with an accumulation of H4K20me1/me3 and a higher efficiency of MCM2-7 loading, as measured by the significant increase in the levels of MCM3 at the UAS and ORI^{RDH} sequences in FR-UAS-ORI^{RDH} plasmid (Fig 2D). Importantly, the same enhancer

Figure 2. H4K20 methylation enhances origin formation and activity.

- Schematic representation of EBNA1 protein and studied EBV-derived plasmids with the relative position of DNA fragments amplified during ChIP-qPCR experiments.
- Quantitation of replicating FR-DS, FR-UAS, and FR-ORI^{RDH} plasmids in cells expressing EBNA1 and either GAL4, GAL4-PR-Set7, or GAL4-PR-Set7^{SETmut}. Data are means ± SEM (*n* = 4) with control FR-DS plasmid arbitrarily set as one in every cell line (gray bars).
- Quantitation of replicating FR-UAS-ORI^{RDH} and FR-ORI^{RDH} in the same cell lines as above. Data are means ± SEM (*n* = 4) relative to FR-ORI^{RDH} (black bars). (*) Statistical significance (paired two-tailed *t*-test) with *P* < 0.05.
- ChIP-qPCR analysis at ORI^{RDH}, UAS, and FR sequences in different GAL4 cell lines transfected with FR-ORI^{RDH} or FR-UAS-ORI^{RDH} plasmids using antibodies as indicated. Data are means ± SEM (*n* = 4) as fold enrichment of the each antibody relative to isotype IgG control. (*) Statistical significance (paired two-tailed *t*-test) with *P* < 0.05.

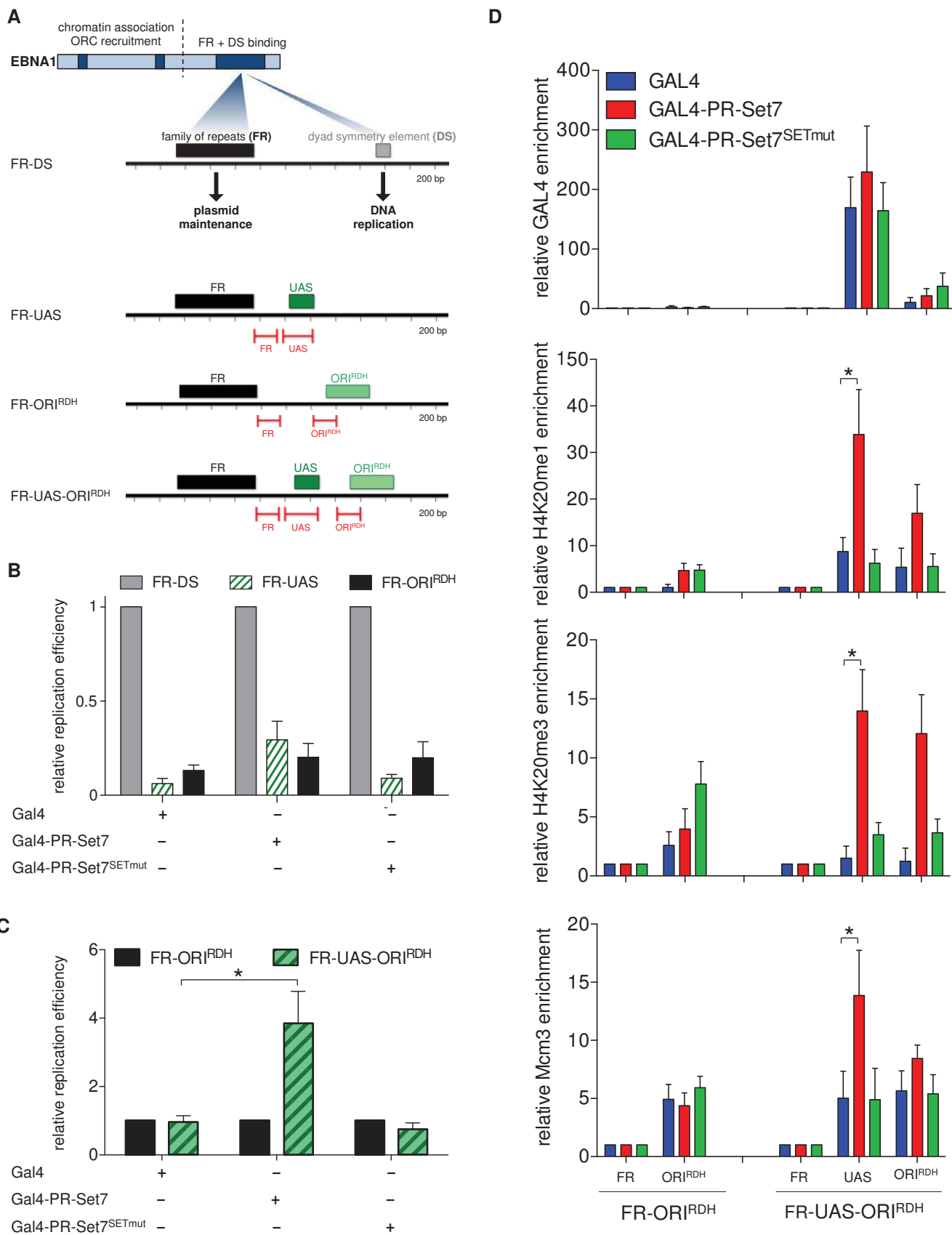


Figure 2.

effect on MCM2-7 loading and origin activity was also observed for the viral origin sequence oriP in a FR-UAS-DS plasmid transfected in GAL4-PR-Set7-expressing cells (Fig EV1B and C), confirming the ability of PR-Set7-induced H4K20 methylation to stimulate replication initiation at defined origins. Taken together, these results show that PR-Set7-induced H4K20 methylation is likely not sufficient to promote efficient origin function but rather serves to strengthen the activity of defined origins by enhancing the recruitment and/or stability of pre-RC complexes at these origins.

PR-Set7-mediated stimulation of origin activity depends on the further methylation of H4K20me1 by Suv4-20h1/h2

Since the ORC shows a higher affinity for H4K20me2/3 than for H4K20me1 *in vitro* (Oda *et al*, 2010; Vermeulen *et al*, 2010; Kuo *et al*, 2012), we asked whether the stimulatory effect of H4K20 methylation on origin activity depends on the switch from H4K20me1 to higher H4K20me states induced by Suv4-20h1/h2 methyltransferases. To address this question *in vivo*, we repeated the replication assay with FR-ORI^{RDH} and FR-UAS-ORI^{RDH} plasmids in GAL4-PR-Set7 cells in the presence of A-196, a chemical inhibitor of Suv4-20h1/h2. Immunoblot analysis of whole-cell extracts confirmed the specificity of the A-196 treatment, which led to a strong reduction in the levels of H4K20me2/3 and the subsequent increase in H4K20me1 without an impact on the levels of histone H3 tri-methylation at lysines 4, 9, and 27 (Appendix Fig S2). Consistent with these results, ChIP-qPCR analysis showed that H4K20me1, but not H4K20me3, was highly enriched at the UAS and ORI^{RDH} sequences in GAL4-PR-Set7-expressing cells treated with A-196 (Fig 3A). In this experimental context, the FR-UAS-ORI^{RDH} and FR-ORI^{RDH} plasmids displayed a similar replication activity without any significant difference in the levels of MCM3 loading at the ORI^{RDH} origin (Fig 3B and C). These results confirm that PR-Set7-mediated H4K20me1 is only a prerequisite for replication origin stimulation (Beck *et al*, 2012b), which depends on additional methylation of H4K20me1 by Suv4-20h enzymes.

Loss of Suv4-20h activity on H4K20me1 specifically impairs heterochromatin replication timing

We next sought to determine whether the ability of Suv4-20h and higher H4K20 methylation states to enhance replication origin

activity plays an essential role in the replication of all the genome or only at specific chromatin regions. To address this question, we examined at genome-wide levels the spatiotemporal replication program of mouse embryonic fibroblast (MEF^{364.2}) line derived from *Suv4-20h2*^{-/-}, *Suv4-20h1*^{-/lox}, Cre-ER embryos and in which the remaining knocked-in floxed *SUV4-20H1* gene can be deleted by addition of 4-hydroxytamoxifen (4OHT). Four days after 4OHT treatment, immunoblot analyses showed a complete and irreversible

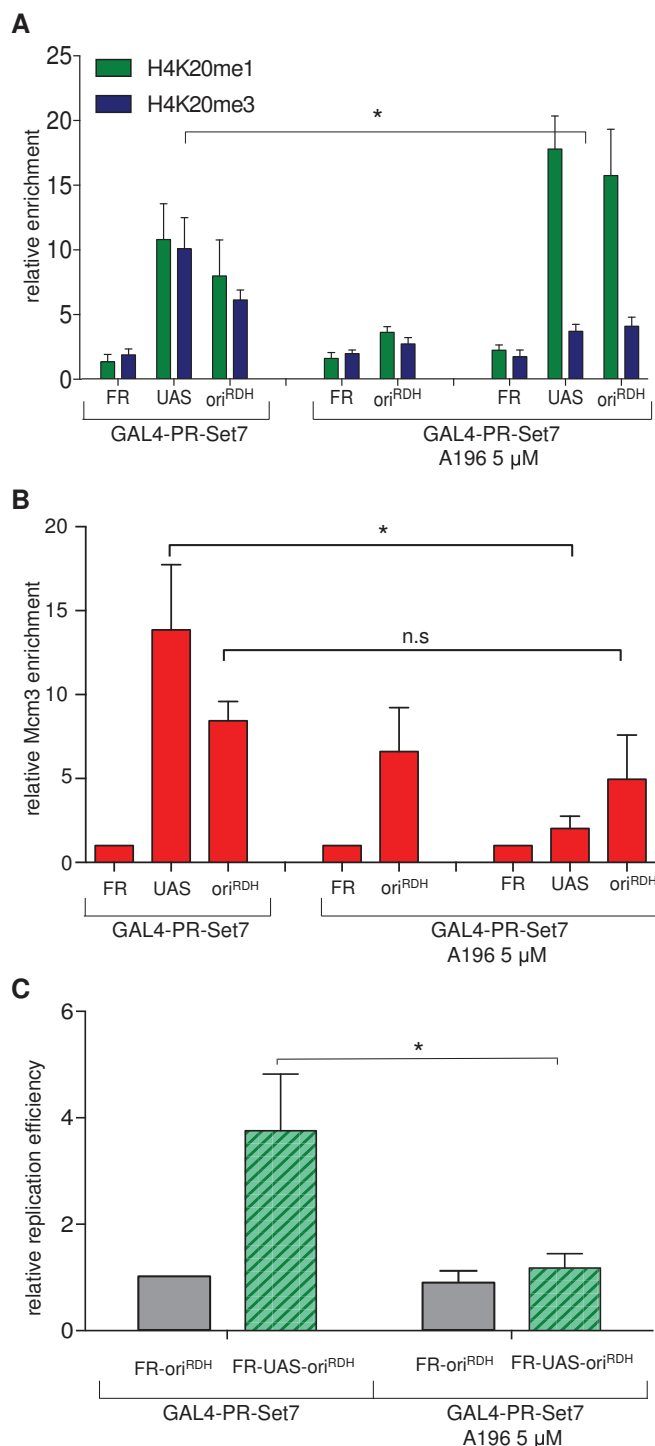


Figure 3. PR-Set7 improves origin activity through Suv4-20h activity on H4K20me1.

A ChIP-qPCR analysis of H4K20me1 and H4K20me3 levels at ORI^{RDH}, UAS, and FR in the HEK293 EBNA1⁺ Gal4-PR-Set7-expressing cell line in the absence (left panel) and presence of the Suv4-20h inhibitor A196 (right panels). Data are means \pm SEM ($n = 4$).

B ChIP-qPCR analysis of MCM3 levels at ORI^{RDH}, UAS, and FR in EBNA1/Gal4-PR-Set7-expressing cell lines in the absence (left panel) and presence of A196 (right panel). Data are means \pm SEM ($n = 4$).

C Quantitation of replicating FR-ORI^{RDH} (black) and FR-UAS-ORI^{RDH} (striped) plasmids in EBNA1/GAL4-PR-Set7-expressing cells in the presence and absence of A196. The replication efficiency is relative to ORI^{RDH} in untreated cells. Data are means \pm SEM ($n = 4$).

Data information: Significance was determined employing an unpaired two-tailed *t*-test. * $P < 0.05$.

disappearance of H4K20me2 and H4K20me3 followed by a concomitant accumulation of H4K20me1 in MEFs^{364.2} (Fig 4A, left panels). At this time, untreated and 4OHT cells were pulse-labeled with BrdU and sorted into early and late S-phase fractions by flow cytometry. Nascent BrdU-substituted DNA of each fraction was then isolated and labeled with fluorescence dyes before hybridization on microarrays covering the mouse genome, at the exception of centromeric and telomeric regions, with one probe every 13 kb. The replication timing of these cells was determined using the Agilent CGH algorithm that generates a log ratio value corresponding to early-replicating regions when the log ratio is positive and to late-replicating regions when the log ratio is negative. As illustrated in Fig 4A for a fragment of chromosome 11 (right panel), the loss of Suv4-20h in 4OHT-treated MEFs^{364.2} specifically delays the replication of some mid- and late-replicating chromatin domains, whereas the replication of early domains remained largely unaffected. Consistent with these results, 4OHT-treated MEFs^{364.2} displayed a lower proliferation rate and tended to accumulate in late S-phase as shown by FACS analysis (Fig EV2A and B). Furthermore, replication-timing delays of the same chromatin regions were also observed in fibroblast lines derived from *Suv4-20h1/2* knockout embryos (Fig EV2C), thereby indicating that the disrupted replication pattern upon loss of Suv4-20h was highly reproducible and cell line independent. To verify that the replication-timing alterations observed in 4OHT-treated MEFs^{364.2} are indeed triggered by the loss of H4K20me2/3 states, we generated as described above the replication-timing profile of untreated MEF^{364.2} expressing similar levels of FLAG-tagged histone H4^{WT} or H4^{K20A}. As shown in Fig 4B, expression of histone H4^{K20A} led to a decrease in the levels of three H4K20 methylation states, which was followed by the same replication-timing alterations than those observed in 4OHT-treated MEFs^{364.2} (see arrows in Fig 4A and B). In addition, we noticed that both histone H4^{K20A}- and H4^{WT}-expressing MEFs^{364.2} displayed some replication-timing changes in early-replicating domains compared to untreated cells, which might be caused by the artificial expression of FLAG-tagged histone H4 proteins in these cells (compare Fig 4A and B, right panels). Conspicuously, although H4^{K20A} expression caused only a partial decrease in H4K20me2/3 levels compared to the loss of Suv4-20h, we found that 54% of replication-timing

alterations in 4OHT-treated MEFs^{364.2} were also detected in H4^{K20A}-expressing MEFs^{364.2}, demonstrating that these replication defects are indeed caused by the loss of Suv4-20h activity on H4K20me1.

Further analysis of replication-timing delays in 4OHT-treated MEFs^{364.2} revealed that 80% of these delays occurred in late-replicating domains (Fig 4C). These domains correspond to large genomic regions with a median size of 2.2 megabases (Fig 4D). Quantification of these data shows that 114 distinct late-replication domains, which cover ~15% of the genome, displayed a significant replication-timing delay upon loss of Suv4-20h (P -value $< 1 \times 10^{-3}$). In mammalian cells, late-replication domains have been reported to be gene poor and often to coincide with heterochromatin regions (Rhind & Gilbert, 2013). In line with these results, the 114 altered replication domains exhibited the lowest gene density and coverage with activating chromatin mark H3K27 acetylation, but the highest coverage with the heterochromatin repressive mark H3K9me2 compared to stochastic or unmodified early/mid/late-replication domains in Suv4-20h-null cells (Fig 4E–G, statistical analysis in Appendix Table S1). Altogether, these results show that Suv4-20h activity on H4K20me1 is specifically required for the replication timing of late domains corresponding to heterochromatin regions.

High levels of H4K20me3 at origins are required for proper heterochromatin replication

Since H4K20me3 is a hallmark of heterochromatin (Schotta *et al*, 2004), we next examined by ChIP-qPCR whether H4K20me3 is particularly enriched at replication origins in late-replicating heterochromatin domains that were delayed in Suv4-20h-null cells. The results of four replication origins randomly selected in a delayed domain and of four origins in a non-delayed late domain of the chromosome 11 are shown in Fig 5. Moreover, the results of 10 additional origins in different delayed and non-delayed late domains are shown in Fig EV3A. The localization of all these origins was previously found by nascent DNA strand purification in MEF lines (Cayrou *et al*, 2011, 2015). Compared to a control origin in an early-replicating domain and a flanking negative sequence (NEG) close to ORI-1, the levels of H4K20me3 at origins in non-delayed late domains were generally weak or close to background levels in all cellular

Figure 4. Loss of Suv4-20h impairs the timing of late-replicating heterochromatin.

- A Immunoblot analysis (left panel) of H4K20me1, H4K20me2, and H4K20me3 levels and replication-timing profile (right panel) of a 23-Mb fragment of chromosome 11 (cytogenetic coordinates qA31 to qB1.2) in MEFs^{364.2} untreated or 4 days after 4-hydroxytamoxifen (4OHT) treatment. Arrows point to delayed domains in 4OHT-treated cells.
- B Immunoblot analysis (left panel) of histone H4, H4K20me1, H4K20me2, and H4K20me3 levels and replication-timing profile (right panel) of the same fragment of chromosome 11 as above in MEFs^{364.2} 5 days after transduction with retrovirus encoding histone H4^{WT} or H4^{K20A} mutant. Arrows point to delayed domains in H4^{K20A}-expressing cells.
- C Box-plot showing the percentage of delayed replication domains in each timing categories in 4OHT-treated MEFs^{364.2}.
- D Size distribution (megabase) of delayed domains in MEFs^{364.2} treated with 4OHT.
- E Box-plot showing gene coverage (percentage) in unaffected early, mid-, and late domains, in delayed domains, and in stochastic replication domains of 4OHT-treated MEFs^{364.2}.
- F Box-plot showing H3K27ac coverage levels in unaffected early, mid-, and late domains, and in delayed domains, and in stochastic replication domains of 4OHT-treated MEFs^{364.2}.
- G Box-plot showing H3K9me2 coverage levels in unaffected early, mid-, and late domains, in delayed domains, and in stochastic replication domains of 4OHT-treated MEFs^{364.2}.

Data information: (*) Statistical significance was detected when a Student's test (t -test) was performed with $P < 10^{-3}$ (see Appendix Table S1 for detailed statistical analysis). Inside the box-plot graphs, the thick line represents the median, the limit of the boxes corresponds to the 0.25 to 0.75 quartiles with whiskers extending to the maximum value of 1.5 times the interquartile range.

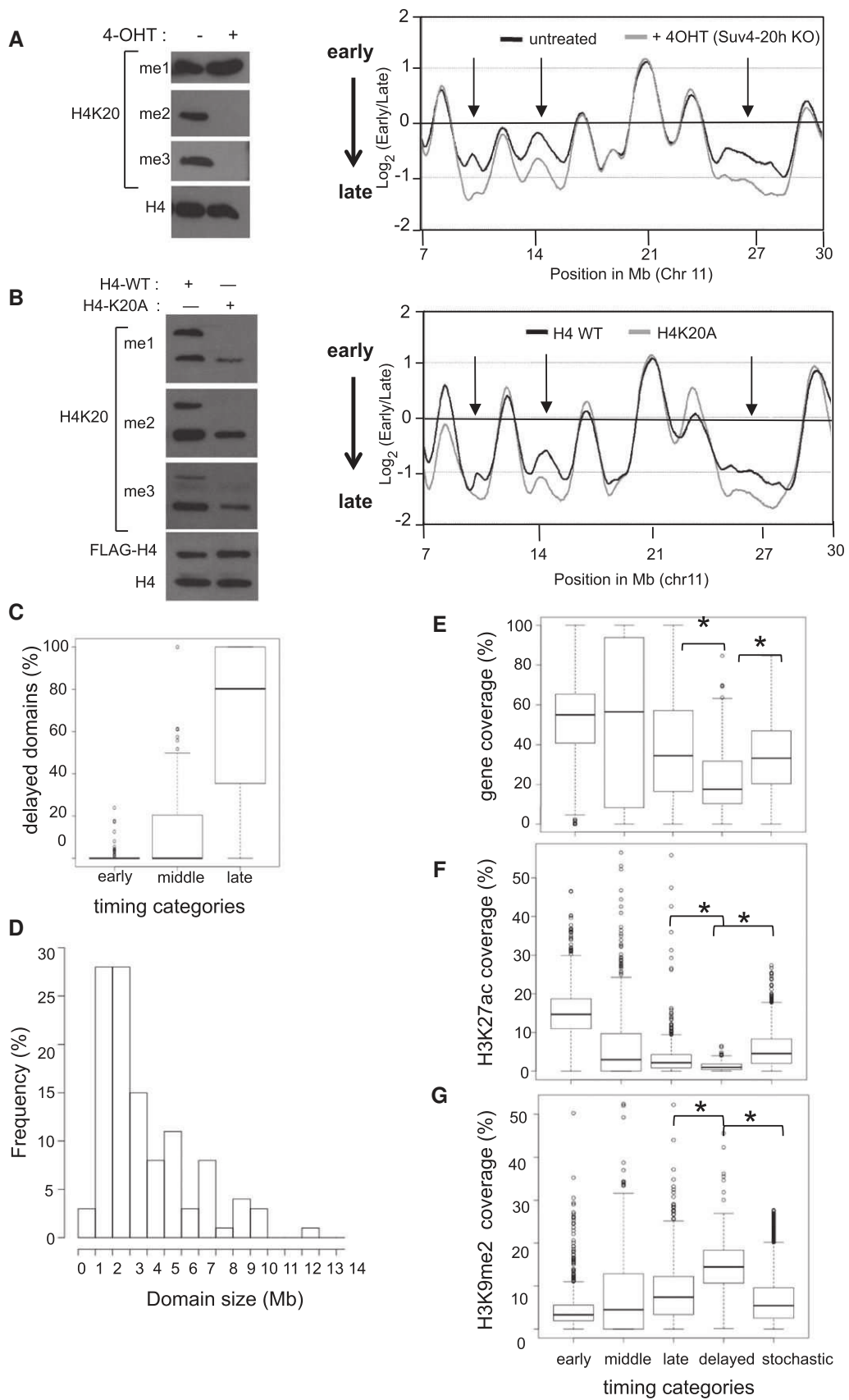


Figure 4.

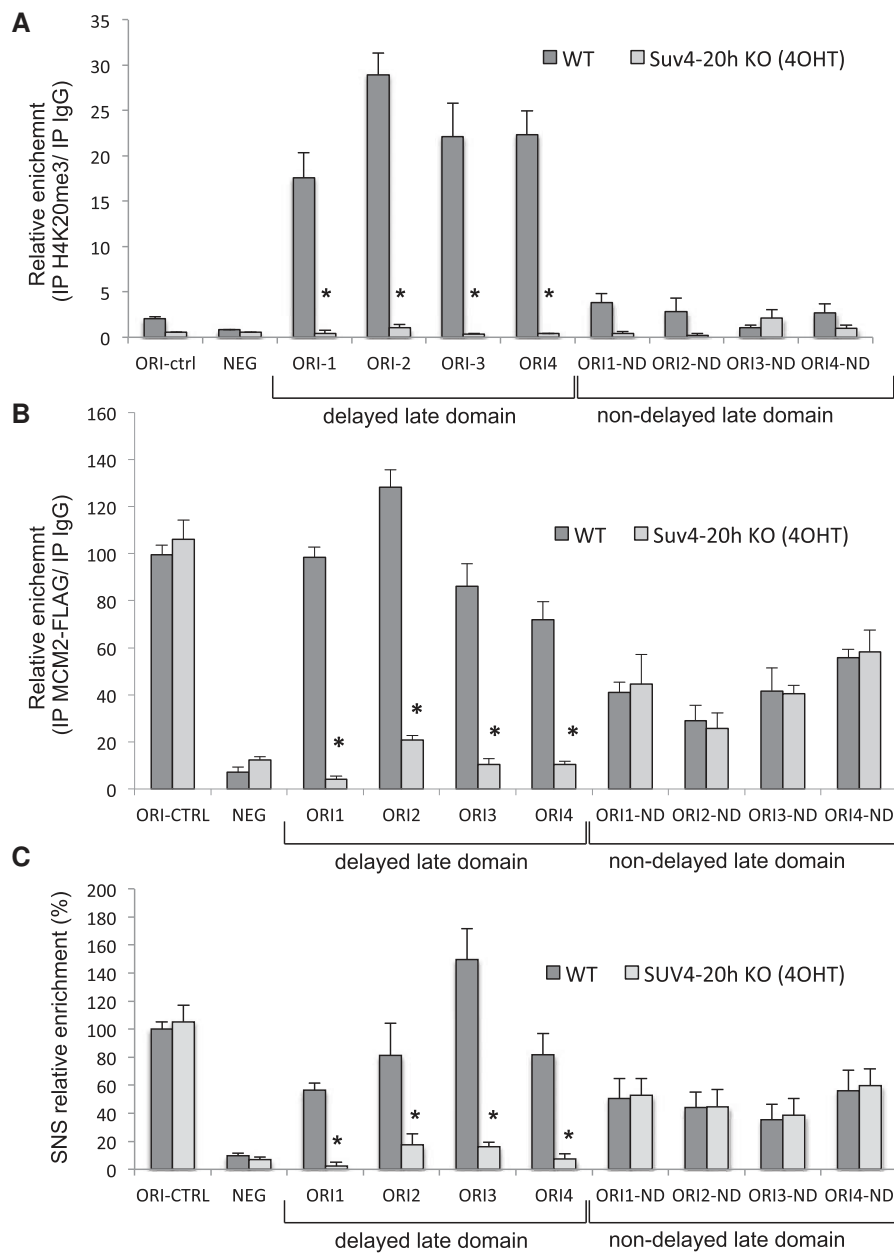


Figure 5. Suv4-20h-mediated H4K20me3 is required for the appropriate licensing and activity of a subset of origins in late-replicating heterochromatin.

A ChIP-qPCR analysis of H4K20me3 levels at the control early-firing MYC origin and at origins in delayed and non-delayed late domains of chromosome 11 in untreated and 4OHT-treated MEFs^{364.2} using anti-H4K20me3 and an isotype non-relevant antisera (IgG) as control. NEG corresponds to a negative control region 5 kb downstream of ORI-1. Coordinates of studied ORIs are indicated in Appendix Table S2. Errors bars represent SD ($n = 3$).

B ChIP-qPCR analysis of MCM2 levels at the same origins as above in untreated and 4OHT-treated MEFs^{364.2} stably expressing FLAG-tagged MCM2 and using anti-FLAG or IgG as ChIP control. Errors bars represent SD ($n = 3$).

C Quantitation of the relative SNS enrichment of the same origins as above origin in untreated and 4OHT-treated MEFs^{364.2} and arbitrarily normalized with respect to the control origin. Data are means \pm SD ($n = 3$).

Data information: (*) Statistical significance with $P < 0.001$ (unpaired t -test).

conditions, whereas a peak of H4K20me3 was detected at almost all origins in delayed late domains before but not after 4OHT treatment (Figs 5A and EV3A). Consistent with these results, H4K20me1 was found highly enriched instead of H4K20me3 at these origins in 4OHT-treated cells (Fig EV3B). Importantly, the decrease in H4K20me3 levels at origins in delayed late domains was also observed in

H4^{K20A}-expressing MEF^{364.2} (Fig EV4A), thereby suggesting that the replication-timing alterations upon loss of Suv4-20h-mediated H4K20 methylation principally occur in heterochromatin regions where origins are normally associated with high levels of H4K20me3.

To determine whether the lack of H4K20me3 has indeed an impact on the licensing and activity of these origins, wild-type as

well as H4^{WT}- and H4^{K20A}-expressing MEFs^{364.2} were transduced with retroviral vectors encoding FLAG-tagged MCM2 or MCM5 and ChIP-qPCR experiments were performed with FLAG antibody to measure pre-RC formation at different origins. In parallel, we isolated and quantified by qPCR the levels of short nascent DNA strands at these origins (SNS), which is a direct measure of their efficiency (Valton *et al.*, 2014). As shown in Figs 5B and C, and EV4B–D, all origins tested were normally associated with FLAG-tagged MCM5 and/or MCM2 proteins and displayed high SNS levels in untreated or H4^{WT} cells. In contrast, whereas the loading of MCM proteins and the activity of origins in non-delayed late domains largely remained unaffected, the abrogation of H4K20me3 upon 4OHT treatment or its decrease in H4^{K20A} cells coincided with the inability of H4K20me3-associated origins to recruit appropriate levels of MCM proteins and to efficiently initiate DNA synthesis (Figs 5B and C, and EV4B–D). These results show that high levels of H4K20me3 are critical for the full activity of an important subset of late-firing origins, thereby explaining the delay in heterochromatin replication observed in Suv4-20h and H4K20 methylation-depleted cells.

ORCA/LRWD1 binding to H4K20me3-associated late-firing origins is required for heterochromatin replication

Previous studies have shown that tri-methylated H4K20 peptides can directly interact *in vitro* with the WD40 domain of the ORCA-associated protein ORCA/LRWD1 (Beck *et al.*, 2012b), which is suspected to play an important role in the replication and organization of heterochromatin by facilitating the recruitment of ORC (Wang *et al.*, 2016). We therefore reasoned that H4K20me3 might ensure the proper replication timing of heterochromatin by inducing the recruitment of ORCA at specific late-firing origins. To test this hypothesis, FLAG-tagged ORCA was stably expressed in the different MEFs^{364.2} lines and the ability of this protein to associate with origins in delayed and non-delayed late domains of the chromosome 11 was evaluated by ChIP-qPCR in Suv4-20h-null and H4^{K20A}-expressing cells. Whereas FLAG-tagged ORCA was found associated with all origins tested in untreated and H4^{WT} cells, the abrogation of H4K20me3 upon Suv4-20h inactivation or H4^{K20A} expression coincided with the inability of ORCA to associate specifically with the set of origins that are normally highly enriched in this methylation mark (Figs 6A and EV5). Consistent with the absence of ORCA

binding to this specific subset of late-firing origins, which control the replication of ~15% of the mouse genome (Fig 4), the amount of chromatin-associated pool of ORCA was reduced of 40% in Suv4-20h-null cells compared to control cells (Fig 6B). Altogether, these results suggest that ORCA may associate with origins through multiple mechanisms and that the binding of ORCA to H4K20me3 is specifically required for its association with a subset of late-firing origins.

To determine whether the recruitment of ORCA to H4K20me3-enriched origins is necessary for the activity of these origins and the proper replication of associated late domains, we induced the silencing of ORCA by two independent shRNA (Fig 6C) and then examined the replication timing and activity of H4K20me3-associated origins in ORCA-depleted cells as described above. Although ORCA was not fully depleted (Fig 6C), the replication of mid- and late-replicating domains was delayed in shRNA ORCA-treated cells, while early-replicating domains remained unchanged or eventually slightly advanced (Fig 6D and Appendix Fig S3). Clearly, 64% of late-replicating domains delayed in Suv4-20h-null and H4^{K20A}-expressing cells were also found significantly altered in ORCA-depleted cells, as shown for the same fragment of chromosome 11 in the three cellular conditions (compare Figs 4A and B, and 6D). In line with these results, we found that ORCA depletion impairs the levels of MCM loading and replication initiation at H4K20me3-associated origins (Fig 6E and F). Moreover, consistent with the ability of ORCA to interact with Suv4-20h (Giri & Prasanth, 2015), ORCA depletion also caused a significant reduction of H4K20me3 at these origins, thereby indicating a mutual dependence between the binding of ORCA and the accumulation of high levels of H4K20me3 at these sites (Fig 6G). Taken together, these results suggest a model where the timely replication of a large fraction of heterochromatin regions in mammalian cells depends on the concerted activities of PR-Set7 and Suv4-20h in order to generate H4K20me3-mediated ORCA binding at a subset of late-firing origins and thus to enhance the licensing and efficiency of these origins.

Discussion

This study provides new insights into the role of H4K20 methylation in the control of DNA replication in mammalian cells. First, we demonstrate that H4K20 methylation is a critical effector of PR-Set7

Figure 6. ORCA/LRWD1 binds to H4K20me3-associated origins and promotes the licensing and activity of these origins.

- A ChIP-qPCR analysis of ORCA levels at the same origins as in Fig 5 in untreated and 4OHT-treated MEFs^{364.2} stably expressing FLAG-tagged ORCA and using anti-FLAG or IgG as a control. NEG corresponds to a negative ORCA binding site. Errors bars represent SD ($n = 3$).
- B Immunoblot analysis of HCF-1 and ORCA proteins in whole-cell extracts (inputs) and in chromatin-enriched fraction in untreated and 4OHT-treated MEFs^{364.2}. Chromatin-bound HCF-1 protein was used as control of chromatin purification. Quantitation of ORCA protein levels are indicated relative to HCF-1 and normalized with respect to the ORCA levels in untreated cells. (*) indicates a ORCA cleavage product in chromatin fraction after biochemical fractionation.
- C Immunoblot analysis of ORCA and tubulin proteins in immortalized MEFs transduced with lentivirus encoding shRNA control or two independent shRNA ORCA. Quantitation of ORCA protein levels is indicated relative to tubulin and normalized with respect to the ORC levels in control cells.
- D Replication-timing profile of the same 23-Mb chromosome fragment as in Fig 5A in MEFs treated with shRNA control or shRNA (2) ORCA. Arrows point to delayed late domains in ORCA-depleted cells.
- E ChIP-qPCR analysis of MCM5 levels at the control early-firing MYC origin and H4K20me3-associated origins in control and ORCA-depleted MEFs expressing FLAG-tagged MCM5 and using anti-FLAG or IgG as ChIP control. Errors bars represent SD ($n = 3$).
- F Quantitation of the relative SNS enrichment of the same origins as above. SNS enrichment was arbitrarily normalized with respect to the control origin. Errors bars represent SD ($n = 2$).
- G ChIP-qPCR analysis of H4K20me3 levels at the same origins as above using anti-H4K20me3 and IgG as ChIP control. Errors bars represent SD ($n = 3$).
- Data information: (*) Statistical significance (unpaired *t*-test) with $P < 0.05$ (for panels E–G) and $P < 0.005$ (for panel A).

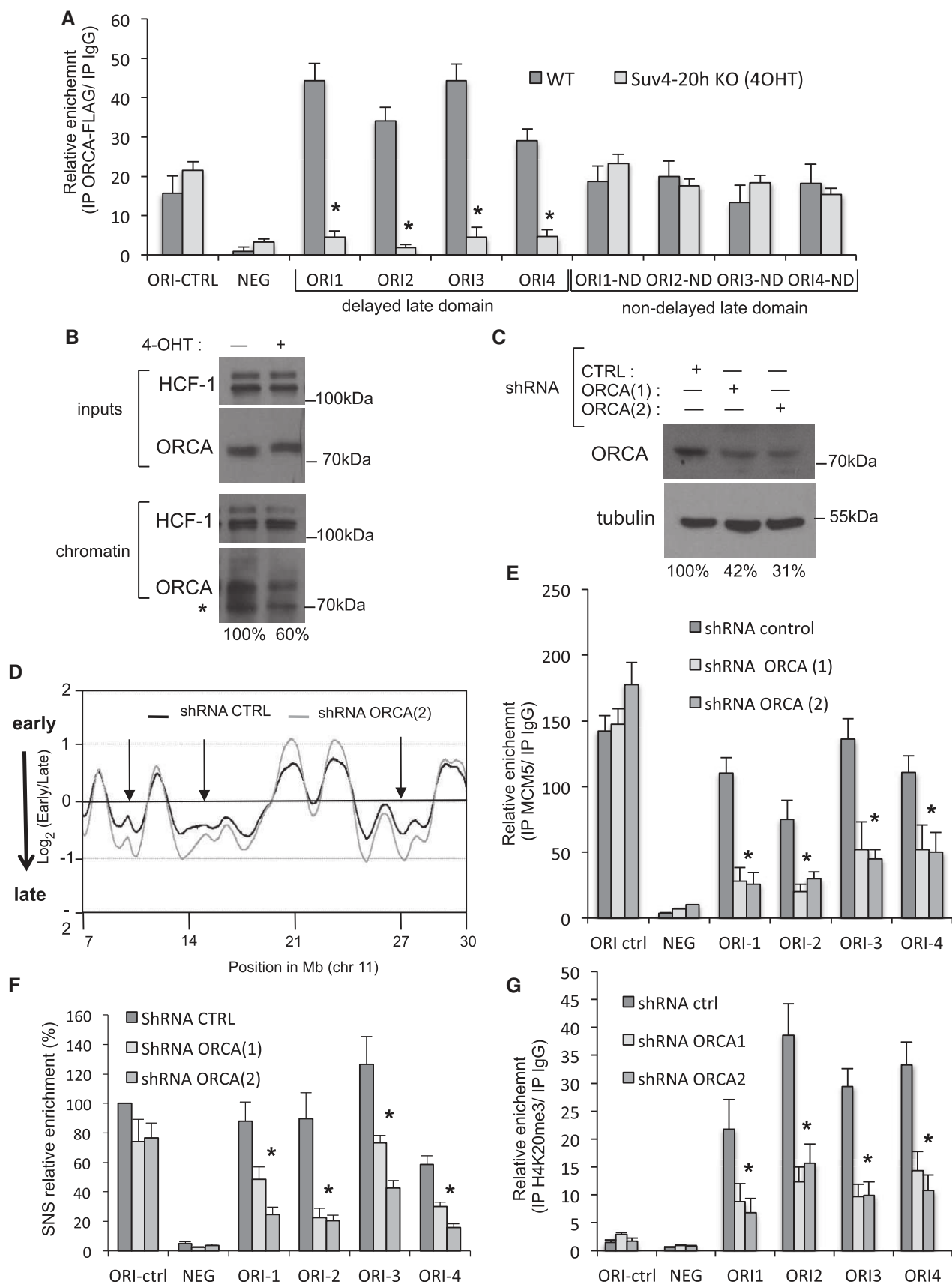


Figure 6.

replication licensing functions and appropriate levels of this methylation mark are important for faithful and timely progression through S-phase (Fig 1). Together with origin DNA sequences, we show that a local increase in PR-Set7-induced H4K20me1 followed by its conversion to higher H4K20me states by Suv4-20h is not sufficient to define a functional origin *per se* and rather serves to enhance replication origin activity by improving MCM2-7 loading (Figs 2 and 3). Moreover, we reveal that the loss of Suv4-20h and H4K20me methylation impair the licensing and activity of a subset of late-firing origins, which delay the replication of 15% of the genome mostly at the levels of heterochromatin domains (Figs 4 and 5). Finally, we show that the recruitment of ORCA and the associated pre-RC complex at these defined late-firing origins depends on Suv4-20h-mediated H4K20me3, which is therefore essential for proper heterochromatin replication (Figs 5 and 6). Altogether, these results place H4K20 methylation and the degree of this methylation, through the concerted activities of PR-Set7 and Suv4-20h, as a critical determinant in the selection of active replication initiation sites in heterochromatin regions of mammalian genomes.

Although previous studies have shown that the role of PR-Set7 in replication origin licensing is connected to Suv4-20h (Beck *et al*, 2012b), it still remained unclear whether H4K20 methylation was the effector of these enzymes in the control of DNA replication. Indeed, PR-Set7 and Suv4-20h are also known to interact with and target non-histone proteins important for DNA replication and flies harboring a histone H4 with a K20A substitution are viable, although sick, with no apparent DNA replication defects (McKay *et al*, 2015). By taking advantage that mammalian cells can rapidly adapt the levels of endogenous histone H4 in response to an ectopic histone H4 expression, we replaced a large fraction of the pool of histone H4 with histone H4K20A mutant and thus directly assessed the role of H4K20 methylation in mammalian cell-cycle progression. Although we cannot exclude non-histone substrates being also involved, our results demonstrate that H4K20 methylation is indeed required for PR-Set7 and Suv4-20h functions at replication origins in mammalian cells. Thus, the role of H4K20 methylation in replication origin activity is likely specific to mammals, which is corroborated by the absence of replication origin activation defects in *Drosophila Suv4-20h* mutant and in *Drosophila Kc167* cells depleted for PR-Set7 (Sakaguchi *et al*, 2008; Li *et al*, 2016). H4K20 methylation is actually not the unique replication origin feature that may differ between *Drosophila* and mammalian models. Although enhanced DNA flexibility similarly marks *Drosophila* and mammalian replication origins, the sequence composition of these origins is remarkably different between these two organisms (Lombraña *et al*, 2013; Picard *et al*, 2014; Comoglio *et al*, 2015). Furthermore, *Drosophila* replication initiation sites are generally poor in nucleosomes (Liu *et al*, 2015), while a versatile nucleosome occupancy is often found at mammalian replication initiation sites (Cayrou *et al*, 2011; Lombraña *et al*, 2013). Thus, the role of H4K20 methylation in DNA replication could have emerged with a differential nucleosome contribution to origin specification and activity in mammals.

It is becoming increasingly evident that flexible combinations of genetic and epigenetic features are responsible for the recruitment of pre-RC complex and participate in the proper control of replication origin activation (Leonard & Méchali, 2013). Consistent with this idea, GC-rich DNA sequences contribute to origin specification but

requires the presence of other elements to define a fully competent replication origin in mammalian cells (Valton *et al*, 2014). Similarly, using EBV-derived episomes, we showed that PR-Set7-induced H4K20me1 and its subsequent conversion to higher H4K20me states by Suv4-20h constitute a weak specificity factor for origin. Instead, our results suggest that Suv4-20h activity on H4K20me1 marks can enhance origin efficiency when this methylation activity is combined with genetic origin features (Figs 2 and 3). We also showed that Suv4-20h stimulates the activity of replication origins by increasing or stabilizing the levels of MCMs at origin DNA sequences. This is in agreement with previous studies showing that multiple MCMs can be loaded at origins and that this excess of MCM proteins increases origin efficiency (Bowers *et al*, 2004; Das *et al*, 2015).

How might Suv4-20h activity improve MCM2-7 helicase loading at specific loci? Since the BAH domain of ORC1 and the WD40 domain of ORCA display a high affinity for H4K20me2 and H4K20me3, respectively (Oda *et al*, 2010; Beck *et al*, 2012b; Kuo *et al*, 2012), one simple explanation is that the subsequent methylation of H4K20me1 by Suv4-20h at specific origins would enhance the affinity of ORC for these origins, resulting in a higher ORC occupancy or stability that in turn favors a more efficient MCM recruitment and higher origin efficiency. Interestingly, our replication-timing analysis of Suv4-20h-null and histone H4^{K20A}-expressing cells suggests that this enhancer function of H4K20 methylation marks on origin activity is likely specific to late-replicating origins in silent chromatin regions, which are naturally less favorable for MCM2-7 loading. It is somehow reminiscent of the differential ORC-origin binding mechanisms in *S. cerevisiae*, where the high affinity of ORC for specific DNA sequences is required for late-firing origins and heterochromatin formation (Palacios DeBeer *et al*, 2003; Hoggard *et al*, 2013). However, the mammalian ORC complex does not have noticeable DNA specificity unlike its yeast counterpart (DePamphilis, 2005) and it is more likely that new mechanisms have evolved in mammals to increase ORC occupancy at heterochromatin, including the ability of ORC to interact with H4K20 methylation marks.

Despite many attempts and similarly to other laboratories (Eid *et al*, 2016), we were unable to identify a specific H4K20me2 antibody for ChIP experiments, which has precluded exploring further the impact of this Suv4-20h-mediated H4K20me state in our studies. Although we cannot rule out a role of H4K20me2 in DNA replication, our results suggest that this function would be restrained to late-replicating heterochromatin regions. However, H4K20me2 is an ubiquitous histone modification found at almost 80% of histone H4 molecules (Pesavento *et al*, 2008) and it is therefore difficult to envision H4K20me2 as a specific determinant of replication origin activity in heterochromatin. Instead, Suv4-20h-mediated H4K20me3 is a hallmark of heterochromatin and our results show that this H4K20me state is particularly enriched at a subset of late-firing origins in heterochromatin domains retarded in Suv4-20h-null cells. In the absence of this mark, we showed that the licensing and firing of these origins are strongly reduced. The specific affinity of ORCA for H4K20me3 could explain why this histone methylation is required for sustaining proper replication origin activity in heterochromatin regions (Vermeulen *et al*, 2010; Beck *et al*, 2012b). Indeed, previous studies have shown that ORCA is a heterochromatin protein that facilitates the recruitment of ORC to chromatin and, in the absence of this factor, the MCM2-7 loading is impaired (Shen *et al*, 2010). In line with this, we showed that loss of H4K20me3 triggers a decrease in

ORCA binding followed by a reduction in the recruitment of MCMs at a specific subset of late-firing origins in Suv4-20h-null and H4^{K20A} cells (Figs 5 and 6). Our results are also in agreement with a recent genome-wide study showing that ORCA is enriched at late-firing origins in chromatin regions associated with H3K9me3 and methyl-CpG (Wang *et al*, 2016), two repressive chromatin marks that often coincide with H4K20me3 (Benetti *et al*, 2007; Pannetier *et al*, 2008). In addition to its role in replication origin licensing, it has been proposed that ORCA could also mediate heterochromatin formation by associating with these repressive marks and regulating their deposition on chromatin through the interaction with the enzymes responsible for these marks (Giri & Prasanth, 2015). In agreement with these results, we observed a strong decrease of H4K20me3 at late-firing origins in ORCA-depleted cells (Fig 6). Since H3K9me3 appears as a prerequisite for the subsequent H4K20me3 (Schotta *et al*, 2004), we therefore propose that the initial recruitment of ORCA could depend on H3K9me3 and the subsequent appearance of H4K20me3 signal at some origins would serve to reinforce and stabilize ORCA binding to these specific sites, which in turn is pivotal to ensure an appropriate loading of pre-RC complex and proper replication timing in more condensed regions of the genome. It is also interesting to note that the decrease of H4K20me3 mark is generally associated with a negative cancer prognosis (Koturbash *et al*, 2012), suggesting that the observed alterations in heterochromatin replication upon loss of Suv4-20h and H4K20me3 could contribute to malignant transformation. Consistent with this possibility, Suv4-20h-null cells exhibit a high sensitivity to stress conditions resulting in abnormal mitotic chromosome behavior and genome instability (Schotta *et al*, 2008; Hahn *et al*, 2013), two hallmarks of pre-cancerous cells that can be the consequences of reduced origin activity and delayed late-replication domains (Donley & Thayer, 2013).

Because of the cell-cycle regulation of PR-Set7 activity, H4K20me1 is mainly synthesized during G2/M transition and converted to H4K20me2/3 afterward, leaving H4K20 largely un-methylated after replication and during most of the G2-phase (Saredi *et al*, 2016). This cell-cycle regulation is essential to prevent premature origin licensing and re-replication during S/G2-phase (Tardat *et al*, 2010), as confirmed by our results with H4K20A mutant (Fig 1). However, the reset in H4K20 methylation states after each round of DNA replication could also provide a window of opportunity for changes in the chromosomal distribution of H4K20 methylation and thus in the choice of active replication origins among several potential origins. Indeed, late-firing origins are generally cell type specific and variations in replication timing are controlled primarily at the level of origin activity and often associated with chromatin structure changes that drive cell differentiation (Smith *et al*, 2016). Determining how PR-Set7 and Suv4-20h enzymes find their specific targets on chromatin will therefore be exciting and fruitful research avenues to focus on and help to unravel the epigenetic mechanisms that regulate the usage of late-firing origins in each cell lineage.

Materials and Methods

Plasmids and shRNA constructs

pCDNA-UAS(5X)-LUC, pMSCV PR-SET7^{FY/AA}, and pMSCV PR-Set7^{FY/AA-SETmut} were previously described (Tardat *et al*, 2010).

pQCXIP H4^{WT} was generated by cloning the histone H4 cDNA and a C-terminal 3× FLAG sequence as an AgeI-NotI fragment into the pQCXIP vector (Clontech). pQCXIP H4^{K20A} substitution mutant was generated by site-directed mutagenesis (Agilent). pQCXIP GAL4-PRSet7 and pQCXIP 3xFlag-ORC2, ORCA, MCM2, and MCM5 were generated as described for pQCXIP H4^{WT}. pDEST-ZEO-GAL4^{DBD}-RfA plasmid was first generated by cloning GAL4^{DBD} and RfA sequences into pCDNA3-ZEO and subsequently used to shuttle PRSet7^{WT} and PR-Set7^{SETmut} sequence from pDON221 vectors using clonase LR in order to generate pZEO-GAL4-PR-Set7^{WT} and pZEO-GAL4-PR-Set7^{SETmut}. Control and ORCA shRNA lentiviral constructs (Sigma) were previously described (Chan & Zhang, 2012), and viral production and infection were performed as described in Tardat *et al* (2007).

Cell culture and establishment of stable cell lines

Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) with 10% fetal bovine serum (Sigma). For Suv4-20h inhibition in human cells, A-196 (Sigma) was added to a final concentration of 5 μM. Primary mouse embryonic fibroblast cells with inducible deletion of Suv4-20h1 (E364.2) were established by standard procedures from Suv4-20h1^{fllox/-}; Suv4-20h2^{-/-}; Cre-ER embryos at E13.5 as described previously (Hayashi & McMahon, 2002; Schotta *et al*, 2008). As oxidative stress is associated with the loss of Suv4-20h enzymes (Schotta *et al*, 2008), MEFs^{364.2} were cultured under low oxygen conditions in a tri-gas incubator containing 2% O₂ and 5% CO₂. FLAG-tagged pre-RC protein expression was established by transduction with the appropriate pQCXIP retroviral vectors. Deletion of floxed *Suv4-20h1* allele in MEF364.2 lines was achieved by treatment with 4-hydroxytamoxifen (1 μM) for 48 h. Establishment of GAL4 and GAL4-PR-Set7^{WT} and GAL4-PRSet7^{SETmut}-expressing HEK293 EBNA1⁺ cell lines were established by transfection of pZEO vectors followed by Zeocin selection (20 μg/ml).

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis

Cells were prepared as described previously (Tardat *et al*, 2010). For cell-cycle analysis, cells were washed with PBS and resuspended in PBS containing 7-amino-actinomycin D (Sigma) and RNase A (100 mg/ml) for 4 h at room temperature. Samples were run on a FACSCalibur (Becton Dickinson) and data analysis was performed using Flowjo software (Tree Star).

ChIP-qPCR

ChIP experiments with MEFs were performed as described previously (Tardat *et al*, 2010). ChIP-qPCR on EBV episomes was performed with transfected HEK293 EBNA1⁺ cell lines. Detailed methods and primer sequences used for qPCR are available in Appendix Supplementary Methods. ChIP was performed with 300 μg of sheared chromatin with the appropriate antibody as follows: anti-GAL4 (Santa Cruz), anti-FLAG M2 (Sigma), anti-H4K20me1 (Diagenode), anti-H4K20me3 (Abcam and Diagenode), anti-ORCA (Bethyck), and anti-MCM (Ritzi *et al*, 2003). Quantitative PCR analysis was performed using the Roche LightCycler 480 System and the SYBR Green I Master (Roche) according to the

manufacturer's instructions. Quantitative PCR values were calculated as fold enrichment relative to isotype IgG control.

Nascent DNA strand purifications and analysis

Nascent strands (NS) were purified as described previously (Cayrou *et al*, 2011). Briefly, after extraction by DNaseI, NS are crudely separated from genomic DNA by sucrose gradient. Fractions of interest containing NS were then processed by the lambda exonuclease to eliminate contaminating DNA. Three samples were collected from three independent cell cultures. Control was obtained after treatment of the high sucrose fractions (which do not contain NS) by lambda exonuclease digestion, in order to remove lambda exonuclease artefactual digestion. NS levels at specific origins were then evaluated by qPCR using specific sets of primers (Appendix Table S2) with the Roche LightCycler 480 System and the SYBR Green I Master (Roche).

Immunoblot analysis and small-scale biochemical fractionation

The following antibodies were used: anti-PRSet7 (1:1,000, Cell Signaling), anti-H4 and anti-H4K20me1, me2, me3 (1:1,000, Cell Signaling), anti-H4 acetylation (Active motif, 1:1,000), anti-H3K9me3 (1:1,000, Abcam), anti-FLAG (1:1,000, Sigma), anti-H3K4me3 (1:1,000; Abcam), anti-H3K27me3 (1:2,000; Upstate), anti-GAL4^{DBD} (1:10,000, Santa Cruz), anti-MEK1 (1:1,000, Millipore), anti-HCF-1 (1:5,000), anti-ORCA (1:1,000, Bethyl), and anti-MCM (Cell Signaling). Small-scale biochemical fractionation to purify chromatin-enriched fraction was prepared with 10⁷ cells as described previously (Tardat *et al*, 2010).

Plasmid replication assay

Detailed protocol is available in the Appendix Supplementary Methods. GFP-positive reporter plasmids (1 µg) were transfected into HEK293 EBNA1⁺ cell line stably expressing the respective GAL4-fusion protein using Lipofectamine 2000 (Life technologies). Transfections with comparable efficiencies were verified by visualizing GFP-positive cells. Six days post-transfection, cells were harvested according to the HIRT protocol (Gerhardt *et al*, 2006). After centrifugation (2,000 × g) for 1 h at 4°C, DNA was purified by phenol–chloroform extraction and digested with 40 U *DpnI* (NEB) in the presence of RNase (Roche). Digested DNA (300 ng) was electroporated into Electromax DH10B competent cells (Invitrogen) and ampicillin-resistant colonies, representing the number of recovered plasmids, were counted. The FR-DS plasmid was always transfected in parallel, and the number of resulting colonies was used for normalization. Statistical analysis of replication efficiency was performed using paired Student's *t*-test.

Replication-timing analysis

A detailed method is provided as Appendix Supplementary Methods. Briefly, 30 × 10⁶ cells were incubated with BrdU for 1 h before ethanol fixation. Fixed cells were sorted into early and late S-phase fractions using INFLUX 500 (Cytopeia BD Biosciences). After lysis and anti-BrdU immunoprecipitation, whole-genome amplification was conducted (WGA, Sigma) and early and late

neo-synthesized DNAs were labeled with Cy3 and Cy5 ULS molecules (Genomic DNA Labeling Kit, Agilent). The hybridization was performed according to the manufacturer's instructions on 4 × 180K mouse microarrays (SurePrint G3 Mouse CGH Microarray Kit, 4 × 180K, AGILENT Technologies, reference genome: mm9). Microarrays were scanned with an Agilent High-Resolution C Scanner using a resolution of 2 µm and the autofocus option. Feature extraction was performed with the Feature Extraction 9.1 software (Agilent technologies). Analysis was performed with the Agilent Genomic Workbench 5.0 software. The log₂ ratio timing profiles were smoothed using the Agilent Genomic Workbench 5.0 software with the Triangular Moving Average option (500-kb windows). The analysis of replication-timing data was performed using algorithms from CGH applications (Agilent Genomic Workbench 5.0 software), particularly the aberration detection algorithms (*Z*-score with a threshold of 1.8) that define the boundaries and magnitudes of the regions of DNA loss or gain corresponding to the late- and early-replicating domains, respectively. A Student test (*t*-test) was performed on the average of the log₂ values of every domain with R program 3.2.3 and significant difference is annotated when *P*-value < 10⁻³. The intersection with different data sets was performed with GALAXY tools and *t*-test was performed to identify significant differences. The microarray data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) (accession no. GSE69084). Positions of genes used for gene coverage come from RefSeq mm9. Positions of H3K27ac peaks used for coverage come from GSM1631248 (GEO database). Positions of H3K9me2 peaks used for coverage come from GSM887877 (GEO database).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Plan-Cancer 2009/2013 (C13106FS), from Ligue Nationale Contre le Cancer (RS16/75-108), Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE10-0008-02), Fondation pour la recherche Médicale, and German Research Foundation (DFG-SFB1064 TP05). Institutional Support was provided by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and by HMGU. We thank Z. Zhang for ORCA and shRNA plasmids. F.I. and J.B. were supported by fellowships from LNCC, FRM, and Association pour la Recherche contre le Cancer.

Author contributions

JB, FI, NK, PP, CC, AFA, JCC, CG, and EJ performed experiments and analyzed data. EJ conceived the project and AS, JJC, and EJ supervised the study. GS generated reagents. CG, JD, CS, GB, and MM provided conceptual advice on study and interpretation of the data. CG, AS, J-CC, and EJ wrote the manuscript. CG, J-CC, and EJ revised the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Arias EE, Walter JC (2007) Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev* 21: 497–518

- Beck DB, Burton A, Oda H, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla M-E, Reinberg D (2012b) The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h. *Genes Dev* 26: 2580–2589
- Beck DB, Oda H, Shen SS, Reinberg D (2012a) PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev* 26: 325–337
- Bell SD, Botchan MR (2013) The minichromosome maintenance replicative helicase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a012807
- Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Schotta G, Klatt P, Jenuwein T, Blasco MA (2007) Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Biol* 178: 925–936
- Besnard E, Babled A, Lapasset L, Milhavet O, Parrinello H, Dantec C, Marin J-M, Lemaitre J-M (2012) Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat Struct Mol Biol* 19: 837–844
- Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA (2011) How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem Sci* 36: 405–414
- Bowers JL, Randell JCW, Chen S, Bell SP (2004) ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell* 16: 967–978
- Brustel J, Tardat M, Kirsh O, Grimaud C, Julien E (2011) Coupling mitosis to DNA replication: the emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol* 21: 452–460
- Cayrou C, Coulombe P, Vigneron A, Stanojic S, Ganier O, Peiffer I, Rivals E, Puy A, Laurent-Chabalier S, Desprat R, Méchali M (2011) Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res* 21: 1438–1449
- Cayrou C, Ballester B, Peiffer I, Fenouil R, Coulombe P, Andrau J-C, van Helden J, Méchali M (2015) The chromatin environment shapes DNA replication origin organization and defines origin classes. *Genome Res* 25: 1873–1885
- Chan KM, Zhang Z (2012) Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein 1 is recruited to pericentric heterochromatin by trimethylated lysine 9 of histone H3 and maintains heterochromatin silencing. *J Biol Chem* 287: 15024–15033
- Comoglio F, Schlumpf T, Schmid V, Rohs R, Beisel C, Paro R (2015) High-resolution profiling of *Drosophila* replication start sites reveals a DNA shape and chromatin signature of metazoan origins. *Cell Rep* 11: 821–834
- Das SP, Borrman T, Liu VWT, Yang SC-H, Bechhoefer J, Rhind N (2015) Replication timing is regulated by the number of MCMs loaded at origins. *Genome Res* 25: 1886–1892
- DePamphilis ML (2005) Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex. *Cell Cycle Georget Tex* 4: 70–79
- Ding Q, MacAlpine DM (2011) Defining the replication program through the chromatin landscape. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 46: 165–179
- Donley N, Thayer MJ (2013) DNA replication timing, genome stability and cancer: late and/or delayed DNA replication timing is associated with increased genomic instability. *Semin Cancer Biol* 23: 80–89
- Eid A, Rodríguez-Terrones D, Burton A, Torres-Padilla M-E (2016) SUV4-20 activity in the preimplantation mouse embryo controls timely replication. *Genes Dev* 30: 2513–2526
- Fragkos M, Ganier O, Coulombe P, Méchali M (2015) DNA replication origin activation in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 360–374
- Gerhardt J, Jafar S, Spindler M-P, Ott E, Schepers A (2006) Identification of new human origins of DNA replication by an origin-trapping assay. *Mol Cell Biol* 26: 7731–7746
- Giri S, Prasanth SG (2015) Association of ORCA/LRWD1 with repressive histone methyl transferases mediates heterochromatin organization. *Nucl Acids Res* 43: 435–441
- Hahn M, Dambacher S, Dulev S, Kuznetsova AY, Eck S, Wörz S, Sadic D, Schulte M, Mallm J-P, Maiser A, Debs P, von Melchner H, Leonhardt H, Schermelleh L, Rohr K, Rippe K, Storchova Z, Schotta G (2013) Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev* 27: 859–872
- Hammerschmidt W, Sugden B (2013) Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a013029
- Hayashi S, McMahon AP (2002) Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244: 305–318
- Hoggard T, Shor E, Müller CA, Nieduszynski CA, Fox CA (2013) A link between ORC-origin binding mechanisms and origin activation time revealed in budding yeast. *PLoS Genet* 9: e1003798
- Jørgensen S, Elvers I, Trelle MB, Menzel T, Eskildsen M, Jensen ON, Helleday T, Helin K, Sørensen CS (2007) The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *J Cell Biol* 179: 1337–1345
- Jørgensen S, Schotta G, Sørensen CS (2013) Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res* 41: 2797–2806
- Koturbash I, Simpson NE, Beland FA, Pogribny IP (2012) Alterations in histone H4 lysine 20 methylation: implications for cancer detection and prevention. *Antioxid Redox Signal* 17: 365–374
- Kuo AJ, Song J, Cheung P, Ishibe-Murakami S, Yamazoe S, Chen JK, Patel DJ, Gozani O (2012) The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome. *Nature* 484: 115–119
- Leonard AC, Méchali M (2013) DNA replication origins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a010116
- Li Y, Armstrong RL, Duronio RJ, MacAlpine DM (2016) Methylation of histone H4 lysine 20 by PR-Set7 ensures the integrity of late replicating sequence domains in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 44: 7204–7218
- Liu J, Zimmer K, Rusch DB, Paranjape N, Podicheti R, Tang H, Calvi BR (2015) DNA sequence templates adjacent nucleosome and ORC sites at gene amplification origins in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 43: 8746–8761
- Lombraña R, Almeida R, Revuelta I, Madeira S, Herranz G, Saiz N, Bastolla U, Gómez M (2013) High-resolution analysis of DNA synthesis start sites and nucleosome architecture at efficient mammalian replication origins. *EMBO J* 32: 2631–2644
- McGuffee SR, Smith DJ, Whitehouse I (2013) Quantitative, genome-wide analysis of eukaryotic replication initiation and termination. *Mol Cell* 50: 123–135
- McKay DJ, Klusza S, Penke TJR, Meers MP, Curry KP, McDaniel SL, Malek PY, Cooper SW, Tatomer DC, Lieb JD, Strahl BD, Duronio RJ, Matera AG (2015) Interrogating the function of metazoan histones using engineered gene clusters. *Dev Cell* 32: 373–386
- Méchali M, Yoshida K, Coulombe P, Pasero P (2013) Genetic and epigenetic determinants of DNA replication origins, position and activation. *Curr Opin Genet Dev* 23: 124–131
- Oda H, Hübner MR, Beck DB, Vermeulen M, Hurwitz J, Spector DL, Reinberg D (2010) Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4 (Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage. *Mol Cell* 40: 364–376
- Palacios DeBeer MA, Muller U, Fox CA (2003) Differential DNA affinity specifies roles for the origin recognition complex in budding yeast heterochromatin. *Genes Dev* 17: 1817–1822

- Pannetier M, Julien E, Schotta G, Tardat M, Sardet C, Jenuwein T, Feil R (2008) PR-SET7 and SUV4-20H regulate H4 lysine-20 methylation at imprinting control regions in the mouse. *EMBO Rep* 9: 998–1005
- Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA (2008) Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 28: 468–486
- Picard F, Cadoret J-C, Audit B, Arneodo A, Alberti A, Battail C, Duret L, Prioleau M-N (2014) The spatiotemporal program of DNA replication is associated with specific combinations of chromatin marks in human cells. *PLoS Genet* 10: e1004282
- Pope BD, Gilbert DM (2013) The replication domain model: regulating replicon firing in the context of large-scale chromosome architecture. *J Mol Biol* 425: 4690–4695
- Pope BD, Ryba T, Dileep V, Yue F, Wu W, Denas O, Vera DL, Wang Y, Hansen RS, Canfield TK, Thurman RE, Cheng Y, Gülsoy G, Dennis JH, Snyder MP, Stamatoyannopoulos JA, Taylor J, Hardison RC, Kahveci T, Ren B et al (2014) Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* 515: 402–405
- Prioleau M-N, MacAlpine DM (2016) DNA replication origins—where do we begin? *Genes Dev* 30: 1683–1697
- Remus D, Diffley JFX (2009) Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr Opin Cell Biol* 21: 771–777
- Renard-Guillet C, Kano H, Shirahige K, Masai H (2014) Temporal and spatial regulation of eukaryotic DNA replication: from regulated initiation to genome-scale timing program. *Semin Cell Dev Biol* 30: 110–120
- Rhind N, Gilbert DM (2013) DNA replication timing. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5: a010132
- Ritzi M, Tillack K, Gerhardt J, Ott E, Humme S, Kremmer E, Hammerschmidt W, Schepers A (2003) Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci* 116: 3971–3984
- Sakaguchi A, Karachentsev D, Seth-Pasricha M, Druzhinina M, Steward R (2008) Functional characterization of the *Drosophila* Hmt4-20/Suv4-20 histone methyltransferase. *Genetics* 179: 317–322
- Saredi G, Huang H, Hammond CM, Alabert C, Bekker-Jensen S, Forne I, Reverón-Gómez N, Foster BM, Mlejnkova L, Bartke T, Cejka P, Mailand N, Imhof A, Patel DJ, Gorth A (2016) H4K20meO marks post-replicative chromatin and recruits the TONSL–MMS22L DNA repair complex. *Nature* 534: 714–718
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18: 1251–1262
- Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callén E, Celeste A, Pagani M, Opravil S, De La Rosa-Velazquez IA, Espejo A, Bedford MT, Nussenzweig A, Busslinger M, Jenuwein T (2008) A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev* 22: 2048–2061
- Shen Z, Sathyan KM, Geng Y, Zheng R, Chakraborty A, Freeman B, Wang F, Prasanth KV, Prasanth SG (2010) A WD-repeat protein stabilizes ORC binding to chromatin. *Mol Cell* 40: 99–111
- Siddiqui K, On KF, Diffley JFX (2013) Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a012930
- Smith OK, Aladjem MI (2014) Chromatin structure and replication origins: determinants of chromosome replication and nuclear organization. *J Mol Biol* 426: 3330–3341
- Smith OK, Kim R, Fu H, Martin MM, Lin CM, Utani K, Zhang Y, Marks AB, Lalande M, Chamberlain S, Libbrecht MW, Bouhassira EE, Ryan MC, Noble WS, Aladjem MI (2016) Distinct epigenetic features of differentiation-regulated replication origins. *Epigenetics Chromatin* 9: 18
- Takawa M, Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Kogure M, Yamane Y, Iwai Y, Maejima K, Ueda K, Masuda A, Dohmae N, Field HI, Tsunoda T, Kobayashi T, Akasu T, Sugiyama M, Ohnuma S, Atomi Y, Ponder BA, Nakamura Y et al (2012) Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer Res* 72: 3217–3227
- Tardat M, Murr R, Herceg Z, Sardet C, Julien E (2007) PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *J Cell Biol* 179: 1413–1426
- Tardat M, Brustel J, Kirsh O, Lefevbre C, Callanan M, Sardet C, Julien E (2010) The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 12: 1086–1093
- Valton A-L, Hassan-Zadeh V, Lema I, Boggetto N, Alberti P, Saintomé C, Riou J-F, Prioleau M-N (2014) G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators. *EMBO J* 33: 732–746
- Vermeulen M, Eberl HC, Matarese F, Marks H, Denissov S, Butter F, Lee KK, Olsen JV, Hyman AA, Stunnenberg HG, Mann M (2010) Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142: 967–980
- Wang Y, Khan A, Marks AB, Smith OK, Giri S, Lin Y-C, Creager R, MacAlpine DM, Prasanth KV, Aladjem MI, Prasanth SG (2016) Temporal association of ORCA/LRWD1 to late-firing origins during G1 dictates heterochromatin replication and organization. *Nucleic Acids Res* 45: 2490–2502

Appendix. Brustel J et al. Histone H4K20 tri-methylation at late-firing origins ensure timely heterochromatin replication.

Page 2 : Appendix Figure S1

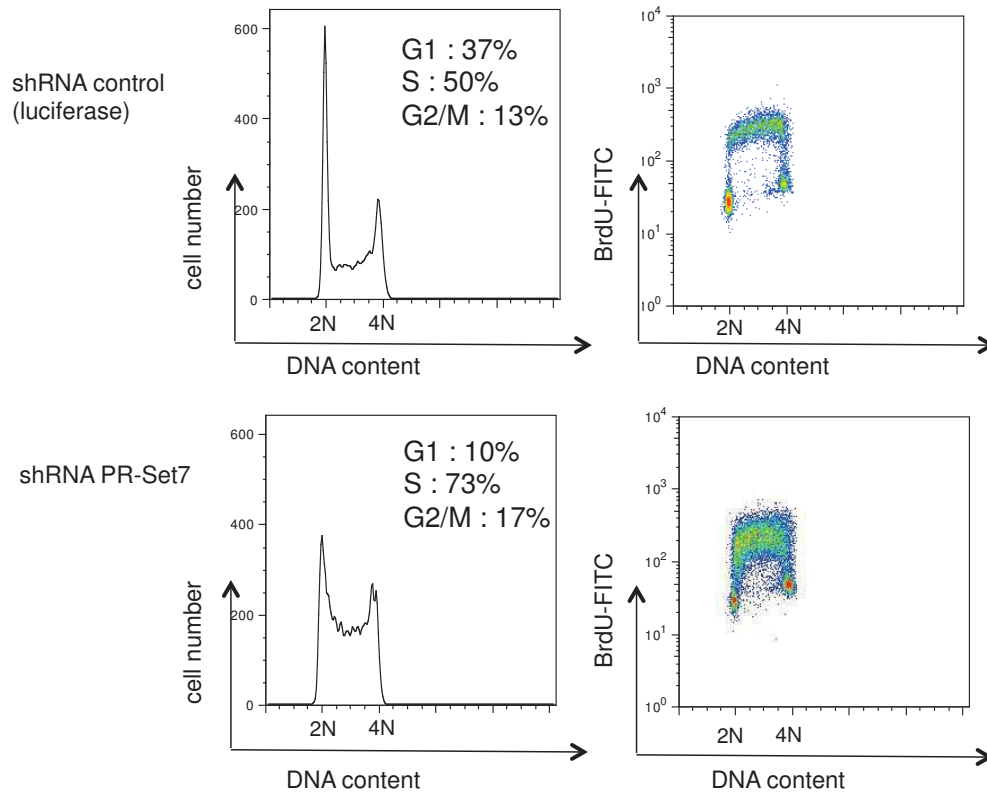
Page 3 : Appendix Figure S2

Page 4 : Appendix Figure S3

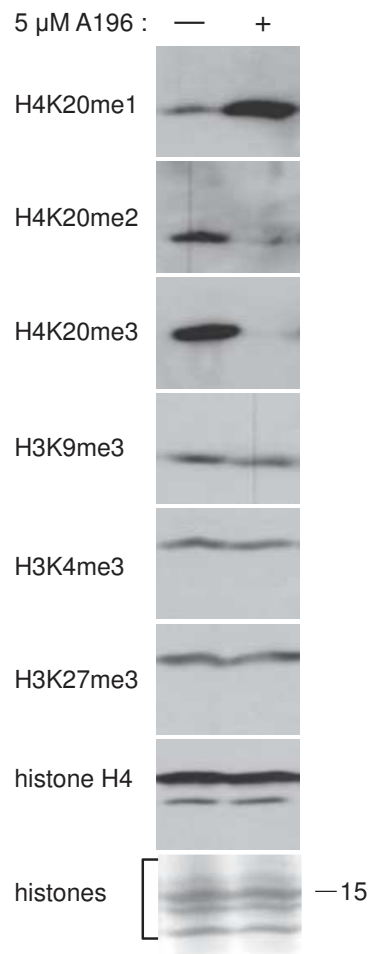
Page 5 ; Appendix table S1

Page 6 : Appendix table S2

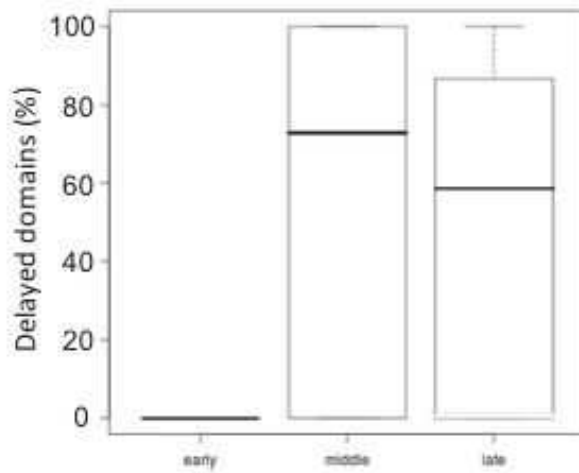
Page 7-10 : supplementary Material and Methods



Appendix Figure S1: PR-Set7 depleted U2OS cells accumulate in S-phase, indicating improper DNA replication. Cell-cycle analysis by FACS showing DNA content (7AAD, x-axis) versus cell number (left panel, y-axis) or versus BrdU incorporation (right panel, y-axis) three days after control (luciferase) and PR-Set7 shRNA expression. DNA replication was measured by treating control and PR-Set7 shRNA expressing cells with BrdU for 2h, followed by BrdU-specific and FITC-conjugated antibodies.



Appendix Figure S2 : Immunoblot analysis of H4K20me1, H4K20me2, and H4K20me3, H3K9me3, H3K4me3, H3K27me3 and histone H4 levels and SDS-page analysis of total histone levels (Coomassie staining) in EBNA1-expressing HEK293 cells untreated or treated with A-196 inhibitor during 6 days.



Appendix Figure S3 : Box-plot showing the percentage of delayed domains in each timing category in immortalized MEFs treated with shRNA (2) ORCA. Note the high percentage of delayed domains in mid and late categories, indicating a broader effect of ORCA depletion on replication timing program than the loss of Suv4-20h and H4K20 methylation in MEFs.

coverage genes			
T-test	t	degree of freedom	p_value
delayed vs early	-14.928	163.04	<2.2 ⁻¹⁶
delayed vs middle	-12.765	305.76	<2.2 ⁻¹⁶
delayed vs late	-7.8907	199.44	1.949E-13
delayed vs stocha	-6.0761	115.14	1.63E-8

coverage H3K27ac			
T-test	t	degree of freedom	p_value
delayed vs early	-44.942	770.77	<2.2 ⁻¹⁶
delayed vs middle	-14.042	783.05	<2.2 ⁻¹⁶
delayed vs late	-9.1731	596.31	<2.2 ⁻¹⁶
delayed vs stocha	-31.721	141.55	<2.2 ⁻¹⁶

coverage H3K9me2			
T-test	t	degree of freedom	p_value
delayed vs early	13.518	130.55	<2.2 ⁻¹⁶
delayed vs middle	-14.042	167.92	1.521E-015
delayed vs late	8.4551	139.17	3.39E-13
delayed vs stocha	11.321	114.18	<2.2 ⁻¹⁶

Appendix Table S1 : Values of different T-test associated with the figures 4E, 4F, and 4G. The table shows are the statistical value of the T-test (t), the degree of freedom and the p-value. T-test were performed with R program version 3.2.3

ORIs	start	end	ORI location	primers	
ORI1-ND	82505263	82505426	chr11:82505263-82505426	CCTAAACCTGCTCTGCTAAGG	GGCACAGATAGGTCAACACA
ORI2-ND	82646414	82646774	chr11:82646414-82646774	CCATGCCAAGGTATCTCTTCTC	CTCTCCCTCTCTGTCTTTCT
ORI3-ND	82684108	82684567	chr11:82684108-82684567	ATCCCAAACCTCCCATCTAACC	GGAAGGATGCATTTCTGTAGGA
ORI4-ND	82685667	82686187	chr11:82685667-82686187	CCTTCTCTGCTCTGCTTATT	GACAATGTTGGTGCCTCAAAG
ORI5-ND	71274933	71275606	chr11:71274933-71275606	GAGGGTGAGGAAAGAGACAAATAG	TTCTCCCATCCATTGTGCTTAG
ORI6-ND	71243973	71244400	chr11:71243973-71244400	CAGAGGTGGTAACCTCAGAAAG	TGGCAAGACAGAAGAGATGAAG
ORI7-ND	71196358	71199261	chr11:71196358-71199261	CGAGCGGAAGGAGCTTAATAAT	GTGACAGTTTGCCTCTGATCT
ORI8-ND	67017089	67017576	chr11:67017089-67017576	CAGCATCAGCCATGTTCTTTG	GTGACTCCTTGCTGTCTTAG
ORI9-ND	66958207	66958903	chr11:66958207-66958903	TTTCAGCTGGATCCCAATAGAC	GAACCCAAACTCGAGATGA
ORI10-ND	66775679	66776129	chr11:66775679-66776129	GCAGTGTGGATGAAATGATCTG	GTGCTTTGCCCTCCTACTT
ORI11-ND	66519315	66519914	chr11:66519315-66519914	CCTGTACCTGGCATGGTTT	GCATAGCACCGTATCCCTAATG
ORI12-ND	65981038	65981586	chr11:65981038-65981586	ACCAAATCGCCTCCTTCTAAAC	CAAGGGCCAAGGACAAGAAA
ORI13-ND	65849784	65850098	chr11:65849784-65850098	GCACACTTCTCCCTCATAAA	GTCTGTCTCACATTCGATCTCC
ORI14-ND	64878087	64878780	chr11:64878087-64878780	TCCCAGAGTCTCCTGTTGATAC	CCTGCTCTCCGTGCAATAA
ORI1	91364840	91365042	chr11:91365072-91367583	CTTACACAGCAAGCCCTAGAC	AGCAACATAGACCACCTTCAC
ORI2	91473274	91473511	chr11:91472486-91474388	AGGCAGTGCTAAGTGTATGG	CACAGCCTTCTGACCTGTTTA
ORI3	91998063	91998271	chr11:91997085-91999288	CTGGGAGGAGATGAACTTAGAC	CATCACTGCCTCTCCATCT
ORI4	92655589	92655885	chr11:92655064-92656805	CAGCTGGGAGTGCCATTTAG	TGACTGGGAAGGGACTTGTA
ORI5	66782899	66783024	chr12:66782899-66783024	GTATGAGTGGCAGAGAGAATCG	AGTCAACCACCGAACATATCC
ORI6	39984698	39985795	chr17:39984698-39985795	CAGCTGGGAGTGCCATTTAG	TGACTGGGAAGGGACTTGTA
ORI7	21419636	21419959	chr18:21419636-21419959	CGGCAAGCCAGAGAACAATA	GGTAGCATGTCACCTAATCA
ORI8	114481978	114482092	chr7:114481978-114482092	TGAAGCGTCTGATGTGTCTG	TCCGATTGCCTCTGGATAAC
ORI9	114482109	114482238	chr7:114482109-114482238	GGGAACCCATTAGGAAGCTATT	AGATGATCCACCTCATCTAGA
ORI10	86061118	86061443	chr13:86061118-86061443	CTCACCCACGCACAATGATA	GAAGTACGGTATGCTAGAAGG
ORI11	21106191	21106716	chr18:21106191-21106716	GCTATGGGTTGGCGATTAC	CCTGGGTGTGATCCAAGAAA
ORI12	27074390	27074715	chr6:27074390-27074715	TGAACTGGTTGCATTGCTTATG	GCTATGTTGCTCCTCCATTA
ORI13	64963191	64963691	chr6:64963191-64963691	ACAGTGTGAGAACCCCAAG	GGTGTCACTCGTTCTCTGAATAG
ORI14	67147836	67148711	chr7:67147836-67148711	CAACACCCGAGAAATGACAAAG	CGCCATTGTGAGGATCTGTAA
ORI CTRL	618166046	61816497	chr15:6181660461816497	TTCTGTTTTCCCAGCCTTA	TCGGCTGAAGTGTGTTCTTG
ORI CTRL	82131951	82131972	chr11:8213195182131972-	CTCGCCTTCTCATGGATTCA	GGACAGTGTGAGTTACGGAAGGT

Appendix Table S2 : coordinates in mm9 and primer sequences used to analyze the different late-firing replication origins in MEF models.

Supplementary Materials and Methods:

Detailed ChIP-qPCR experiments. ChIP experiments with MEFs^{364.2} were performed as described previously (Tardat et al., 2010). Cells were fixed with 1% formaldehyde (10 min) and quenching was done with 125 mM Glycine. After a PBS wash, cells were resuspended in lysis buffer (10min, 4°C). After sonication with a vibra Cell (Bioblock) to obtain chromatin fragments less than 800 bp, ChIP was performed with 200 µg of sheared chromatin incubated with protein G magnetic beads (Invitrogen) coupled with the appropriate antibody as follows: anti-GAL4 (Santa Cruz), anti-Flag M2 (Sigma), anti-H4K20me1 (Diagenode) and anti-H4K20me3 (Abcam). ChIP experiments were performed at least three times from independent chromatin preparations and quantitative PCR analyses of ChIP DNAs were performed using a SYBR green quantitative PCR kit (Invitrogen) and a light cycler 480 II (Roche) under conditions standardized for each primer set. The amount of DNA in ChIP samples was extrapolated from standard curve analysis of chromatin DNA before immunoprecipitation (input) and values were represented as a percentage of input chromatin.

CHIP-qPCR on EBV episomes was performed with transfected HEK293 EBNA1⁺ cell lines. Cells were resuspended in PBS (per 2×10^7 cells) and fixed with 1% of methanol-free formaldehyde (Thermo Scientific) for 5 minutes on a roller at room temperature. The cross-linking reaction was then quenched with glycine (1.25 M) and incubated for another minute on the roller. After washing once with PBS and once with PBS 0,5% NP-40, cells were resuspended in PBS containing 10% glycerol, pelleted and snap frozen in liquid nitrogen. For plasmid ChIP analysis, cells were thawed on ice and resuspended for lysis in LB3+ buffer (25 mM HEPES (pH 7,5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC, 0,25% Triton-X-100, containing protease inhibitor cocktail (Roche)) to a final concentration of 2×10^7 cells/ ml. Sonication was performed for 20 min using the Covaris S220 with the settings 150W, 200 cycles/burst, 20% duty cycle at an average temperature of 5°C. After sonication,

sheared chromatin was pre-cleared with protein A beads for 2h, and incubated 16h at 4°C, with the appropriate antibody: anti-GAL4 (Santa Cruz Biotechnologies, sc-577), anti-H4K20me1 (Diagenode, MAb-147-100), anti-H4K20me3 (Diagenode, pAB-057-050), anti-MCM3 (Ritzi et al., 2003). BSA-blocked protein A beads were then added and incubated for at least 4h, and then sequentially washed with RIPA-150 mM NaCl, RIPA-300 mM NaCl, LiCl buffer (250 mM LiCl, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% NP-40, 50 mM Tris (pH 8.0) and finally twice in TE (pH 8.0) buffer. Immunoprecipitated chromatin fragments were eluted from the beads by shaking for 10 min at 65°C with 100µl of TE and 1% SDS. The elution was treated with RNase A for 2h at 37°C and with proteinase K at 65°C for 16h. DNA was purified using the NucleoSpin Extract II Kit according to manufacturer's instructions. Quantitative PCR analysis was performed using the Roche LightCycler 480 System and the SYBR Green I Master (Roche) according to the manufacturers instructions. Amplification was performed using the standard program and an annealing temperature of 60°C. The primer pairs for FR, UAS and ORI-RDH sequences are available in supplementary Table 1. Quantitative PCR values were calculated as described above and represented as fold enrichment relative to isotype IgG control.

Detailed Replication timing analysis. 30×10^6 MEFs^{364.2}, untreated and 4OHT-treated, were incubated with BrdU for 2 hours before ethanol fixation. After centrifugation, fixed cells were suspended in DPBS with RNase A (0.5 mg/ml) and propidium iodide (50 µg/ml) for 30 min at room temperature. 100,000 cells were sorted into two fractions, S1 and S2, using INFLUX 500 (Cytocpeia BD Biosciences) corresponding to Early and Late S-phase fractions respectively. Cells in each fraction were suspended in a lysis buffer (50mM Tris pH=8, 10mM EDTA, 300mM NaCl, 0.5% SDS, and 0.2mg/ml of Proteinase K) and neo-synthesized DNA was immuno-precipitated with BrdU antibodies (Anti-BrdU Pure, BD Biosciences, # 347580). The quality of enrichment of early and late fractions in S1 and S2 was performed by qPCR with CAV2 oligonucleotides (early control) and with bgGRM8 oligonucleotides (late control) as

described previously (Hadjadj et al., 2016). Whole genome amplification was conducted (WGA, Sigma) to obtain the amount of DNA (500 ng) required for microarray hybridization. To verify that this step did not introduce bias, a post WGA qPCR was performed to confirm the specific enrichment in both the S1 and S2 fractions. After amplification, early and late neo-synthesized DNAs were labeled with Cy3 and Cy5 ULS molecules (Genomic DNA labeling Kit, Agilent) as recommended by the manufacturer. The hybridization was performed according to the manufacturer's instructions on 4x180K mouse microarrays (SurePrint G3 Mouse CGH Microarray Kit, 4x180K, AGILENT Technologies, reference genome: mm9) that covers the whole genome with one probe every 13Kb (11 Kb in RefSeq sequences). Microarrays were scanned with an Agilent High-Resolution C Scanner using a resolution of 2 μ m and the autofocus option. Feature extraction was performed with the Feature Extraction 9.1 software (Agilent technologies). Analysis was performed with the Agilent Genomic Workbench 5.0 software. The \log_2 -ratio timing profiles were smoothed using the Agilent Genomic Workbench 5.0 software with the Triangular Moving Average option (500 kb windows).

To determine the replication domains in different conditions, algorithms from CGH applications in the Agilent Genomic Workbench 5.0 software were used, particularly the aberration detection algorithms (Z-score with a threshold of 1.8) that define the boundaries and magnitudes of the regions of DNA loss or gain corresponding to the late and early replicating domains respectively. Then, a comparative analysis of replication domains was performed between the different cellular conditions, in order to determine DNA segments with significant replication timing changes. A Student test (T-Test) was performed on the average of the Log^2 values of every domains with R program 3.2.3 and significant difference is annotated when p-value $< 10^{-3}$. The intersection with different data sets was performed with GALAXY tools and T-test was performed to identify significant differences. The microarray data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) (accession no. GSE69084). Positions of genes used for gene coverage come from RefSeq mm9. Positions of H3K27ac peaks used for

coverage come from GSM1631248 (GEO database). Positions of H3K9me2 peaks used for coverage come from GSM887877 (GEO database).

Plasmid replication assay. GFP-positive reporter plasmids (1 μ g) were transfected into HEK293 EBNA1⁺ cell line stably expressing the respective GAL4-fusion protein using Lipofectamine2000 (Life technologies) according to manufacturers instructions. Transfections with comparable efficiencies were verified by visualizing GFP-positive cells. Six days post-transfection, cells were harvested according to the HIRT protocol. After washing with PBS, cells were first equilibrated in 10 ml of TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). Cells were then diluted in 1.5 ml of TEN buffer and an equal volume of 2xHIRT buffer (1,2% SDS, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM EDTA) was then added for cell lysis. The lysate was then incubated at 4°C for 16h, in the presence of 1.25 M NaCl. After centrifugation (2000xg) for 1h at 4°C, DNA was purified by phenol-chloroform extraction and digested with 40 U *DpnI* (NEB) in presence of RNase (Roche). Digested DNA (300 ng) was electroporated into Electromax DH10B competent cells (Invitrogen) and ampicillin-resistant colonies, representing the number of recovered plasmids, were counted. The FR-DS plasmid was always transfected in parallel and the number of resulting colonies was used for normalization. Statistical analysis of replication efficiency was performed using paired students T-test.

II. LA VOIE DE METHYLATION H4K20 REGULE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE

**1. ARTICLE 2: CHROMATIN COMPACTION LIMITS DNA REPLICATION
LICENSING TO PROMOTE GENOME STABILITY.**

Muhammad Shoaib, David Walter, Peter J. Gillespie, Birthe Fahrenkrog, Fanny Izard, David Lleres, Eric Julien, J. Julian Blow, Claus S. Sorensen

Manuscrit en preparation, 2017

1.1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

La fonction de la voie H4K20 dans la réplication implique donc une mono-méthylation par PR-Set7 au niveau des origines permettant la fixation des protéines ORC (Tardat et al., 2010). Cette mono-méthylation sera convertie en di- et tri-méthylation H4K20 sur les origines tardives hétérochromatiniennes par les Suv4-20h. La tri-méthylation H4K20 sert ensuite de site de fixation pour ORCA/LRWD1 (Brustel et al., 2017) qui va permettre de stabiliser les protéines ORCs aux origines (Wang et al., 2017) et donc de stimuler leur activation et leur efficacité. La liaison des protéines ORCs à la chromatine est donc largement déterminée par la méthylation H4K20. Etant donné que la fixation des protéines ORCs est aussi favorisée par l'accessibilité de la chromatine (Vorobyeva et al., 2013) et le rôle de plus en plus décrit de la voie de méthylation H4K20 dans la structure de la chromatine, on peut se demander si la voie H4K20 pourrait, en régulant la structure de la chromatine, contrôler la fixation des protéines ORC sur les origines de réplication. Pour confirmer cette hypothèse, il s'est agi, en collaboration avec l'équipe de Claus S Sørensen, de déterminer l'impact de la compaction de la chromatine sur le processus de licensing en G1 et de déterminer le rôle de la voie de méthylation H4K20 dans ce processus. De façon plus générale, cet article (Article 2, Shoaib et al.,) démontre l'impact de la structure de la chromatine en G1 sur la progression du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité génomique.

1.2. PRINCIPAUX RESULTATS

Dans un premier temps cette étude a consisté à montrer, par des approches de déplétion de PR-Set7 et d'immunofluorescence, que la déplétion de PR-Set7 entraîne l'apparition de dommages ADN avant même le début de la réplication (Figure 1). Ainsi, PR-Set7 est indispensable au maintien de l'intégrité génomique à la sortie de mitose et en G1 avant l'entrée en phase de réplication. La déplétion de PR-Set7 conduit de plus à une décompaction de la chromatine en sortie de mitose, observée en microscopie électronique à transmission et sur cellules vivantes grâce à un système d'analyse quantitative de la compaction de la chromatine par FRET/FLIM (Figure 2). Est-ce que les phénotypes d'apparition de dommages ADN et de décompaction de la chromatine sont liés ? Pour répondre à cette question nous nous sommes demandé si la création artificielle de chromatine compacte pouvait contrebalancer la perte de PR-Set7 et empêcher l'apparition de dommages ADN. En effet, le traitement au sucrose et la surexpression de RNF2, décrits pour entraîner une compaction de la chromatine, suppriment les dommages ADN consécutifs à la perte de PR-Set7 (Figure 2). Ces résultats suggèrent que la fonction de PR-Set7 dans le maintien de l'intégrité génomique en G1 dépend de son activité de régulation de la structure de la chromatine. De façon intéressante, ce phénotype de décompaction s'accompagne d'une augmentation de la liaison des protéines du pre-RC (ORC et MCM) à la chromatine qui est contrecarrée par un traitement au sucrose (Figure 3). Ce résultat valide l'hypothèse selon laquelle le niveau de compaction de la chromatine influence le licensing des origines de réplication. Le processus de réplication nécessite par la suite une activation des protéines MCM qui vont dérouler le double brin d'ADN et conduire à l'apparition d'ADN simple brin. Les auteurs ont pu montrer que la perte de PR-Set7, qui entraîne une augmentation du recrutement des MCM à la chromatine, s'accompagne, de plus, de l'apparition d'ADN simple brin, qui est encore une fois contrecarrée par l'ajout de sucrose (Figure 4). Ainsi, la compaction de la chromatine limite la liaison des composants du pre-RC à la chromatine et donc prévient l'apparition anormale d'ADN simple brin. Enfin, la déplétion partielle des MCM ou le traitement avec un inhibiteur de DDK (responsable de leur activation) empêche cette apparition d'ADN simple brin et de dommages ADN suite à la perte de PR-Set7 (Figure 5). La structure de la chromatine, largement régulée par la voie H4K20, est donc déterminante pour un recrutement et une activation correcte des composants du pre-RC.

Chromatin compaction limits DNA replication licensing to ensure genome integrity

Muhammad Shoaib^{1§}, David Walter^{1§}, Peter J. Gillespie², Birthe Fahrenkrog³, Fanny Izard⁴, David Lleres⁵, Eric Julien⁴, J. Julian Blow², Claus S. Sørensen^{1*}

Affiliations

¹ Biotech Research and Innovation Centre (BRIC), University of Copenhagen, Ole Maaløes Vej 5, 2200 Copenhagen N, Denmark.

² Centre for Gene Regulation & Expression, School of Life Sciences, University of Dundee, Dow Street, Dundee DD1 5EH, UK.

³ Institute for Molecular Biology and Medicine, Universite Libré de Bruxelles, Charleroi, Belgium.

⁴ Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194, University of Montpellier Institut régional du cancer (ICM), F-34298, France

⁵ Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM), CNRS UMR5535, University of Montpellier, F-34293, France

§ These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: Email: claus.storgaard@bric.ku.dk

Summary

DNA replication is tightly regulated to maintain genome stability, however, the interplay between chromatin structure and DNA replication is poorly understood. Here, we show that chromatin structural dynamics ensure genome integrity by limiting replication licensing upon exit from mitosis. Excessive chromatin relaxation is prevented by SET8-dependent methylation of histone H4 on Lysine 20 as well as by histone deacetylase activity. Thus, in the absence of SET8 or when histone deacetylases are inhibited, substantial chromatin decompaction permits aberrant loading of the Origin recognition complex

(ORC) followed by excessive loading of the CDC45-MCM-GINS (CMG) helicase; under these conditions CMG promotes single-stranded DNA formation and DNA damage. Restoring chromatin structure suppresses both excess licensing and the loss of genome integrity. Taken together, we unravel a mechanism, whereby SET8 and HDAC activities control chromatin structure relaxation to suppress excessive detrimental replication licensing at the exit of mitosis.

Introduction

Chromatin is organized into repeating arrays of nucleosomes consisting of DNA wrapped around an octamer of histone molecules. The spatial

organization of chromatin is complex and depends on intra- and inter-nucleosomal interactions and the presence of additional chromatin proteins (Luger et al., 2012). This can create several layers of chromatin folding and compaction that has profound impact on the regulation of DNA-based cellular processes, such as transcription, replication and repair (Bannister and Kouzarides, 2011; Rothbart and Strahl, 2014; Woodcock and Ghosh, 2010). The composition of nucleosomes, post-translational modifications (PTMs) of histones and shifts in nucleosome positioning ensure the stability and dynamics of chromatin structure in this regard (Campos and Reinberg, 2009; Segal and Widom, 2009). Numerous changes in histone PTMs and histone variants can significantly alter the chromatin compaction landscape by creating local and pan-nuclear (global) chromatin higher-order structures, which in turn define nuclear functions. Histone acetylation, in particular, by disrupting electrostatic interactions between histones and DNA, has the potential to create a less compact chromatin structure. Hyper-acetylated histones thereby make DNA more accessible to protein machineries that use DNA as a template (Bannister and Kouzarides, 2011).

The chromatin structure in proliferating cells is very dynamic, being highly compact during mitosis and adopting a relatively more open conformation in interphase. This is critically important for the two fundamental events occurring in dividing cells, DNA synthesis and mitosis, which are strongly influenced by several determinants of chromatin structure, including histone PTMs, nucleosome remodeling activities and higher order organization of chromatin (Donaldson, 2005; Hayashi and Masukata, 2011; MacAlpine and Almouzni, 2013). Faithful duplication of DNA during S-phase and unperturbed cell division during mitosis are essential for the

maintenance of genome stability (Ishikawa et al., 2006; Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013), however, it is not well understood how chromatin organization ensures the fidelity of these processes to safeguard genome integrity.

Eukaryotic DNA replication is initiated from multiple origins that are tightly regulated to promote precise genome duplication specifically once in every cell cycle (Fragkos et al., 2015; Nordman and Orr-Weaver, 2012). To accomplish this, replication initiation is temporally separated into discrete steps during the cell cycle. First, binding of the six subunit origin recognition complex (ORC) to chromatin in late mitosis and early G1 defines the position of future replication origins. Then, during ‘replication licensing’, ORC, together with CDC6 and CDT1, load a double hexameric MCM2–7 complex onto DNA to form the pre-RC complex, ‘licensing’ these sites to act as replication origins (Frigola et al., 2013; Remus et al., 2009). MCM2–7 is considered the molecular motor of the replicative helicase and remains inactive in G1 phase (Remus et al., 2009; Yeeles et al., 2015). The activation of the pre-RC complex by the combined action of two kinases, CDK and the Dbf4-dependent protein kinase (DDK) marks the start of S phase. These kinases directly target the MCM2–7 double hexamer and additional factors involved in the loading of CDC45 and the GINS complex into a pre-initiation complex (pre-IC) that precedes activation of the MCM2–7 helicase (Sheu and Stillman, 2006; Yeeles et al., 2015). DDK and CDK activate MCM2–7 helicase locally at origins throughout S phase, implementing a highly orchestrated replication-timing program with some origins firing early while others later in the S phase (Fragkos et al., 2015).

In multicellular organisms, the requirement of specific DNA sequences for ORC loading is

unclear, suggesting that ORC localization is regulated by other determinants, most notably chromatin environment (Aladjem, 2007; MacAlpine and Almouzni, 2013). ORC has previously been shown to bind several histone modifications (Bartke et al., 2010; Kuo et al., 2012), which could promote licensing. However, ORC binding sites frequently overlap with nucleosome-depleted regions, suggesting that licensing and the selection of replication origins in metazoans might be regulated by changes in chromatin accessibility occurring during the transition from mitosis to G1 (Lubelsky et al., 2014; MacAlpine et al., 2010). To address this issue, we have investigated how chromatin structure impacts cell cycle progression and genome maintenance upon exit from mitosis. We discovered that regulated chromatin compaction suppresses replication licensing in G1 phase. Chromatin structure dynamics in early G1 phase is orchestrated by histone H4 lysine 20 monomethyltransferase (H4K20me1), SET8, as well as histone deacetylase activity. Together, our results uncover a key role of chromatin structure in limiting DNA replication licensing to promote genome integrity.

Results

Genome integrity correlates with chromatin dynamics in cells exiting mitosis

Chromatin packages the genome in a compact form within the eukaryotic nucleus. As cells exit mitosis, condensed chromatin undergoes relaxation to facilitate DNA-based processes. We hypothesized that cell cycle regulated changes in chromatin structure are actively controlled to support major cellular functions, including ensuring genome integrity. To test this hypothesis, we exposed human cells to chromatin-perturbing conditions upon exit

from mitosis. This was achieved by either inhibiting histone deacetylases or by depleting SET8, the enzyme responsible for monomethylation of histone H4 on lysine 20 (H4K20me). Both activities are linked with organizing chromatin compaction status and safeguarding genome integrity (Houston et al., 2008; Jorgensen et al., 2011; Lee et al., 2010; Tardat et al., 2010). To this end, U2OS cells were first synchronized with a double thymidine block, treated with SET8 or control siRNA, for 6 hours during the block and then released from the G1/S transition before analysis for cell-cycle progression and the potential presence of DNA damage (Figure 1A). To monitor genome integrity status, cells were subjected to flow cytometry with immunostaining for γ H2A.X, a marker of DNA damage, as well as neutral COMET assays and pulse field gel electrophoresis (PFGE) to directly measure DNA doublestrand breaks. Our data revealed that cells lacking SET8 and H4K20me1 display DNA damage upon mitotic exit, which accumulates as cells progress through G1 phase, as evidenced by FACS profiles of γ H2A.X positive cells and DNA double strand breaks on PFGE and neutral COMET assay (Fig. 1B, 1C, 1D, 1E and 1F and Figures S1A, S1B, S1C and S1D). Secondly, we employed HDACi, which represent a well-studied tool to induce genome-wide chromatin relaxation (Ricci et al., 2015; Toth et al., 2004) in a similar experimental setup as for SET8 (Figure 1A). Our results revealed that treatment of synchronized U2OS cells with two different HDACi, i.e., Trichostatin A (TSA) and Panobinostat (PS), leads to DNA damage (Fig. 1E-G) that is reminiscent of DNA damage we observed in the absence of SET8 (Figures 1B, 1C and 1D and Figure S1D). Taken together, these results indicate that SET8 and HDAC enzymes are crucial for maintaining genome integrity in cells upon entering G1 phase.

To further investigate the temporal appearance of DNA damage, we immunostained cells for γ H2A.X together with Cyclin A, a cell-cycle regulatory protein that is present in low-abundance in G1 and early S phase. Notably, γ H2A.X positive cells were found to be Cyclin A negative suggesting that loss of genome integrity upon loss of SET8 is not paralleled with S-phase progression (Figures S1E and S1F). Likewise, in the case of HDACi treated cells, γ H2A.X positive cells were negative for Cyclin A (Figures S1G and S1H) confirming that the challenge to genome integrity arises in non-replicating cells. Furthermore, we observed significantly lower chromatin levels of the replication proteins PCNA and Pol α in cells depleted for SET8 (Figure S2A). Consistent with this finding, the immunofluorescence analysis of cells exiting mitosis without SET8 revealed a γ H2A.X staining in cells with low nuclear PCNA staining (Figure S2B). Moreover, we noticed significantly reduced EdU incorporation in SET8 depleted cells as compared to control cells (Figures S2C and S2D) and γ H2A.X positive cells were also found to be negative for EdU staining compared to cells treated with a control siRNA (Figure S2E). To verify that DNA damage upon loss of SET8 is not a consequence of improper mitotic progression, we synchronized U2OS cells using double thymidine block, as previously (Figure 1A) and trapped cells in mitosis using nocodazole (Figure S3A). Cells were then released from the mitotic arrest and analyzed for appearance of DNA damage at regular intervals. Our results showed that both control and SET8 depleted cells go through mitosis and enter G1 phase without any delay. SET8 depleted cells, however, accumulated γ H2A.X signals upon mitotic exit (Figure S3B). We also depleted SET8 in serum starved G0 phase NIH-3T3 untransformed fibroblasts (Figure S3C). Notably, FACS analysis revealed that cells were

released from G0 and passed through G1, S, G2 and M phases without apparent delay and only accumulated DNA damage during the next cell cycle (Figure S3D). Overall, these results suggest that cells require SET8 to maintain genome integrity when they exit mitosis and enter G1 phase prior to bulk DNA replication in the subsequent S phase.

In order to verify the role of the methyltransferase activity of SET8 in maintaining genome integrity, we transiently over-expressed HA-tagged versions of either wild type SET8 or catalytically dead mutant SET8 in U2-OS cells. Our results revealed that the challenge to genome integrity could be rescued by expressing the wild type but not the methyltransferase dead mutant version of SET8 (Figures S4A and S4B). Thus confirming that SET8 methyltransferase activity is critical for the maintenance of genome integrity.

Genome integrity is dependent on regulated chromatin compaction

Next, we aimed to study the causal relationship between global chromatin structure alteration and genome integrity in cells exiting mitosis. Given that HDACs are crucial for chromatin structure, we reasoned that SET8 could play a similar role, a notion supported by earlier work suggesting a role of SET8 in chromatin compaction (Centore et al., 2010; Jorgensen et al., 2011; Oda et al., 2009). Hence, we assayed for chromatin structural alterations in the absence of SET8. Firstly, we employed transmission electron microscopy analysis of G1 phase nuclei of siRNA control and SET8 treated cells using the same experimental setup as described earlier (Figure 1A). We observed a reduction in chromatin density throughout the nucleus and in particular a decrease in the amount of heterochromatin associated with the nuclear envelope in SET8 depleted cells, suggesting alterations in the architecture of

chromatin upon loss of SET8 (Figures 2A and 2B). To further explore chromatin compaction status, we performed quantitative analysis of chromatin compaction at the scale of nucleosome arrays using a FLIM-FRET (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy-Förster Resonance Energy Transfer) approach in live cells. To this end, histone H2B tagged to either enhanced green fluorescent protein (EGFP) or mCherry fluorescent protein was stably expressed at low levels in U2OS cells. Thus, FRET can occur between fluorescent protein-tagged histones on separate nucleosomes and is increased when chromatin compacts (Lleres et al., 2009). Cells were synchronized with single thymidine block at the G1/S transition and FRET signal was detected and spatially analyzed before and after release from the block. Control and SET8 depleted cells showed similar compaction profiles as judged by the FRET map at the time of release from thymidine (at the G1/S boundary) (Figures 2C and 2D and Figures S5A and 5B). In contrast, we observed a significant reduction in the levels of FRET signal in SET8 depleted cells after exiting mitosis, indicating a major reduction in chromatin compaction of these cells compared to control cells (Figures 2C and 2D). Altogether these results indicate a major role for SET8 in securing appropriate chromatin compaction.

We then hypothesized that chromatin compaction status ensures genome integrity. To test this we investigated if the genome integrity phenotype could be rescued by inducing global chromatin compaction. We employed two different methods, using both biochemical and biophysical means, to alter global chromatin structure and induce chromatin compaction. First, we made use of hyperosmolar medium, which has been shown previously to induce molecular crowding and thereby promote highly reversible chromatin compaction (Albiez et al., 2006; Richter et al.,

2007). Addition of sucrose-based hypertonic medium provoked a more compact chromatin in control and SET8 depleted U2OS cells (Figure S5C). In a similar experimental setup as described earlier (Figure 1A), we incubated synchronized U2OS cells either depleted of SET8 or treated with HDACi (TSA) in sucrose-based hyperosmolar medium at a time corresponding to late stages of mitosis. In line with our hypothesis, addition of sucrose-based hypertonic medium can suppress DNA damage in cells either lacking SET8 or treated with HDACi (TSA) (Figures 2E and 2F and Figures S5D and S5E).

Secondly, we overexpressed RNF2, an E3 ubiquitin ligase and a component of the PRC1 complex, which was previously shown to compact chromatin independent of its ubiquitin ligase activity (Eskeland et al., 2010). As expected, overexpression of RNF2 provoked a more compact chromatin in control and SET8 depleted U2OS cells (Figure S5C). Similar to sucrose treatment, mCherry-RNF2 significantly suppressed the challenge to genome integrity upon SET8 depletion or treatment with TSA (Figures 2G and 2H and Figures S5F and S5G). In order to rule out the possibility that the cells with reduced γ H2A.X signal after RNF2 transfection were not delayed in previous G2/M phase, we co-stained cells with Cyclin A, a marker of mid to late S and G2 phases. The results showed that γ H2A.X positive cells are negative for Cyclin A indicating either G1 or early S phase status (Figure S5H). Taken together, these results suggest that maintenance of genome integrity in cells progressing through G1 phase depends on the degree of chromatin compaction.

Chromatin compaction restricts excessive loading of licensing proteins

During late mitosis and early G1 phase of the cell cycle, the six-subunit origin recognition complex (ORC), together with CDC6 and CDT1, loads the

replicative helicase complex MCM2–7 onto DNA, a process also termed as pre-RC formation or replication licensing (Boos et al., 2013; Gillespie et al., 2001; Yeeles et al., 2015). To determine whether the degree of chromatin compaction influences the replication licensing process, we first examined by immunofluorescence the nuclear staining of ORC1 and MCM2 proteins in synchronized U2OS cells depleted of SET8 or treated with TSA. Cells were pre-extracted with buffer to remove soluble proteins prior to fixation and antibody staining procedure. This approach revealed increased nuclear abundance of these pre-RC proteins compared to control cells (Figures 3A, 3B, 3C, 3D, and 3E and Figures S6A and 6B). Similarly, an increase in the chromatin loading of replication proteins was observed in G1 cells depleted for SET8 by immunoblot analysis of chromatin-enriched protein fractions (Figure 3F and Figure S6C).

Since, ORC1 has previously been shown to bind to H4K20me2 through its BAH domain (Kuo et al., 2012), we asked if H4K20me2 is affected in our experimental setup after SET8 depletion. Our results indicated that H4K20me2 is not affected after SET8 depletion (Figure 3G). H4K20me2 is the most abundant histone modification and an estimated 80% of all nucleosomes contain at least one histone H4K20me2 (our unpublished data, (Schotta et al., 2008)). Thus, short term SET8 depletion does not markedly affect the global levels of H4K20me2 suggesting that changes in ORC1 nuclear distribution (Figure 3G) is mediated by other chromatin structure alterations. Consistent with this hypothesis, an increase in ORC1 staining was also observed for cells treated with TSA in a similar experimental setup (Figure 3D). To determine whether the increased chromatin loading of the replicative helicase MCM2–7 complex is caused by alterations in the levels of chromatin

compaction, we added sucrose-based hypertonic medium to induce chromatin compaction. Our data revealed that MCM loading is significantly restricted in a more compact chromatin environment (Figure 3H and Figures S7A, S7B, S7C, and S7D). This result supports our hypothesis that chromatin compaction status influences regulation of replication licensing.

Chromatin structure limits unscheduled ssDNA formation

The pre-RC remains inactive until cells reach the G1/S transition, when it becomes an active helicase complex termed CMG, named after its components CDC45, MCM2–7 and the GINS complex (Siddiqui et al., 2013; Yeeles et al., 2015). Consequently, we investigated the phosphorylation of MCM2 on serine 53 by Cdc7/Dbf4-dependent kinase (DDK), which is thought to be an essential step in the activation of the CMG replicative helicase (Tenca et al., 2007; Tsuji et al., 2006). DDK dependent MCM2 phosphorylation is temporally regulated and generally occurs at the G1/S boundary and coincides with the initiation of DNA replication (Tsuji et al., 2006). Most interestingly, we found that the phosphorylation of MCM2 on serine 53 is markedly increased in cells lacking SET8 or treated with TSA (Figures S8A, S8B, S8C, and S8D), suggesting a crucial role for chromatin structure in the temporal regulation of enzymes critical for DNA replication. In agreement with this notion, we also observed an increased chromatin loading of PSF2 and CDC45 in cells depleted of SET8 (Figure 3F), suggesting the potential activation of MCM helicase activity. A consequence of MCM activation is DNA unwinding leading to the formation of single stranded DNA (ssDNA), which is a key step in the replication process. Such unwinding is normally strictly regulated spatially and temporally, occurring only at a fraction of replication origins

starting at the G1/S boundary and continuing throughout S phase (Weinreich, 2015). We therefore asked if alteration in chromatin compaction status in cells entering G1 phase could lead to accumulation of ssDNA. For this purpose, we analyzed native BrdU staining as ssDNA readout in synchronized cells entering G1 phase without SET8 or treated with TSA.

Notably, native BrdU signal was highly abundant in cells lacking SET8 suggesting the presence of excessive ssDNA (Figures 4A and 4B). Consistently, the major ssDNA binding protein RPA was increased on chromatin in the absence of SET8 or in response to TSA treatment further implying the presence of ssDNA (Figures 4C, 4D, 4E and 4F and Figures S9A and S9B) (Bunting et al., 2010; Kousholt et al., 2012). To further highlight the role of chromatin structure in controlling replication licensing and preventing premature DNA unwinding, we analyzed both native BrdU signal and RPA chromatin loading in cells treated with sucrose-based hypertonic medium, in the same experimental setup as in figures 4A and 4D and figure S9A. Indeed, native BrdU signal and RPA loading were significantly reduced by adding hypertonic medium to cells lacking SET8 or treated with TSA (Figures 4A, 4B, 4D, 4E and 4F and Figure S9A), indicating a likely relationship between chromatin compaction status, replication licensing and DNA unwinding. Furthermore, the immunofluorescence analysis of cells entering G1 phase without SET8 revealed increased RPA staining in cells with low nuclear PCNA staining (Figure S9B). Taken together, these data suggest that chromatin compaction status, by limiting the DNA binding of pre-RC components in cells progressing through G1 phase, prevents unscheduled DNA unwinding.

Chromatin---mediated control of the MCM2-

-7 complex promotes genome integrity

Our results suggested a key role for MCM activity in chromatin compaction dependent genome integrity. To further test this, we first depleted the MCM7 subunit of the replicative helicase MCM2-7 complex to levels sufficient to still allow cell cycle progression (Fig S10). Conspicuously, depletion of MCM7 reduced the challenge to genome integrity in cells lacking SET8 (Figures 5A and 5B). Importantly, ssDNA was also reduced after MCM7 co-depletion in cells lacking SET8 (Figure 5C). These results suggest that the MCM2-7 complex could be functionally involved in generating ssDNA. Previous reports suggested that DDK dependent phosphorylations are required for activation of MCM2-7 helicase activity (Siddiqui et al., 2013; Yeeles et al., 2015). Moreover, in yeast, it has been reported that an MCM5 mutant mimics CDC7 dependent MCM-complex phosphorylation and prematurely activates the helicase activity of the MCM-complex leading to inappropriate DNA unwinding in G1 phase (Geraghty et al., 2000). Therefore, to further verify the functional involvement of MCMs in cells with perturbed chromatin compaction, we determined if DDK activity contributes to ssDNA accumulation and γ H2A.X signaling. Notably, we observed a dramatic reduction in DNA damage, as evident from γ H2A.X positive cells, when a DDK inhibitor (PHA-767491) (Poh et al., 2014) was added to the cells lacking SET8 or treated with HDACi at the time of exit of mitosis (Figures 5D, 5E, 5G, and 5H). Moreover, treatment of SET8 depleted cells with DDK inhibitor reduced ssDNA accumulation (Figure 5F). These results support our hypothesis that chromatin structure is crucial for the correct loading and activation of licensing factors.

It remained a possibility that DNA damage in response to SET8 and HDAC inhibition would lead to chromatin relaxation similar to what is described

in the “Access–Repair– Restore” model (Smeenk and van Attikum, 2013; Soria et al., 2012) where induced chromatin structural alterations at sites of DNA damage help ensure efficient recruitment of repair factors to damaged DNA. To test our hypothesis that indeed chromatin relaxation leads to DNA damage rather than initial DNA damage leading to chromatin relaxation, we performed MNase digestion of nuclei lacking SET8 and simultaneously treated with DDKi to suppress MCM-dependent genome instability. The results showed that cells lacking SET8 retain their relaxed chromatin even in the absence of DNA damage (Figure S11). These results suggest that abnormal chromatin relaxation precedes additional events that ultimately lead to loss of genome integrity.

Discussion

The structural organization of chromatin is of paramount importance in not only governing all DNA based processes but is also thought to maintain genome integrity (Luger et al., 2012; Woodcock and Ghosh, 2010). Here, we demonstrate that chromatin compaction status limits replication licensing, which provides novel link between chromatin structural perturbations and genome integrity.

SET8 and HDACs in chromatin control

Chromatin exists in a variety of alternative states of varying compactness depending upon the phase of the cell cycle. This temporal control of chromatin plasticity is governed by several factors, most importantly, histone PTMs (Bannister and Kouzarides, 2011; Woodcock and Ghosh, 2010). In the data presented here we used two independent approaches affecting different histone PTMs to study chromatin dynamics in cells exiting mitosis. By the first approach our data shed new light on the function of SET8, a cell cycle regulated mono-

methyltransferase for histone H4 lysine 20, in cells exiting mitosis and links it with genome integrity. While our lab and others (Houston et al., 2008; Jorgensen et al., 2011; Oda et al., 2009; Schotta et al., 2008) have previously studied the role of SET8 in maintenance of chromatin compaction, DNA replication and genome integrity, our current work, for the first time, suggests a link between these three important nuclear functions of SET8. Furthermore, we connect these functions temporally, finding that cells display their dependence upon SET8/H4K20me1 in maintaining genome integrity while they enter G1 phase. (Abbas et al., 2010; Centore et al., 2010; Jorgensen et al., 2011; Oda et al., 2010; Tardat et al., 2010; Wu et al., 2010). While we argued that loss of SET8 leads to genome instability in cells after they exit from mitosis, it remains a possibility that loss of SET8 leads to improper chromosome compaction during mitosis as suggested earlier (Houston et al., 2008; Oda et al., 2009). In our experimental setup, mitotic progression is not affected in the absence of SET8 (Figures S3A and S3B), however, improper chromosome relaxation during mitosis may also promote licensing and the loss of genome integrity in the ensuing G1 phase. Histone modifications and their effectors represent regulatory mechanisms that cross- talk and modulate chromatin structure in a coordinated manner (Bannister and Kouzarides, 2011; Rothbart and Strahl, 2014). In the second approach to study the role of chromatin structure in maintaining genome integrity, we used histone deacetylase inhibitors (HDACi) because histone deacetylases (HDACs) reverse chromatin acetylation and promote a more compact and repressive chromatin structure (Bannister and Kouzarides, 2011; Haberland et al., 2009; Woodcock and Ghosh, 2010). HDACi counteract the effects of HDACs and thereby leads to a globally increased histone

acetylation causing a reversible relaxation of chromatin (Toth et al., 2004). Our results now link HDACi dependent chromatin relaxation and genome instability. HDACi have been shown to induce DNA damage in cancer cells, however a functional understanding of DNA damage induction is lacking. It has been suggested that induction of DNA damage may be linked to hyperacetylation of histones and the resulting chromatin structural alterations (Carrier, 2013; Lee et al., 2010; Nalabothula and Carrier, 2011), which is consistent with our findings.

Chromatin and licensing control

The accessibility of trans-acting factors to chromatin is strictly regulated so that every DNA-based transaction is temporally and spatially determined (Hayashi and Masukata, 2011; Martin and Cardoso, 2010). The selection and activation of replication origins occurs in a local chromatin context, starting from binding of ORC complex to activation of MCM2-7 helicase (MacAlpine and Almouzni, 2013). Notably, our results highlight the important regulatory role of chromatin structure on the binding of ORC and the MCM2-7 complex, which is consistent with the fact that specification of higher eukaryotic replication origins is not only governed by DNA sequence (Remus et al., 2004; Vashee et al., 2003). Thus, the licensing of replication origins can be viewed as an opportunistic mechanism aided by ORC (and MCM) affinity for DNA per se. Thus, relaxing the chromatin structure can reveal new affinity sites for replication licensing factors, which are not restricted anymore by chromatin structure (Figure 6). Furthermore, the presence of histone H4K20me or absence of acetylation might enhance this phenotype, since these histone modifications contribute to create a restricted number of sites of higher affinity at specific positions along the genome (Beck et al., 2012; Kuo et al., 2012; Tardat

et al., 2010). Thus, we suggest that well-compacted chromatin with appropriate levels of K20me and acetylation limit the number of potential sites for the formation of replication origins and also prevent their improper activation by reducing the accessibility of the pre-RC complex, before S phase (Figure 6).

Histone acetylation and methylation have previously been shown to regulate origin selection and binding of licensing proteins locally, at selected origins (Goren et al., 2008; Kuo et al., 2012; Miotto and Struhl, 2010; Tardat et al., 2010). Here, we have uncovered a role for chromatin structure at a pan-nuclear level. Intriguingly, previous studies linked SET8 and H4K20me with a positive role in licensing (Goren et al., 2008; Kuo et al., 2012; Miotto and Struhl, 2010; Tardat et al., 2010). However, these studies were carried out under extended periods of analysis, and loss of SET8 activity might decrease the licensing of only a limited number of replication origins and their activation in S phase (Beck et al., 2012; Tardat et al., 2010). In contrast, we have applied short-term depletion of SET8 in synchronized cells (generally less than 20 hours), which allowed us to uncover specifically the role of SET8-mediated chromatin compaction in replication licensing after a single passage through mitosis. Of note, our finding that HDACi has similar role through chromatin compaction further supports a general role of chromatin structure in the regulation of replication licensing process.

Taken altogether, we show that chromatin compaction status controls replication licensing and ensures genome stability. Loss of chromatin compaction, in the absence of either SET8 or when HDACs are inhibited, leads to increased loading of CDC45, MCM-2-7 complex, and GINS, as well as DDK and MCM-dependent ssDNA formation and genome instability in cells exiting mitosis (Figure

6). HDACi are currently applied in the clinic for the treatment of some forms of Lymphomas, most notably, cutaneous T-cell lymphoma. We have identified a potentially novel mechanism through which HDACi promote genome instability and we suggest that this mechanism may contribute to the anti-cancer effects of these agents in the clinical

setting. In conclusion, our results highlight the role of chromatin structure and organization in controlling DNA-based processes, such as replication licensing and provide an important basis for the understanding of global regulation of essential nuclear processes.

References

Abbas, T., Shibata, E., Park, J., Jha, S., Karnani, N., and Dutta, A. (2010). CRL4(Cdt2) regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Molecular cell* *40*, 9-21.

Aladjem, M. I. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nature reviews Genetics* *8*, 588-600.

Albiez, H., Cremer, M., Tiberi, C., Vecchio, L., Schermelleh, L., Dittrich, S., Kupper, K., Joffe, B., Thormeyer, T., von Hase, J., *et al.* (2006). Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* *14*, 707-733.

Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* *21*, 381-395.

Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S. C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* *143*, 470-484.

Beck, D. B., Oda, H., Shen, S. S., and Reinberg, D. (2012). PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes & development* *26*, 325-337.

Boos, D., Yekezare, M., and Diffley, J. F. (2013). Identification of a heteromeric complex that promotes DNA replication origin firing in

human cells. *Science* *340*, 981-984.

Bunting, S. F., Callen, E., Wong, N., Chen, H. T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* *141*, 243-254.

Campos, E. I., and Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics* *43*, 559-599.

Carrier, F. (2013). Chromatin Modulation by Histone Deacetylase Inhibitors: Impact on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation. *Molecular and cellular pharmacology* *5*, 51-59.

Centore, R. C., Havens, C. G., Manning, A. L., Li, J. M., Flynn, R. L., Tse, A., Jin, J., Dyson, N. J., Walter, J. C., and Zou, L. (2010). CRL4(Cdt2)-mediated destruction of the histone methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase. *Molecular cell* *40*, 22-33.

Donaldson, A. D. (2005). Shaping time: chromatin structure and the DNA replication programme. *Trends in genetics : TIG* *21*, 444-449.

Eskeland, R., Leeb, M., Grimes, G. R., Kress, C., Boyle, S., Sproul, D., Gilbert, N., Fan, Y., Skoultchi, A. I., Wutz, A., and Bickmore, W. A. (2010). Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. *Molecular cell* *38*, 452-464.

Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and Mechali, M. (2015). DNA replication origin

- activation in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology* *16*, 360-374.
- Frigola, J., Remus, D., Mehanna, A., and Diffley, J. F. (2013). ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. *Nature* *495*, 339-343.
- Geraghty, D. S., Ding, M., Heintz, N. H., and Pederson, D. S. (2000). Premature structural changes at replication origins in a yeast minichromosome maintenance (MCM) mutant. *The Journal of biological chemistry* *275*, 18011-18021.
- Gillespie, P. J., Li, A., and Blow, J. J. (2001). Reconstitution of licensed replication origins on *Xenopus* sperm nuclei using purified proteins. *BMC biochemistry* *2*, 15.
- Goren, A., Tabib, A., Hecht, M., and Cedar, H. (2008). DNA replication timing of the human beta-globin domain is controlled by histone modification at the origin. *Genes & development* *22*, 1319-1324.
- Haberland, M., Montgomery, R. L., and Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews Genetics* *10*, 32-42.
- Hayashi, M. T., and Masukata, H. (2011). Regulation of DNA replication by chromatin structures: accessibility and recruitment. *Chromosoma* *120*, 39-46.
- Houston, S. I., McManus, K. J., Adams, M. M., Sims, J. K., Carpenter, P. B., Hendzel, M. J., and Rice, J. C. (2008). Catalytic function of the PR-Set7 histone H4 lysine 20 monomethyltransferase is essential for mitotic entry and genomic stability. *The Journal of biological chemistry* *283*, 19478-19488.
- Ishikawa, K., Ishii, H., and Saito, T. (2006). DNA damage-dependent cell cycle checkpoints and genomic stability. *DNA and cell biology* *25*, 406-411.
- Jorgensen, S., Eskildsen, M., Fugger, K., Hansen, L., Larsen, M. S., Kousholt, A. N., Syljuasen, R. G., Trelle, M. B., Jensen, O. N., Helin, K., and Sorensen, C. S. (2011). SET8 is degraded via PCNA-coupled CRL4(CDT2) ubiquitylation in S phase and after UV irradiation. *The Journal of cell biology* *192*, 43-54.
- Kousholt, A. N., Fugger, K., Hoffmann, S., Larsen, B. D., Menzel, T., Sartori, A. A., and Sorensen, C. S. (2012). CtIP-dependent DNA resection is required for DNA damage checkpoint maintenance but not initiation. *The Journal of cell biology* *197*, 869-876.
- Kuo, A. J., Song, J., Cheung, P., Ishibe-Murakami, S., Yamazoe, S., Chen, J. K., Patel, D. J., and Gozani, O. (2012). The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome. *Nature* *484*, 115-119.
- Lee, J. H., Choy, M. L., Ngo, L., Foster, S. S., and Marks, P. A. (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 14639-14644.
- Lleres, D., James, J., Swift, S., Norman, D. G., and Lamond, A. I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *The Journal of cell biology* *187*, 481-496.
- Lubelsky, Y., Prinz, J. A., DeNapoli, L., Li, Y., Belsky, J. A., and MacAlpine, D. M. (2014). DNA replication and transcription programs respond to the same chromatin cues. *Genome research* *24*, 1102-1114.
- Luger, K., Dechassa, M. L., and Tremethick, D. J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature reviews Molecular cell biology* *13*, 436-447.
- MacAlpine, D. M., and Almouzni, G. (2013). Chromatin and DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *5*, a010207.
- MacAlpine, H. K., Gordan, R., Powell, S. K., Hartemink, A. J., and MacAlpine, D. M. (2010). *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome research* *20*, 201-211.
- Martin, R. M., and Cardoso, M. C. (2010). Chromatin condensation modulates access and binding of nuclear proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of*

- American Societies for Experimental Biology 24, 1066-1072.
- Miotto, B., and Struhl, K. (2010). HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Molecular cell* 37, 57-66.
- Nalabothula, N., and Carrier, F. (2011). Cancer cells' epigenetic composition and predisposition to histone deacetylase inhibitor sensitization. *Epigenomics* 3, 145-155.
- Nordman, J., and Orr-Weaver, T. L. (2012). Regulation of DNA replication during development. *Development* 139, 455-464.
- Oda, H., Hubner, M. R., Beck, D. B., Vermeulen, M., Hurwitz, J., Spector, D. L., and Reinberg, D. (2010). Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage. *Molecular cell* 40, 364-376.
- Oda, H., Okamoto, I., Murphy, N., Chu, J., Price, S. M., Shen, M. M., Torres-Padilla, M. E., Heard, E., and Reinberg, D. (2009). Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Molecular and cellular biology* 29, 2278-2295.
- Papamichos-Chronakis, M., and Peterson, C. L. (2013). Chromatin and the genome integrity network. *Nature reviews Genetics* 14, 62-75.
- Poh, W. T., Chadha, G. S., Gillespie, P. J., Kaldis, P., and Blow, J. J. (2014). *Xenopus* Cdc7 executes its essential function early in S phase and is counteracted by checkpoint-regulated protein phosphatase 1. *Open biology* 4, 130138.
- Remus, D., Beall, E. L., and Botchan, M. R. (2004). DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *The EMBO journal* 23, 897-907.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J. D., Morris, E. P., and Diffley, J. F. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* 139, 719-730.
- Ricci, M. A., Manzo, C., Garcia-Parajo, M. F., Lakadamyali, M., and Cosma, M. P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell* 160, 1145-1158.
- Richter, K., Nessling, M., and Lichter, P. (2007). Experimental evidence for the influence of molecular crowding on nuclear architecture. *Journal of cell science* 120, 1673-1680.
- Rothbart, S. B., and Strahl, B. D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et biophysica acta* 1839, 627-643.
- Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callen, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I. A., et al. (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes & development* 22, 2048-2061.
- Segal, E., and Widom, J. (2009). What controls nucleosome positions? *Trends in genetics* : TIG 25, 335-343.
- Sheu, Y. J., and Stillman, B. (2006). Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Molecular cell* 24, 101-113.
- Siddiqui, K., On, K. F., and Diffley, J. F. (2013). Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Smeenk, G., and van Attikum, H. (2013). The chromatin response to DNA breaks: leaving a mark on genome integrity. *Annual review of biochemistry* 82, 55-80.
- Soria, G., Polo, S. E., and Almouzni, G. (2012). Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Molecular cell* 46, 722-734.
- Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefevbre, C., Callanan, M., Sardet, C., and Julien, E. (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nature cell biology* 12, 1086-1093.
- Tenca, P., Brotherton, D., Montagnoli, A., Rainoldi, S., Albanese, C., and Santocanale, C. (2007). Cdc7 is an active kinase in human cancer cells undergoing replication stress. *The Journal of biological chemistry* 282, 208-215.

- Toth, K. F., Knoch, T. A., Wachsmuth, M., Frank-Stohr, M., Stohr, M., Bacher, C. P., Muller, G., and Rippe, K. (2004). Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *Journal of cell science* *117*, 4277-4287.
- Tsuji, T., Ficarro, S. B., and Jiang, W. (2006). Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. *Molecular biology of the cell* *17*, 4459-4472.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T. J., and Walter, J. C. (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes & development* *17*, 1894-1908.
- Weinreich, M. (2015). Molecular biology: DNA replication reconstructed. *Nature* *519*, 418-419.
- Woodcock, C. L., and Ghosh, R. P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a000596.
- Wu, S., Wang, W., Kong, X., Congdon, L. M., Yokomori, K., Kirschner, M. W., and Rice, J. C. (2010). Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes & development* *24*, 2531-2542.
- Yeeles, J. T., Deegan, T. D., Janska, A., Early, A., and Diffley, J. F. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* *519*, 431-435.

Materials and methods

Cell culture, cell cycle synchronization, and chemicals

U2OS and NIH-3T3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin-Streptomycin. For synchronization at G1/S, U2OS cells were cultured in the presence of 2 mM thymidine (Sigma) for 20 h, washed three times with PBS, and released in fresh medium without thymidine for 10 h. After another 17 h in thymidine, cells were washed three times with PBS and cultured in fresh medium. Cells were then collected at 16 h. The following additional drugs were used: 3.3 μ M DDKi (PHA-767491 from Sigma), TSA 25 μ M (Sigma), and PS 10 μ M (Selleck Chemicals), Sucrose 125 mM (Sigma).

Plasmids and siRNA

pCMVHA-SET8wt and pCMVHA-SET8mut encoding either N-terminal HA-tagged human wild-type SET8 or methyltransferase dead mutant SET8 were generated as described previously (Jorgensen et al., 2011). U2OS were transfected with plasmid DNA using FuGENE® 6 (Promega) according to the manufacturer's instruction. siRNA transfections were performed with 50 nM siRNA duplexes using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The siRNA sequences used for knockdown are (5'-3'):

SET8 human (GUACGGAGCGCCAUGAAGU),
SET8 human/mouse (GCUGCAGUCUGAAGAAAGG),
MCM7 (UAGCCUACCUCUACAAUGA),

Flow cytometry

Cells were fixed in 70% ethanol and stained with antibodies toward phospho-Histone H3-S10

(1:250; 06-570, Millipore) and γ H2AX (1:1000; 05-636/JBW301, Millipore) for 1 h followed by 1 h incubation with Alexa Fluor 488 and 647 secondary antibodies (1:1000; Invitrogen). DNA was stained using 0.1 mg/ml propidium iodide containing RNase for 30 min at 37°C. Flow cytometry analysis was performed on FACSCalibur using CellQuest Pro software (BD). Data were analyzed using FlowJo software (v7.2.2; Tree Star).

Cellular fractionation and chromatin isolation

To obtain soluble and chromatin-enriched cellular fractions, cell fractionation was performed. In brief, cells were lysed for 30 min in a small volume of CSK buffer (0.5% Triton X-100, 10 mM Pipes, pH 6.8, 300 mM sucrose, 100 mM NaCl, and 1.5 mM MgCl₂). The lysed cells were pelleted by centrifugation at 2,000 g, and supernatant was collected (soluble fraction). The pellet was washed once with CSK buffer, resuspended in 0.2 M HCl, and incubated at 4°C for 2 h. The supernatant represented the chromatin-enriched fraction. HCl-containing samples were neutralized with Tris buffer before SDS-PAGE. Alternatively, U2-OS cells were trypsinised and pooled prior to centrifugation at 1500 rpm for 5 mins at RT. The media is removed and the cells are resuspended in 1 ml Transport Buffer (20mM Hepes, 110mM K-Acetate, 5mM Na-Acetate, 2mM Mg-Acetate, 1mM EGTA, pH=7.6) and stored on ice. Supplement Transport Buffer/cell mix with 300 μ g/ml digitonin (Sigma) and incubate on ice for 5 mins. The reaction was stopped by the addition of 1 ml of Transport Buffer + 3% BSA with gentle mixing. Nuclei were recovered with a 5 mins at 1500rpm at 4°C and were resuspended in NIB (50 mM KCl, 50 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM Spermidine, 0.15 mM Spermine, 2 mM DTT, 1

µg/ml each leupeptin, pepstatin, aprotinin) + 30% (w:v) sucrose at approximately 300 ng/µl (50,000 cells---nuclei/µl assuming each diploid nucleus is 6pg). Nuclei were then mixed well and aliquoted in eppendorf tubes and freezed directly in liquid nitrogen.

To obtain, cytoplasmic, nuclear and chromatin fractions, cellular fractionation was done as described previously (Mendez and Stillman, 2000; Tardat et al., 2010). Briefly, cells were resuspended in buffer A (10 mM HEPES, [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose, 10% glycerol, 1 mM DTT, 5 µg of aprotinin per ml, 5 µg of leupeptin per ml,

0.5 µg of pepstatin A per ml 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Triton X-100 (0.1%) was added, and the cells were incubated for 5 min on ice. Nuclei were collected in pellet 1 (P1) by low-speed centrifugation (4 min, 1,300 × g, 4°C). The supernatant (S1) was further clarified by high-speed centrifugation (15 min, 20,000 × g, 4°C) to remove cell debris and insoluble aggregates (S2). Nuclei were washed once in buffer A, and then lysed in buffer B (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT, protease inhibitors as described above). Insoluble chromatin (S3) was collected by centrifugation (4 min, 1,700 × g, 4°C), washed once in buffer B, and centrifuged again under the same conditions. The final chromatin pellet (P3) was resuspended in Laemmli buffer and sonicated.

Immunoblotting and antibodies

Cells were lysed on ice in cold EBC-buffer (150 mM NaCl; 50 mM TRIS pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.5% NP-40/Igepal) containing protease inhibitors (1% aprotinin, 5 µg ml⁻¹ leupeptin, 1 mM PMSF), phosphatase inhibitors (50 mM NaF; β-glycerophosphate; µM Calyculin A) and 1 mM DTT. The lysates were sonicated using a digital sonifier (102C CE Converter; Branson). Proteins were separated by

SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Blocking and blotting with primary antibodies were performed in PBS-T supplemented with 5% skimmed milk powder. Proteins were visualized on films using secondary HRP-conjugated antibodies (1:10,000; Vector Laboratories) and ECL (GE Healthcare). Films were developed using an x-ray machine (Valseo; Ferrania Technologies). The following commercial rabbit antibodies were used in this study: SET8 (06-1304, Millipore), MCM4 (), Pola (), H3 (ab1791, Abcam), pRPA2-S4/S8 (A300-245A, Bethyl labs). The following commercial mouse antibodies were used: γH2AX (05-636/JBW301, Millipore), MCM2 (610700, BD Transduction Lab), MCM7 (sc-9966, Santa Cruz), PCNA (PC10, Abcam), RPA2 (), Actin (MAB1501, Millipore) and Vinculin (V9131, Sigma).

Immunofluorescence microscopy

Cells were grown on coverslips, washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with Formaldehyde 4% for 10 min, permeabilized with PBS containing 0,3% Triton X-100 for 10 min and blocked for 1 h in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 3% BSA prior to incubation with primary antibodies for γH2AX (05-636/JBW301, Millipore), pRPA2-S4/S8 (A300-245A, Bethyl labs), pMCM2-S53 (A300-756A, Bethyl labs), Cyclin A (H-432, sc-751, Santa Cruz). For RPA2 (), MCM2 (610700, BD Transduction Lab), BrdU (RPN20AB, Amersham) and HA (MMS101P, Covance) cells grown on coverslips were washed with PBS, then extracted for 3 minute in ice cold pre-extraction buffer (0.5% Triton X-100, 20 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, and 3 mM MgCl₂), washed with PBS and fixed with 4% formaldehyde for 10 min and then incubated in primary antibodies. Secondary antibodies were from donkey and conjugated with Alexa Fluor

fluorochromes (Invitrogen). Images were acquired using either an Axiovert 200M confocal microscope equipped with an LSM510 laser module (Zeiss) or LSM880 in AiryScan super resolution mode.

Micrococcal nuclease digestion

2 million U2OS cells were labeled with ^{14}C (radioactive isotope of Carbon) during synchronization with double thymidine and were harvested in G1 phase. Nuclei were prepared as described previously (Shoaib et al., 2013). Briefly, cells for each condition were resuspended in cytosolic lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, and 0.25 mM PMSF) and left on ice for 8 min. Nuclei were pelleted by centrifugation (500 g for 5 min at 4°C). The pellet was washed once in nuclei buffer (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.34 M sucrose, 0.25 mM PMSF, and 1 mM DDT) and resuspended in nuclei buffer. 2 mM CaCl₂ was added, and the samples were pre-warmed to 25°C. Micrococcal nuclease (0,1 U/μl; Sigma- Aldrich) was added to each sample and aliquoted into 7 pre-chilled eppendorf tubes. 6 tubes were incubated at 37°C for the indicated time period (0, 1, 3, 8, 13 and 20 min) and 1 tube from each sample was sonicated and taken as a control for ^{14}C incorporation efficiency in the cells. All samples were immediately centrifuged at 10,000 g and supernatants were collected in the scintillation tubes containing 3 ml of scintillation liquid (Ultima Gold, Perkin Elmer). All readings were taken on scintillation counter

Electron microscopy

Cells were fixed in Karnofski solution (3% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde in 10 mM PBS, pH 7.4) for 1 hour, washed once in PBS and post-fixed first in 1% reduced osmium tetroxide (containing 1.5% potassium ferricyanide) for 40 minutes and subsequently in 1% osmium tetroxide

for another 40 minutes. After washing in water, fixed samples were dehydrated, embedded in Epon resin, and processed for EM as described (Fahrenkrog et al., 2002) EM micrographs were recorded on a Phillips CM- 100 transmission electron microscope equipped with a CCD camera at an acceleration voltage of 80 kV. Images were recorded using the systems software and processed using Adobe Photoshop.

FLIM-FRET measurements and analysis

FLIM-FRET experiments were performed in U2OS cells stably expressing H2B-GFP alone (U2OS_{H2B-GFP}) or with mCherry tagged histone H2B (U2OS_{H2B-mCherry}). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) was performed using an inverted laser scanning multiphoton microscope LSM780 (Zeiss) equipped with temperature- and CO₂- controlled environmental black walls chamber. Measurements were acquired in live cells at 37°C, 5% CO₂, and with a 40xoil immersion lens NA 1.3 Plan-Apochromat objective from Zeiss. Two-photon excitation was achieved using a Chameleon Ultra II tunable (680–1080 nm) laser (Coherent) to pump a mode-locked frequency-doubled Ti:Sapphire laser that provided sub-150-femtosecond pulses at a 80-Mhz repetition rate with an output power of 3.3 W at the peak of the tuning curve (800 nm). Enhanced detection of the emitted photons was afforded by the use of the HPM-100 module (Hamamatsu R10467-40 GaAsP hybrid PMT tube). The fluorescence lifetime imaging capability was provided by TCSPC electronics (SPC- 830; Becker & Hickl GmbH). TCSPC measures the time elapsed between laser pulses and the fluorescence photons. EGFP and mCherry fluorophores were used as a FRET pair. The optimal two-photon excitation wavelength to excite the donor (EGFP) was 890 nm. Laser power was adjusted to give a mean photon count rate of the

order 1.10^5 - 5.10^5 photons/sec. Fluorescence lifetime measurements were acquired over 60 sec and fluorescence lifetimes were calculated for all pixels in the field of view (256×256 pixels). The analysis of the FLIM measurements was performed by using the SPCImage software (Becker & Hickl, GmbH). Because FRET interactions cause a decrease in the fluorescence lifetime of the donor molecules (EGFP), the FRET efficiency was calculated by comparing the FLIM values obtained for the EGFP donor fluorophores in presence (U2OS_{H2B-2FPs}) and absence (U2OS_{H2B-GFP}) of the mCherry acceptor fluorophores. FRET efficiency (EFRET) was derived by applying the following equation: $EFRET = 1 - (t_{DA}/t_D)$, where t_{DA} is the mean fluorescence lifetime of the donor (H2B-EGFP) in U2OSH2B-2FPs cells and t_D is the mean fluorescence lifetime of H2B-EGFP (in absence of acceptor) in U2OS-H2BGFP cells that are present in the same field of view. FRET efficiency values from 20 to 30 cells was then normalized and graphically represented using GraphPad Prism

References

Fahrenkrog, B., Maco, B., Fager, A.M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K.S., and Aebi, U. (2002). Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *Journal of structural biology* 140, 254-267.

Jorgensen, S., Eskildsen, M., Fugger, K., Hansen, L., Larsen, M.S., Kousholt, A.N., Syljuasen, R.G., Trelle, M.B., Jensen, O.N., Helin, K., *et al.* (2011). SET8 is degraded via PCNA-coupled CRL4(CDT2) ubiquitylation in S phase and after UV irradiation. *The Journal of cell biology* 192, 43-54.

Mendez, J., and Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition

software.

Acknowledgments

We are grateful to S. Jørgensen and C. Colding for assistance in the early stages of the project and to Yasuko Antoku and Kasper Nørskov Kragh for immunofluorescence analysis assistance. We thank Ursula Sauder and Vesna Oliveri for electron microscopy expert technical assistance. CSS, MS and DW are funded by The Novo Nordisk Foundation (CSS), The Danish Cancer Society (CSS), The Lundbeck Foundation (CSS), and The Danish Medical Research Council (CSS), Swiss National Science Foundation (DW) and Villum Foundation (MS). BF is funded by FNRS Belgium and PJG and JJB are funded by Cancer Research UK (grant C303/A14301). FI and EJ are funded by the institutional support from CNRS and INSERM, and the EPIG2013-13 grant from the French Plan-Cancer. FI was supported by a PhD fellowship from the French "Ligue Contre le Cancer". DL was supported by a Cancéropole GSO-Emergence grant (2014-E17) and CNRS.

complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Molecular and cellular biology* 20, 8602-8612.

Shoaib, M., Kulyyassov, A., Robin, C., Winczura, K., Tarlykov, P., Despas, E., Kannouche, P., Ramanculov, E., Lipinski, M., and Ogryzko, V. (2013). PUB-NChIP-"in vivo biotinylation" approach to study chromatin in proximity to a protein of interest. *Genome research* 23, 331-340.

Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefevbre, C., Callanan, M., Sardet, C., and Julien, E. (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nature cell biology* 12, 1086-1093.

Figure Legends

Figure 1: Genome integrity correlates with chromatin dynamics in cells exiting Mitosis

Design of the experiment. Briefly, U2-OS cells were synchronized by double thymidine block (2 mM) and were depleted of SET8 during the second block, 6 hours before release from G1/S boundary. Cells were then collected at indicated time points after G1/S release.

Cells from (A) were fixed for FACS analyses and stained with indicated antibodies.

Bars represent percentage of γ H2AX positive U2-OS cells. Average \pm SD of 3 independent experiments. **** p <0.0001 (unpaired t-test).

U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in (A), were fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

U2-OS cells synchronized by double thymidine block and were treated with HDAC inhibitors (HDACi), Trichostatin A (TSA) 25 μ M and Panobinostat (PS) 10 μ M, added at 12 hours after release from G1/S boundary. Cells were fixed at 15 hours post G1/S release for FACS analyses and stained with indicated antibodies.

Bars represent percentage of γ H2AX positive cells from (E). Average \pm SD of 3 independent experiments. **** p <0.0001 (unpaired t-test).

U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in (E) were fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in (A), were fixed at 15 hours post G1/S release and prepared for single-cell electrophoresis in neutral electrophoresis buffer.

Relative comet-tail moments are plotted as means and S.E.M.

Figure 2. Genome integrity is dependent upon

proper chromatin compaction

(Upper) U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in Fig. 1A were fixed at 15 hours post G1/S release for scanning electron microscope visualization as described in materials and methods. (Lower) Magnified images of boxed area in the upper panel. Bars represent quantification of nuclei fixed for electron microscope visualization in (E). Average intensity \pm SD of >10 nuclei). **** p <0.0001 (unpaired t-test).

U2OS cells stably expressing H2B-GFP alone (U2OS_{H2B-GFP}) or with mCherry tagged histone H2B (U2OS_{H2B-2FPs}) were synchronized with single thymidine block. Cells were treated with either control or SET8 siRNA during the block. FRET measurements were taken 24 hours after release.

Quantification of the FLIM-FRET chromatin compaction assay. Bars, 10 μ m.

U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in Fig. 1A, were mock and Sucrose treated (125 mM) at 12 hours post G1/S release and were fixed at 15 hours post G1/S release. Bars represent percentage of γ H2AX positive cells in indicated samples (average \pm SD of 3 independent experiments). **** p <0.0001 (unpaired t-test).

U2-OS cells synchronized and HDACi treated as in (Fig. 2A), were mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release and were fixed at 15 hours. Bars represent percentage of γ H2AX positive cells in indicated samples (average \pm SD of 3 independent experiments). ** p <0.01 (unpaired t-test).

U2-OS cells were transfected with mCherry-tagged human wild-type RNF2 (RING1b) and were double thymidine synchronized and transfected with siControl and siSet8 as previously. Cells were fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

U2-OS cells were transfected with mCherry-tagged human wild-type RNF2 (RING1b) and were double thymidine

synchronized and treated with either Mock or TSA as previously. Cells were fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

Figure 3. Chromatin compaction restricts loading of licensing proteins and CMG components

siControl and siSET8 transfected U2-OS cells were synchronized with double thymidine block and fixed at 15 hours post G1/S release. Cells were pre-extracted and immunostained with indicated antibodies.

Scatter plot showing the quantification of ORC1 intensity from cells in (A) where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test). Scatter plot showing the quantification of MCM2 intensity from cells in (A) where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

U2-OS cells were synchronized as in (A) and treated with TSA at 12 hours and fixed 15 hours post G1/S release. Scatter plot showing the quantification of ORC1 intensity where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

U2-OS cells were synchronized and treated as in (A). Cells were pre-extracted, fixed and immunostained with indicated antibodies. Scatter plot showing the quantification of MCM2 intensity where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

Chromatin was prepared from cells depleted of SET8 as in (A) and immunoblotted with indicated antibodies.

Western blots showing abundance of H4K20m1 and H4K20me2 levels in control versus SET8 depleted double thymidine synchronized cells harvested 15 hours post G1/S release.

Chromatin was prepared from cells synchronized with double thymidine block and treated with sucrose at 12 h post G1/S release. Samples were blotted with indicated antibodies.

Figure 4: Chromatin decompaction leads to ssDNA formation

U2-OS cells synchronized by double thymidine block were transfected with Control and SET8 siRNA. Cells were released into BrdU containing medium from G1/S boundary and were mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release. Cells were then fixed at 15 hours post G1/S release and were immunostained with indicated antibodies.

Scatter plot showing the quantification of BrdU intensity Chromatin was prepared from cells depleted of SET8 as in (A) and immunoblotted samples harvested at 15 hours post G1/S release with indicated antibodies.

U2-OS cells were treated and fixed as in (A) and were immunostained with RPA2 antibody after pre-extraction in CSK buffer containing 0,5% triton. Scatter plot showing the quantification of RPA2 intensity from cells in (D) where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test). U2-OS cells synchronized as in (A) were treated with HDAC inhibitor (HDACi) Trichostatin A (TSA) at 12 hours and were mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release. Cells were then fixed at 15 hours post G1/S release and were immunostained with RPA2 antibody. Scatter plot showing the quantification of RPA2 intensity where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

Figure 5. Chromatin-mediated control of the MCM2-7 complex promotes genome integrity

U2-OS cells were transfected with siMCM7 and synchronized with double thymidine block. SET8 was depleted at the G1/S transition. Cells were then released for 15 hours, fixed in next G1 phase and processed for immunofluorescence staining with indicated antibodies. Scatter plot showing the quantification of γ H2AX intensity from cells in (A) where median and interquartile range is indicated. $n > 50$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

Chromatin prepared from samples in (A) was immunoblotted with indicated antibodies.

U2-OS cells were synchronized with double thymidine block and were either transfected with control or SET8 at G1/S boundary. DDKi inhibitor (3 μ M of PHA-767491) was added at 11 hours post release from G1/S boundary. Cells were then collected at 16 hours (G1-phase) and processed for FACS staining with indicated antibodies. Bars representing percentage of γ H2AX positive cells in indicated samples (average \pm SD of 3 independent experiments). **** p <0.0001 (unpaired t-test).

Chromatin was prepared from cells depleted of SET8 as in (D), treated with DDKi at 11 hours, harvested at 15 hours post G1/S release and immunoblotted with indicated antibodies.

U2-OS cells were synchronized with double thymidine block and were either mock or TSA treated at 12 hours after 2nd release from G1/S boundary). DDKi inhibitor (3 μ M of PHA-767491) was added at 11 hours post release from G1/S boundary. Cells were then collected at 16 hours (G1-phase) and processed for FACS staining with indicated antibodies.

Bars representing percentage of γ H2AX positive cells in indicated samples (average \pm SD of 3 independent experiments). ** p <0.01 (unpaired t-test)

Figure 6. Chromatin structural dynamics promote genome stability.

Model depicting the essential role of chromatin structure dynamics in maintaining genome stability in cells exiting mitosis. Chromatin decompaction in cells exiting mitosis is regulated by SET8 and H4K20 methylation and histone deacetylases (HDACs). In the absence of SET8/H4K20me1 or HDACs, chromatin undergoes abnormal decompaction that leads to deregulated replication licensing and premature loading of ORC1 and CMG components onto the chromatin in cells exiting mitosis. This leads to excessive ssDNA formation and

loss of genome integrity in cells depleted of SET8 or treated with HDACi.

Supplementary Figure Legends

Fig. S1.

Design of the experiment. Briefly, U2-OS cells were synchronized by double thymidine block (2 mM) and were depleted of SET8 during the second block, 6 hours before release from G1/S boundary. Cells were then collected at indicated time points after G1/S release.

U2-OS cells synchronized as illustrated in (S1A) were harvested at 15 hours post G1/S release and immunoblotted with indicated antibodies.

FACS profile for samples in (A) stained with indicated antibodies.

U2-OS cells synchronized as illustrated in (S1A) were siRNA transfected and treated with TSA as indicated, harvested at 15 hours post G1/S release and processed for PFGE analysis.

U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in (S1A) were fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

Bars represent percentage of γ H2AX positive cells from (S1E). Average \pm SD of 3 independent experiments. **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

U2-OS cells synchronized by double thymidine block and were treated with HDAC inhibitors (HDACi), Trichostatin A (TSA) 25 μ M and Panobinostat (PS) 10 μ M, added at 12 hours after release from G1/S boundary. Cells were fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

Bars represent percentage of γ H2AX positive cells from (S1G). Average \pm SD of 3 independent experiments. **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

Fig. S2.

Chromatin was prepared from double thymidine-synchronized U2-OS cells, transfected with either control

or SET8 siRNA, collected at indicated time points post G1/S release and immunoblotted with indicated antibodies.

Clustered column graph showing γ H2AX and PCNA intensity in control versus SET8 depleted cells at indicated time points after G1/S release.

U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in (S1A), were given 15 minutes EdU pulse and fixed at 15 hours post G1/S release, stained with indicated antibodies and analyzed by flow cytometry.

Bars representing percentage of EdU positive cells in the indicated samples from S1C (average \pm SD of 3 independent experiments). **** $p < 0.001$ (unpaired t-test).

U2-OS cells synchronized and siRNA transfected as in (S1A), were given 15 minutes EdU pulse and fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

Fig. S3.

Design of the experiment. Briefly, U2-OS cells were synchronized by double thymidine block (2 mM) and were depleted of SET8 during the second block, 6 hours before release from G1/S boundary. Cells were treated with Nocodazole at 11 hours after thymidine release. 5 hours later, cells were release from Nocodazole trap and collected at indicated time points.

Cells from (A) were fixed for FACS analyses and stained with indicated antibodies.

Design of the experiment. NIH-3T3 cells were serum starved for 72 hours and released into complete culture medium. Control or SET8 siRNA were transfected 24 hours before release. Cells were fixed at 11, 22 and 32 hours after release. 30 minutes EdU pulse was given before fixation.

NIH-3T3 cells from (C) were processed for FACS staining with indicated antibodies.

Bars representing percentage of γ H2AX positive cells in the indicated samples (average \pm SD of 3 independent

experiments). **p<0.01 (unpaired t-test).

Fig. S4.

A. U2-OS cells were transfected with either HA-tagged human wild-type SET8 or methyltransferase dead mutant SET8 and were depleted of endogenous SET8 using siRNA. After 48 hours, cells were immunostained with indicated antibodies after pre-extraction in CSK buffer containing 0,5% triton. Arrows represent mutually exclusive staining for HA and γ H2AX in case of wild type SET8 but not in case of methyltransferase dead mutant SET8.

Fig. S5.

U2-OS cells were transfected with mCherry-tagged human wild-type RNF2 (RING1b) and were double thymidine synchronized and transfected with siControl and siSet8. Cells were harvested 24 hours after G1/S release and immunoblotted with indicated antibodies.

U2OS cells from (A) were fixed for FACS analyses and stained with indicated antibodies.

U2-OS cells were double thymidine synchronized and transfected with HA-tagged human wild-type RNF2 (RING1b) cDNA and SET8 siRNA as indicated. Cells were Sucrose treated at 12 hours post G1/S release were indicated and fixed 15 hours post G1/S release and analyzed by electron microscopy. Bars represent quantification of electron microscope analysis in (S5A). Average intensity \pm SD of >20 nuclei). ****p<0.0001 (unpaired t-test) and

***p<0.001 (unpaired t-test).

U2-OS cells synchronized by double thymidine block were transfected with Control and SET8 siRNA and were Mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release. Cells were then fixed at 15 hours post G1/S release, processed for FACS analysis and stained with γ H2AX antibody.

U2-OS cells synchronized as in (A) were treated with HDAC inhibitors (HDACi), Trichostatin A (TSA) and

Panobinostat (PS) at 12 hours and were Mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release. Cells were then fixed at 15 hours post G1/S release, processed for FACS analysis and stained with γ H2AX antibody.

Cells counts from U2OS cells as in Figure 2G, representing HA-RNF2 positive and negative cells in γ H2AX positive and negative background.

Cells counts from U2OS cells as in Figure 2H, representing HA-RNF2 positive and negative cells in γ H2AX positive and negative background.

U2-OS cells were double thymidine synchronized and transfected HA-tagged human wild-type RNF2 (RING1b) cDNA and SET8 siRNA as indicated. Cells were fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibodies.

Fig. S6.

U2-OS cells were synchronized by double thymidine block and treated with TSA at 12 hours post G1/S release. Cells were fixed after pre-extraction at 15 hours post release and stained with indicated antibodies.

U2-OS cells were synchronized by double thymidine block and treated with TSA as in S6A. Cells were fixed after pre-extraction at 15 hours post release and stained with indicated antibodies.

U2OS cells were synchronized with double thymidine block and treated with either control or SET8 siRNA. Cells were released from G1/S block, harvested and fractionated to obtain different cellular fractions as described in Materials and Methods. Samples were immunoblotted with indicated antibodies.

Fig. S7.

U2-OS cells synchronized by double thymidine block were transfected with Control and SET8 siRNA and were Mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release. Cells were then fixed at 15 hours post G1/S release and were immunostained with MCM2 antibody after pre-extraction in CSK buffer containing 0,5% triton.

Scatter plot showing the quantification of MCM2 intensity from cells in (A) where median and interquartile range is indicated. $n > 100$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test). U2-OS cells synchronized as in (A) were treated with TSA at 12 hours and were mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release. Cells were then fixed at 15 hours post G1/S release and stained with MCM2 antibody after pre-extraction in CSK buffer containing 0,5% triton. Scatter plot showing the quantification of MCM2 intensity from cells in (C) where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

Fig. S8.

U2-OS cells were synchronized as previously and fixed at 15 hours post G1/S release. Cells were pre-extracted and immunostained with indicated antibodies.

Scatter plot showing the quantification of MCM2 phospho Serine 53 intensity from cells in where median and interquartile range is indicated. $n > 150$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

U2-OS cells were synchronized as in (A) and treated with TSA at 12 hours and fixed 15 hours post G1/S release. Cells were pre-extracted as in (A) and immunostained with indicated antibodies.

Scatter plot showing the quantification of MCM2 phospho Serine 53 intensity from cells in (C) where median and interquartile range is indicated. $n > 100$, **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test).

Fig. S9.

U2-OS cells synchronized by double thymidine block were treated with HDAC inhibitor (HDACi) Trichostatin A (TSA) at 12 hours and were mock and Sucrose treated at 12 hours post G1/S release. Cells were then fixed at 15 hours post G1/S release and stained with indicated antibody after pre-extraction in CSK buffer containing 0,5% triton. Graphs represent quantification of RPA2 and PCNA intensity in individual cells from mock and TSA treated samples as in (A).

Fig. S10.

U2-OS cells were transfected with siMCM7 and synchronized with double thymidine block. SET8 was depleted at the G1/S transition. Cells were then released and fixed at indicated times, which correspond to G1/S, G2/M and G1 phases of the cell cycle. Graph shows PI profile of the indicated samples.

Fig. S11.

U2-OS cells were synchronized with double thymidine block. Thymidine containing ^{14}C was added throughout the cell culture. Cells were treated with DDKi at 11 h post G1/S release and harvested at 16 h post G1/S boundary. Nuclei were prepared and digested using MNase for varying duration of times. Graph represents the relative abundance of ^{14}C released from chromatin after digestion in control versus cells lacking SET8.

Figure 1: Genome integrity correlates with chromatin dynamics in cells exiting Mitosis

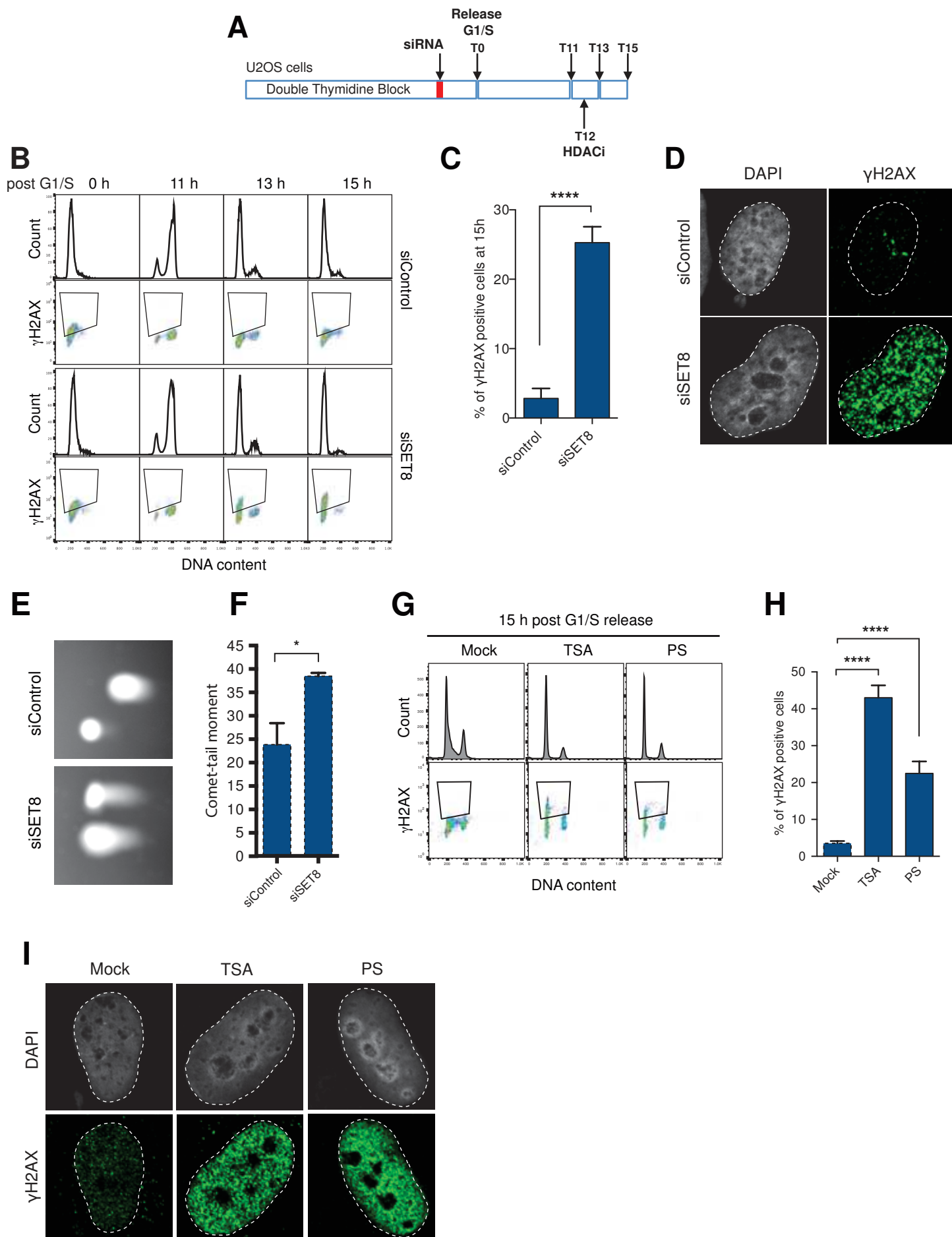


Figure 2: Genome integrity is dependent on proper chromatin compaction.

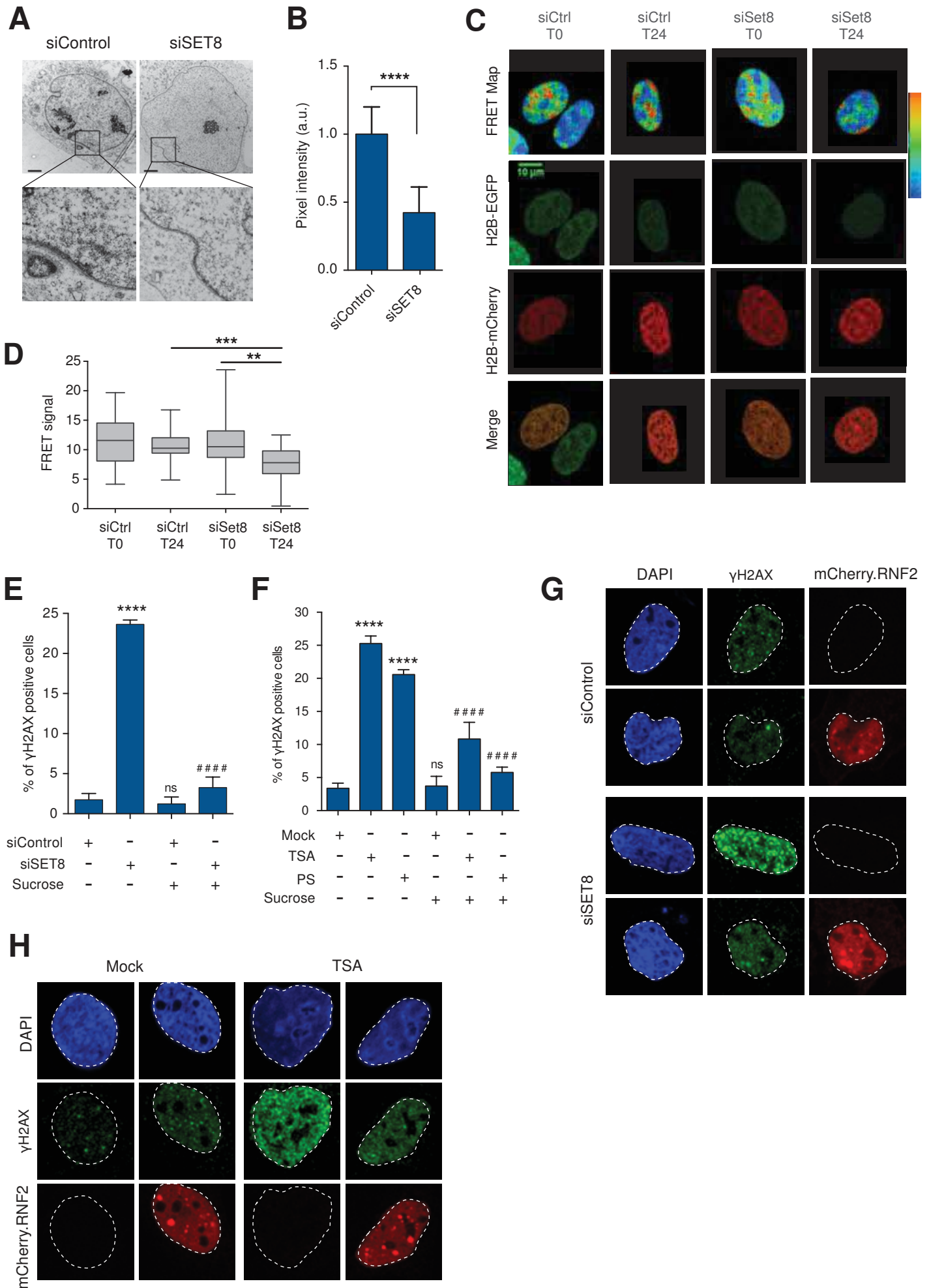


Figure 3: Chromatin compaction restricts excessive loading of licensing proteins.

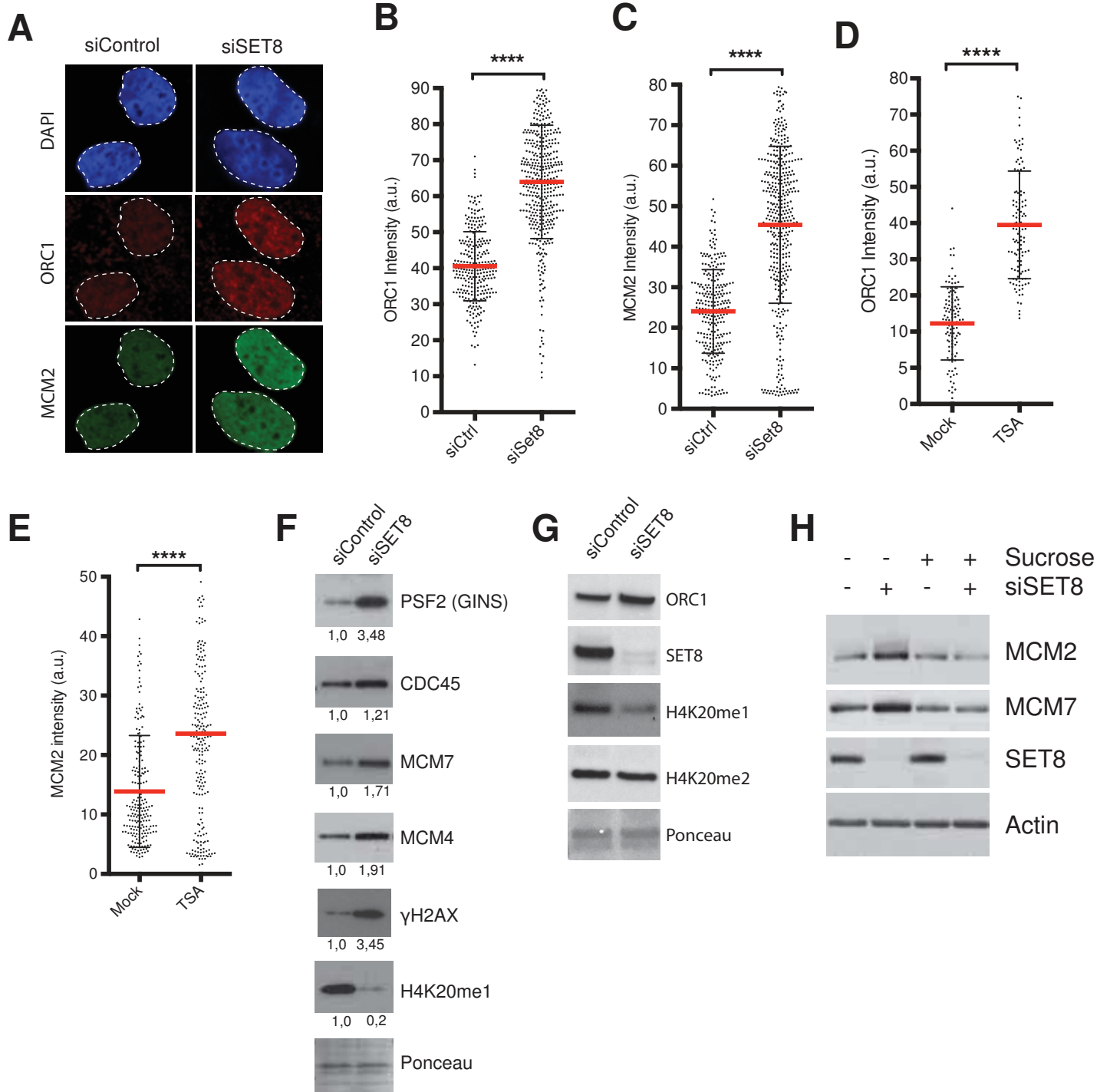


Figure 4: Chromatin structure limits unscheduled ssDNA formation.

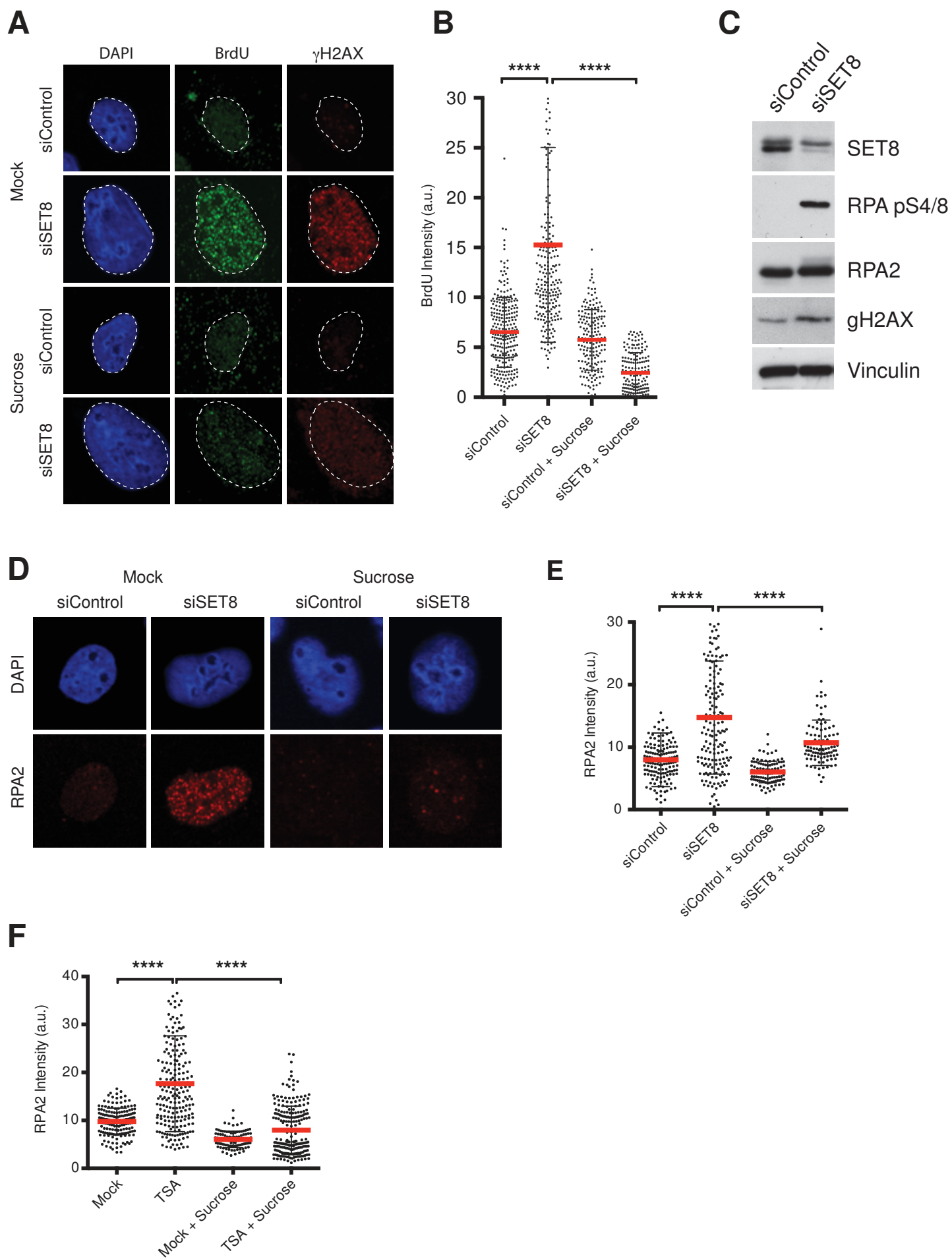


Figure 5: Chromatin-mediated control of the MCM2-7 complex promotes genome integrity

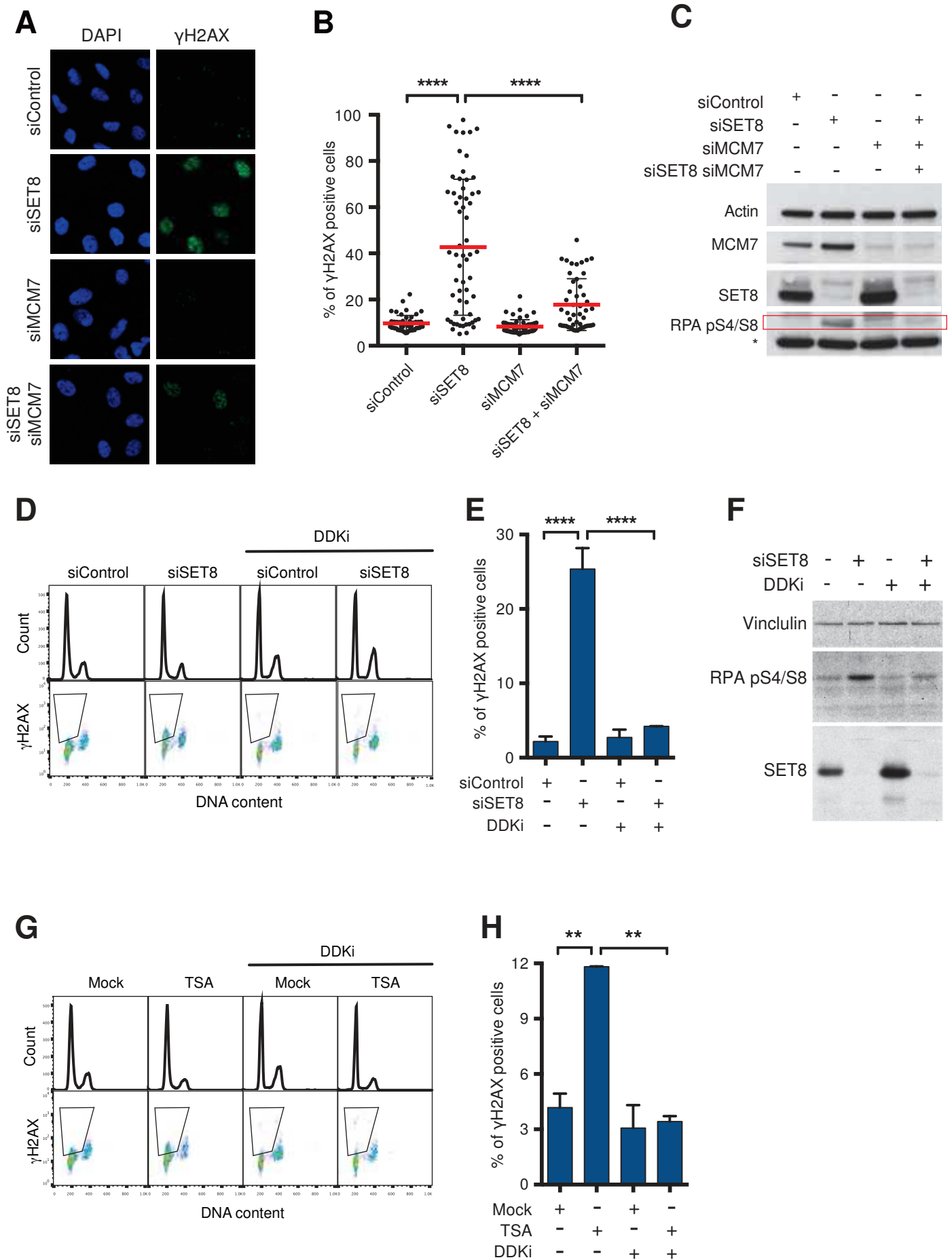


Figure 6: Chromatin structural dynamics promote genome stability

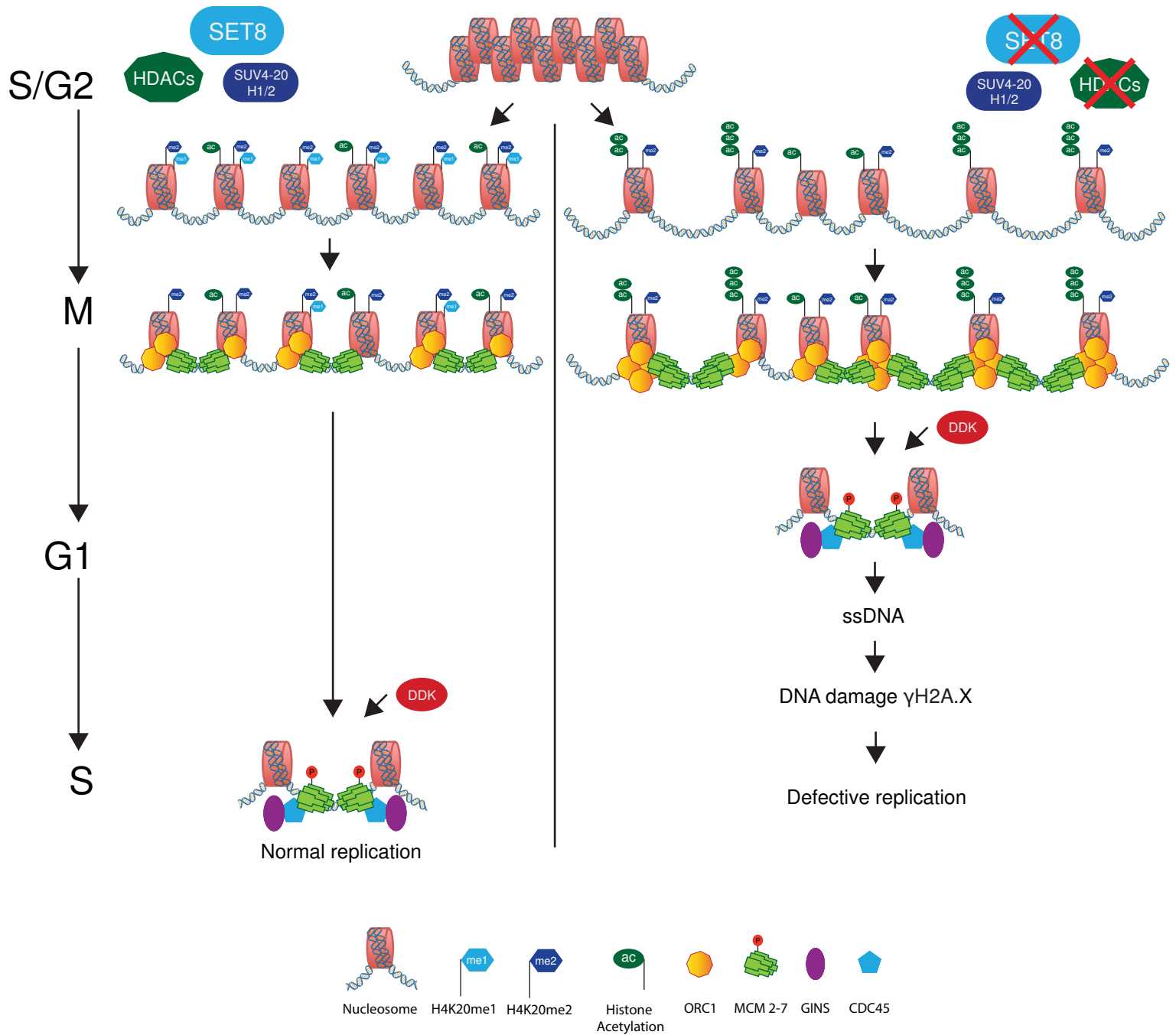


Figure S1

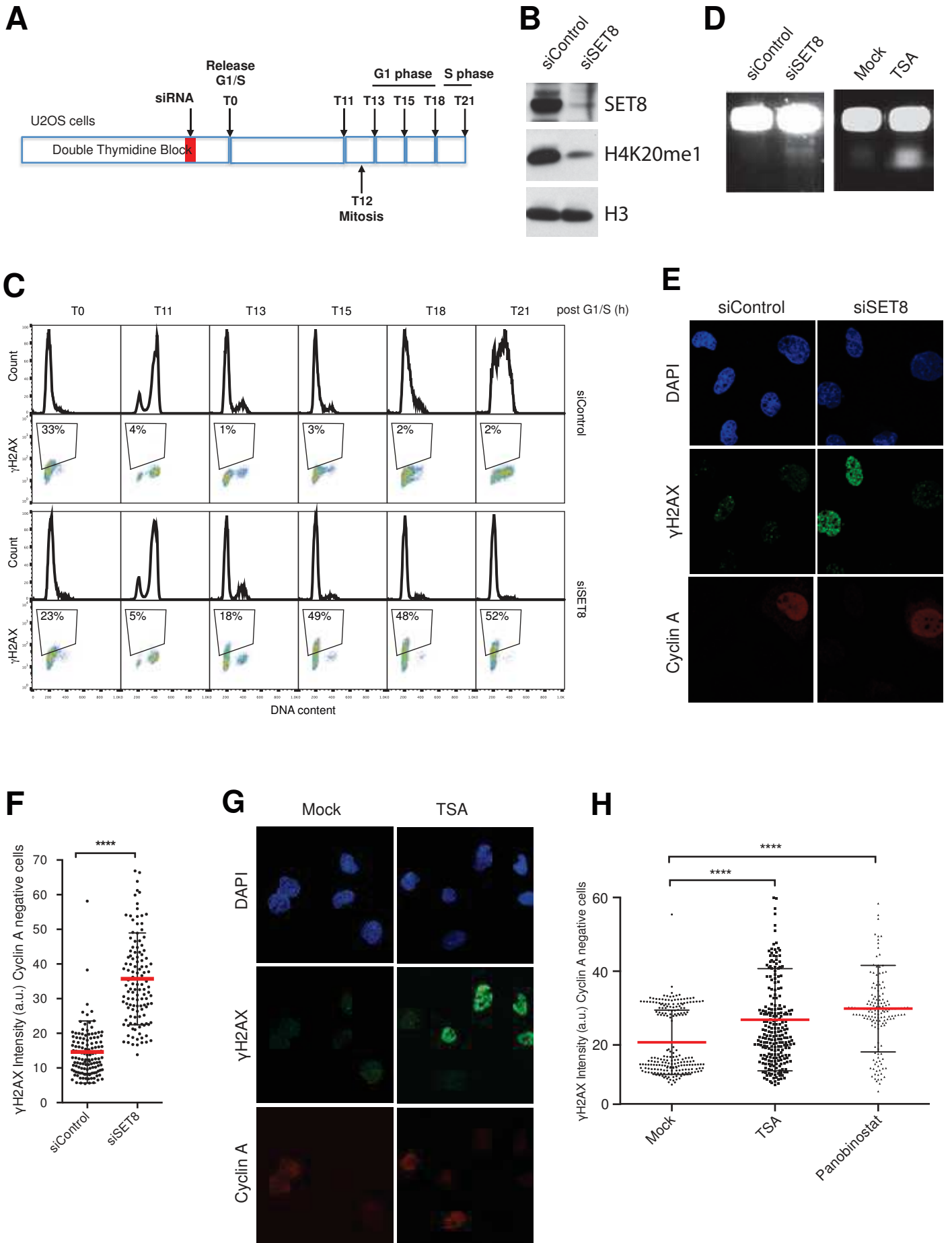
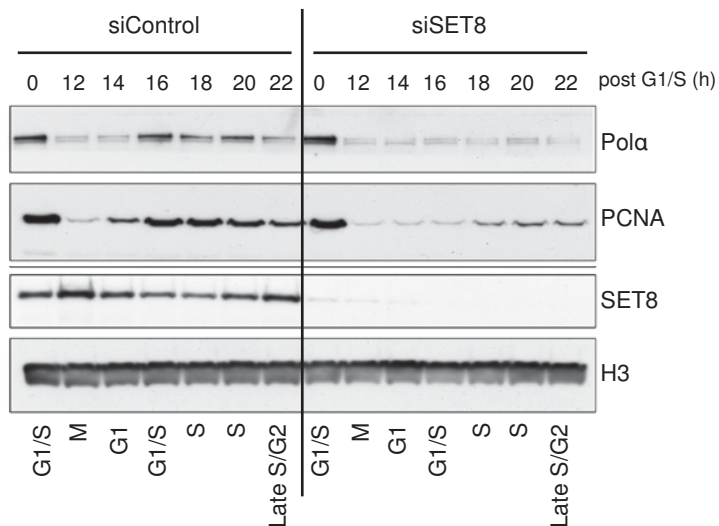
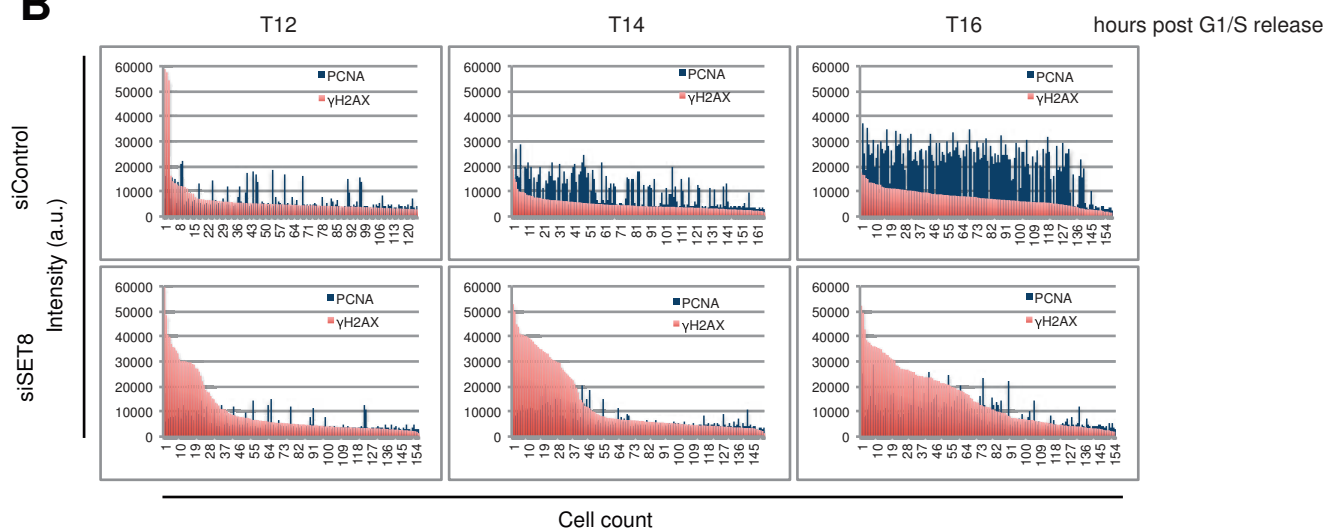


Figure S2

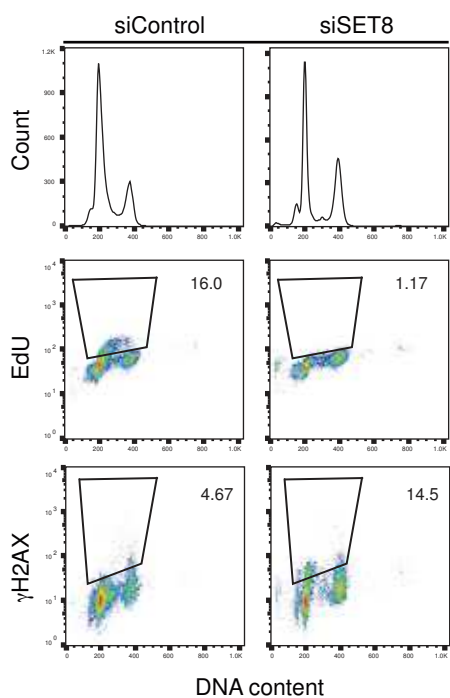
A



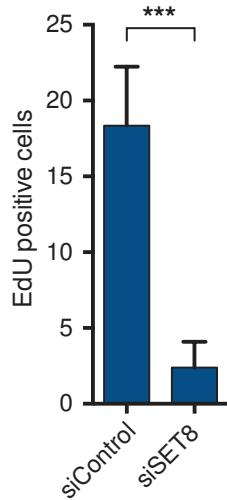
B



C



D



E

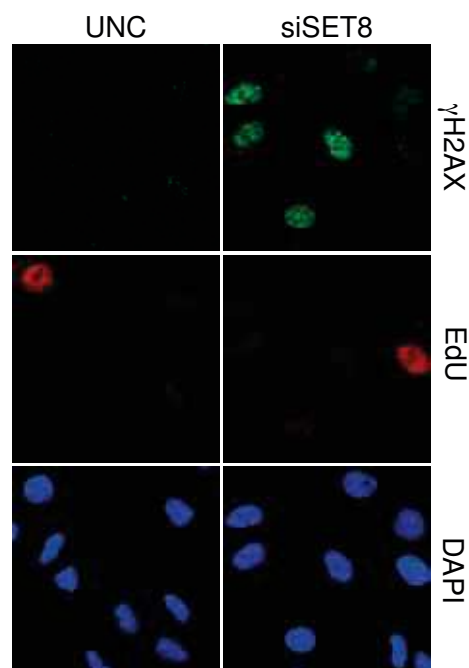


Figure S3

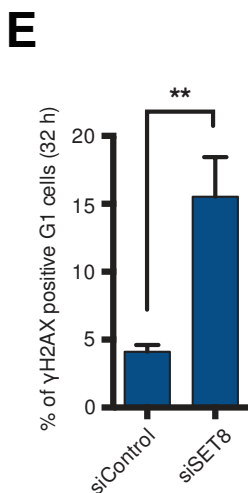
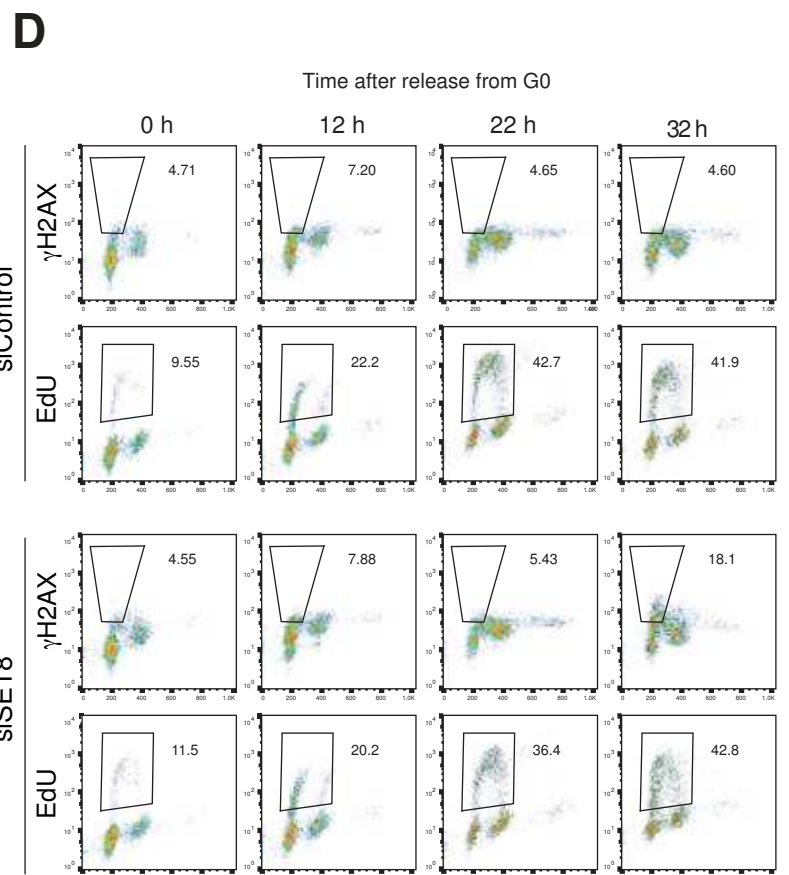
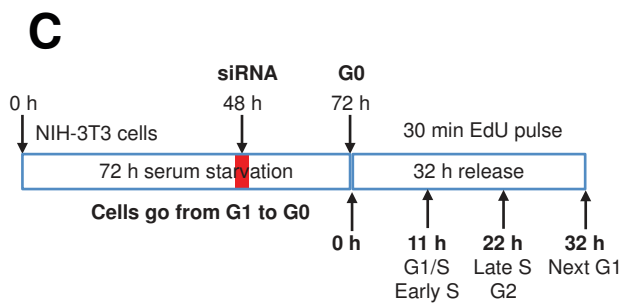
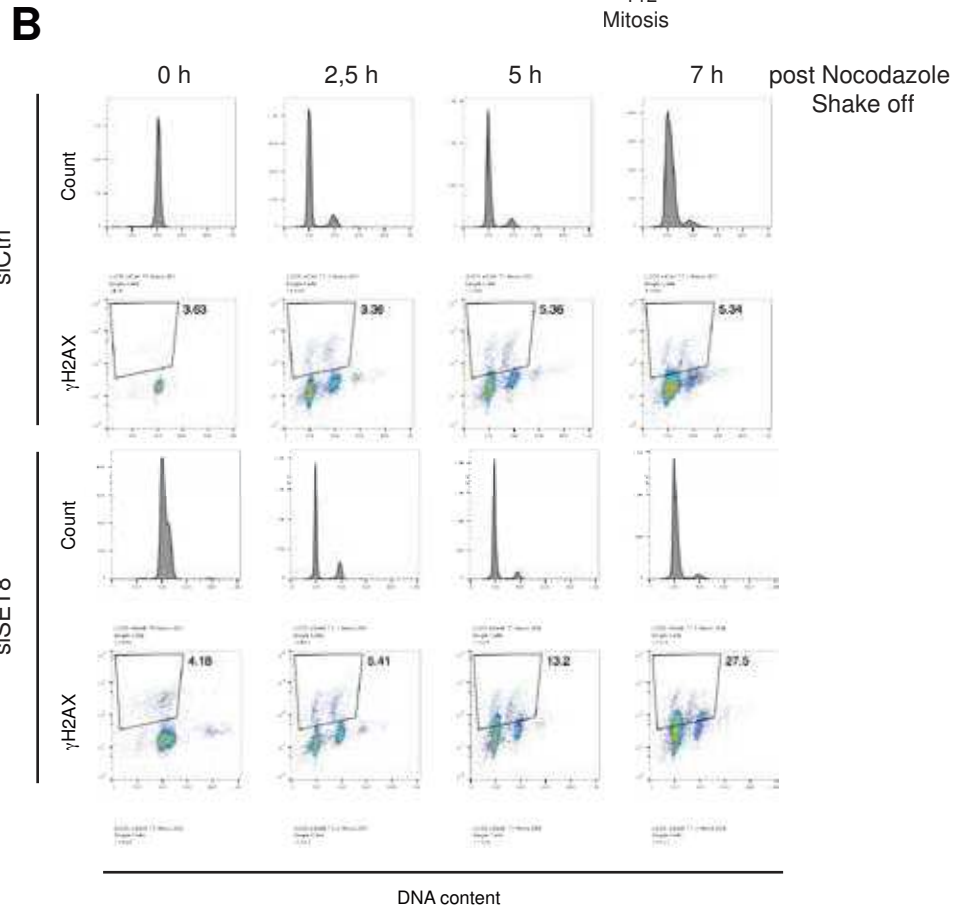
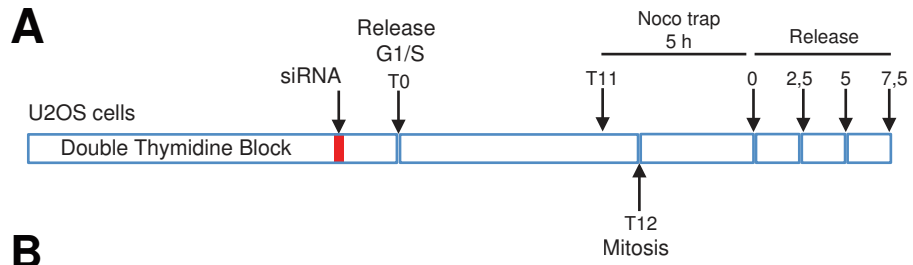


Figure S4

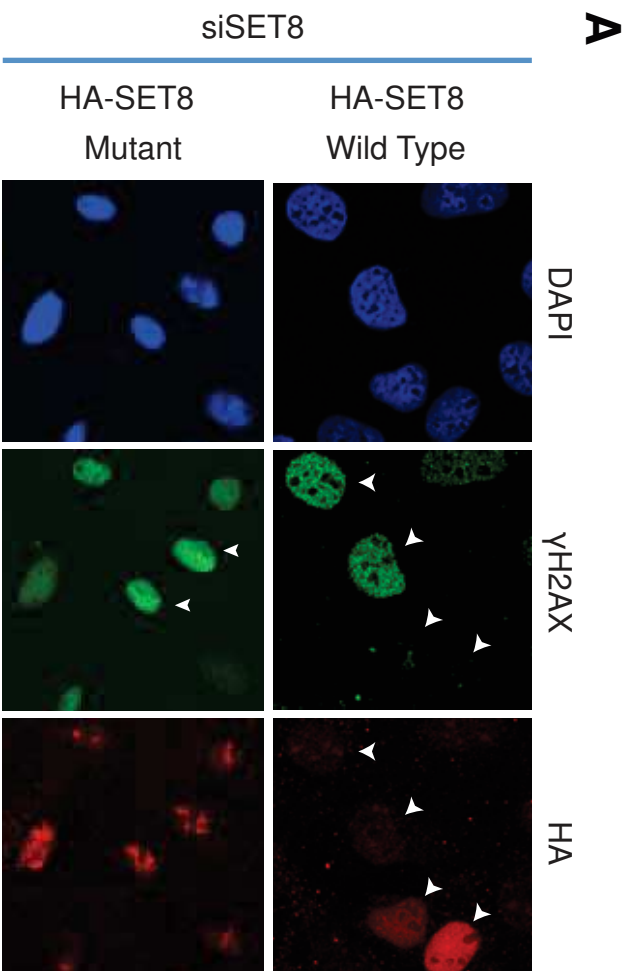


Figure S5

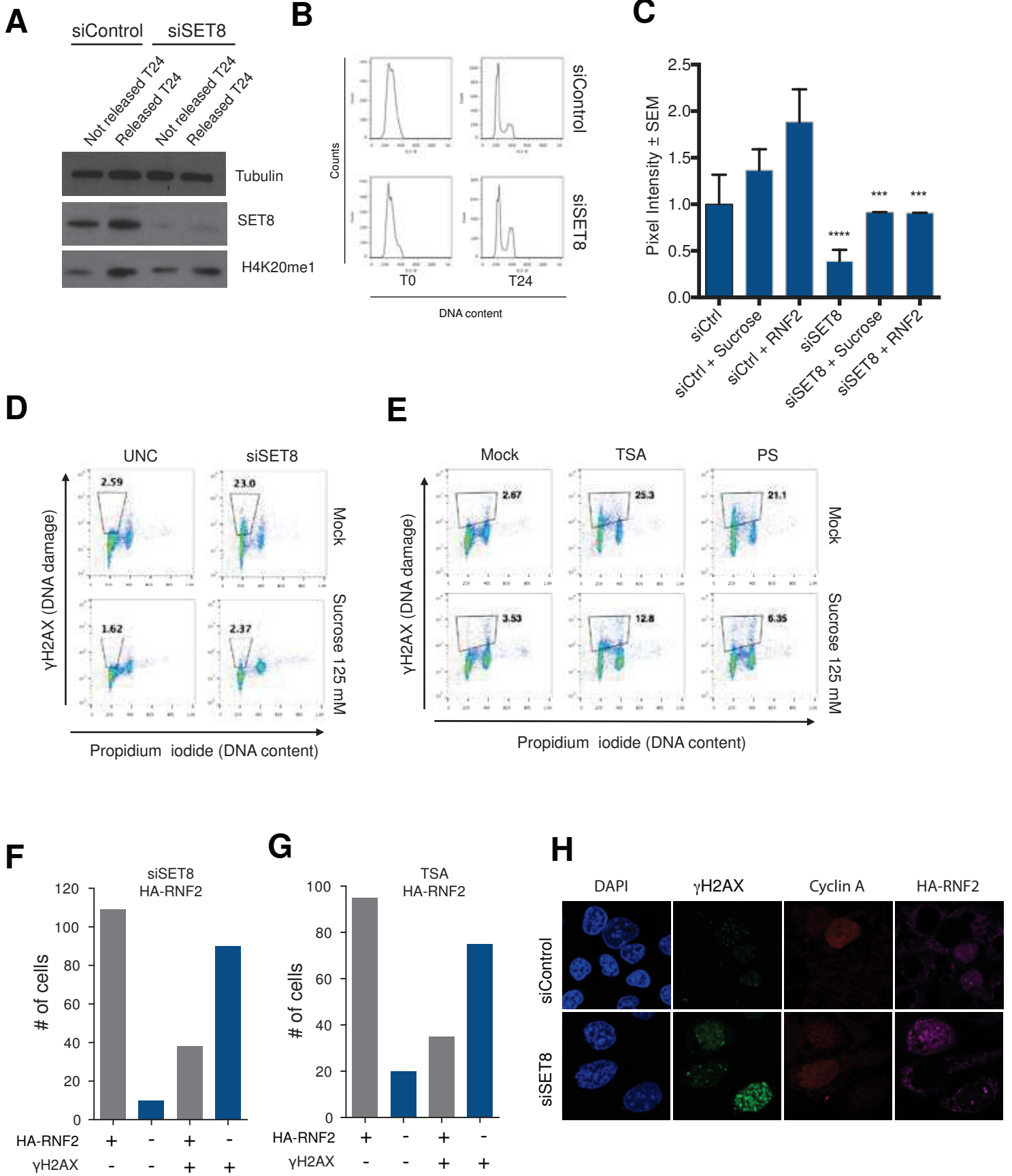


Figure S6

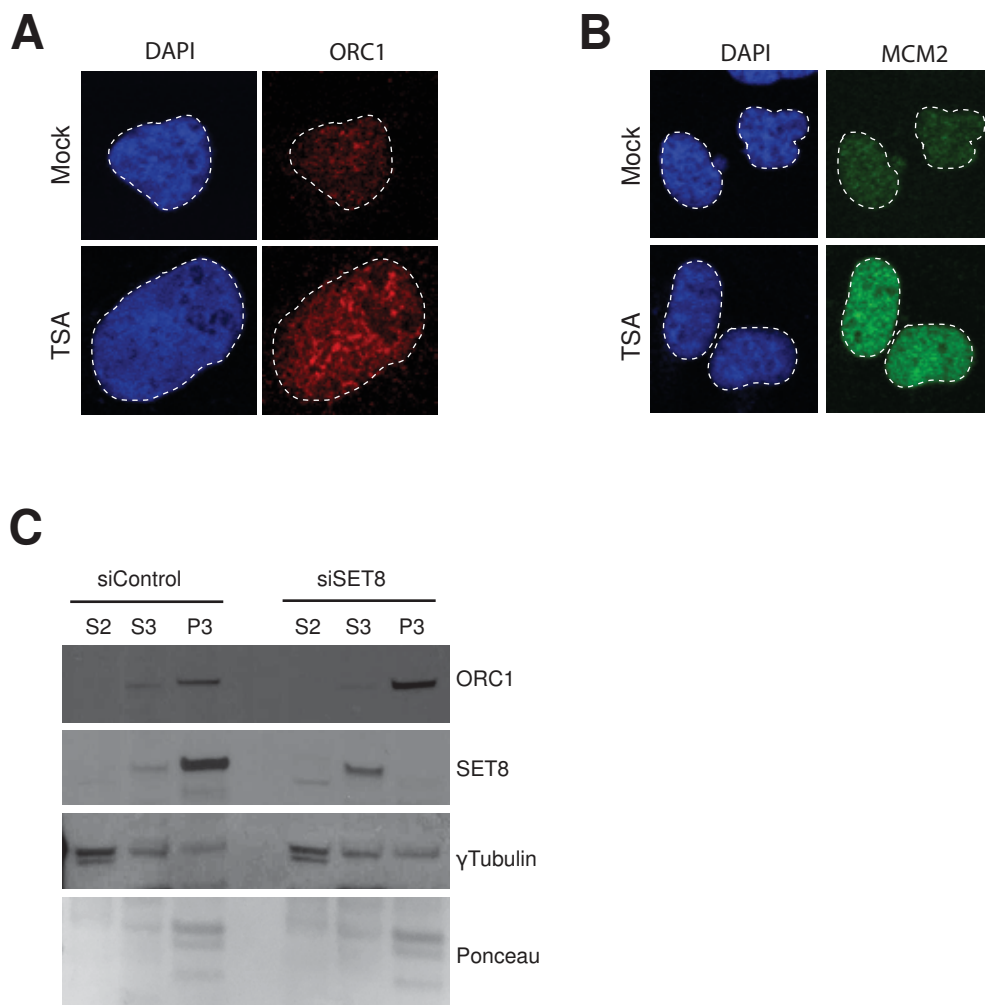


Figure S7

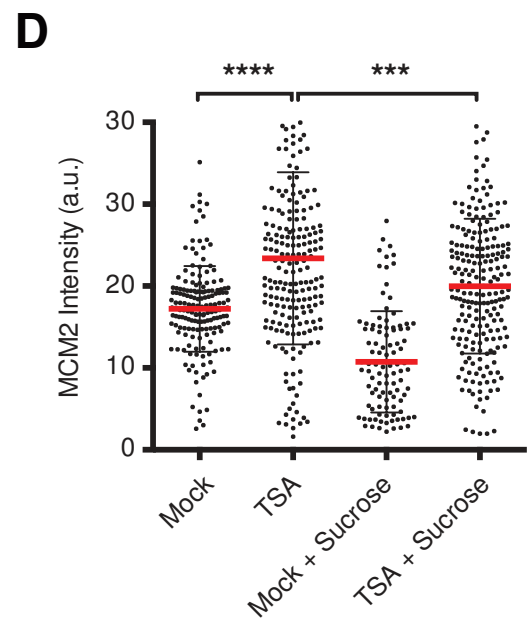
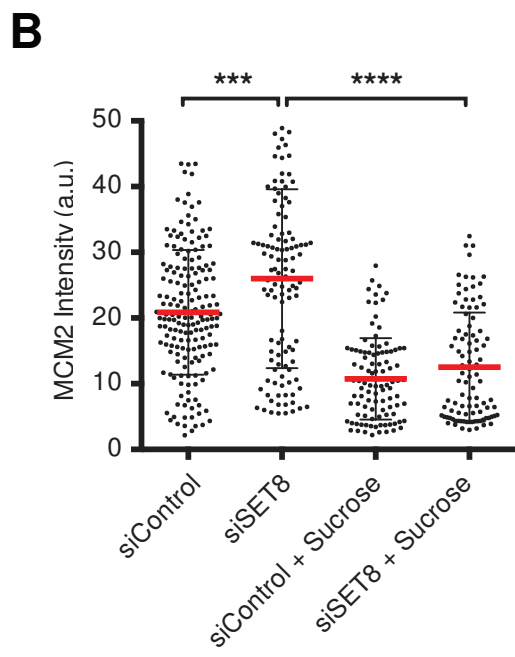
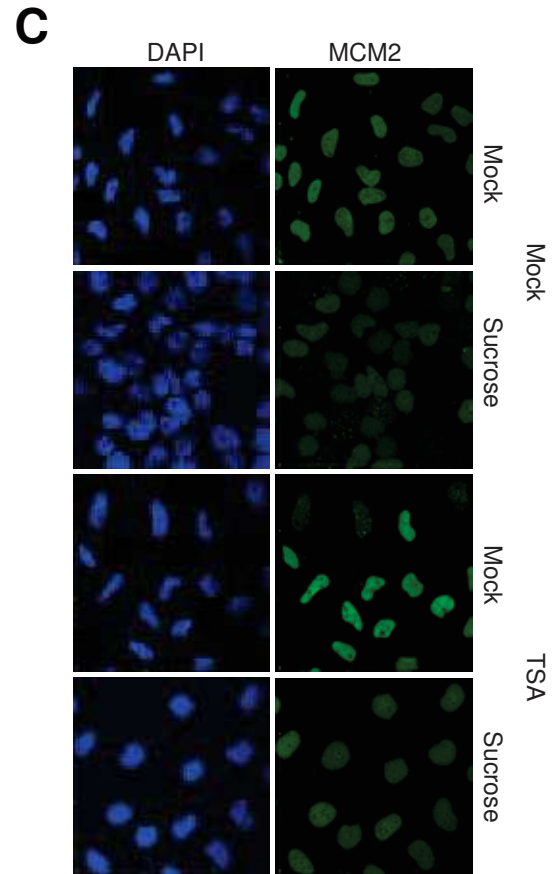
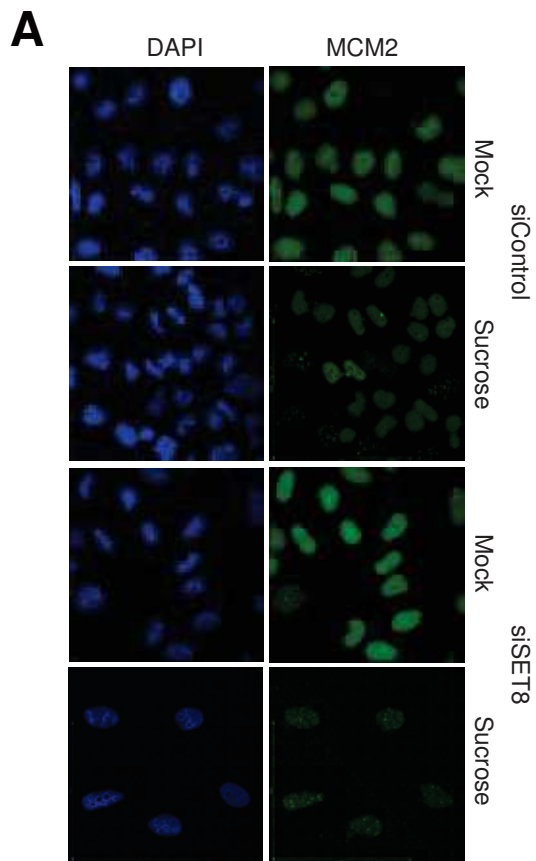
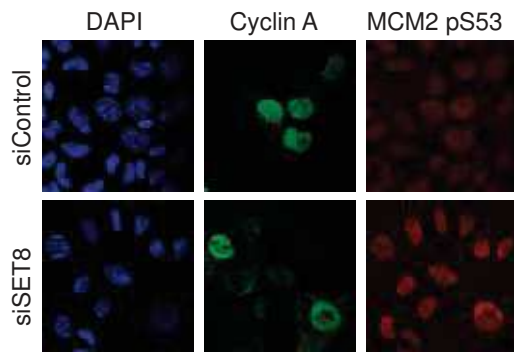
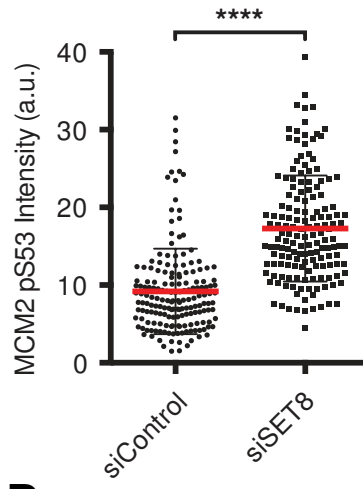


Figure S8

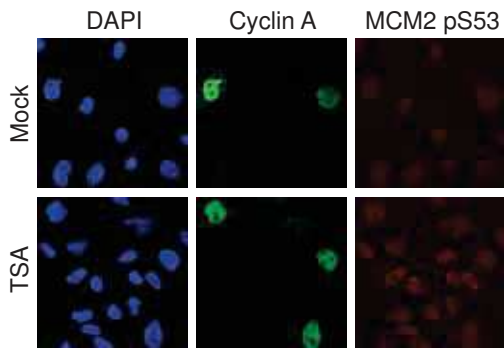
A



B



C



D

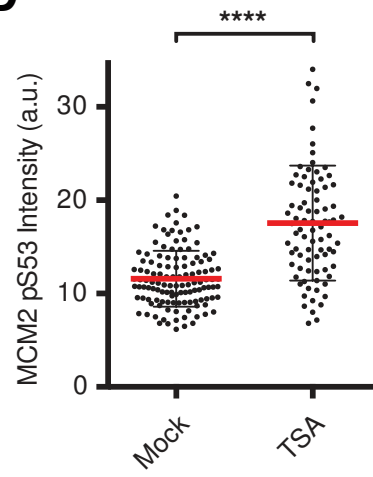


Figure S9

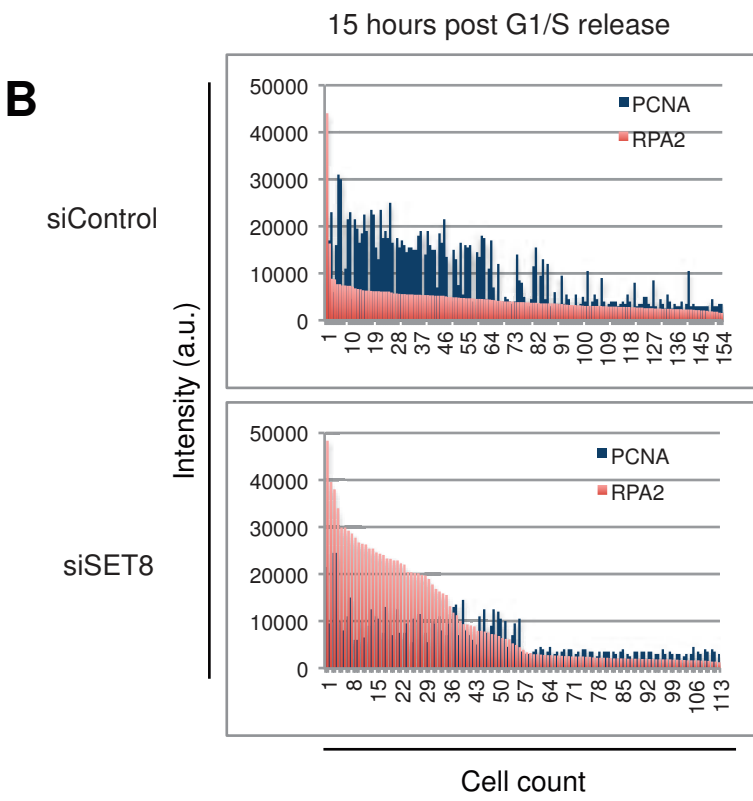
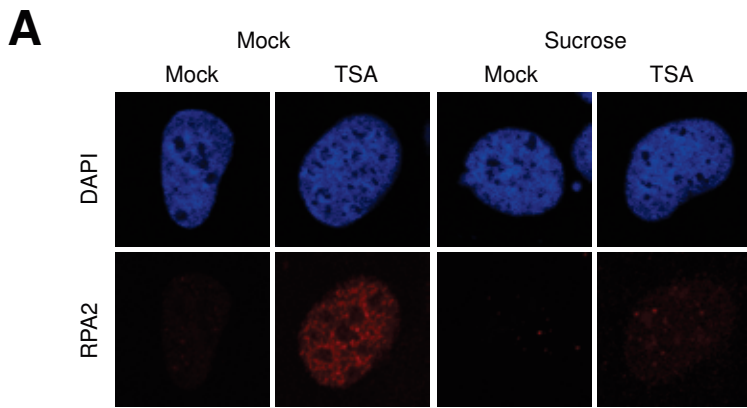


Figure S10

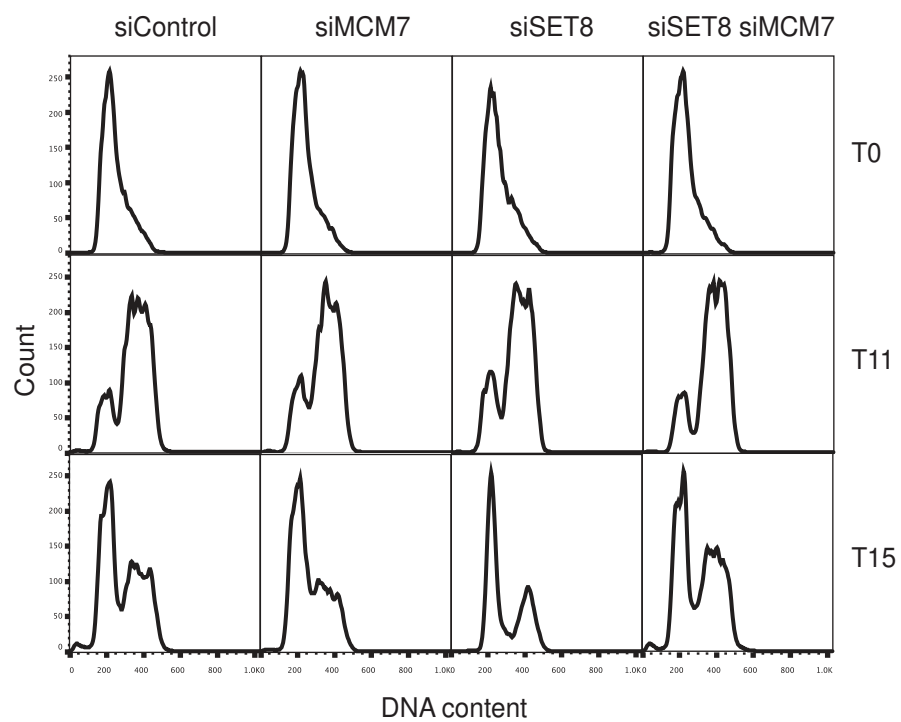
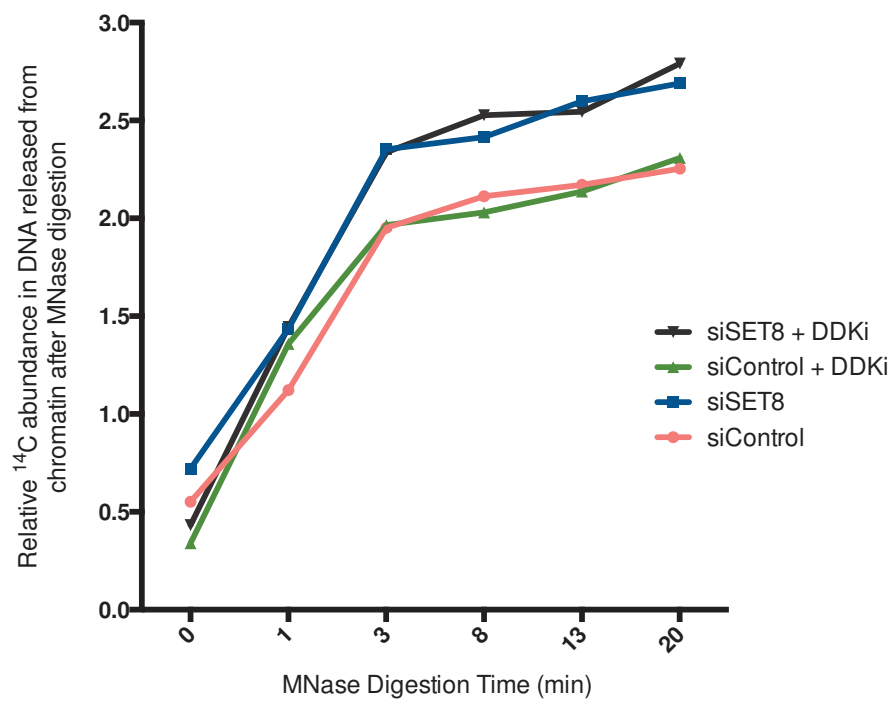


Figure S11



**2. ARTICLE 3: REPLICATION COUPLED PR-SET7 DEGRADATION
PRECLUDES ORCA-INDUCED HETEROCHROMATIN COMPACTION**

Fanny Izard, David Lleres, Robert Feil, Charlotte Grimaud, Eric Julien

Manuscrit en préparation, 2017

2.1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

Si plusieurs études démontrent un rôle de PR-Set7 dans la structure de la chromatine, le mécanisme par lequel PR-Set7 pourrait promouvoir une compaction de la chromatine normale durant le cycle cellulaire reste peu clair. Ainsi, la déplétion de PR-Set7 ou sa stabilisation en phase de réplication conduisent à des altérations de la structure de la chromatine en interphase et en mitose (Houston et al., 2008; Karachentsev et al., 2005; Oda et al., 2009). De façon plus spécifique le laboratoire de Lee Zou a fait l'hypothèse que les complexes condensines II reconnaîtraient la marque H4K20me1 ce qui permettrait leur recrutement à la chromatine en mitose (Centore et al., 2010). Toutefois ce mécanisme n'est pas formellement démontré. De plus, le KO conditionnel de PR-Set7 dans des cellules ES de souris au moment de la phase de réplication entraîne une diminution de H4K20me1 mais ne provoque pas de défauts de condensation au cours de la mitose suivante (Oda et al., 2009). Les cellules doivent avoir passé une mitose sans PR-Set7 pour commencer à présenter des défauts de condensation, ce qui va à l'encontre du modèle proposé. En outre, le laboratoire de Danny Reinberg a proposé un modèle selon lequel la marque H4K20me1 est mutuellement exclusive avec la marque H4K16Ac et promeut ainsi la compaction mitotique (Nishioka et al., 2002). Cependant, certaines données vont à l'encontre de ce modèle et notamment le fait que l'on retrouve de la mono-méthylation H4K20 sur les promoteurs de gènes actifs en même temps que de l'acétylation H4K16 (Talasz et al., 2005). Une partie de ma thèse a donc consisté à étudier l'implication de cette voie de méthylation dans la compaction de la chromatine en utilisant un système de microscopie haute résolution (Lières et al., 2009) dans des cellules U2OS en culture. Ce système repose sur la mesure du transfert d'énergie entre un couple de fluorophores (FRET, Fluorescence resonance energy transfer) par diminution du temps de vie du fluorophore donneur (FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy) dans des cellules U2OS exprimant de façon stable l'histone H2B en fusion avec EGFP et avec mCherry. Ainsi, plus la chromatine est compacte, plus les histones et donc les fluorophores sont proches et plus on observe de FRET par FLIM.

2.2. PRINCIPAUX RESULTATS

Mon travail de thèse a permis de montrer par un système d'étude de la compaction de la chromatine par FRET/FLIM que la stabilisation de PR-Set7 en phase de réplication par mutation de son domaine d'interaction avec PCNA (PIP) entraîne une compaction anormale de la chromatine qui se caractérise par une augmentation de la taille des zones d'hétérochromatine autour des nucléoles et à la périphérie du noyau. L'utilisation d'un mutant de PR-Set7 muté sur le domaine PIP et sur le domaine SET a permis de montrer que sa capacité à générer de la chromatine hyper-compacte dépend de son activité catalytique et donc possiblement de la méthylation H4K20 (Figure 2-C). De façon intéressante, la surexpression de la forme WT de PR-Set7, qui est dégradée en phase de réplication et qui n'induit pas d'augmentation globale de H4K20me1, n'entraîne pas de défaut de la structure de la chromatine (Figure 2-A). Ainsi, nous nous sommes demandé si cette compaction de la chromatine anormale pouvait concerner spécifiquement les cellules en phase de réplication. Cette hypothèse a été validée par une expérience de mesure de la compaction de la chromatine par FRET/FLIM dans des cellules qui expriment la protéine PCNA en fusion avec la BFP induites ou non pour PR-Set7^{PIPMUT} pendant 4 heures. Ainsi, j'ai pu observer que la formation d'hétérochromatine a lieu spécifiquement dans les cellules en cours de réplication (Figure 2-D). De façon intéressante cette compaction anormale est dépendante de l'activité des fourches de réplication et donc de la création de chromatine naissante (Figure 1-E/F). Ces données nous ont conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle la stabilisation de PR-Set7 entraîne une maturation anormale de la chromatine naissante. Si la dégradation PR-Set7 médiée par PCNA est nécessaire pour empêcher la formation d'hétérochromatine au moment de la réplication de l'ADN, la réapparition progressive de cette enzyme à la fin de la phase S pourrait être importante pour assurer une compaction et une maturation appropriée de l'hétérochromatine naissante. La déplétion de PR-Set7 par siRNA entraîne une décondensation de la chromatine qui s'accompagne d'une perte de foyers H3K9me3 et HP1 α . Cela suggère que la fonction de la voie H4K20 dans la formation d'hétérochromatine est une fonction naturelle qui a pu être mise en évidence à un moment du cycle cellulaire où la protéine PR-Set7 est normalement absente. Quel est le mécanisme impliqué dans cette maturation anormale ? Etant donné les données du laboratoire de Lee Zou qui suggèrent un recrutement des condensines sur la mono-méthylation H4K20 en phase de réplication conduisant une compaction prématurée de la chromatine j'ai voulu étudier l'implication des condensines dans la compaction anormale que j'ai observée en phase de réplication. Ainsi, la déplétion par siRNA de la sous-unité NCAPD3 ou de la sous-unité NCAPG2 du complexe condensine II n'abolit pas la compaction anormale induite par PR-Set7 (Figure 4-C), suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués. La marque de tri-méthylation H4K20 étant impliquée dans la structure de la chromatine je me suis demandé si ce phénotype de compaction dépendait d'une conversion de la marque H4K20me1 en H4K20me3 par les Suv4-20h.

L'inhibition de ces enzymes par un inhibiteur chimique (A-196) abolit la compaction anormale induite par la stabilisation de PR-Set7^{PIP MUT} (Figure 4-E). Cette expérience montre que, comme pour sa fonction dans l'activation de la réplication dans les régions hétérochromatiniennes, la fonction de PR-Set7 dans la structure de la chromatine dépend de la conversion de H4K20me1 en H4K20me3. La marque H4K20me3 est un site de fixation pour ORCA/LRWD1 qui semble impliquée dans la formation d'hétérochromatine (Giri and Prasanth, 2016; Giri et al., 2015). La déplétion, même partielle, d'ORCA/LRWD1 par siRNA en G1/S empêche cette compaction anormale induite par PR-Set7^{PIP MUT} (Figure 5-B), suggérant un rôle critique d'ORCA/LRWD1 et de la formation d'hétérochromatine dans ce processus de maturation de la chromatine en phase de réplication. La formation d'hétérochromatine implique largement les protéines HP1 et de façon intéressante la stabilisation de PR-Set7 en phase de réplication conduit à une modification du profil de HP1 α et HP1 β (Figure S1) et la déplétion de ces protéines empêche la compaction anormale de la chromatine induite par PR-Set7 (Figure 5-D). Tous ces résultats suggèrent que la stabilisation de PR-set7 entraîne un dépôt anormal de H4K20me1 sur la chromatine naissante qui sera convertie en H4K20me3 par les Suv4-20h. La marque H4K20me3 sera reconnue par la protéine ORCA/LRWD1 qui conduit à la formation anormale d'hétérochromatine *via* les protéines HP1.

Replication-coupled PR-Set7 degradation precludes premature ORCA-induced heterochromatin compaction

Fanny IZARD^{1,2}, David LLERES^{2,3}, Robert FEIL^{2,3}, Charlotte GRIMAUD^{1,2,+} and Eric JULIEN^{1,3,+}

1. Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194, Institut Régional du Cancer (ICM), Montpellier F-34298, France
2. IGMM, CNRS UMR5535
3. University of Montpellier, Montpellier, F-34090, France

+ : co-senior authors ;

Corresponding authors: Charlotte Grimaud (charlotte.grimaud@inserm.fr) and Eric Julien (eric.julien@inserm.fr)

SUMMARY

The heterochromatin domains are essential for the maintenance of genome stability by preventing recombination and ensuring nuclear architecture and proper mitotic chromosome segregation during the cell cycle. DNA replication poses a severe challenge for preserving heterochromatin structure in proliferating cells, as chromatin undergoes a wave of disruption and subsequent restoration in the wake of the passage of replication forks. The establishment of heterochromatin is tightly correlated with this histone methylation through mechanisms that still remains poorly understood. Several studies revealed that H4K20 methylation could be important in chromatin structure and chromosome compaction especially through H4K20me3 which is an epigenetic hallmark of heterochromatin. In this study, we investigated the mechanisms by which H4K20 methylation states regulate chromatin structure during the cell cycle. By developing a quantitative analysis of chromatin compaction using FRET-FLIM approach with histone H2B-Cherry and H2B-GFP proteins, we revealed that PR-Set7 stabilization in S phase and the subsequent appearance of H4K20me1 causes a premature chromatin compaction on nascent chromatin. This chromatin compaction phenotype depends on Suv4-20h enzymes and the conversion of H4K20me1 to H4K20me3. This triggers the promiscuous binding of ORCA/ORC complex followed by the aberrant recruitment of heterochromatin isoforms HP1 α and HP1 β , thereby leading to the premature assembly of compact heterochromatin structure on nascent DNAs. Altogether, these results indicate that the restoration of H4K20me3 after DNA synthesis constitutes a primary signal for heterochromatin compaction on newly assembly chromatin and that the replication-coupled PR-Set7 degradation regulates timely heterochromatin maturation.

INTRODUCTION

In eukaryotic cells, the differential organization of chromatin into euchromatin and heterochromatin domains determines genome compaction and activity in the nucleus. Whereas euchromatin is defined as the loosely packed and transcriptionally poised chromatin fraction, heterochromatin corresponds to chromatin regions that remains highly condensed after mitosis and that impedes DNA accessibility and gene expression. These heterochromatin regions are replicated at late S-phase compared to euchromatin regions and tend to cluster together and localize close to nuclear periphery and around nucleoli, forming condensed sub-nuclear foci typically enriched for tri-methylation of histone H3 at lysine 9 (Dambacher et al., 2013; Farkash-Amar and Simon, 2010; Goren and Cedar, 2003). The establishment of heterochromatin is tightly correlated with this histone methylation, which serves as molecular anchors for the HP1 family of chromodomain proteins required for heterochromatin compaction and silencing (Dambacher et al., 2013). Beyond its role in transcriptional repression, the assembly of heterochromatin domains is also essential for the maintenance of genome stability, by preventing recombination and ensuring nuclear architecture and proper mitotic chromosome segregation during the cell cycle (Bloom, 2014; Ellermeier et al., 2010; Peters et al., 2001). However, DNA replication poses a severe challenge for preserving heterochromatin structure in proliferating cells, when chromatin undergoes a wave of disruption and subsequent restoration in the wake of the passage of replication forks. If uncontrolled, an unfaithful heterochromatin restoration at the right time and the right place during S phase can have a profound impact on genome integrity and thus favor human diseases such as cancer (You and Jones, 2012).

The recycling of modified parental histones offers an attractive system for propagating the chromatin organization after each round of DNA synthesis, as it ensures that histone modifications are kept at their correct location on newly replicated DNA (Almouzni and Cedar, 2016). Moreover, parental histones may also serve as a template to modify neighboring new histones. This mechanism has been proposed for the replication-coupled maintenance of heterochromatin, given that H3K9me3 marks can recruit their cognate enzymes and potentially be self-propagating (Loyola et al., 2009; Margueron et al., 2009). However, this view is challenged by the fact that the establishment of H3K9me3 on newly histones extends over cell generations (Alabert et al., 2015). Moreover, although the depletion of HP1 proteins or enzymes responsible for H3K9me3 significantly impairs heterochromatin organization, cells depleted for these factors still display DAPI-dense heterochromatin foci (Peters et al., 2003). Thus, other mechanisms and chromatin components are also required to ensure the proper

compaction of heterochromatin domains after each round of DNA synthesis. To date, the nature of these mechanisms and the factors involved still remains poorly understood, but they are likely connected to the process of de-acetylation of newly synthesized histones and the preferential replication/assembly of heterochromatin in late S-phase.

Another epigenetic hallmark of heterochromatin regions is the strong enrichment in the trimethylation of histone H4 at lysine 20 (H4K20me3) (Schotta et al., 2004). In mammalian cells, this methylation is generated by the Suv4-20h1/2 enzymes from H4K20 monomethylation (H4K20me1) state, which is earlier induced by the lysine methyltransferase PR-Set7 (also known as KMT5A or SET8) from unmethylated H4K20 (Brustel et al., 2011). H4K20 methylation is unique among histone methylation in that it oscillates during the cell cycle with the lowest levels during S-phase (Tardat et al., 2010). This cell-cycle oscillation is caused by the proteolytic destruction of PR-Set7 at the onset of DNA replication (Abbas et al., 2010; Centore et al., 2010; Oda et al., 2010). PR-Set7 undergoes a PCNA-coupled CRL4cdt2-dependent degradation (Tardat et al., 2010), which prevents the appearance of H4K20me1 on newly deposited histone H4 until the end of S phase, at which time this mark is re-established on nascent chromatin (Oda et al., 2009). After what, most of H4K20me1 signals are rapidly converted by Suv4-20h1/h2 to H4K20me2 all along the genome and to H4K20me3 specifically in heterochromatin regions (Schotta et al., 2008). Until now, the functional role of H4K20me3 in heterochromatin and its cell-cycle oscillation is poorly understood.

Recently, several studies revealed that H4-K20me3 is important for the replication timing of a large fraction of heterochromatin domains, by serving as binding site for the heterochromatin ORC-associated protein LRWD1/ORCA and the subsequent the recruitment of pre-replication complex at a subset of late-firing origins (Brustel et al., 2017). Consistent with this, loss of Suv4-20h1/2 and H4K20me3 impair the licensing of these origins and delay the replication of heterochromatin. Conversely, failure to degrade PR-Set7 leads to premature appearance of H4K20 methylation marks on nascent chromatin followed by repeated licensing/activation of origins (DNA re-replication) in Suv4-20h expressing cells (Beck et al., 2012; Centore et al., 2010; Tardat et al., 2010). Intriguingly, this DNA re-replication phenotype is preceded by a premature chromatin compaction and a G2/M arrest (Centore et al., 2010). Because improper mitotic chromosome structure is observed in PR-Set7 depleted cells and that H4K20me1 might serve as binding sites for CAPD3 and CAPG2, two key members of the mitotically operating condensin II complex, it has been proposed that PR-Set7-induced H4K20me1 at the end of S phase might be important for the conversion of interphase chromatin into condensed mitotic chromosomes (Centore et al., 2010; Houston et al., 2008;

Karachentsev et al., 2005; Liu et al., 2010; Oda et al., 2009). However, this view is questioned by the fact that cells depleted for PR-Set7 at G1/S transition can still progress normally through mitosis until the following cell cycle where defects in chromatin structure and replication occur (Oda et al., 2009). Furthermore, the influence on chromatin organization is not restrained to mitosis, as PR-Set7 depleted cells display less compact interphase chromatin structure when compared to wild-type cells (Sakaguchi et al., 2012).

In this study, we sought to investigate the mechanisms by which PR-Set7 and H4K20 methylation regulate chromatin structure during the cell cycle. By developing a quantitative analysis of chromatin compaction using FRET-FLIM approach with histone H2B-Cherry and H2B-GFP proteins (Llères et al., 2009), we revealed that PR-Set7 stabilization in S phase and the subsequent appearance of H4K20me1 causes a premature chromatin compaction on nascent chromatin that is unrelated to a premature chromatin recruitment of condensin II complex as previously thought (Centore et al., 2010). Instead, this chromatin compaction phenotype depends on Suv4-20h enzymes and the conversion of H4K20m1 to H4K20me3. This triggers the promiscuous binding of heterochromatin proteins ORCA followed by the aberrant recruitment of HP1 proteins and enzymes responsible for H3K9me3, thereby leading to the formation of extra heterochromatin structure on nascent chromatin. Altogether, these results indicate that, in addition to promote the licensing of late-firing origins in heterochromatin, H4K20me3 constitutes a primary signal for heterochromatin assembly on newly assembly chromatin during the cell cycle and that the replication-coupled PR-Set7 degradation contributes to secure the timely assembly of heterochromatin at the end of S-phase.

RESULTS & DISCUSSION

Setting up the FRET-FLIM approach to quantify nanoscale chromatin structure and dynamics during the cell cycle. To investigate the role of PR-Set7 in the regulation of chromatin structure and dynamics during the cell cycle, we used a quantitative multiphoton FRET-FLIM approach to measure chromatin compaction at nanoscale levels in living cells (Lleres et al., 2009). To this end, fluorescent-tagged histones H2B-eGFP and histones H2B-mcherry were stably expressed in U2OS cell lines (hereafter named U2OS-2FP), which harbored tetracycline-inducible FLAG-PR-SET7 constructs. Immunoblotting analysis after biochemical cellular fractionation showed that fluorescent H2B fusion proteins were efficiently incorporated into chromatin and represented less than 10% of total histone H2B (Figure 1A). Consistent with this, fluorescence imaging showed that both H2B-eGFP and H2B-

mcherry were localized in all nuclei with a staining pattern similar to DAPI, (Figure 1B, upper panels). Furthermore, the cell-cycle profile of U2OS-2FP was similar to the wild-type cell line (Figure 1C), indicating that H2B fusion proteins by themselves did not perturb the U2OS cell-cycle progression. Previous studies have shown that inter-nucleosomal interactions between H2B-eGFP and H2B-mCherry can generate FRET (i.e. Forster energy transfer between donor and acceptor fluorescent proteins), whose efficiency depends on the distance between distinct nucleosomes (Lleres et al., 2009). Thus, an increase in FRET efficiency reflects a reduced inter-nucleosomal distance and a higher degree of chromatin compaction in living cells. To verify that the expression levels of fluorescence H2B fusion proteins in U2OS-2FP was sufficient to measure differential chromatin compaction states, cells were imaged following two-photon excitation at 890 nm and the FRET between fluorescent proteins was measured by FLIM in each pixel. Then, the FRET efficiency was calculated for each pixel and its distribution (as % FRET) into nuclei was depicted using discrete pseudocolors. As negative control, U2OS cells expressing H2B-eGFP only were imaged in parallel. As expected, a marked decrease in the mean fluorescence lifetime (T) of H2B-eGFP and was detected in U2OS-2FP but not in U2OS cells expressing only H2B-eGFP, which confirmed FRET interactions between the two fluorescent H2B histones (Figure 1B, lower panels and Figure 1D). Importantly, a heterogeneous FRET efficiency map was observed throughout nuclei, with highest FRET efficiency (red color) overlapping with constitutive heterochromatin regions at the nuclear periphery and around nucleoli (Figure 1B, lower panels). These data demonstrate the efficiency of the FRET-FLIM approach to measure the spatial distribution of different chromatin compaction states into the nuclei of living U2OS cells.

The stabilization of PR-Set7 during S-phase promotes heterochromatin compaction on nascent DNAs. We next examined the levels of chromatin compaction by measuring FRET efficiency in asynchronous U2OS-2FP cells overexpressing the PR-Set7 mutant harboring a mutated PIP degnon motif (PR-Set7^{PIPmut}) and that is therefore resistant to PCNA-mediated proteolytic degradation or the catalytic inactive PR-Set7^{PIPmut+SETmut} double mutant. For this, cells were treated with tetracyclin to induce the expression of different FLAG-tagged PR-SET7, 24 hours before the microscopic analysis (Figures 2A, 2B and 2C). FRET-FLIM revealed that expression of PR-Set7^{PIPmut}, but not of PR-Set7^{PIPmut+SETmut}, led to a higher FRET efficiency in U2OS cells (Figures 2A and 2B). At this time, we did not observe yet a significant appearance of cells with a DNA content higher than 4N (data not shown), thereby indicating that the expression of a catalytic active PR-Set7 enzyme unable to interact

with PCNA triggers an aberrant degree of chromatin compaction before to induce a DNA re-replication. Analysis of chromatin accessibility by low-resolution MNase cleavage experiments led to the conclusion that expression of PR-Set7^{PIP} might promote an overall chromatin compaction (Centore et al., 2010; Jorgensen et al., 2011). However, as illustrated in images of Figure 2A, the increase in FRET efficiency was not homogeneously distributed but mainly occurred in chromatin regions around nucleoli and at nuclear periphery, suggesting that the aberrant chromatin compaction upon PR-Set7^{PIP} expression may be related to the extension of the size and/or the nuclear territory of heterochromatin domains (Figure 2B). Consistent with this possibility, significant changes in the nuclear pattern of heterochromatin proteins HP1 α and HP1 β was observed in PR-Set7^{PIPmut} cells, whereas the profile of HP1 γ protein remains largely unaffected (supplementary Figure S1). Unexpectedly, forced expression of PR-Set7^{WT} did not cause higher FRET efficiency in U2OS-2FP cells (Figure 2C), suggesting that the ability of PR-Set7^{PIPmut} to promote heterochromatin compaction at distinct nuclear regions is linked to the stabilization of this mutant during S-phase. To verify this, we performed FRET-FLIM measurements in PR-Set7^{PIPmut} expressing U2OS-2FP cells previously transfected with BFP-tagged PCNA vector in order to discriminate between non-replicating and replicating cells (Figure 2D). Conspicuously, higher FRET efficiency was observed only in BFP-PCNA positive cells, confirming that alterations in chromatin structure upon PR-Set7^{PIPmut} expression are specific to replicating cells (Figure 2D). We therefore hypothesized that these chromatin alterations could be related to an uncontrolled timing of heterochromatin assembly on nascent DNAs. To test this hypothesis, FRET-FLIM analysis were performed in U2OS-2FP cells arrested into early S-phase by thymidine block before induction of PR-Set7^{PIPmut} expression or released into S-phase at the time of induction. Whereas cells released from thymidine and that progressed through S phase displayed the appearance of higher FRET population compared to control cells, thymidine-arrested replicating cells did not (Figure 2E). The same results were obtained with aphidicolin-treated cells arrested in S phase 5 (Figure 2F). Altogether, these results indicate that the ability of PR-Set7-to induce the formation of highly compact chromatin domains is linked to the progression of replication forks and the process of DNA synthesis. In other words, it suggests that the absence of PR-Set7 degradation during S-phase triggers a promiscuous heterochromatin assembly and compaction on nascent DNAs generated by replication forks.

Loss of PR-Set7 impairs heterochromatin compaction and organization. If PCNA-mediated PR-Set7 degradation is necessary to preclude heterochromatin formation at the beginning of DNA

replication, the progressive re-appearance of this enzyme at end of S-phase might be important to ensure proper compaction and maturation of nascent heterochromatin. To investigate further this possibility, we depleted PR-Set7 by siRNA and examined the effects on FRET efficiency in U2OS-2FP cells and the distribution of HP1 α and the heterochromatin epigenetic marker H3K9me3 by immunofluorescence in U2OS-eGFP cells. These analysis were performed two days after siRNA treatment, at the time where PR-Set7 depletion led to a decrease in H4K20 methylation but did not cause yet a strong impact on cell cycle progression, as measured by western-blot and flow cytometry (Figure 3A). As shown in Figure 3B, a heterogeneous FRET efficiency map was observed throughout control siRNA nuclei, reflecting different chromatin compaction states. Upon PR-Set7 depletion, the highest FRET populations, including heterochromatin regions at the nuclear periphery and around nucleoli, were largely eliminated, with a few remaining condensed foci predominantly located at the nuclear periphery. Consistent with this reduction in heterochromatin compaction, immunofluorescence analysis of PR-Set7 depleted cells with anti HP1 α and anti-H3K9me3 antibodies showed a significant reduction in the number and intensity of nuclear foci for these two heterochromatin markers with a higher staining at the nuclear periphery compared to control siRNA treated cells (Figure 3C). Taken together, these results suggest that PR-Set7 is indeed required for establishing proper chromatin compaction and organization at nuclear regions of heterochromatin.

PR-Set7 induced heterochromatin compaction depends on Suv4-20h activity, but not of condensin II complex. We next sought to determine the mechanisms by which the PR-Set7 may control the timing of heterochromatin restoration and compaction on nascent DNAs. As described previously, we observed that the stabilization of PRSet7^{PIPmut} led to an increase in the global levels of both H4K20me1 and H4K20me3 (Figure 4A). Since H4K20me1 increase naturally coincides with mitotic condensation and may serve as binding for NCAPD2 and NCAPG3 (Centore et al., 2010; Liu et al., 2010), two key components of condensin II complex that triggers mitotic chromatin condensation, we asked whether the premature recruitment of these complex is responsible for the chromatin compaction phenotype in PR-Set7^{PIPmut} expressing cells. To verify this hypothesis, we performed FRET-FLIM experiments in PR-Set7^{PIPmut} U2OS-2FP cells previously treated for 2 days with siRNA against *NCAPD2* or *NCAPG3* mRNA. Although CAPD2 or CPAG3 depletion slightly delayed cell-cycle progression by reducing the number of replicating cells compared to siRNA control treated cells (Figure 4B), we still observed chromatin over-compaction upon PR-Set7^{PIPmut} expression in CAPD2 and CAPG3 depleted cells, as indicated by the appearance of higher FRET nuclear regions

in these cells compared to controls (Figure 4C). Thus, despite the defined role of H4K20me1 in mitotic condensation and CAPD2/CPAG3 in chromatin condensation and heterochromatin, these results indicate that the recruitment of condensin II complex on H4K20me1 is not involved in the chromatin compaction phenotype induced by PR-Set7^{PIPmut} in replicating cells.

Because H4K20me3 is hallmark constitutive heterochromatin (Schotta et al., 2008), we asked whether the promiscuous heterochromatin compaction induced by the stabilization of PR-Set7 during S phase could be caused by the premature appearance of H4K20me1 on nascent DNAs and its rapid conversion to H4K20me3 by Suv4-20h methyltransferases. To test this possibility, we measured FRET efficiency in PR-Set7^{PIPmut} expressing U2OS 2FP cells that were previously treated for 2 days with A-196, a chemical inhibitor of Suv4-20h1/h2 enzymes (Bromberg et al., 2017). Immunoblot analysis of whole cell extracts confirmed that A-196 treatment was sufficient to maintain high levels of H4K20me1 and to prevent the increase appearance of H4K20me3 signals in PR-Set7^{PIP} expressing cells (Figure 4D). In this context, the increase in percentage of FRET efficiency was abolished in these cells compared to control PR-Set7^{PIPmut} expressing cells treated with DMSO (Figure 4E). The same results were obtained in U2OS-2FP cells depleted for Suv4-20h1/h2 by siRNA (Supplementary Figure S3). Taken together, these results demonstrate that the assembly of highly compact heterochromatin structure caused by PR-Set7 stabilization during S-phase is dependent on Suv4-20h and its products H4K20me3.

PCNA-mediated PR-Set7 degradation controls timely ORCA-induced heterochromatin compaction in a manner depending on HP1 α and HP1 β . Our previous work, along with that of others, has shown that the conversion of H4K20me1 to H4K20me3 by Suv4-20h recruits ORC-associated ORCA/LRWD1 protein and thus enhances the licensing and activity of a large subset of late-firing origins necessary for proper replication timing of heterochromatin domains (Beck et al., 2012; Brustel et al., 2017). In addition to their role in replication origin licensing, ORCA-ORC complex could also act as a scaffold for the establishment and organization of heterochromatin structure (Giri et al., 2015). We therefore hypothesized that the promiscuous heterochromatin formation upon PR-Set7^{PIPmut} stabilization might be caused by the recruitment of ORCA-ORC complex on H4K20me3 marks. To test this hypothesis, we examined by FRET-FLIM the levels of chromatin compaction in PR-Set7^{PIPmut} expressing U2OS-2FP cells that were depleted for ORCA or ORC1 by siRNA treatment. To avoid defects in replication origin licensing and activity that might affect S-phase progression and indirectly the results of FRET efficiency, U2OS-2FP cells were first

synchronized at G1/S transition by thymidine block and then transfected by siRNA to induce ORCA and ORC1 depletion. Two days after siRNA transfection and ORCA and ORC1 depletion (Figure 4A and Supplementary Figure S4), tetracyclin was then added into cell medium to induce PR-Set7^{PIPmut} expression and cells were released into S-phase 6 hours before FRET-FLIM analysis. The results of FRET-efficiency for ORCA-depleted cells are shown in Figure 5B and for ORC1-depleted cells in supplementary Figure S4. In both case, we found that the depletion of ORCA and ORC1 in replicating cells avoided the appearance of the chromatin compaction induced by PR-Set7^{PIPmut} expression. Interestingly, we also observed that ORCA overexpression causes a chromatin compaction that is associated with a conversion of H4K20me1 to H4K20me3 (supplementary figure S5), which might be related to the ability of ORCA to interact directly with Suv4-20h1/h2 and PR-Set7 (Giri and Prasanth, 2015). Since ORCA-ORC complex can also associate with heterochromatin HP1 α and HP1 β , we also tested whether PR-Set7-induced ORCA-mediated chromatin compaction depends on these two specific HP1 proteins. As shown in Figure 5C and 5D, siRNA-depletion of HP1 α or HP1 β , but not HP1 γ that is principally enriched in euchromatin, was sufficient to prevent ORCA-induced heterochromatin compaction phenotype induced by PR-Set7^{PIP} expression in replicating cells, thereby suggesting that both heterochromatin HP1 isoforms are required in this process.

Collectively, these results suggest that H4K20me3 is required for the assembly of highly compact chromatin structure by serving as a primary signal for ORCA binding and thus the subsequent recruitment of ORC complex and the heterochromatin factors HP1 α and HP1 β on nascent chromatin. Improper activation of this heterochromatin assembly cascade during S-phase, *via* the expression of PR-Set7^{PIPmut} mutant, leads to a premature heterochromatin assembly, as observed the appearance and spreading of newly compact chromatin structure during DNA synthesis. Thus, the replication-coupled degradation of PR-Set7 and the subsequent cell-cycle oscillation of H4K20me1 and H4K20me3 marks not only ensure the timely control of the licensing and activity of ORCA-associated late-firing origins necessary for proper replication timing of heterochromatin domains, but also constitute a novel chromatin compaction pathway necessary for proper timing of heterochromatin maturation and compaction on nascent DNAs; both functions depending on heterochromatin ORCA/LRWD1 protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of stable cell lines expressing H2BGFP and H2B-Cherry

To generate U2OS cells expressing H2BGFP alone or with H2Bm-cherry, cells were transfected with 2 μ g of EGFP-H2B plasmid (Llères et al., 2009) using JET-PEI. After selection with the addition of

4 μ g/mL of Blasticidine-S into the cell medium during 2 weeks, different clones were isolated. Cells expressing high amount of H2BGFP (line U2OS-GFP) were amplified and transfected with 2 μ g of mCherry-H2B plasmid using the same procedure. Clonal selection was done with G418 (400 μ g/mL) during 2 weeks before the acquisition of a stable cell line (U2OS-2FP line). U2OS-2FP Cells overexpressing BFP tagged PCNA were transiently transfected with a vector encoding mTagBFP2-PCNA (Adgene) prior FRET/FLIM experiment. Overexpression of ORCA (LRWD1) was done by viral infection (ORCA-pQCXIH) using the same procedure as previously described in Tardat *et al.* Selection of infected cells was done using 60 μ g/mL of hygromycin B.

Cell culture, cell cycle synchronization, and chemicals

U2OS TetR cells inducible for PR-Set7^{WT}, PR-Set7^{PIP} or PR-Set7^{PIP-SET} were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin Streptomycin. U2OS inducible for PR-Set7^{WT}, PR-Set7^{PIP} are a gift from Centore laboratory (called RCZ11 and RCZ23 respectively, (Centore *et al.*, 2010)). Induction was done with Tetracycline at 0.8 μ g/mL. For synchronization at G1/S, U2OS cells were cultured in the presence of 2 mM Thymidine (Sigma) for 15 h, washed three times with PBS, and released in fresh medium without Thymidine for 8 h. After a second round of Thymidine treatment of 15 h, cells were washed three times with PBS and cultured in fresh medium. Depending on experiment constraints a second synchronization protocol was used: Cells were cultured at confluence 4 days and were diluted and cultured with thymidine 2 days. The following additional drugs were used: TSA 200 ng/mL during 24h, aphidicolin 1 μ M during 24h, A196 5 μ M during 48h.

Plasmids, siRNA and retroviral infection

To generate U2OS inducible for PR-Set7^{PIP-SET} we performed site-directed mutagenesis of pCDNA4-TO-Flag PR-Set7^{PIP} plasmid (a generous gift of R. Centore) using Pfu ultra polymerase and U2OS TetR cell line was transfected using Jet Pei. Stable cell line was obtained upon Zeocin treatment at concentration during X days. siRNA transfections were performed using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions with the following concentrations: siPR-Set7 (GUACGGAGCGCCAUGAAGU; 50 nM), siHP1 α (EHU134611; 0.2 μ g/mL), siHP1 β (EHU110901; 0.2 μ g/mL), siHP1 γ (EHU113471; 0.2 μ g/mL), siORCA (EHU130861, 1 μ g/mL), siORC1 (EHU003051, 1 μ g/mL), siSuv4-20h1, siSuv4-20h2, siNCAPD3 (EHU017391; 0.2 μ g/mL) and siNCAPG2 (EHU134881) (0.2 μ g/mL). To generate U2OS-2FP, U2OS cells were transfected with

2µg of EGFP-H2B plasmid, selected with 4µg/mL of Blasticidine-S and clones were isolated. One clone was chose according to H2B-EGFP expression. Then, cells were amplified and transfected with 2µg of mCherry-H2B plasmid and selected with G415 (400µg/mL). mTagBFP2-PCNA comes from Addgene and was transfected in U2OS-2FP cells using Jet Pei 4 days prior FRET/FLIM experiment. Virus production and cell infection were performed as described (Tardat et al., 2007). Infected cells were selected using 60 µg/mL 1 hygromycin B (ORCA-pQCXIH).

Flow cytometry

Cells were fixed in 70% ethanol. DNA was stained using 0.4 µg/ml 7AAD containing RNase overnight at 4°C. Flow cytometry analysis was performed on FACSCalibur using CellQuest Pro software (BD) or with Gallios. Data were analyzed using FlowJo (v7.2.2; Tree Star) or Kaluza.

Immunoblotting and antibodies

Cells were lysed in Laemmli 2X buffer (10mM TRIS pH 6.8, 1% SDS, 5% Glycerol, 1% β-Mercaptoethanol) containing protease inhibitors (cOmplete™, Mini EDTA-free Protease Inhibitor, roche), and 1 mM DTT. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Blocking and blotting with primary antibodies were performed in PBS-T supplemented with 5% skimmed milk powder or PBS-T with 5% BSA. Proteins were visualized on films using secondary HRP conjugated antibodies (1:5,000; Cell signaling) and ECL (Millipore). Films were developed using an x-ray machine. The following commercial rabbit antibodies were used in this study: SET8 (Cell signaling, #2996, 1:1000), H4K20me1 (Cell signaling, #9724, 1:1000), H4K20me2 (Cell signaling, #9759, 1:1000), H4K20me3 (Cell signaling, #5737, 1:1000), HP1α (Cell signaling #2616, 1:1000), N-CAPD3 (Cell signaling (D3H6L), #13473, 1:1000), H2B (Cell signaling (D2H6) #12364, 1:1000), H3K9me3 (Active motif, 39765, 1:1000). The following commercial mouse antibodies were used: Flag-M2 (??), Tubulin (??). HP1β (1:2000) and HP1γ (1:3000) mouse antibodies were a gift from Florence Cammas.

Immunofluorescence microscopy

Cells were grown on coverslips, washed with phosphate buffered saline (PBS), fixed with Formaldehyde 4% for 10 min, permeabilized with PBS containing 0,3% Triton X100 (PBS-Tr) for 10 min and blocked for 1 h in PBS-Tr and 3% BSA prior to overnight incubation with primary antibodies for HP1α (Cell signaling #2616, 1:100), HP1β (FC, 1:100), HP1γ (FC, 1:100). Secondary antibodies

were from donkey and conjugated with Alexa Fluor 594 (1:1000). Images were acquired with a laser scanning confocal microscope (LSM780 Zeiss) using a 40x oil immersion NA 1.3 Plan Apochromat objective from Zeiss, assisted by the Zen software.

FLIM FRET measurements and analysis

FLIM FRET experiments were performed in U2OS cells stably expressing H2B-GFP alone (U2OSH2B--GFP) or with mCherry tagged histone H2B (U2OSH2B--2FPs). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) was performed using an inverted laser scanning multiphoton microscope LSM780 (Zeiss) equipped with temperature and CO₂ controlled environmental black walls chamber. Measurements were acquired in live cells at 37°C, 5% CO₂, and with a 40x oil immersion lens NA 1.3 Plan Apochromat objective from Zeiss. Two photon excitation was achieved using a Chameleon Ultra II tunable (680–1080 nm) laser (Coherent) to pump a mode locked frequency doubled Ti:Sapphire laser that provided sub 150 femtosecond pulses at a 80 Mhz repetition rate with an output power of 3.3 W at the peak of the tuning curve (800 nm). Enhanced detection of the emitted photons was afforded by the use of the HPM 100 module (Hamamatsu R10467 40 GaAsP hybrid PMT tube). The fluorescence lifetime imaging capability was provided by TCSPC electronics (SPC 830; Becker & Hickl GmbH). TCSPC measures the time elapsed between laser pulses and the fluorescence photons. EGFP and mCherry fluorophores were used as a FRET pair. The optimal two-photon excitation wavelength to excite the donor (GFP) was determined to be 890 nm (Lières et al., 2009). Laser power was adjusted to give a mean photon count rate of the order 1.105---5.105 photons/sec. Fluorescence lifetime measurements were acquired over 60 sec and fluorescence lifetimes were calculated for all pixels in the field of view (256x256 pixels). The analysis of the FLIM measurements was performed by using the SPCImage software (Becker & Hickl, GmbH). Because FRET interactions cause a decrease in the fluorescence lifetime of the donor molecules (EGFP), the FRET efficiency was calculated by comparing the FLIM values obtained for the EGFP donor fluorophores in presence (U2OSH2B--2FPs) and absence (U2OSH2B--GFP) of the mCherry acceptor fluorophores. FRET efficiency (E% FRET) was derived by applying the following equation: $E_{FRET} = 1 - (t_{DA}/t_D)$, where t_{DA} is the mean fluorescence lifetime of the donor (H2B-EGFP) in U2OSH2B-2FPs cells and t_D is the mean fluorescence lifetime of H2B-EGFP (in absence of acceptor) in U2OSH2BGFP cells that are present in the same field of view. FRET efficiency values from 20 to 30 cells was then normalized and graphically represented using excel software.

REFERENCES

- Abbas, T., Shibata, E., Park, J., Jha, S., Karnani, N., and Dutta, A. (2010). CRL4(Cdt2) regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Mol. Cell* *40*, 9–21.
- Alabert, C., Barth, T.K., Reverón-Gómez, N., Sidoli, S., Schmidt, A., Jensen, O.N., Imhof, A., and Groth, A. (2015). Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes Dev.* *29*, 585–590.
- Almouzni, G., and Cedar, H. (2016). Maintenance of Epigenetic Information. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*.
- Beck, D.B., Burton, A., Oda, H., Ziegler-Birling, C., Torres-Padilla, M.-E., and Reinberg, D. (2012). The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h. *Genes Dev.* *26*, 2580–2589.
- Bloom, K.S. (2014). Centromeric heterochromatin: the primordial segregation machine. *Annu. Rev. Genet.* *48*, 457–484.
- Bromberg, K.D., Mitchell, T.R.H., Upadhyay, A.K., Jakob, C.G., Jhala, M.A., Comess, K.M., Lasko, L.M., Li, C., Tuzon, C.T., Dai, Y., et al. (2017). The SUV4-20 inhibitor A-196 verifies a role for epigenetics in genomic integrity. *Nat. Chem. Biol.* *13*, 317–324.
- Brustel, J., Tardat, M., Kirsh, O., Grimaud, C., and Julien, E. (2011). Coupling mitosis to DNA replication: The emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol.* *21*, 452–460.
- Brustel, J., Kirstein, N., Izard, F., Grimaud, C., Prorok, P., Cayrou, C., Schotta, G., Abdelsamie, A.F., Déjardin, J., Méchali, M., et al. (2017). Histone H4K20 tri-methylation at late-firing origins ensures timely heterochromatin replication. *EMBO J.*
- Centore, R.C., Havens, C.G., Manning, A.L., Li, J.-M., Flynn, R.L., Tse, A., Jin, J., Dyson, N.J., Walter, J.C., and Zou, L. (2010). CRL4(Cdt2)-mediated destruction of the histone methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase. *Mol. Cell* *40*, 22–33.
- Dambacher, S., Hahn, M., and Schotta, G. (2013). The compact view on heterochromatin. *Cell Cycle* *12*, 2925–2926.
- Ellermeier, C., Higuchi, E.C., Phadnis, N., Holm, L., Geelhood, J.L., Thon, G., and Smith, G.R. (2010). RNAi and heterochromatin repress centromeric meiotic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8701–8705.
- Farkash-Amar, S., and Simon, I. (2010). Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosome Res.* *18*, 115–125.
- Giri, S., and Prasanth, S.G. (2015). Association of ORCA/LRWD1 with repressive histone methyl transferases mediates heterochromatin organization. *Nucl. Austin Tex* *6*, 435–441.

Giri, S., Aggarwal, V., Pontis, J., Shen, Z., Chakraborty, A., Khan, A., Mizzen, C., Prasanth, K.V., Ait-Si-Ali, S., Ha, T., et al. (2015). The preRC protein ORCA organizes heterochromatin by assembling histone H3 lysine 9 methyltransferases on chromatin. *ELife* 4, e06496.

Goren, A., and Cedar, H. (2003). Replicating by the clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4.

Houston, S.I., McManus, K.J., Adams, M.M., Sims, J.K., Carpenter, P.B., Hendzel, M.J., and Rice, J.C. (2008). Catalytic Function of the PR-Set7 Histone H4 Lysine 20 Monomethyltransferase Is Essential for Mitotic Entry and Genomic Stability. *J. Biol. Chem.* 283, 19478–19488.

Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., and Steward, R. (2005). PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev.* 19, 431–435.

Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O.V., Zhou, T.Y., Gassmann, R., Liu, W.T., Ohgi, K.A., Benner, C., Garcia-Bassets, I., Aggarwal, A.K., et al. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466, 508–512.

Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D.G., and Lamond, A.I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J. Cell Biol.* 187, 481–496.

Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S.Y.R., and Almouzni, G. (2009). The HP1 α -CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep.* 10, 769.

Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury, W.J., Voigt, P., Martin, S.R., Taylor, W.R., De Marco, V., et al. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461, 762–767.

Oda, H., Okamoto, I., Murphy, N., Chu, J., Price, S.M., Shen, M.M., Torres-Padilla, M.E., Heard, E., and Reinberg, D. (2009). Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2278–2295.

Oda, H., Hübner, M.R., Beck, D.B., Vermeulen, M., Hurwitz, J., Spector, D.L., and Reinberg, D. (2010). Regulation of the Histone H4 Monomethylase PR-Set7 by CRL4Cdt2-Mediated PCNA-Dependent Degradation during DNA Damage. *Mol. Cell* 40, 364–376.

Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., et al. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337.

Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., et al. (2003). Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Mol. Cell* 12, 1577–1589.

Sakaguchi, A., Joyce, E., Aoki, T., Schedl, P., and Steward, R. (2012). The Histone H4 Lysine 20 Monomethyl Mark, Set by PR-Set7 and Stabilized by L(3)mbt, Is Necessary for Proper Interphase Chromatin Organization. *PLoS ONE* 7, e45321.

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18, 1251–1262.

Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callén, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I.A., et al. (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev.* 22, 2048–2061.

Tardat, M., Murr, R., Herceg, Z., Sardet, C., and Julien, E. (2007). PR-Set7–dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *J. Cell Biol.* 179, 1413–1426.

Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefebvre, C., Callanan, M., Sardet, C., and Julien, E. (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 12, 1086–1093.

You, J.S., and Jones, P.A. (2012). Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell* 22, 9–20.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: FRET measurement in U2OS expressing H2B^{2FP} allows to spatially evaluate chromatin compaction

A: Chromatin fractionation followed by western blot analysis shows proper incorporation of tagged histones in U2OS H2B-2FPs. S1: Cytosolic fraction, S2: nuclear soluble fraction, P3: Chromatin fraction. B: Upper panels show EGFP, mCherry signal and merge of H2B-EGFP and H2B-2FP nuclei. FRET efficiency value is calculated for each 2FP nucleus using this formula: $E(\%) = 1 - \tau_{2FP} / \tau_{EGFP}$ with τ =lifetime. For each acquisition, FRET is calculated with $\tau_{EGFP} = \text{Mean of } \tau_{EGFP} \text{ of all H2B-EGFP nuclei in the image}$. C: Tagged histones overexpression does not impair cell cycle progression as shown with FACS analysis of 7AAD incorporation. D: Scatterplots show the mean GFP FRET efficiency distribution in GFP-H2B (green diamonds; 128 cells) and 2FPs-H2B (red diamonds; 128 cells) cells. 2FP FRET efficiency is significantly increased in 2FPs-H2B cells compared to GFP-H2B cells. **** $p < 0.0001$ (two-tailed Mann-Whitney test).

Figure 2: Stabilization of PR-Set7 in S phase by overexpression of PR-Set7 PIP triggers abnormal chromatin compaction which is dependent on replication

A/B/C: PR-Set7 PIP overexpression induce abnormal chromatin compaction dependently on catalytic activity. Western blot and FRET/FLIM quantifications of U2OS TetR 2FP-H2B cells overexpressing PR-Set7 WT, PR-Set7 PIP or PR-Set7 PIP SET mutant. Asynchronous U2OS TetR were induced 24h with tetracyclin for PR-Set7 WT-FLAG or PR-Set7 PIP-FLAG overexpression, then western-blot and FRET/FLIM experiments were performed. For immunoblotting, protein were separated on SDS page and probed with tubulin and PR-Set7 or FLAG specific antibodies. The statistical analysis of FRET efficiency using at least 20 nuclei per condition is presented as box and whisker plots. FRET percentages are recalculated using FRET(%) of the control as 100%. Spatial distribution of FRET efficiency ((%) FRET map) is displayed using a continuous pseudo-color scale ranging from 0 to 15% (A) or from 0 to 25% (B). Scale bar = 10 μ M. *** $p < 0.0005$; ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ D: Chromatin compaction upon PR-Set7 PIP overexpression occurs specifically in S phase cells. FRET/FLIM analysis of U2OS TetR 2FP-H2B cells overexpressing PR-Set7 PIP-FLAG. Asynchronous U2OS TetR were transfected with PCNA-BFP 3 days and were induced 24h with tetracyclin for PR-Set7 PIP-FLAG overexpression, then FRET/FLIM experiments were performed. Top panel presents (%) FRET map and PCNA-BFP localization detected with confocal bi-photon microscopy. Bottom panel shows statistical analysis of FRET efficiency. E: Chromatin compaction upon PR-Set7 PIP

overexpression is dependent on replication fork activity. U2OS TetR cells were synchronized with thymidine, induced for PR-Set7 PIP overexpression and released or not 6h in fresh medium. Upper panels show FACS analysis at the moment of the experiment. Lower panels present FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency.

Figure 3: PR-Set7 is necessary for normal chromatin compaction and heterochromatin structure

A: Western-blot showing PR-Set7 depletion and H4K20 methylation levels. U2OS cells were transfected with siRNA Ctrl or siRNA PR-Set7 2 days and analyzed in western-blot and FACS (A). B: PR-Set7 depletion causes chromatin décompaction. Left panels show FACS analysis at the moment of the experiment. Right panel presents FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency and (%) FRET map. C: Chromatin décompaction is correlated with changes in heterochromatin marks. U2OS treated with siRNA were fixed and immune-staining was performed to detect HP1 α and H3K9me3.

Figure 4: PR-Set7 PIP induced chromatin compaction depends on Suv4-20h activity

A: PR-Set7 PIP over-expression induces H4K20me1 and H4K20me3 increase. Asynchronous U2OS TetR were induced 24h with tetracyclin for PR-Set7 PIP-FLAG overexpression, then western-blot analysis were performed to detect Tubulin, FLAG, H4K20me1 and H4K20me3 with specific antibodies. B: Condensin depletion and PR-Set7 over-expression. U2OS TetR cells were transfected with siRNA Ctrl, siRNA NCAPD3 or siRNA NCAPG2 3 days and induced for PR-Set7 PIP overexpression 24h. Immunoblot was performed at the moment on the experiment, samples were separated on SDS page and probed with NCAPD3 and PR-Set7 FLAG specific antibodies (upper panel). Lower panels show FACS analysis at the moment of the experiment. C: PR-Set7 PIP over-expression induce abnormal chromatin compaction even in the absence of NCAPD3 or NCAPG2. FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency and (%) FRET map in siCtrl, siCNAPD3 or siNCAPG2 expressing or not PR-Set7 PIP FLAG. D: Chromatin compaction induced by PR-Set7 PIP over-expression is S phase depends conversion of H4K20me1 in H4K20me3 by Suv4-20h enzymes. U2OS TetR cells were synchronized with double thymidine block and treated with DMSO or A196 at the time of the second block, then cells were released 4h in fresh medium containing DMSO or A196 and induced for PR-Set7 PIP over-expression. Western-blot analysis showing Tubulin, FLAG, H4, H4K20me1 and H4K20me3 are presented in D. E: FRET/FLIM

analysis with statistical analysis of FRET efficiency and (%) FRET map of U2OS H2B-2FP cells treated with A196 or DMSO 48h and induced or not for PR-Set7 PIP FLAG overexpression.

Figure 5: Chromatin compaction in S phase induced by PRset7PIP mutant depends on ORCA/LRWD1, HP1 α and HP1 β

A: Western-blot showing ORCA depletion, PR-Set7 PIP over-expression and H4K20 methylation levels. U2OS TetR cells were synchronized with thymidine block and transfected with siRNA Ctrl or siRNA ORCA. 4h before experiment cells were released and induced for PR-Set7 PIP overexpression. Right panels show FACS analysis at the moment of the experiment. B: ORCA/LRWD1 depletion impairs chromatin compaction upon PR-Set7 PIP over-expression. FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency of siCtrl and siLRWD1 cells overexpressing PR-Set7 PIP FLAG or not and (%) FRET map of siLRWD1 cells. C: Western-blot showing specific HP1 α , HP1 β and HP1 γ depletions, PR-Set7 PIP over-expression and H4K20 methylation levels. U2OS TetR cells were transfected with siRNA Ctrl or siRNA HP1 α , HP1 β and HP1 γ . 24h before experiment cells were induced for PR-Set7 PIP overexpression. D: HP1 α and HP1 β depletion impairs chromatin compaction induced by PR-Set7 PIP over-expression. FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency and (%) FRET map of siHP1 α , siHP1 β and siHP1 γ cells overexpressing or not PR-Set7 PIP FLAG.

LEGENDS OF SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1: PR-Set7-PIP over-expression leads to changes in nuclear pattern of HP1 α and HP1 β
PR-Set7 PIP over-expression causes changes in HP1 α and HP1 β localization. U2OS TetR cells were induced for PR-Set7 PIP overexpression 4h, fixed and immune-staining were performed to detect the three HP1 isoforms.

Figure S2: HP1 depletion does not impair cell cycle progression

FACS analysis of siHP1 α , siHP1 β and siHP1 γ transfected H2B-2FP cells.

Figure S3: Combination of siRNA Suv4-20h1/2 impair chromatin compaction upon PR-Set7 PIP overexpression

Chromatin compaction induced by PR-Set7 PIP over-expression is S phase depends conversion of H4K20me1 in H4K20me3 by Suv4-20h enzymes. U2OS TetR cells were transfected with siRNA Suv4-20h1 and Suv4-20h2 48h before experiment and induced for PR-Set7 PIP over-expression 24h. Western-blot analysis showing Tubulin, FLAG, H4, H4K20me1 and H4K20me3 are presented in the left panel. Middle panel shows FACS analysis at the moment of the experiment. Right panel presents FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency and (%) FRET map.

Figure S4: Chromatin compaction in S phase induced by PRset7PIP mutant depends on ORC1

A: Western-blot showing ORC1 depletion, PR-Set7 PIP over-expression and H4K20 methylation levels. U2OS TetR cells were synchronized with thymidine block and transfected with siRNA Ctrl or siRNA ORC1. 4h before experiment cells were released and induced for PR-Set7 PIP overexpression. Right panels show FACS analysis at the moment of the experiment. B: ORC1 depletion impairs chromatin compaction upon PR-Set7 PIP over-expression. FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency and (%) FRET map of U2OS H2B-2FP siCtrl or siORC1 and induced or not for PR-Set7 PIP FLAG overexpression.

Figure S5: ORCA overexpression leads to increased level of H4K20-me3 and chromatin compaction

A/B: U2OS cells were infected with ORCA-pqcxih or empty vector then Western-blot and FRET analysis were performed 3 days after infection. A: Western-blot showing ORCA overexpression and H4K20 methylation levels. B: FRET/FLIM analysis with statistical analysis of FRET efficiency and (%) FRET map.

Figure 1 FRET measurement in U2OS expressing H2B^{2FP} allows to spatially evaluate chromatin compaction

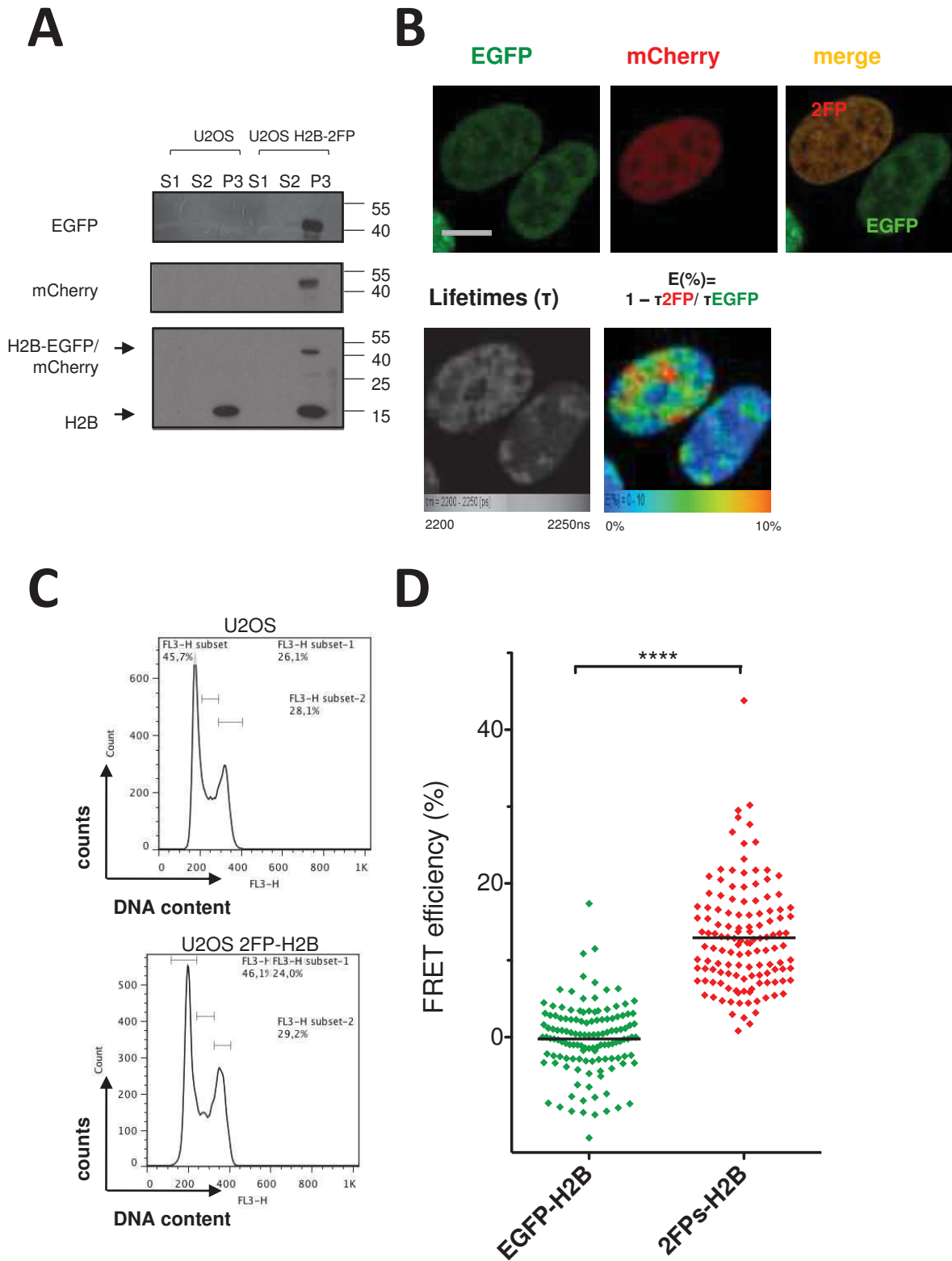


Figure 2 Stabilization of PR-Set7 in S phase by overexpression of PR-Set7 PIP triggers abnormal chromatin compaction which is dependent on replication

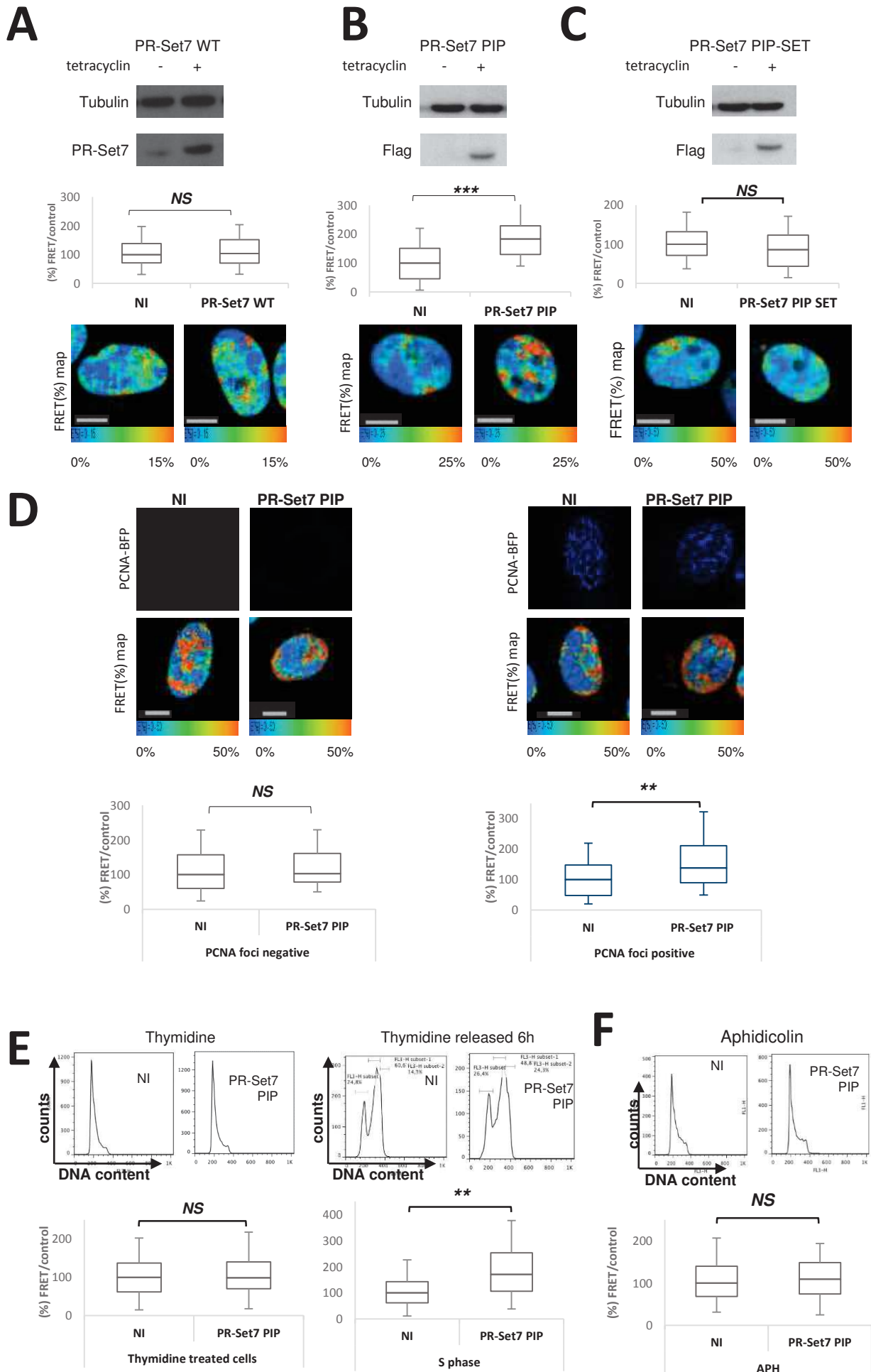


Figure 3 PR-Set7 is necessary for normal chromatin compaction and heterochromatin structure

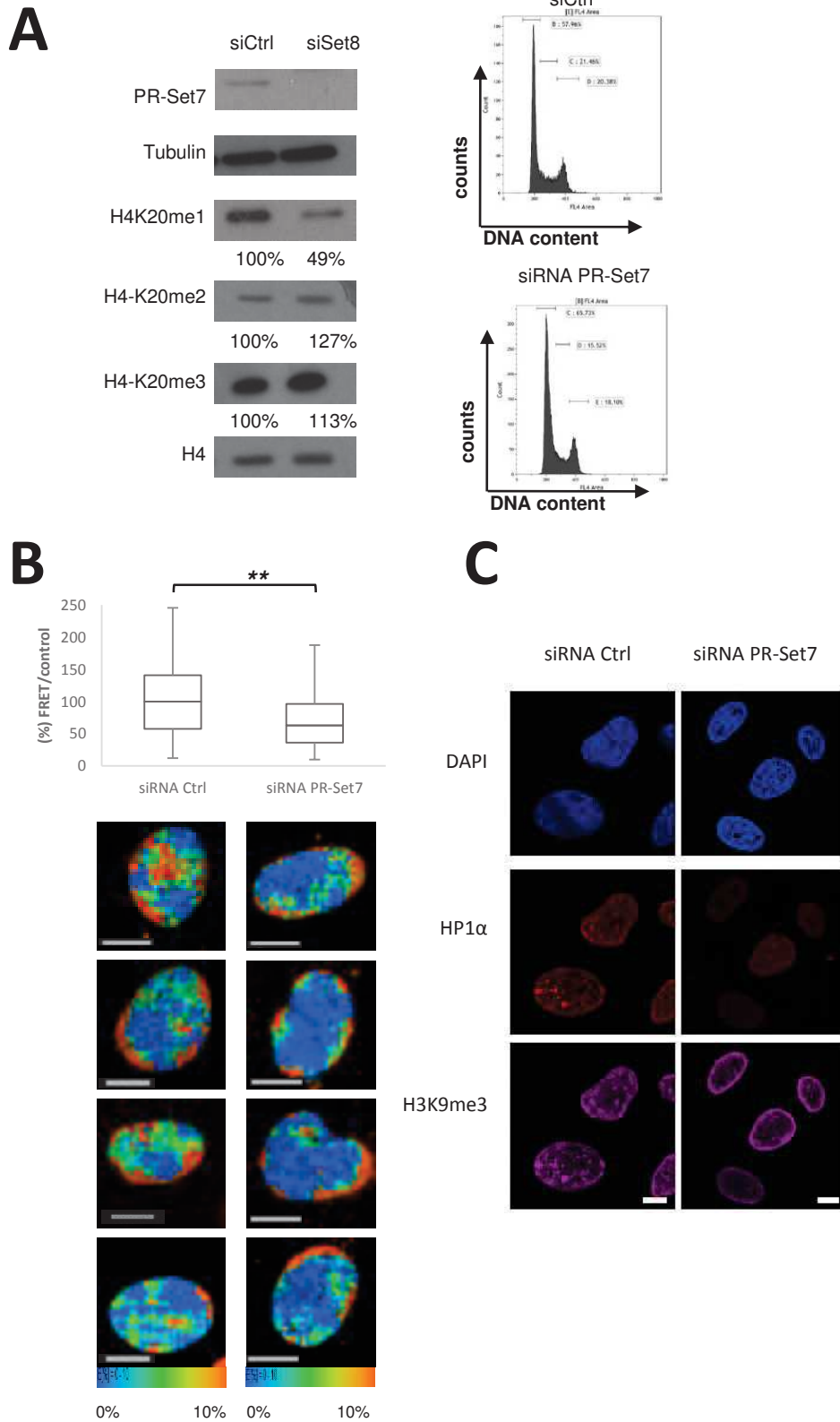


Figure 4 PR-Set7 PIP induced chromatin compaction depends on Suv4-20h activity

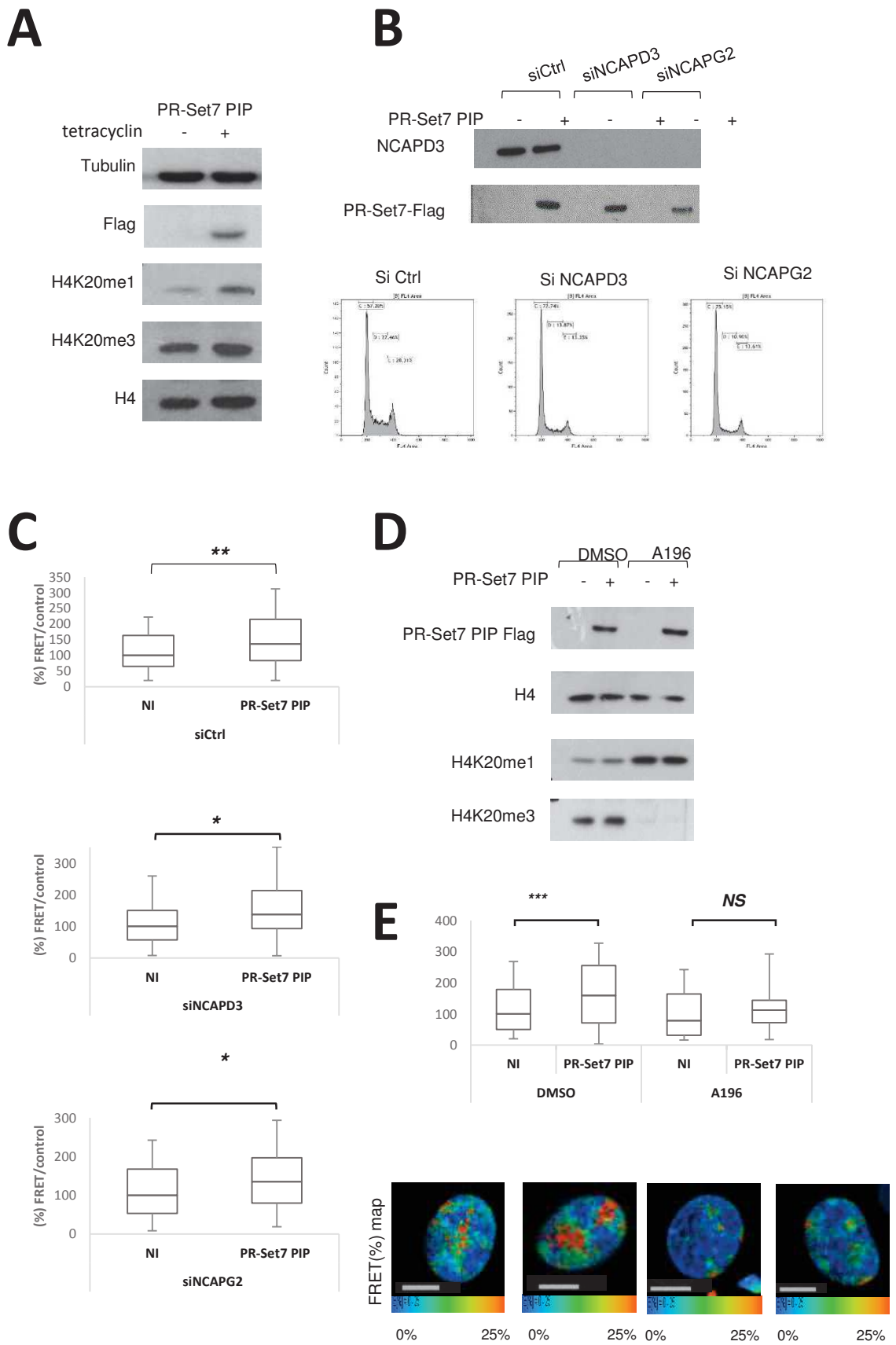
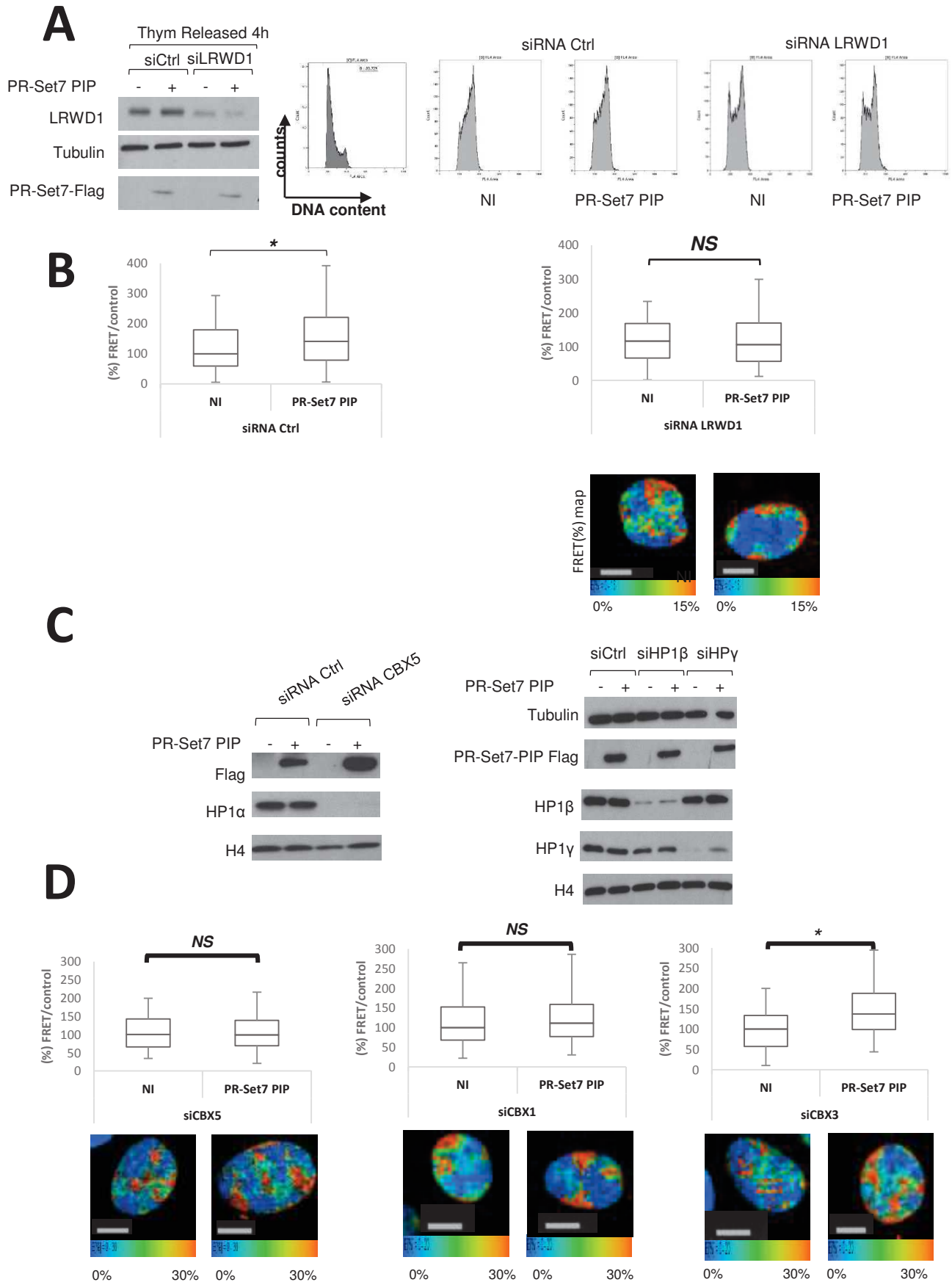


Figure 5 Chromatin compaction in S phase induced by PRset7PIP mutant depends on ORCA/ LRWD1, HP1 α and HP1 β .



Supplementary figures

Figure S1 PR-Set7-PIP over-expression leads to changes in nuclear pattern of HP1 α and HP1 β

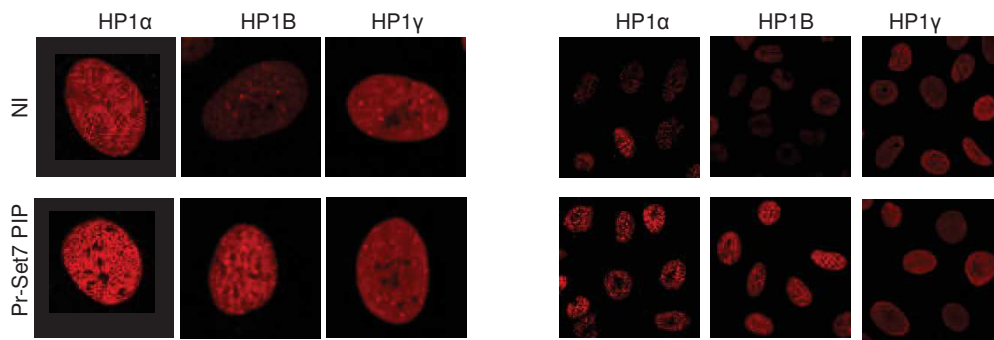


Figure S2 HP1 depletion does not impair cell cycle progression

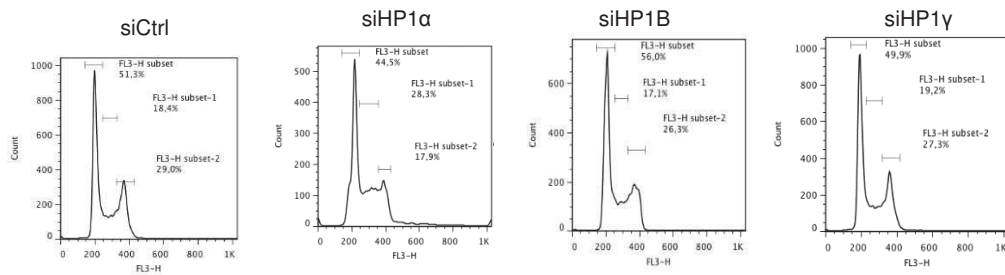


Figure S3 Combination of siRNA Suv4-20h1/2 impair chromatin compaction upon PR-Set7 PIP overexpression

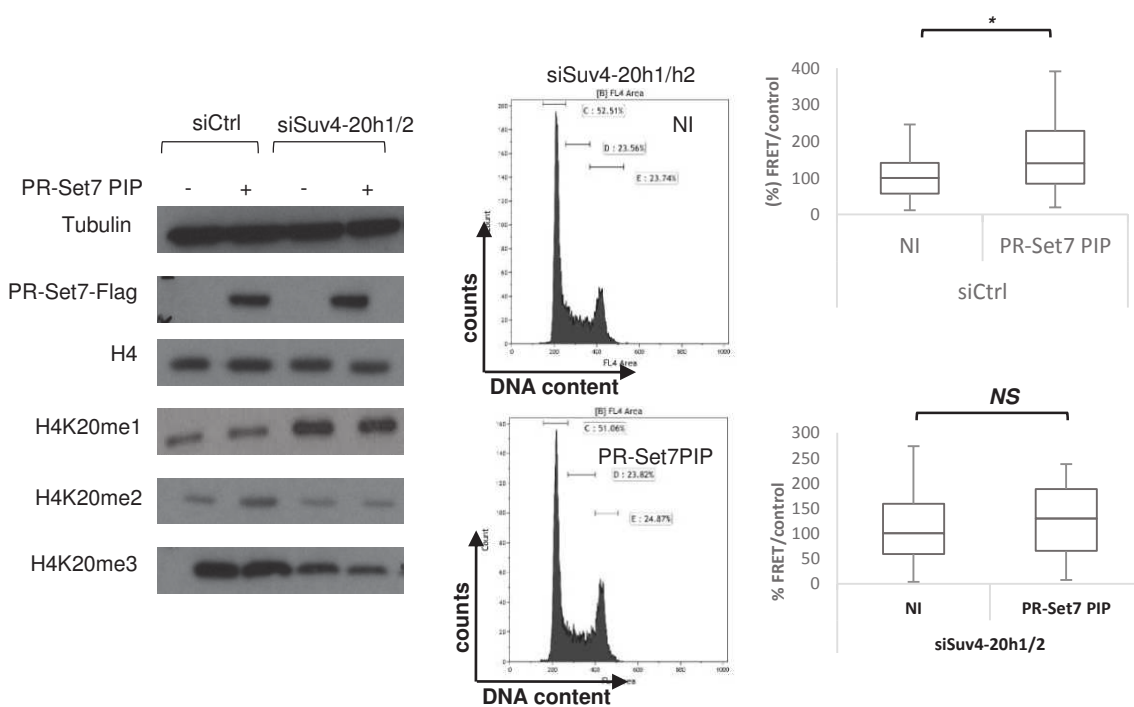


Figure S4 ORC1 depletion impairs PR-Set7 PIP induced chromatin compaction

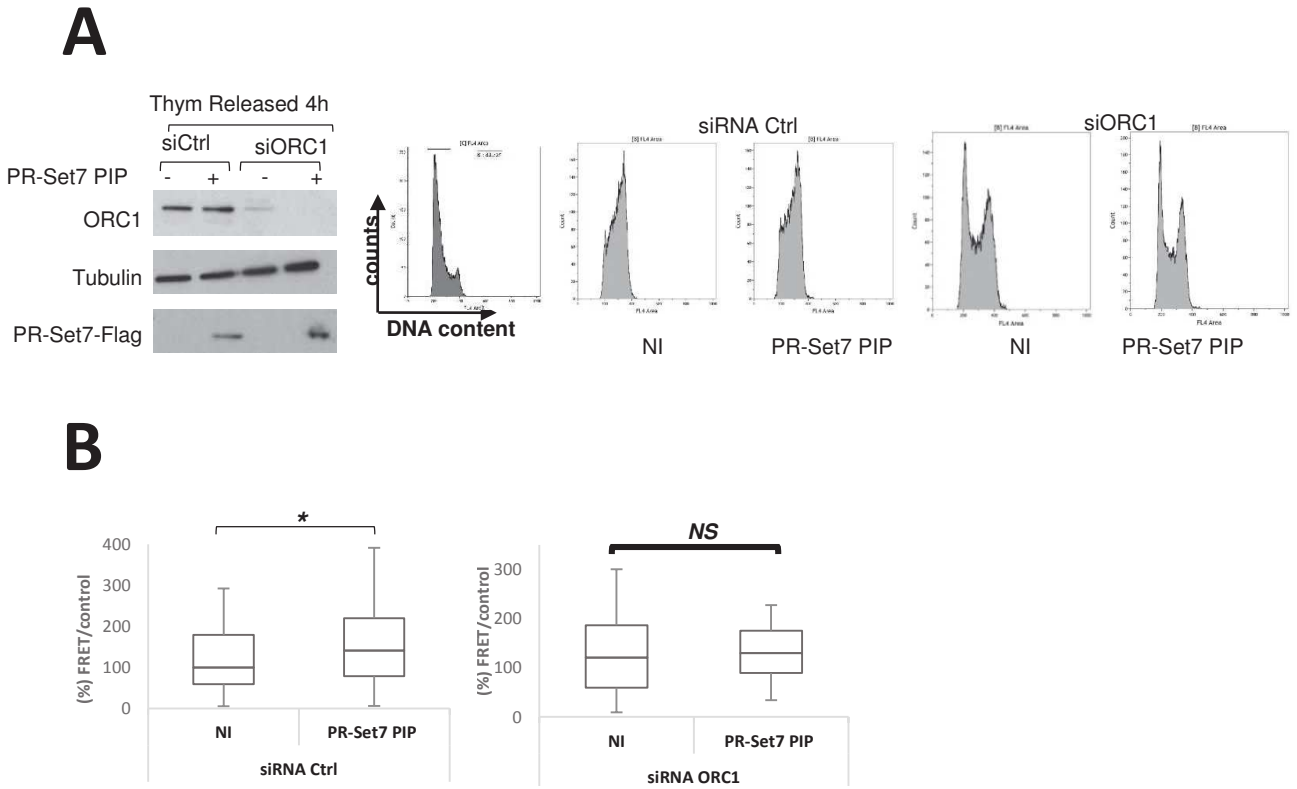
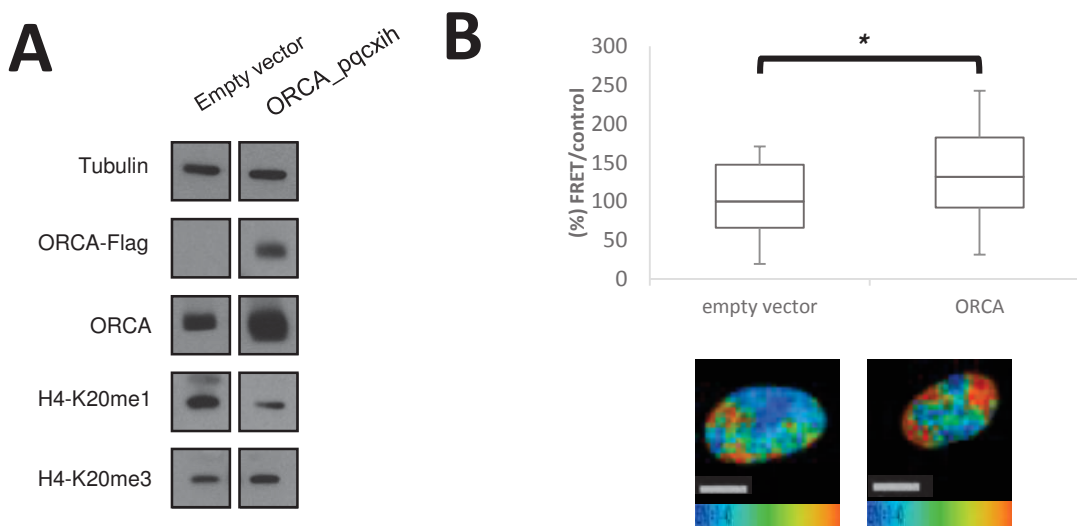


Figure S5 ORCA overexpression leads to increased level of H4K20-me3 and chromatin compaction



DONNEES COMPLEMENTAIRES

Rôle de la méthylation H4K20 dans la maturation de la chromatine

En utilisant un système in vitro d'assemblage de la chromatine à partir d'extraits d'embryons de drosophile, l'équipe d'Axel Imhof a constaté que les nucléosomes, une fois incorporés à l'ADN, sont rapidement mono-méthylés sur H4K20 (Scharf et al., 2009). Dans nos expériences, la stabilisation de PR-Set7 entraîne une compaction anormale de la chromatine probablement due à une maturation anormale ainsi qu'une augmentation de la mono- puis de la tri-méthylation H4K20. Par ailleurs, la compaction de la chromatine médiée par PR-Set7^{PIPMUT} dépend de l'activité des Suv4-20h or la lysine 20 de l'histone H4 est le seul substrat commun connu entre PR-Set7 et les Suv4-20h. Ainsi, est-ce que ce phénotype de maturation anormale induit par PR-Set7^{PIPMUT} est lié à la méthylation H4K20 ? Pour étudier l'implication de la méthylation H4K20 dans la structure de la chromatine j'ai réalisé des expériences de surexpression de mutants non méthylables de H4K20 (H4K20A et H4K20R) dans des cellules U2OS H2B-2FP. La surexpression de ces deux mutants conduit à une baisse globale du niveau de mono-méthylation H4K20 (Figure

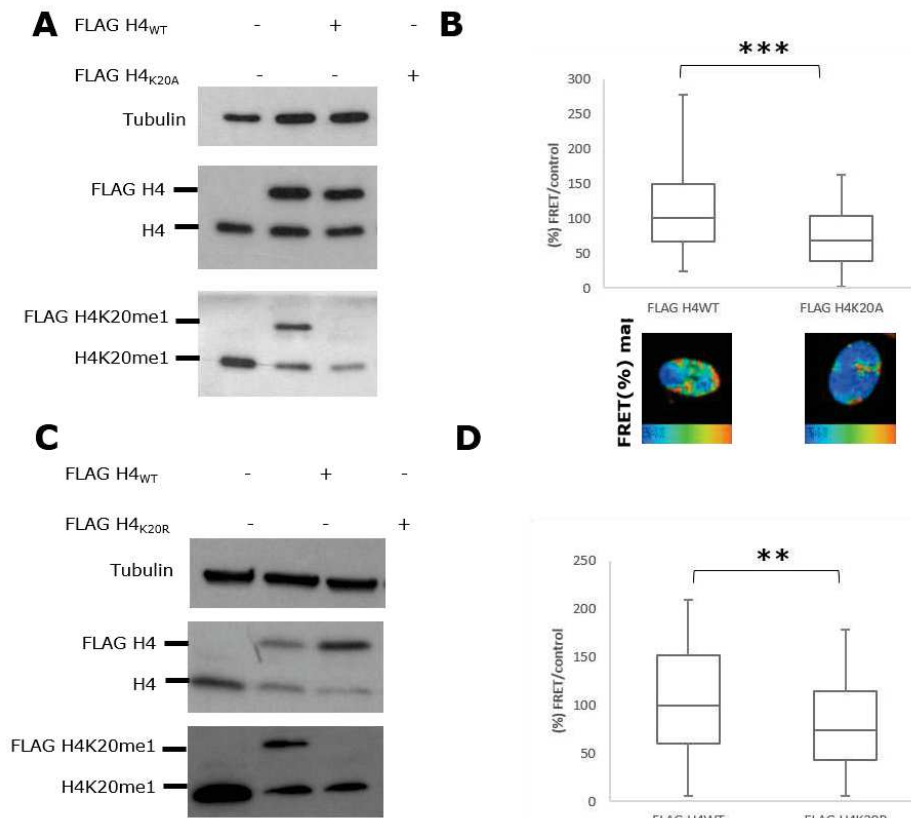


Figure 1: La méthylation H4K20 est nécessaire à une compaction de la chromatine normale. (A) Immunoblots et (B) quantification de FRET à partir de cellules qui surexpriment H4WT, H4K20A ou H4K20R.

1-A/C) et une diminution de l'efficacité de FRET qui indique une décondensation de la chromatine (Figure 1- B/D). Ce phénotype est similaire à celui observé lorsqu'on déplete PR-Set7, suggérant que la fonction de PR-Set7 dans la structure de la chromatine dépend de la méthylation H4K20.

Lien avec la déacétylation des histones néo-synthétisées

Dans les expériences de l'équipe de Axel Imhof la mono-méthylation H4K20 semble requise pour enlever les marques d'acétylation H4K5 et H4K12 présentes sur les histones néo-synthétisées (Scharf et al., 2009). On peut ainsi se demander si la compaction anormale de la chromatine suite à la stabilisation de PR-Set7^{PIP^{MUT}} en phase de réplication, en plus de faire intervenir une hétérochromatinisation impliquant ORCA/LRWD1, pourrait être la conséquence d'une activation ou d'un ciblage des HDACs à la chromatine. Cet aspect a été étudié avec l'aide de Yannick Perez, un étudiant en master 2. Comme le montre la Figure 2, la stabilisation de PR-Set7 entraîne une augmentation globale des niveaux de

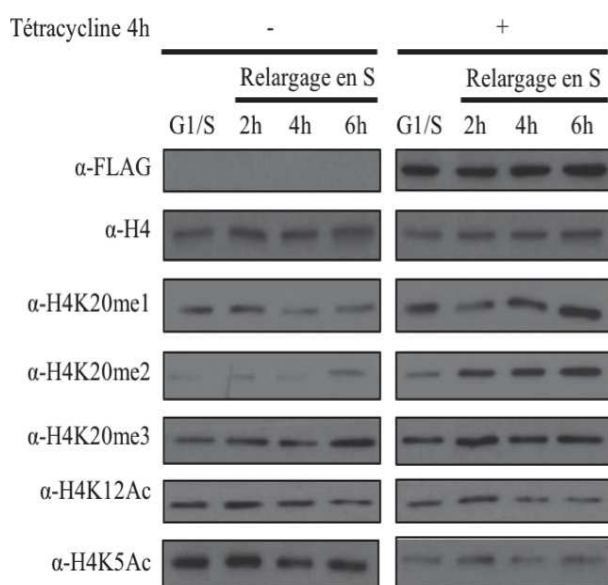


Figure 2: La stabilisation de la méthylation H4K20 en phase de réplication entraîne une diminution des niveaux de H4K12Ac et H4K5Ac. Immunoblots à partir d'extraits totaux de cellules synchronisées en phase S, induites ou non pour l'expression de FLAG-PR-Set7^{mutPIP}

Au cours de la phase S, la dé-acétylation H4K5 est médiée en grande partie par HDAC3. PR-Set7 a été fonctionnellement associée à RPD3, l'orthologue de HDAC3 chez la Drosophile (Scharf et al., 2009). De plus, les résultats publiés dans le manuscrit de thèse de Lauren Marie Congdon (Multiple functions of the PR-Set7 histone methyltransferase: from transcription to the cell cycle) démontrent l'existence d'une interaction entre PR-Set7 et HDAC3 *in vitro*. Nous nous sommes donc demandé si PR-Set7 pourrait être un partenaire de HDAC3. Pour cela,

méthylation H4K20me1 et H4K20me2 sur la chromatine des cellules à la transition G1/S et en cours de phase S. De manière intéressante, nous avons également observé que l'expression de PR-Set7^{PIP^{MUT}} entraîne une diminution significative des niveaux H4K5Ac et H4K12Ac pendant la phase S, avec un effet plus prononcé sur l'acétylation K5, suggérant que la stabilisation de PR-Set7 pendant la phase S baisse les niveaux d'acétylation de l'histone H4.

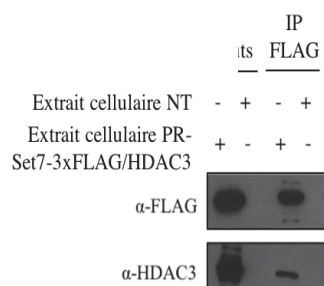


Figure 3: PR-Set7 interagit avec HDAC3 Immunoprécipitation anti-FLAG à partir d'extraits de cellules non-transfectées (NT, contrôle) ou transfectées PR-Set7-3xFLAG et HDAC3.

nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules U2OS sur-exprimant ou non HDAC3 et PR-Set7. Comme le montre la Figure 3, lorsque nous immunoprécipitons FLAG-PR-Set7 avec un anticorps α -FLAG, nous co-immunoprécipitons HDAC3. Les résultats décrits ci-dessus conduisent à l'hypothèse que la compaction de la chromatine naissante induite par une stabilisation de PR-Set7 en phase S pourrait être liée à une dé-acétylation incontrôlée de l'histone H4 via un recrutement de l'activité de HDACs, et possiblement HDAC3.

Pour tester cette hypothèse, les cellules U2OS inductibles pour la forme non-dégradable de PR-Set7 et exprimant les histones H2B-GFP et H2B-mcherry ont été traitées avec un siRNA HDAC3 ou contrôle (Lac-Z) avant d'être synchronisées à la transition G1/S par double block thymidine. Après induction de l'expression de FLAG-PR-Set7^{PIP MUT}, les cellules ont été relarguées 6h en phase S avant une analyse par immunoblot (Figure 4-A) et par FRET/FLIM (Figure 4-B). Bien que la déplétion de HDAC3 par RNAi soit efficace et entraîne une légère réduction de l'efficacité de FRET dans les cellules non traitées, l'expression de FLAG-PR-Set7^{PIP MUT} induit une augmentation significative de cette efficacité aussi bien dans les cellules siRNA contrôle que dans celles traitées avec le siRNA HDAC3. Ces résultats suggèrent que la seule déplétion de HDAC3 ne semble pas suffisante pour bloquer la compaction de la chromatine induite par la stabilisation de PR-Set7 en phase S.

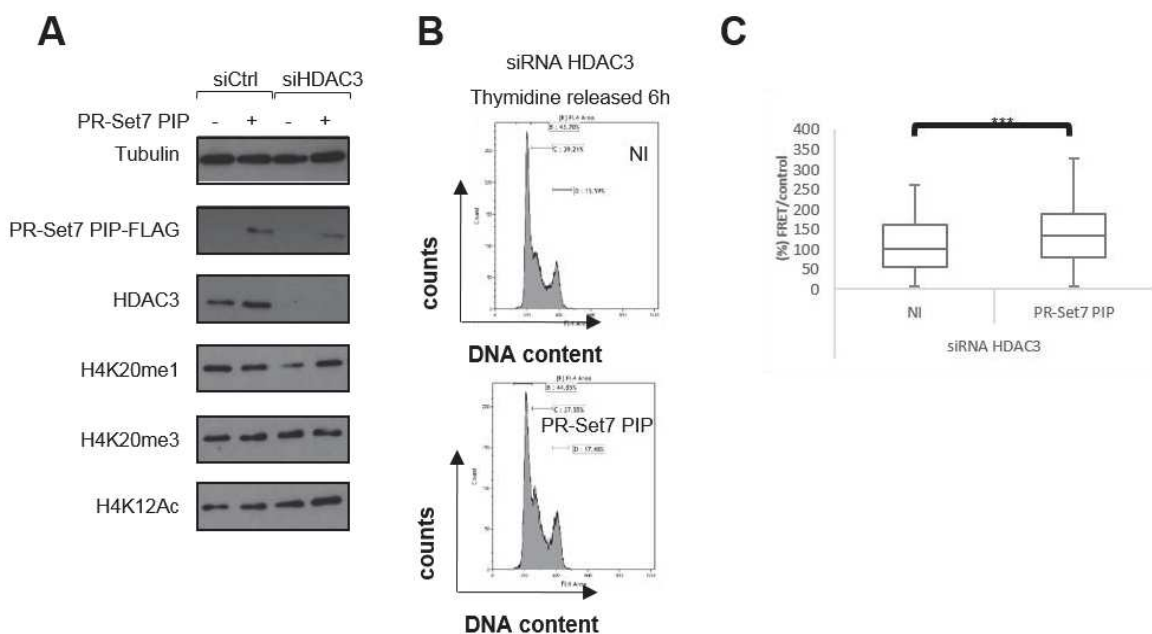


Figure 4: La compaction anormale de la chromatine induite par PRSet7PIP MUT ne dépend pas de HDAC3. (A) Immunoblots, (B) Analyse de FACS et (C) quantification de FRET à partir de cellules H2B-2FP déplétées pour HDAC3, synchronisées en phase S et induites ou non pour l'expression de FLAG-Pr-Set7PIP MUT

Comme il existe une certaine redondance fonctionnelle entre les différentes HDACs qui peuvent compenser la perte de l'une d'entre elles (Li et al., 2009; Montgomery et al., 2007), nous avons réalisé la même expérience de FRET/FLIM après un traitement à la Trichostatine A (TSA), un puissant inhibiteur chimique de toutes les HDACS dépendantes du co-facteur Zn^{2+} (HDACS de type I, II et IV). Les résultats sont montrés dans la Figure 5. Alors que nous observons comme attendu une compaction de la chromatine dans les cellules contrôles (traitées DMSO) exprimant FLAG-PR-Set7^{PIPMUT} (Figure 5-B), le traitement TSA est suffisant pour empêcher la compaction anormale de la chromatine dans ces cellules. L'ensemble de ces résultats montrent que la compaction anormale de la chromatine naissante induite par FLAG-PR-Set7^{PIPMUT} dépend de l'activité des HDACS (possiblement HDAC3 et d'autres) sur les niveaux d'acétylation H4. Toutefois, le traitement à la TSA entraîne une accumulation des cellules en G2 due à une incapacité des cellules à déacétyler leur chromatine et donc à rentrer en mitose. Or, la compaction de la chromatine induite par PR-Set7^{PIPMUT} implique une mono-méthylation de la chromatine naissante anormale au moment de la réplication. Ainsi, on peut penser que l'absence de phénotype de compaction de la chromatine peut aussi être dûe à ce blocage dans le cycle au moment de l'induction de l'expression de PR-Set7^{PIPMUT}.

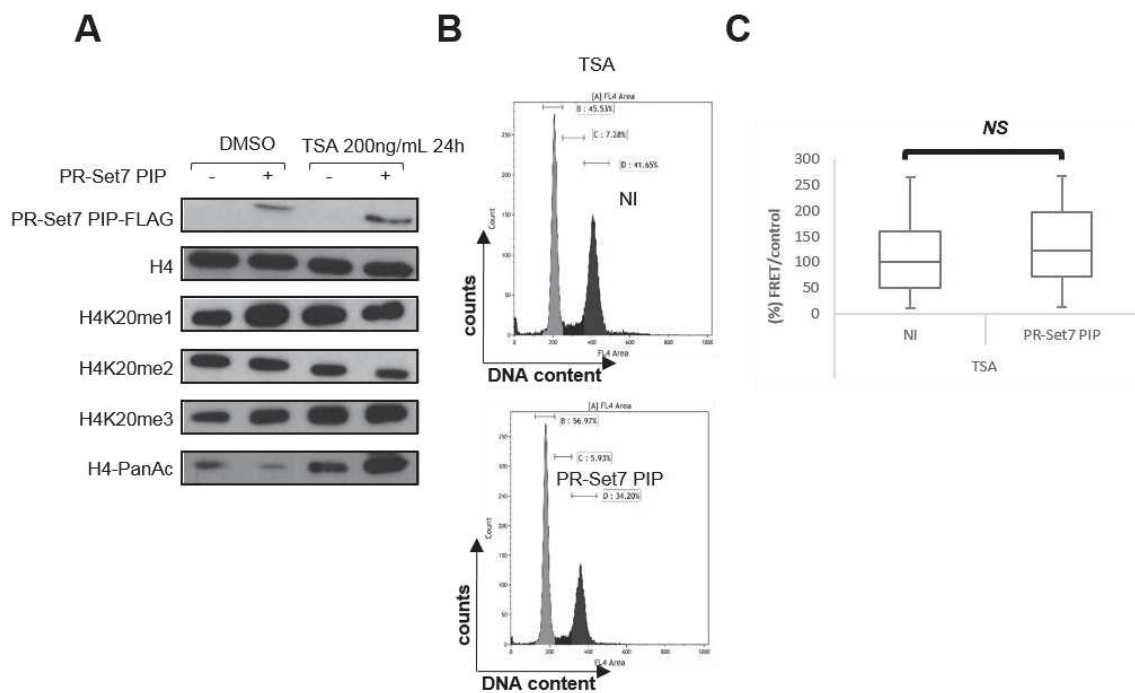


Figure 5: La compaction anormale de la chromatine induite par PRSet7^{PIPMUT} dépend d'une déacétylation par les HDACs. (A) Immunoblots, (B) Analyse de FACS et (C) quantification de FRET à partir d'extraits de cellules H2B-2FP traitées à la Trichostatine A (TSA) et induites ou non pour l'expression de FLAG-Pr-Set7^{PIPMUT}

III. CARACTERISATION D'INHIBITEURS DE PR-SET7 POUR UNE UTILISATION EN THERAPIE CANCEREUSE

1. CONTEXTE/PROBLEMATIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

Dans le cadre de l'étude du statut et de la fonction de PR-Set7 dans les cancers, beaucoup d'études ont montré que l'inhibition de cette enzyme pourrait avoir un effet thérapeutique intéressant pour le traitement du cancer. Le développement ou l'identification d'inhibiteurs chimiques de PR-Set7 qui soient spécifiques et fonctionneraient à une faible concentration est donc un défi majeur dans le domaine de la recherche sur les nouvelles thérapies anti-cancéreuses. En 2013, l'équipe de Raymond J. Andersen a caractérisé un inhibiteur de PR-Set7 produit par *Streptomyces* sp dans des sédiments marins en Papouasie nouvelle Guinée, l'acide nahuoque A (NA-A) (Williams et al., 2013). Cette molécule est un inhibiteur compétitif de PR-Set7 pour le S-adenosyl méthionine. D'autres analyses ont permis d'isoler des analogues de l'acide nahuoque A, les acides nahuoques B, C, D et E qui devaient être caractérisés et testés sur des lignées cancéreuses humaines, ce travail a fait l'objet d'une partie de ma thèse et a été publié dans un article sur lequel je suis signataire (Article 4, (Williams et al., 2016)).

Cet article (Article 4, Williams et al., 2016) a consisté en une description, par des chimistes, de la structure des acides nahuoques B-E et en une étude de la capacité des acides A-E à inhiber PR-Set7 *in vitro*. Ce travail a permis de montrer que l'acide nahuoque A possède l'IC₅₀ (c'est-à-dire la concentration à laquelle l'activité de l'enzyme est réduite de moitié) la plus faible (8µM) parmi les 5 composés (Table 4). Par la suite, cet inhibiteur et deux de ses dérivés (NA-A penta-acétate et methyl nahuoque A penta-acétate), conçus pour améliorer leur capacité d'inhibition ou de pénétration dans les cellules, ont été testés *in vivo* dans des cellules cancéreuses humaines pour évaluer leur cytotoxicité. Pour cela, une lignée U2OS a été traitée avec des doses croissantes des 3 composés. Le NA-A et le NA-A penta-acétate entraînent une diminution de la prolifération des U2OS et ont des IC₅₀ respectifs de 65 et 39µM respectivement (ici, l'IC₅₀ correspond à la dose à laquelle la prolifération cellulaire est réduite de moitié) (Figure 5-A). Le NA-A penta-acétate est aussi cytotoxique dans deux autres lignées cancéreuses, les SUM-159 et les MDA-MB-436 (Figure 5-B). Est-ce que cet effet cytotoxique est dû à l'inhibition de l'enzyme ? Pour répondre à cette question, des cellules U2OS ont été traitées avec le NA-A pendant 24h et 48h et les niveaux de méthylation ont été évalués par western-blot. Nous avons pu observer que le traitement au NA-A conduit, comme la déplétion par siRNA de PR-Set7, à une diminution, mais pas une disparition, des niveaux de H4K20me1 et H4K20me3 (Figure 6). Aucun changement n'a été observé concernant les autres marques de chromatine testées (H3K4me3 et H3K27me3). Ce résultat montre que l'inhibiteur est capable de pénétrer dans les cellules et d'inhiber PR-Set7 de façon partielle. De plus, une analyse du cycle cellulaire de ces cellules par incorporation de BrdU a été réalisée et a montré que le NA-A entraînait une accumulation des cellules en entrée de phase de réplication, comme observé lorsqu'on déplete PR-Set7, suggérant encore que la cytotoxicité du NA-A est liée à sa capacité d'inhibition de PR-Set7 (Figure 7). Le NA-A penta-acétate est donc efficace

pour inhiber PR-Set7 mais présente une IC₅₀ assez élevée (entre 39 et 85µM selon la lignée cellulaire), ce qui rend difficile son utilisation pour des études *in vivo* ou pour une utilisation en clinique. De plus cet inhibiteur est un compétiteur du SAM et non du substrat, ce qui pourrait entraîner des effets non spécifiques. Et enfin, il est difficile d'en produire en grande quantité.

Une partie de mon travail de thèse a donc consisté à caractériser un second inhibiteur chimique de PR-Set7, l'UNC0379, un dérivé de la quinazoline (Ma et al., 2014). Cet inhibiteur est une petite molécule synthétique inhibitrice du substrat, elle est spécifique pour l'inhibition de PR-Set7 parmi 15 autres méthyltransférases testées dont G9a et GLP. En test radioactif d'activité méthyltransférase l'UNC0379 possède une IC₅₀ de 7.3 µM. Ce travail de caractérisation de l'activité de l'UNC0379 a ensuite permis une collaboration avec l'équipe de Jérôme Moreaux qui s'intéresse aux cancers hématologiques et notamment au myélome multiple (MM). Le myélome multiple se caractérise par une transformation cancéreuse des plasmocytes qui vont se multiplier anormalement et conduire à une dérégulation de la fonction des plasmocytes normaux. Une des conséquences sera la diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire face à une infection. Les plasmocytes tumoraux peuvent aussi envahir la moelle osseuse et réduire la formation des autres cellules sanguines et immunitaires. Le myélome multiple est souvent traité en première ligne avec du thalidomide, un inhibiteur de l'angiogenèse, parfois en combinaison avec du melphalan, un agent alkylant. Les cellules de MM (MMC) présentent des altérations épigénétiques et notamment une hyperméthylation de l'ADN au niveau de certains gènes suppresseurs de tumeur (Galm et al., 2004; Ng et al., 1997) et une surexpression de certaines HDACs (Tandon et al., 2016; Weichert, 2009). Des essais cliniques sont en cours avec des drogues ciblant les DNMT et les HDACs. Cependant, l'identification des biomarqueurs prédictifs pour la sensibilité des MMC aux thérapies épigénétiques reste un objectif important pour améliorer les essais cliniques. Dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques il a été intéressant d'examiner le statut de l'enzyme PR-Set7 dans ce cancer et de tester l'intérêt d'une inhibition de cette enzyme dans la perspective de découvrir des nouveaux traitements anti-cancéreux. Ces données sont résumées dans un article en cours de soumission sur lequel je suis signataire (Article 5, Herviou et al.,).

Dans un premier temps l'équipe de Jérôme Moreaux a cherché à savoir si l'expression du gène PR-Set7 était altérée dans le myélome multiple. Ils ont mis en évidence un niveau d'expression significativement plus élevé dans les lignées cellulaires de myélome humain (human myeloma cell lines HMCLs) comparées aux MMcs primaires ou aux cellules plasmiques non-cancéreuses (normal bone marrow plasma cells, BMPCs) (Figure 1). De plus l'équipe a démontré que la surexpression de PR-Set7 est associée avec un mauvais pronostic chez les patients MM (Figure 3). Des expériences sur des U2OS m'ont permis de montrer qu'à 10µM l'inhibiteur UNC0379 était efficace à pour inhiber PR-Set7 et qu'à cette dose on observait une diminution de la mono-méthylation H4K20 en 24h (Figure 5). J'ai

pu montrer que de façon intéressante le traitement à l'UNC0379 entraîne aussi la disparition de l'enzyme PR-Set7 de façon dépendante du protéasome mais pas de l'interaction avec PCNA. Le traitement à l'UNC0379 conduit en outre, comme la déplétion de l'enzyme, à un blocage des cellules dans le cycle cellulaire, une augmentation du signal γ H2AX ainsi qu'une activation du point de contrôle de dommages ADN (Figure 6). L'intérêt de l'utilisation de l'UNC0379 en thérapeutique a été questionné en utilisant des HMLCs traitées avec des doses croissantes d'UNC0379. L'UNC0379 entraîne une inhibition de la croissance cellulaire dépendante de la dose en UNC0379 dans toutes les lignées, avec une IC_{50} de médiane de $2.05\mu M$, associée à une diminution de l'activité de PR-Set7 (Figure 7). L'UNC0379 entraîne de plus de l'apoptose dans 2 lignées HMLCs (Figure 8) et le traitement avec l'UNC0379 combiné à du melphalan augmente la capacité du melphalan à générer des dommages ADN (Figure 9). De plus, le traitement d'échantillons de patients avec l'UNC0379 conduit à une diminution du nombre de cellules cancéreuses sans toxicité pour les cellules saines (Figure 10). L'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt thérapeutique de l'inhibition de PR-Set7 dans le myélome multiple.

1.1. ARTICLE 4 : STRUCTURES OF NAHUOIC ACIDS B-E PRODUCED IN CULTURE BY A STREPTOMYCES SP. ISOLATED FROM A MARINE SEDIMENT AND EVIDENCE FOR THE INHIBITION OF THE HISTONE METHYL TRANSFERASE SETD8 IN HUMAN CANCER CELLS BY NAHUOIC ACID A.

David E. Williams, Fanny Izard, Stéphanie Arnould, Doralyn S. Dalisay, Cholpisut Tantapakul, Wisanu Maneerat, Teatulohi Matainaho, Eric Julien, Raymond J. Andersen

Journal of organic chemistry, 2016

The histone H4-K20 methyltransferase SETD8 is a potential therapeutic target in Multiple Myeloma

L. Herviou, F. Izard, E. De Bruyne, A. Ma, J. Jin, K Vanderkerken, C. Grimaud, E. Julien* & J. Moreaux*

*Equal contribution

Abstract

Multiple Myeloma (MM) is a malignant plasma cell disease that accumulates within the bone marrow. Despite the recent progress in understanding the pathogenesis of MM, this cancer is still incurable and the identification of new therapeutic strategies is therefore essential. In addition to genetic mutations, recent studies have pinpointed that epigenetic alterations, such as histone/DNA methylation and miRNA expression, are also important players in MM. We show here that a high expression level of the lysine methyltransferase SETD8 is an adverse MM prognosis factor that is associated with poor patient survival. SETD8 is the sole enzyme responsible for the monomethylation of histone H4 at lysine 20 (H4K20me1), which has been linked to chromatin compaction, DNA repair and cell-cycle progression. We found that the compound UNC0379 (a derivative of quinazoline) can specifically inhibit SETD8 and leads to a rapid G0/G1 arrest followed by apoptosis in human MM cell lines (HMCLs). Remarkably, SETD8 inhibition is also efficient on primary cancer cells from patients without significant toxicity on the non-myeloma cells, suggesting a specific addiction of cancer cells to SETD8 activity. Melphalan is an

alkylating agent commonly used in MM treatment. Since SETD8 is involved in DNA-damage responses, we investigated the effect of combining low dose of UNC0379 with Melphalan on HMCLs. Our results shows that this drug combination enhances the appearance of DNA breaks, as observed by the accumulation of 53BP1 foci and γ H2AX signal. Furthermore, GSEA analysis of patients with high SETD8 expression also shows a significant enrichment of genes involved in DNA repair, MYC-MAX targets and MAPK pathway. Altogether, these results demonstrate the SETD8 importance for MM cells survival/proliferation and suggest that SETD8 inhibition may represent a promising strategy to improve conventional treatment of MM.

Introduction

Multiple Myeloma (MM) is a currently incurable malignant plasma cell disease, with 25,000 new patients per year in the EU and a median survival of five to six years¹. This disease develops primarily in the bone marrow and is associated with end organ damages: bone lesions due to abnormal bone turnover induced by tumor cells, renal failure due to high levels of monoclonal immunoglobulin (Ig), anemia due to bone marrow invasion by tumor cells.

Malignant plasma cells (Multiple Myeloma Cells, MMCs) are clonal cells that exhibit the same rearranged heavy and light chain Ig genes, with somatic mutations in the variable domains of Ig genes that are fixed throughout disease course. For virtually all patients, Multiple Myeloma (MM) disease is preceded by a premalignant phase, called monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), characterized by the accumulation in the bone marrow of clonal plasma cells surviving for years in the bone marrow and the detection of a clonal Ig in the serum². MGUS frequency increased rapidly with age and occurs in 5.7% the population older than 70 years. Premalignant plasma cells are in an oncogene-induced senescence state, with deregulation of oncogenes (Cyclin D1, Ras and growth factors), partial inactivation of the Rb pathway and accumulation of p21 and p16. MM disease arises at a 1% rate per year in patients with MGUS, independently of the duration of premalignant phase.

Treatment of MM¹ consists of (1) an induction phase with four monthly courses of high doses of corticosteroid (Dexamethasone) and a proteasome inhibitor (Velcade) in association with a cell cycle targeting drug or an immunomodulatory drug, (2) a short-term exposure to high dose of Melphalan, an alkylating agent followed with autologous stem cell transplantation to rescue hematopoiesis and (3) a maintenance treatment with dexamethasone and an immunomodulatory drug (Thalidomide or Revlimid), which targets Cereblon, an F-box protein of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase complex. These regimens do not cure patients and MM repeatedly relapses until the patient succumbs to the disease.

The molecular events governing the onset and progression of malignant transformation are triggered by DNA alterations (translocations, amplifications or deletions, mutations) and defects in pattern of epigenetic modifications in chromatin³, including changes in DNA methylation and in histone methylation and acetylation. These epigenetic changes are often critical in the initiation and progression of many cancers⁴. In multiple myeloma (MM), the profile of DNA methylation comprises genomic global hypomethylation and promoter hypermethylation of tumor suppressor genes^{5,6}. More recently, hypermethylation of *GPX3*, *RBPI*, *SPARC* and *TGFBI* genes was demonstrated to be associated with significantly shorter overall survival, independent of age, ISS score and adverse cytogenetics⁷. Thus, clinical trials for MM treatment are ongoing with DNMT inhibitors (DNMTi) as monotherapy or combined with lenalidomide or dexamethasone⁸. Histone deacetylases (HDAC) represent another molecular targets for the treatment of different cancers including MM⁹⁻¹². Romidepsin and Vorinostat (SAHA) have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma¹³ and several HDAC inhibitors (HDACi) are evaluated in clinical trials in MM^{8,9}. In this regard, combination of panobinostat-bortezomib-dexamethasone (PANORAMA) and of vorinostat-bortezomib (VANTAGE 088) have been initiated in two large phase III clinical trials^{14,15}. Results of VANTAGE 088 trial showed that association of vorinostat and bortezomib prolonged significantly progression free survival in patients with relapsed or refractory MM¹⁵. In PANORAMA clinical trial, panobinostat pan-HDACi treatment combined with bortezomib and dexamethasone

resulted in a significant progression-free survival improvement in patients with relapsed MM¹⁶. However, identification of biomarkers predictive for sensitivity of MMCs to epigenetic therapies remains an important objective to improve clinical trials. We recently reported gene expression (GEP)-based risk scores to predict the sensitivity of MMC to DNMTi^{17,18} and HDACi¹⁷. These scores allow the identification of MM patients who could benefit from HDACi or DNMTi treatment.

In order to identify new epigenetic targets for MM cancer treatment, we asked which genes encoding epigenetic factors are differentially expressed between normal bone marrow plasma cells (BMPCs, n=7), MM plasma cells from newly diagnosed patients (MMCs, n = 206) and human myeloma cell lines (HMCLs, N=40). We identified a significant overexpression of the histone methyltransferase SETD8 in HMCLs compared to normal BMPCs and primary MMCs from newly diagnosed patients. SETD8 (also known as SET8, PR-Set7, KMT5A) is the sole enzyme responsible for the monomethylation of histone H4 at lysine 20 (H4K20me1) which has been linked to chromatin compaction and cell-cycle regulation¹⁹⁻²¹. Indeed, H4K20 methylation is highly dynamic during the cell cycle as SETD8 is degraded by proteasome specifically in S phase upon interaction with PCNA by its PIP domain⁴⁰. SETD8 also induces the methylation of non-histone proteins, such as the replication factor PCNA and the tumor suppressor P53 and its stabilizing protein Numb^{22,23,24}. While SETD8-mediated methylation of P53 and Numb inhibits apoptosis, PCNA methylation upon SETD8 enhances the interaction with the Flap endonuclease FEN1 and promotes cancer cell proliferation^{23,24}. Consistent with this, overexpression of SETD8 is

found in various types of cancer and has been directly implicated in breast cancer invasiveness and metastasis²⁵. A role of SETD8 in development of Multiple Myeloma is not known, however.

Here, we provide evidence that SETD8 overexpression is an adverse prognosis factor in multiple myeloma. The inhibition of this epigenetic enzyme by the chemical drug UNC0379 causes SETD8 degradation and H4K20me1 depletion, which leads to cell-cycle defects and apoptosis in U2OS and human myeloma cell lines. Remarkably, treatment of MM patient samples with UNC 0379 leads to reduce the percentage of myeloma cells without significant toxicity on the non-myeloma cells, suggesting a specific addiction of primary myeloma cells to the SETD8 activity. Finally, combining low dose of UNC0379 with melphalan strongly enhances the appearance of DNA damage, suggesting that SETD8 inhibition by chemical drugs represent a promising strategy to improve conventional treatment of multiple myeloma.

Materials and methods

Human Myeloma Cell Lines (HMCLs) and primary multiple myeloma cells of patients.

Human myeloma cell lines HMCLs, N=40 were obtained as previously described or purchased from DSMZ and American Type Culture Collection. Microarray data are deposited in the ArrayExpress public database (accession numbers E-TABM-937 and E-TABM-1088). Patients presenting with previously untreated multiple myeloma (N=206) or monoclonal gammopathy of undetermined significance (N=5) at the university hospitals of Heidelberg and Montpellier as well as 7 healthy donors have been included in the study approved by

the ethics committee of Montpellier and Heidelberg after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Clinical parameters and treatment regimens of the MM patients included in the Heidelberg-Montpellier (HM) cohort were previously described²⁶. Gene expression profiling (GEP) of purified MMCs was assayed using Affymetrix U133 2.0 plus microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) as described²⁷ and data normalized using the MAS5 Affymetrix algorithm. The .CEL and MAS5 files are deposited in the ArrayExpress public database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), under accession number E-MTAB-362. We also used publicly available MAS5 normalized GEP data (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accession number GSE2658) from purified MMCs of a cohort of 345 patients treated with total therapy 2 protocol (UAMS-TT2 cohort) at the University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS, Little Rock, USA)²⁸. T(4;14) translocation was evaluated using *MMSET* spike expression²⁹ and del17p13 surrogated by *TP53* probe set signal³⁰ for UAMS-TT2 patients. Gene expression data of normal memory B cells (MB), preplasmasts, plasmablasts and early plasma cells^{31,32} are deposited in the ArrayExpress databases under accession numbers E-MEXP-2360 and E-MEXP-3034.

Immunoblot analysis

For immunoblot analysis, cells washed with phosphate-buffered saline (PBS) were lysed in Laemmli buffer. After measuring protein quantity by Bradford, equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and probed with one of the following antibodies: anti-SETD8 (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-H4K20me1 (1:1000

cell signaling) anti-phospho-H2A.X-Ser139 (1:1000, millipore). Membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies. The immunoreactive bands were detected by chemiluminescence.

Sensitivity of HMCLs to SET8 inhibitor.

HMCL were cultured with graded concentrations of the SETD8 inhibitor UNC0379³³. HMCL cell growth was quantified with a Cell Titer Glo Luminescent Assay (Promega, Madison, WI, USA) and the 50% inhibitory concentration (IC50) was determined using GraphPad Prism software (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>)^{17,18,34}.

Sensitivity of primary myeloma cells to SETD8 inhibitor.

Primary myeloma cells of 6 patients were cultured with or without graded concentrations of UNC0379 SETD8 inhibitor. MMCs cytotoxicity was evaluated using anti-CD138-PE mAb (Immunotech, Marseille, France) as described^{18,35}. Results were analyzed using GraphPad Prism (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

DNA repair foci - immunofluorescence microscopy

After deposition on slides using a Cytospin centrifuge, cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.5% Triton in PBS and saturated with 5% bovine milk in PBS. The rabbit anti-53BP1 antibody (clone NB100-304, Novus Biologicals, Cambridge, United Kingdom) and the mouse anti- γ H2AX (Ser139) antibody (clone JBW301, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were diluted 1/300 and

1/100 respectively in 5% bovine milk in PBS, and deposited on cytopins for 90 minutes at room temperature. Slides were washed twice and antibodies to rabbit or mouse immunoglobulins conjugated to alexa 488 (diluted 1/500 in 5% bovine milk in PBS) were added for 45 minutes at room temperature. Slides were washed and mounted with Vectashield and 1% DAPI. Images and fluorescence were captured with a ZEISS Axio Imager Z2 microscope (X63 objective) (company, town state), analyzed with Metafer (version3.6, company, town state) and ImageJ softwares. The number of 53BP1 and γ H2AX foci was counted in at least 300 nuclei.

Statistical analysis

Gene expression data were analyzed using SAM (Significance Analysis of Microarrays) software³⁶ as published²⁹. The statistical significance of differences in overall survival between groups of patients was calculated by the log-rank test. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards model. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method. All these analyses have been done with R.2.10.1 (<http://www.r-project.org/>) and bioconductor version 2.5. Significantly enriched pathways were identified using Reactome functional interaction map. Gene set enrichment analysis was carried out by computing overlaps with canonical pathways and gene ontology gene sets obtained from the Broad Institute³⁷.

Results

As shown in figure 1, *SETD8* gene was not significantly differentially expressed between multiple myeloma cells (MMCs) of patients (median 1253, range 92 - 6928) compared to normal bone marrow plasma cells (BMPCs) (median = 1798; range: 922 - 2422)($P = NS$). However, we noticed some abnormal spiked expression in several patients ($P < 0.001$) and a relative higher expression in human myeloma cell lines (HMCLs) (median 1880, range 286 - 3960) compared to primary MMCs or BMPCs ($P < .001$) (Figure 1). Primary MMCs of previously untreated patients can be classified into seven molecular groups associated with different patients' survival³⁸. *SETD8* expression was not significantly deregulated in a specific subgroup of the molecular classification of MM (Figure 2). Nevertheless, a high *SETD8* expression, defined using maxstat R package²⁹, coincided with shorter overall survival (OS) in two independent cohorts of newly-diagnosed MM patients ($P = 2E-4$ in the UAMS-TT2 cohort (N=256) and $P = 0.003$ in the UAMS-TT3 cohort (N=158)) (Figure 3). In addition, a significant overexpression of *SETD8* is observed in MM patients with 4 copies of chromosome regions 1q21, which are linked to a poor prognosis (Figure 4A). No significant overexpression of *SETD8* was identified in patients with deletion 17p or t(4;14) translocation. There is a significant gradual increase in *SETD8* expression from patients with a low growth proliferation index (GPI)²⁶ to GPI^{medium} and GPI^{high} groups (Figure 4B). Taken together, these results suggest that *SETD8* overexpression is associated with a prognostic value in MM patients.

Given the role of SETD8 in the control of genome integrity and cell proliferation, we investigated the interest of the SETD8 inhibitor, UNC0379, to eradicate MM cells. UNC0379 treatment is efficient to decrease the levels of H4K20me1 within 24 hours, whereas no significant change was observed for other methylated histone marks such as H3K9me1 and H3K27me1 at this time in the osteosarcoma U2OS cell line (Figure 5A). Interestingly, UNC0379 treatment also caused the proteolytic degradation of SETD8, which was prevented by the inhibition of the 26S proteasome pathway by the chemical proteasome inhibitor MG132 (Figure 5B). To know whether SETD8 degradation by proteasome upon UNC0379 treatment was a consequence of PCNA interaction, we overexpressed a mutant of SETD8 mutated on its PIP domain which is able to interact with PCNA and is not ubiquitinated by CRL4-Cdt2 and consequently stable in S phase⁴⁰ (Figure 5C). When cells overexpressing SETD8^{PIPMUT} are treated with UNC0379 we observed degradation of SETD8^{PIPMUT}. Then, degradation of SETD8 upon UNC0379 treatment is not a consequence of PCNA interaction, highlighting another degradation pathway for SETD8. We can ask the question whether H4K20me1 decrease is a consequence of SETD8 inhibition by UNC0379 or if it depends on SETD8 degradation. When U2OS cells are infected to stably express SETD8-HA and treated with a low concentration of UNC0379 which is not sufficient to lead to SETD8-HA degradation, we still observe H4K20me1 decrease. This result shows that UNC0379 has the ability to inhibit SETD8. Together, these results indicate that UNC0379 can penetrate into human cells and induce a specific

inhibition of SETD8 activity followed by its proteolytic degradation *via* the proteasome.

SETD8 inhibition by UNC0379 leads to proliferation defects in U2OS cells and in particular G1/S and G2 accumulation, as shown in Figure 6B with FACS analysis. Since SETD8 is targeted for degradation in response to DNA damage²⁰, the degradation of SETD8 upon UNC0379 might be related the appearance of DNA damage and the activation of the DNA damage checkpoint, as observed by the increase in γ H2A.X and the phosphorylation of CHK1 in UNC0379-treated cells (Figure 6C). Consistent with this, UNC0379 treatment led to the stabilization of P53 and an increase in the levels of the cell-cycle inhibitor P21 (Figure 6C).

The effect of UNC0379 was examined in 10 different human myeloma cell lines representative of the patient's molecular heterogeneity³⁹. As shown in figure 6, UNC0379 induced a dose dependent inhibition of cell growth in all investigated HMCLs with a median IC50 of 2.05 μ M (range: 1,24 – 9.23 μ M) (Figure 6A). As described in figure 5 for U2OS cells, this cell-growth inhibition in HMCLs resulted from a decrease in levels and activity of SETD8 upon UNC0379 treatment (Figure 6B).

Remarkably, UNC0379 (5 μ M) induced apoptosis in XG1 and XG7 HMCLs with 87%, 63% of annexin-V positive respectively (Figure 7, $P < 0.05$).

Furthermore, UNC0379 significantly synergizes with melphalan to induce accumulation of DNA double strand breaks, as evidenced by increased accumulation of 53BP1 foci (Figure 8A&B; $P < 0.001$).

Furthermore, UNC0379 induced a significant apoptosis of primary myeloma cells from patients co-cultured with their bone marrow environment and recombinant IL-6¹⁷ (n=8). SETD8 inhibitor significantly reduced the median number of viable myeloma cells by 19%, 57% and 66% at respectively 1, 2.5 and 5 μ M ($P = NS$, $P = 0.01$ and $P = 0.005$ respectively; n=6) without significant toxicity on the non-myeloma cells (Figure 9). These data demonstrated a specific toxicity of UNC0379 on myeloma cells.

Taken together, these data underline the therapeutic interest of SETD8 inhibitor in MM and especially in patients characterized by high SETD8 expression and a poor prognosis.

References

1. Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):479-491.
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-5417.
3. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2 Suppl 1:S4-11.
4. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J*. 2009;50(4):455-463.
5. Heuck CJ, Mehta J, Bhagat T, et al. Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *J Immunol*. 2013;190(6):2966-2975.
6. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. 2010.
7. Kaiser MF, Johnson DC, Wu P, et al. Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumour suppressor genes in multiple myeloma. *Blood*. 2013.
8. Maes K, Menu E, Van Valckenborgh E, Van Riet I, Vanderkerken K, De Bruyne E. Epigenetic Modulating Agents as a New Therapeutic Approach in Multiple Myeloma. *Cancers*. 2013;5(2):430-461.
9. Neri P, Bahlis NJ, Lonial S. Panobinostat for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21(5):733-747.
10. Neri P, Tagliaferri P, Di Martino MT, et al. In vivo anti-myeloma activity and modulation of gene expression profile induced by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Br J Haematol*. 2008;143(4):520-531.
11. Minami J, Suzuki R, Mazitschek R, et al. Histone deacetylase 3 as a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia*. 2013.
12. Hideshima T, Mazitschek R, Santo L, et al. Induction of differential apoptotic pathways in multiple myeloma cells by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Leukemia*. 2013.
13. Zhang QL, Wang L, Zhang YW, et al. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis. *Leukemia*. 2009;23(8):1507-1514.
14. Richardson PG, Schlossman RL, Alsina M, et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*. 2013;122(14):2331-2337.
15. Dimopoulos M, Siegel DS, Lonial S, et al. Vorinostat or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma (VANTAGE 088): a multicentre, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1129-1140.
16. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):1195-1206.
17. Moreaux J, Reme T, Leonard W, et al. Gene expression-based prediction of myeloma cell sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer*. 2013;109(3):676-685.
18. Moreaux J, Reme T, Leonard W, et al. Development of gene expression-based score to predict sensitivity of multiple myeloma cells to DNA methylation inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(12):2685-2692.
19. Beck DB, Oda H, Shen SS, Reinberg D. PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome

- condensation, and transcription. *Genes Dev.* 2012;26(4):325-337.
20. Brustel J, Tardat M, Kirsh O, Grimaud C, Julien E. Coupling mitosis to DNA replication: the emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol.* 2011;21(8):452-460.
21. Jorgensen S, Schotta G, Sorensen CS. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(5):2797-2806.
22. Shi X, Kachirskaia I, Yamaguchi H, et al. Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Molecular cell.* 2007;27(4):636-646.
23. Dhimi GK, Liu H, Galka M, et al. Dynamic methylation of Numb by Set8 regulates its binding to p53 and apoptosis. *Molecular cell.* 2013;50(4):565-576.
24. Takawa M, Cho HS, Hayami S, et al. Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer Res.* 2012;72(13):3217-3227.
25. Koturbash I, Simpson NE, Beland FA, Pogribny IP. Alterations in histone H4 lysine 20 methylation: implications for cancer detection and prevention. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(2):365-374.
26. Hose D, Reme T, Hielscher T, et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica.* 2011;96(1):87-95.
27. De Vos J, Thykjaer T, Tarte K, et al. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene.* 2002;21(44):6848-6857.
28. Barlogie B, Tricot G, Rasmussen E, et al. Total therapy 2 without thalidomide in comparison with total therapy 1: role of intensified induction and posttransplantation consolidation therapies. *Blood.* 2006;107(7):2633-2638.
29. Kassambara A, Hose D, Moreaux J, et al. Genes with a spike expression are clustered in chromosome (sub)bands and spike (sub)bands have a powerful prognostic value in patients with multiple myeloma. *Haematologica.* 2012;97(4):622-630.
30. Xiong W, Wu X, Starnes S, et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood.* 2008;112(10):4235-4246.
31. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood.* 2009;114(25):5173-5181.
32. Jourdan M, Caraux A, Caron G, et al. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation. *J Immunol.* 2011;187(8):3931-3941.
33. Ma A, Yu W, Li F, et al. Discovery of a selective, substrate-competitive inhibitor of the lysine methyltransferase SETD8. *J Med Chem.* 2014;57(15):6822-6833.
34. Moreaux J, Bruyer A, Veyrune JL, Goldschmidt H, Hose D, Klein B. DNA methylation score is predictive of myeloma cell sensitivity to 5-azacitidine. *Br J Haematol.* 2014;164(4):613-616.
35. Mahtouk K, Jourdan M, De Vos J, et al. An inhibitor of the EGF receptor family blocks myeloma cell growth factor activity of HB-EGF and potentiates dexamethasone or anti-IL-6 antibody-induced apoptosis. *Blood.* 2004;103(5):1829-1837.
36. Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol.* 2003;4(4):210.
37. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-15550.
38. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108(6):2020-2028.
39. Moreaux J, Klein B, Bataille R, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica.* 2011;96(4):574-582.
40. Tardat M, Brustel J, Kirsh O, Lefevbre C, Callanan M, Sardet C, and Julien E. (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 12, 1086–1093.

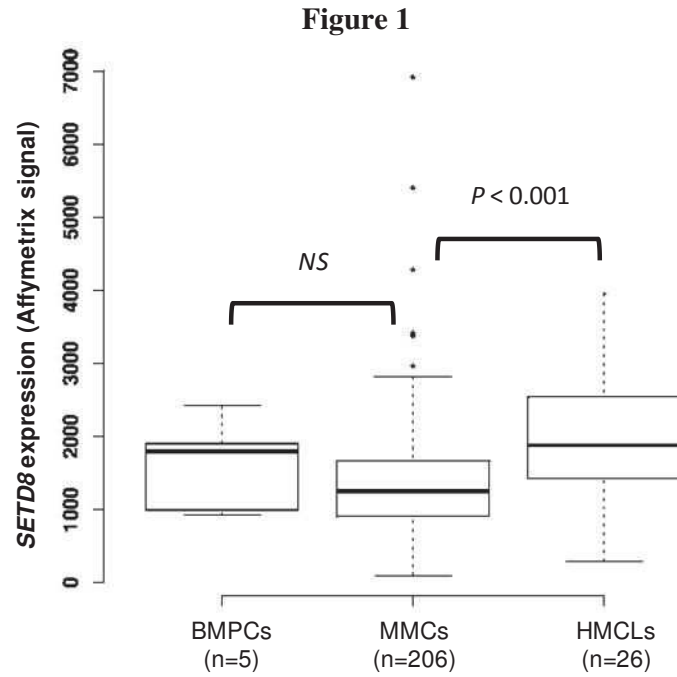


Figure 1: SETD8 expression in MM. A. *SETD8* gene expression in BMPCs, patients' MMCs and HMCLs. Data are MAS5-normalized Affymetrix signals (U133 plus 2.0 microarrays). Statistical difference was assayed using a t-test.

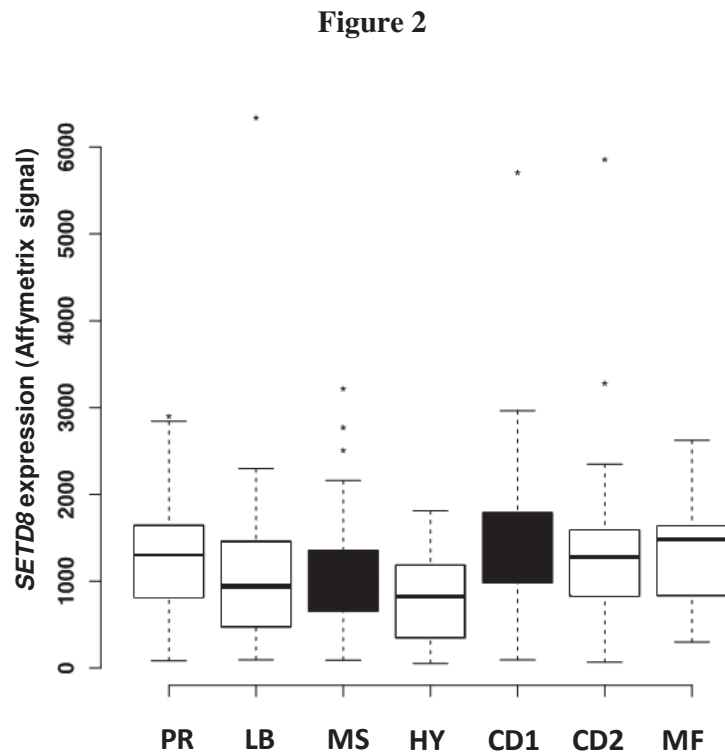


Figure 2: SETD8 gene expression in the 8 groups of the UAMS molecular classification of multiple myeloma. Gene expression profiling of MMCs of the patients of UAMS-TT2 cohort were used. PR: proliferation, LB: low bone disease, MS: MMSET, HY: hyperdiploid, CD1: Cyclin D1-Cyclin D3, CD2: Cyclin D1-Cyclin D3, MF: MAF, MY: myeloid.

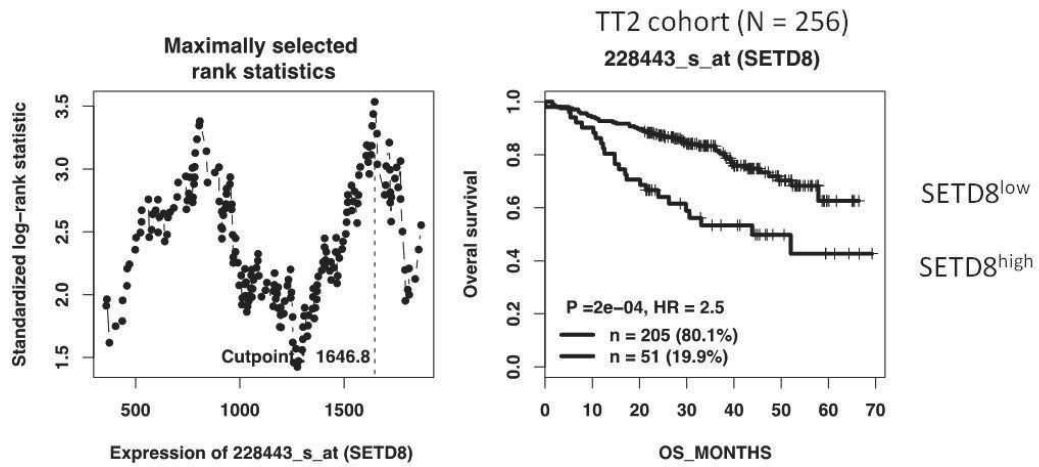


Figure 3A

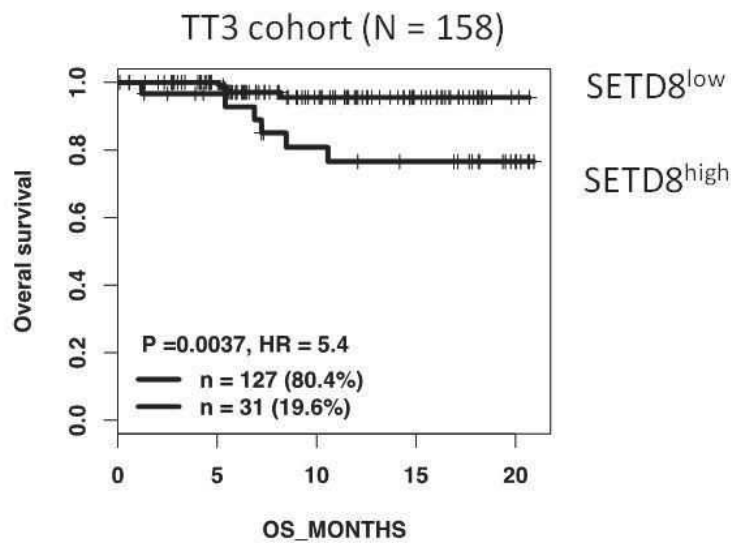


Figure 3B

Figure 3: Prognostic value of SETD8 expression in MM.

(A) Lower overall survival of patients of UAMS-TT2 cohort (n=256) whose MMCs highly expressed *SETD8* gene. The splitting of the patients into two groups according to SETD8 expression in MMCs was done using the Maxstat algorithm. (B) Lower overall survival of patients of the UAMS-TT3 cohort (n=158) whose MMCs highly expressed *RECQ1* gene.

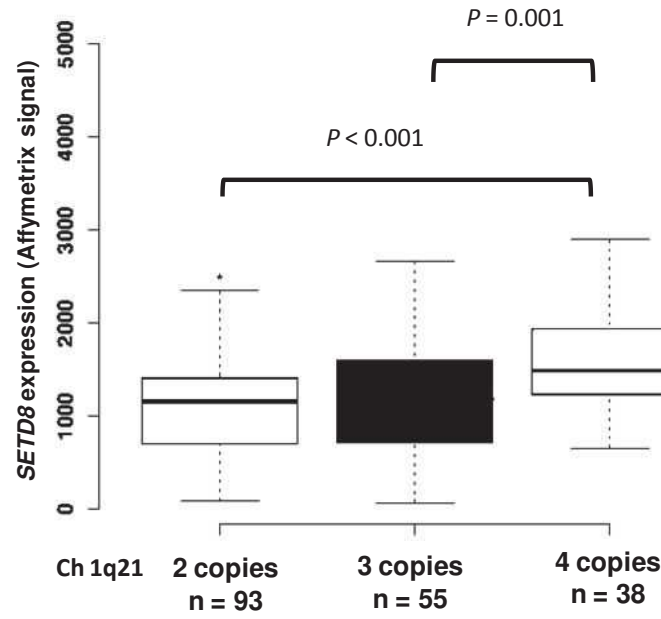


Figure 4A

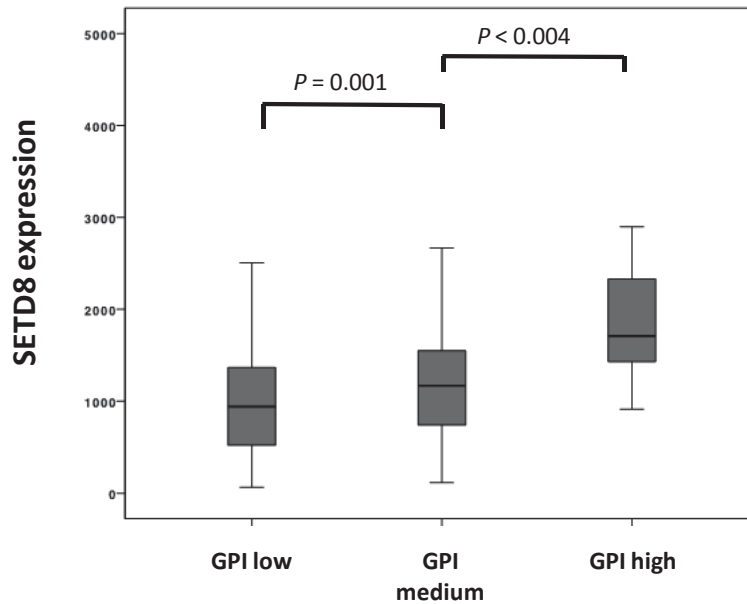


Figure 4B

Figure 4: SETD8 is significantly overexpressed in MM patients with ch 1q21 gain and high growth proliferation index. (A) Association between SETD8 expression and patients' genetic abnormalities was completed using UAMS-TT2 cohort. (B) SETD8 expression in the different gene expression-based proliferation index groups (GPI).

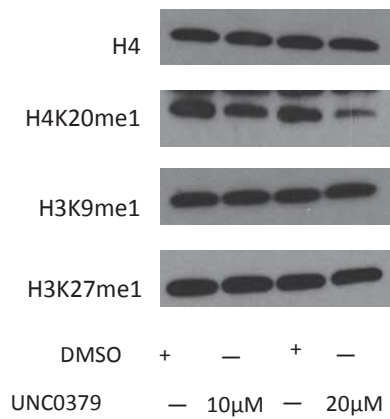


Figure 5A

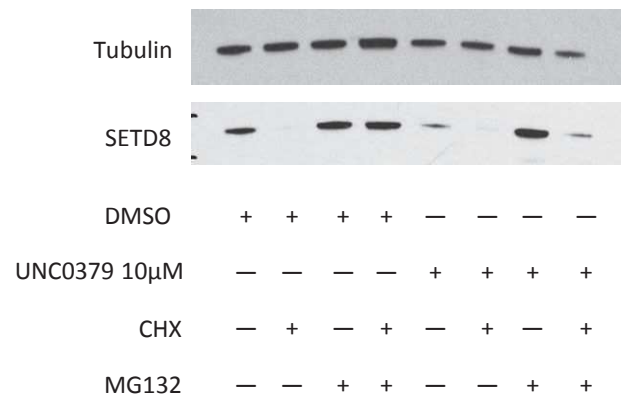


Figure 5B

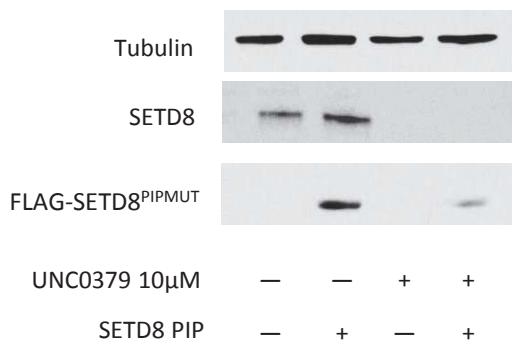


Figure 5C

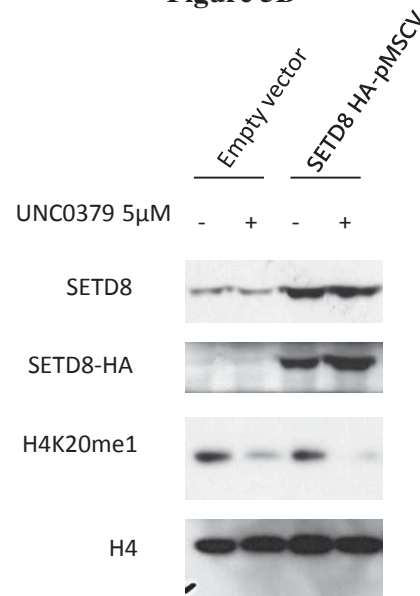


Figure 5D

Figure 5: (A) Immunoblot analysis with anti-H4, anti-H4K20me1, anti-H4K20me2, anti-H4K20me3, anti-H3K9me1 and anti-H3K27me1 of U2OS cells treated with 10 or 20μM of UNC0379 (B) Immunoblot analysis with anti-SETD8 and anti-tubulin (loading control) of DMSO treated cells or UNC0379 treated cells in presence or not of MG123 (proteasome inhibitor) and cycloheximid (protein synthesis inhibitor). (D) Immunoblot analysis with anti-SETD8n anti-HA, anti-H4 and anti-H4K20me1 of DMSO and UNC0379 treated cells overexpressing SETD8-HA.

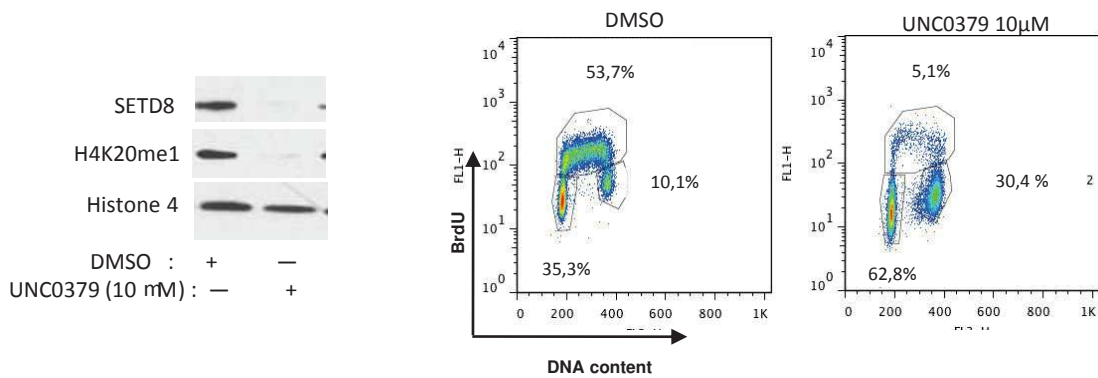


Figure 6A

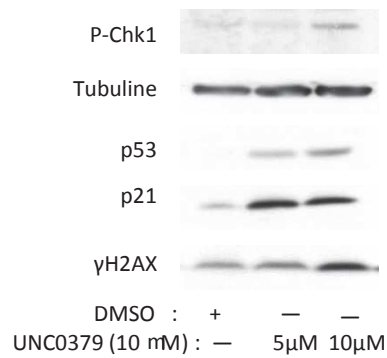


Figure 6B

Figure 6: (A) Immunoblot analysis with anti-SETD8 and anti-H4K20me1 and anti-histone H4 (loading control) and FACS analysis after BrdU incorporation of U2OS cells treated with DMSO or with 10 µM of UNC0379 for 24h. (B) Immunoblot analysis of whole-cell extracts with anti-tubulin (loading control), anti-phospho/CHK1 (marker of DNA damage checkpoint activation), anti-P53, anti-P21, anti-γH2A.X (marker of DNA damage) in cells treated with DMSO or UNC0379 during 24 hours.

A

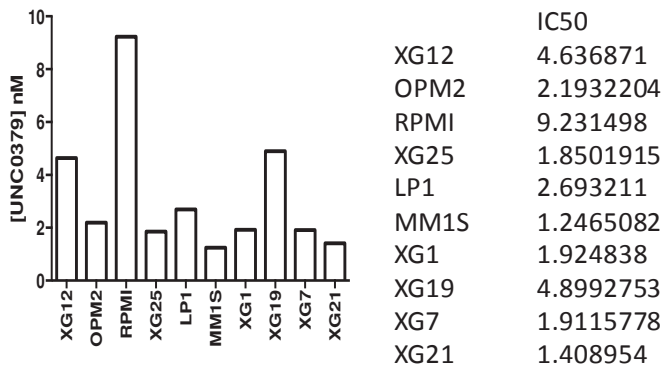
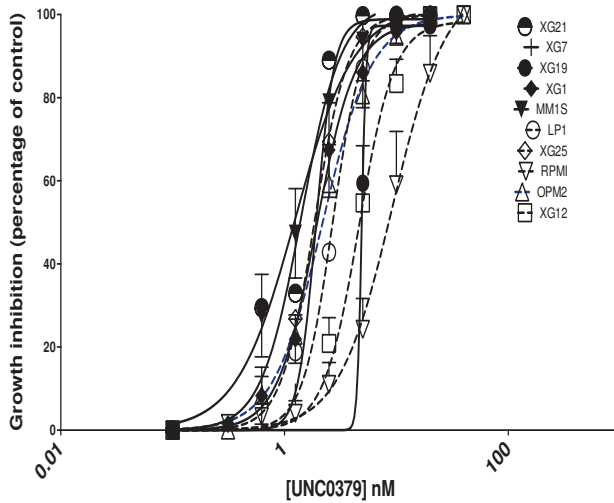


Figure 7A

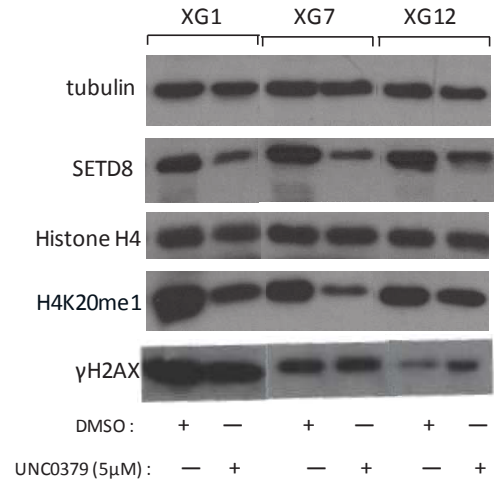


Figure 7B

Figure 7: (A) UNC0379 induces a dose-dependent inhibition of cell growth in HMCL. HMCL were cultured for 4 days in 96-well flat-bottom microtitre plates in RPMI 1640 medium, 10% fetal calf serum, 2 ng/ml interleukin six culture medium (control), and graded concentrations of UNC0379. At day 4 of culture, the viability was assessed by CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. The IC50 (concentration responsible for 50% of the maximal inhibitory effect), was determined using GraphPad PRISM software. Data are mean values ± standard deviation (SD) of five experiments determined on sextuplet culture wells. ; (B) immunoblot analysis of whole-cell extracts with anti-tubulin (loading control), anti-SETD8, anti-histone H4 (loading control), anti-H4K20me1 and anti-γH2AX in XG1, XG7 and XG12 HMCLs treated 24hours with DMSO or UNC0379 at 5 μM.

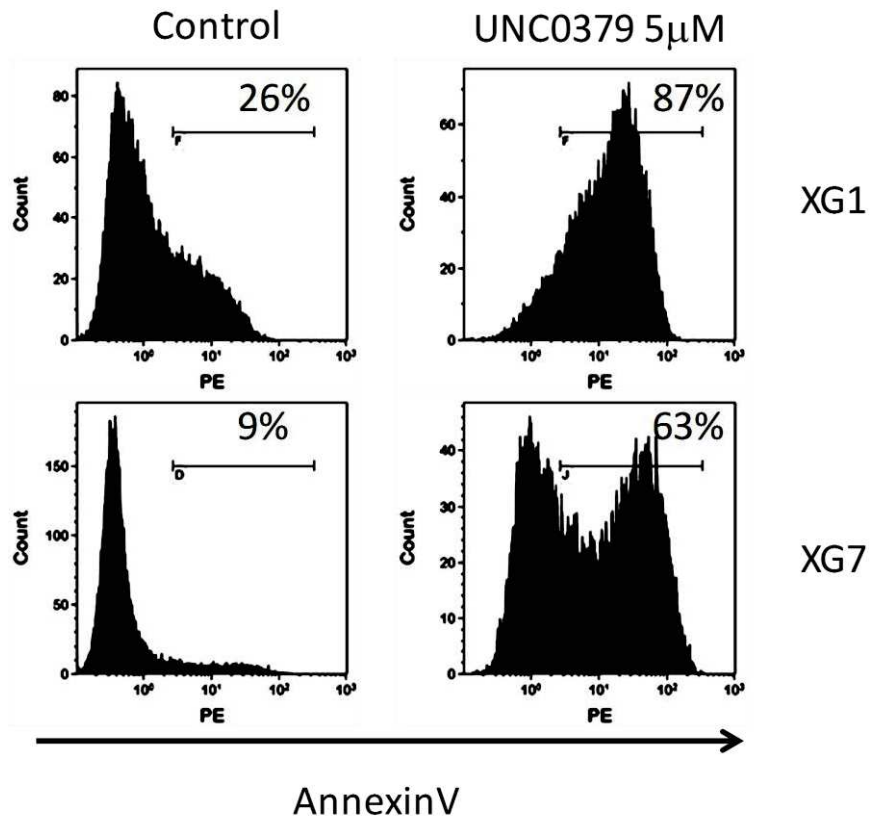


Figure 8

Figure 8: UNC0379 treatment results in MM cell apoptosis induction.

Apoptosis induction was analyzed with Annexin V APC staining by flow cytometry. The shown data is one representative experiment and mean values \pm SD of 3 separate experiments. Statistical analysis was done with a paired t-test.

XG1

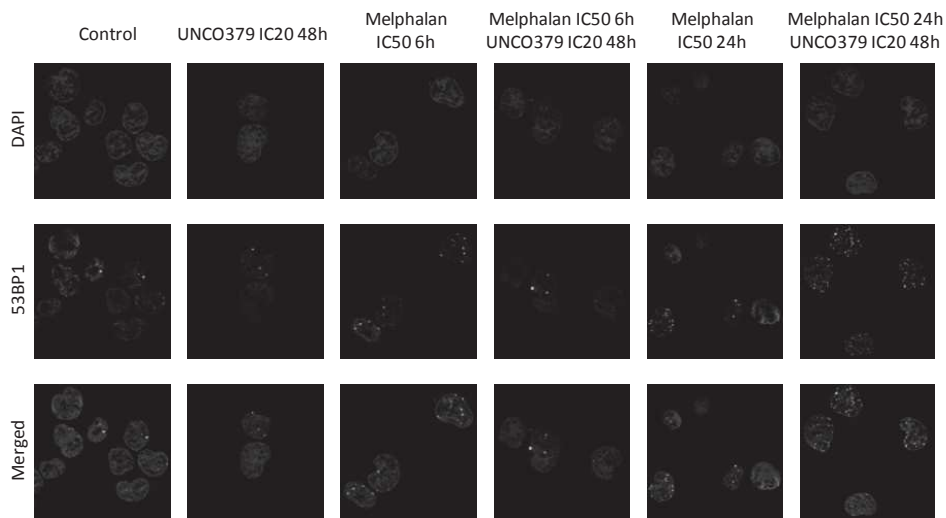


Figure 9A

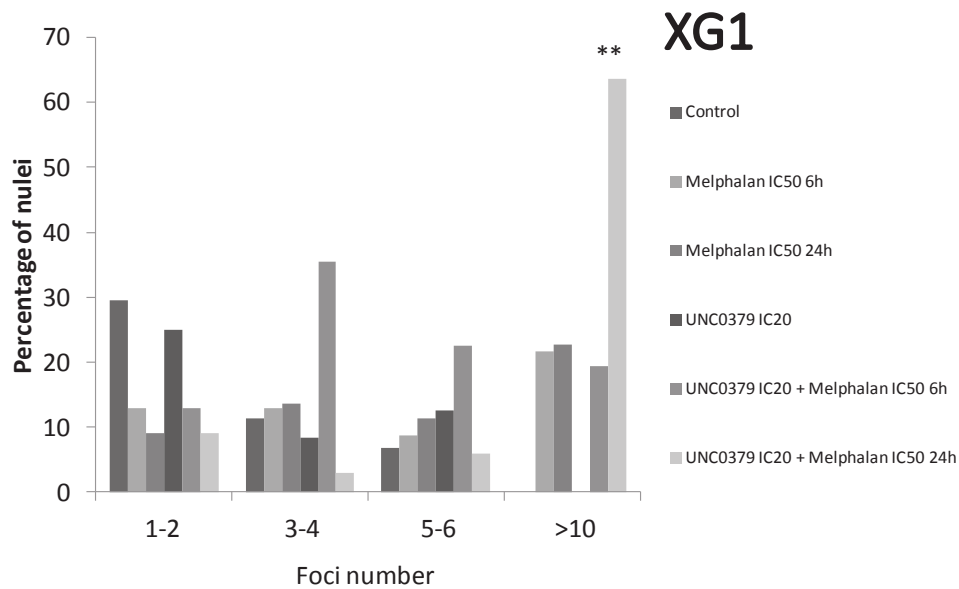


Figure 9B

Figure 9: UNCO379 synergizes with melphalan to induce DNA damage response in MM cells.

(A) 53BP1 staining was used as marker for DNA damage. The number of 53BP1 foci found in each cell was counted, three days after doxycycline treatment. At least 300 cells were counted for each treatment group. (B) The percentage of cells with 53BP1 foci per cell is displayed in the histograms.

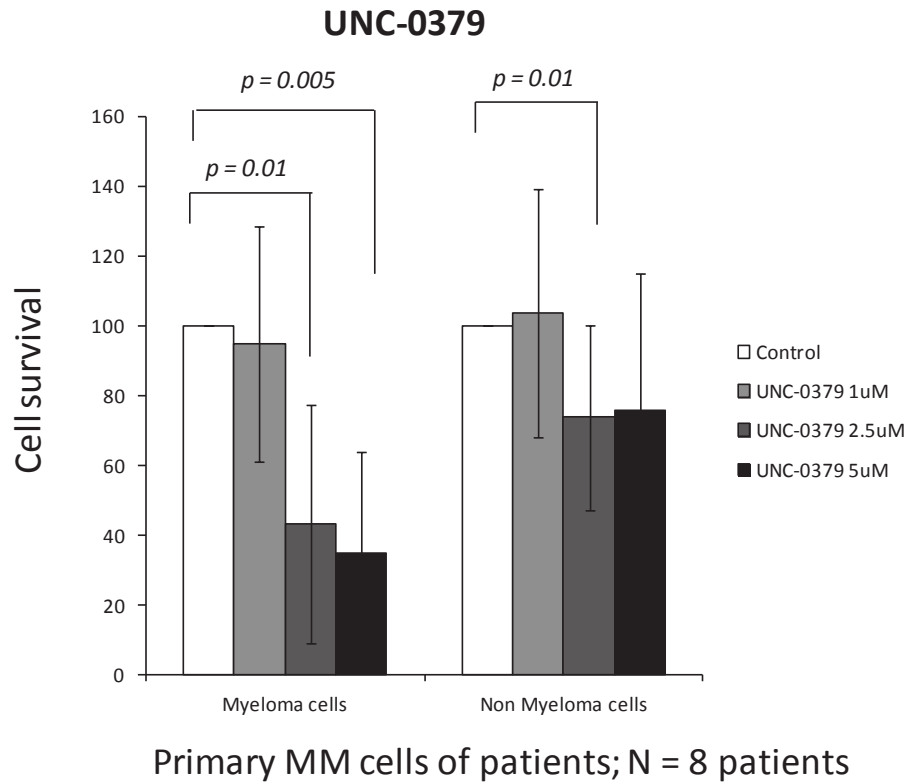


Figure 10

Figure 10: UNC0379 induces mortality of primary MM cells from patients.

Mononuclear cells from 8 patients with MM were treated with different doses of UNC0379. At day 4 of culture, the viability and total cell counts were assessed and the percentage of CD138 viable plasma cells was determined by flow cytometry. Results are median values of the numbers of myeloma cells in the culture wells. The values were compared with a Wilcoxon test for pairs.

1.2. ARTICLE 5: THE HISTONE H4-K20 METHYLTRANSFERASE SETD8 IS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET IN MULTIPLE MYELOMA

Laurie Herviou, Fanny izard, Elke de Bruyne, Anqi Ma, Jian Jin, Karin Vanderkerken, Charlotte Grimaud, Eric Julien* & Jérôme Moreaux*

*Equal contribution

Manuscrit en préparation, 2017

Structures of Nahuoic Acids B–E Produced in Culture by a *Streptomyces* sp. Isolated from a Marine Sediment and Evidence for the Inhibition of the Histone Methyl Transferase SETD8 in Human Cancer Cells by Nahuoic Acid A

David E. Williams,[†] Fanny Izard,[‡] Stéphanie Arnould,[‡] Doralyn S. Dalisay,[†] Cholpisut Tantapakul,[†] Wisanu Maneerat,[†] Teatulohi Matainaho,[§] Eric Julien,[‡] and Raymond J. Andersen^{*,†}

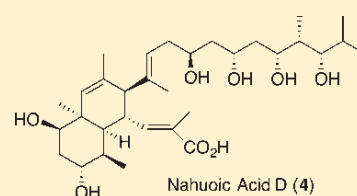
[†]Departments of Chemistry and Earth, Ocean and Atmospheric Sciences, University of British Columbia, 2036 Main Mall, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z1

[‡]Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM), Montpellier F-34298, France

[§]University of Papua New Guinea, Port Moresby 121, Papua New Guinea

Supporting Information

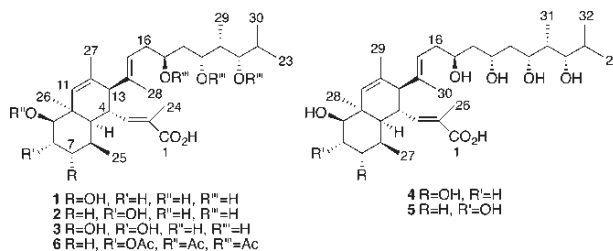
ABSTRACT: Nahuoic acids A–E (1–5) have been isolated from laboratory cultures of a *Streptomyces* sp. obtained from a tropical marine sediment. The structures of the new polyketides 2–5 were elucidated by analysis of spectroscopic data of the natural products and the chemical derivatives 6 and 7. Nahuoic acids 1–5 are in vitro inhibitors of the histone methyltransferase SETD8, and nahuoic acid A (1) and its pentaacetate derivative 8 inhibit the proliferation of several cancer cells lines in vitro with modest potency. At the IC₅₀ for cancer cell proliferation, nahuoic acid A (1) showed selective inhibition of SETD8 in U2OS osteosarcoma cells that reflect its selectivity against a panel of pure histone methyl transferases. A cell cycle analysis revealed that the cellular toxicity of nahuoic acid A (1) is likely linked to its ability to inhibit SETD8 activity.



INTRODUCTION

Histone methyl transferases catalyze the transfer of one to three methyl groups from the cofactor *S*-adenosylmethionine to the side-chain amino groups of lysine residues in the histone proteins that make up the core of nucleosomes, the basic building blocks of chromatin.¹ These methylation events play a key role in the epigenetic regulation of gene expression. SETD8 is a lysine methyltransferase that monomethylates the side-chain amino group of lysine 20 of histone H4 (H4K20),^{2,3} and it also monomethylates lysine 248 of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁴ and lysine 382 of p53/TP53.⁵ SETD8 is overexpressed in various cancers, and it has been suggested that aberrant over-methylation by SETD8 might be involved in carcinogenesis.^{6,7} Recently, we reported the isolation of the polyketide nahuoic acid A (1) from cultures of a *Streptomyces* sp. obtained from a marine sediment collected in Papua New Guinea.⁸ Nahuoic acid A (1) was found to be a selective and SAM competitive inhibitor of SETD8. Further investigations of the nahuoic acid A producing *Streptomyces* sp. cultures have resulted in the isolation of the new analogues nahuoic acids B (2), C (3), D (4), and E (5). Herein, we describe the structure elucidation of nahuoic acids B–E (2–5), their ability to inhibit SETD8 in vitro, evidence showing the ability of nahuoic acid A (1) and its pentaacetate 8 to inhibit the proliferation of human cancer cell lines in vitro with modest potency, and the selective inhibition

of SETD8 by nahuoic acid A (1) in human U2OS osteosarcoma cancer cells.



RESULTS AND DISCUSSION

Large-scale cultures of the nahuoic acid A (1) producing *Streptomyces* sp. were grown as lawns on solid agar containing marine medium as previously described.⁸ EtOAc extracts of the combined cells and solid agar media were fractionated using sequential application of Sephadex LH20 chromatography, step-gradient Si Gel flash chromatography, and reversed-phase HPLC to give nahuoic acids A (1), B (2), C (3), D (4), and E (5).

The first sample of nahuoic acid B (2) obtained from the reversed-phase HPLC fractionation step was collected as a single

Received: November 8, 2015

Published: January 27, 2016

Table 1. ¹H NMR Data for Nahuoic Acids A (1), B (2), and C (3) Recorded in DMSO-*d*₆ and Nahuoic Acid B Pentaacetate (6) Recorded in C₆D₆ at 600 MHz

position	δ , multiplicity (J Hz)			
	nahuoic acid A (1)	nahuoic acid B (2)	nahuoic acid C (3)	nahuoic acid B pentaacetate (6)
1				
2				
3	6.41, d (10.2)	6.37, bd (10.9)	6.41, bd (10.3)	6.70, d (10.9)
4	3.54 ^a	3.40 ^a	3.40 ^a	3.21, ddd (10.9, 10.9, 10.9)
5	1.52, dd (11.6, 2.9)	1.34, dd (10.9, 2.0)	1.47 ^a	1.36 ^a
6	1.92 ^a	2.41 m	2.34 m	2.34 m
7 _{ax}	3.51, td (11.0, 3.7)	1.16, bd (13.4) 1.61 ^a	3.52, dd (11.7, 2.1)	1.64 ^c
7 _{eq}				1.53 ^a
				1.64 ^a
				5.18 ^a
8 _{ax}	1.62 ^a	3.78, m	3.74, bs	
8 _{eq}	1.87, bd (13.6)			
9	3.47, m	3.21, bs	3.40, bs	5.04, bs
10				
11	5.15, bs	5.14, bs	5.13, bs	5.17 ^a
12				
13	2.23, bd (8.9)	2.22, bd (9.1)	2.22, bd (9.4)	2.25 ^a
14				
15	4.97, m	4.98, m	4.98, m	5.21, bt (7.3)
16a	1.91 ^a	1.91, m	1.91, m	2.25 ^a
16b	2.03, m	2.04, m	2.03, m	2.41, m
17	3.57, m	3.58, m	3.57, m	5.25, m
18a	1.17, bt (10.6)	1.18 ^a	1.17 ^a	1.78 ^a
18b	1.42 ^a	1.43 ^a	1.42 ^a	2.12, m
19	3.77, dm (9.8)	3.77 ^a	3.77, dm (9.5)	5.29, m
20	1.39 ^a	1.39, m	1.39 ^a	2.21, m
21	3.12, dd (7.2, 4.0)	3.12, dd (7.0, 4.0)	3.12, dd (7.1, 4.0)	5.11, bt (5.0)
22	1.63 ^a	1.63, m	1.63, m	2.08, m
23	0.76, d (6.5)	0.77, d (6.7)	0.76, d (6.6)	0.96, d (7.0)
24	1.58, s	1.57, bs	1.58, bs	1.93, s
25	0.85, d (7.2)	0.80, d (7.3)	0.85, d (7.4)	0.95, d (7.4)
26	1.01, s	1.14, s	1.14, s	1.16, s
27	1.46, bs	1.46, bs	1.45, bs	1.49, bs
28	1.40, bs	1.41, bs	1.39, bs	1.36, bs
29	0.76, d (6.7)	0.76, d (6.8)	0.76, d (6.7)	1.04, d (6.9)
30	0.83, d (6.7)	0.83, d (6.6)	0.83, d (6.8)	0.88, d (6.6)
1-COOH	11.81, br	11.81, br	NO	NO
7-OH	4.28–4.35 br		NO	
8-OR		NO	NO	1.60, s
9-OR	4.28–4.35 br	4.30 bs	NO	1.64, bs
17-OR	4.28–4.35 br	NO	NO	1.85, s
19-OR	4.28–4.35 br	NO	NO	1.85, s
21-OR	4.28–4.35 br	NO	NO	1.77, s

^aMultiplicity not determined due to overlapping signals; chemical shifts determined from 2D data. NO: not observed.

sharp peak but was found by NMR analysis to contain a coeluting chemically unrelated metabolite that has not been identified. A positive-ion HRESIMS of this impure sample gave a strong [M + Na]⁺ ion at *m/z* 545.3455 that was appropriate for a molecular formula of C₃₀H₅₀O₇, the same as nahuoic acid A (1). The impure sample of B (2) was reacted with acetic anhydride in pyridine, and the reaction mixture was purified by reversed-phase HPLC to give the pentaacetate 6 that gave an [M – H][–] ion in the (–)-HRESIMS at *m/z* 731.4016 appropriate for a molecular formula of C₄₀H₆₀O₁₂. Conversion of nahuoic acid B (2) to the corresponding pentaacetate 6 would account for the addition of 10 carbon, 10 hydrogen, and 5 oxygen atoms compared with the molecular formula C₃₀H₅₀O₇ determined by HRMS for the impure sample. Five new methyl singlets at δ 1.60, 1.64, 1.77,

1.85, and 1.85, in addition to the observed downfield shifts of five carbinol methine resonances at δ 5.04, 5.11, 5.18, 5.25, and 5.29 in the ¹H NMR spectrum of 6, confirmed the formation of a pentaacetate (Table 1).

Detailed analysis of the 1D and 2D NMR data obtained for 6 (Figure 1 and Tables 1 and 2; Supporting Information) supported the pentaacetylation and showed that 1 and 2 were identical in all respects except for the positions of hydroxylation at C-7 and C-8 in the decalin ring system. A correlation in the HMBC spectrum of 6 between the resonance assigned to H-8 at δ 5.18 and an acetate carbonyl at δ 168.6 established that in 6 an acetate, and by analogy a hydroxy in 2, was located at C-8 in 2 instead of C-7 as in 1. A series of tROESY correlations and the scalar coupling data obtained for 6 established that the C-5 to

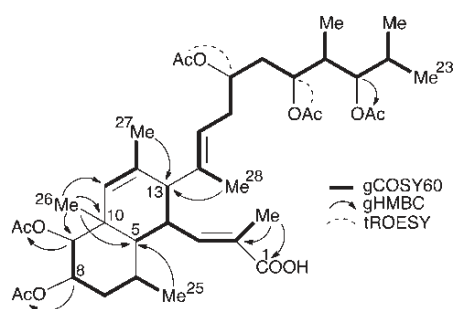


Figure 1. Selected gCOSY60, gHMBC, and tROESY correlations observed for pentaacetate **6**.

C-10 cyclohexane ring was in a chair conformation and that the relative configurations about the decalin ring system at the common stereogenic centers C-4, C-5, C-6, C-9, C-10, and C-13 were the same as those in nahuic acid A (**1**).⁸ tROESY correlations between Me-26 (δ 1.16) and the C-8 acetate methyl (δ 1.60), and between H-8 (δ 5.18) and each of H-7_{ax} (δ 1.64), H-7_{eq} (δ 1.53) and H-9 (δ 5.04) established that the C-8 acetate was axial. The relative configurations at the side-chain carbons C-17, C-19, C-20, and C-21 were assumed to be the same as the corresponding centers in nahuic acid A (**1**), leading to the assignment of the absolute configuration of **6** as 4*R*,5*S*,6*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,17*S*,19*R*,20*S*,21*S*. A pure sample of nahuic acid B (**2**) was obtained from a subsequent *Streptomyces* sp. culture, and analysis of the 1D and 2D NMR data (Tables 1 and 2; Supporting Information) obtained for this sample was in full agreement with the structure assigned to **2** using the NMR data of the pentaacetate **6**.

Nahuic acid C (**3**) was obtained as an optically active oil that gave a $[M + Na]^+$ ion in the HRESIMS at m/z 561.3398 appropriate for a molecular formula of $C_{30}H_{50}O_8$ that differs from the formulas of **1** and **2** by the addition of an oxygen but still requires the six sites of unsaturation present in nahuic acids A (**1**) and B (**2**). The NMR spectra obtained for **3** (Tables 1 and 2)

were very similar to the spectra of **1** and **2** except that there was an additional carbinol methine and the corresponding disappearance of an aliphatic methylene observed in the NMR spectra of **3** compared with the NMR spectra of **1** and **2**. An additional secondary alcohol at one of the three methylenes in the structures **1** or **2** would account for the observed differences in their NMR spectra. Correlations observed in the gradCOSY60 spectrum of **3** between a resonance at δ 3.74 and the resonances assigned to H-7 and H-9 at δ 3.52 (dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz) and δ 3.40 (bs), respectively, established that the sixth hydroxyl substituent in **3** was at C-8 ($^{13}C/^1H$: δ 74.7/3.74). A series of tROESY correlations and the J coupling data obtained for **3** established that the cyclohexane ring encompassing C-5 to C-10 was in a chair conformation with H-7 axial and the relative configurations about the decalin ring system at the common stereogenic centers C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10 and C-13 were the same in nahuic acid C (**3**) as in nahuic acid A (**1**).⁸ A small scalar coupling of 2.1 Hz between H-7 (δ 3.52) and H-8 (δ 3.74), and tROESY correlations observed between H-8 and both the axially orientated H-7 and the equatorial H-9 (δ 3.40), established that H-8 was also equatorial with the hydroxyl at C-8 in an axial orientation. The configurations at the side chain carbons C-17, C-19, C-20, and C-21 were assumed to be the same as those seen in nahuic acid A (**1**), leading to assignment of the absolute configuration of **3** as 4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,17*S*,19*R*,20*S*,21*S*.

Nahuic acid D (**4**) was obtained as an optically active oil that gave a $[M + Na]^+$ ion in the HRESIMS at m/z 589.3712 appropriate for a molecular formula of $C_{32}H_{54}O_8$ that differs from the formula of **1** by the addition of C_2H_4O but still requires six sites of unsaturation. The 1H and ^{13}C NMR spectra (Table 3; Supporting Information) obtained for **4** revealed the presence of an additional alkyl methylene ($^1H/^{13}C$: δ 1.28/44.0) and an additional secondary alcohol ($^1H/^{13}C$: δ 3.75/65.9), which accounted for the difference in the masses of **1** and **4**. Other than these two differences, the NMR spectra obtained for **4** were remarkably similar to the spectra obtained for **1** (Tables 1–3). Detailed analysis of the 2D NMR data obtained for **4** established

Table 2. ^{13}C NMR Data for Nahuic Acids A (**1**), B (**2**), and C (**3**) Recorded in $DMSO-d_6$ and Nahuic acid B Pentaacetate (**6**) Recorded in C_6D_6 at 150 MHz

position	δ				position	δ			
	1	2	3	6		1	2	3	6
1	169.2	169.2	169.2	169.3	19	70.0	70.0	70.0	72.4
2	124.3	124.5	124.4	125.1	20	39.7	39.7	39.7	38.2
3	149.1	149.0	149.0	149.7	21	78.6	78.6	78.6	78.7
4	36.0	35.4	36.2	36.3	22	30.3	30.3	30.3	30.4
5	50.0	48.8	50.6	49.1	23	19.5	19.5	19.5	19.5
6	38.3	24.6	30.6	25.9	24	12.9	13.0	13.0	13.4
7	66.2	32.1	68.4	30.2	25	18.1	22.0	17.9	21.9
8	40.2	71.0	74.7	71.5	26	27.6	27.6	27.7	27.6
9	72.7	73.6	75.7	73.4	27	21.6	21.7	21.7	21.6
10	41.1	40.7	40.5	40.8	28	12.3	12.2	12.1	12.9
11	132.5	133.6	133.1	131.6	29	7.1	7.2	7.2	11.8
12	132.7	131.6	131.6	133.4	30	18.4	18.5	18.5	17.3
13	56.8	56.2	56.5	57.3	8-OR				168.6, 20.7
14	135.1	134.9	134.9	137.1	9-OR				168.4, 21.0
15	125.3	125.3	125.4	123.7	17-OR				169.9 ^a , 20.9 ^b
16	36.7	37.0	37.0	33.0	19-OR				170.5 ^a , 20.8 ^b
17	67.0	67.1	67.1	69.2	21-OR				171.2, 20.5
18	41.7	41.7	41.7	33.8					

^{a,b} Assignments within a column maybe interchanged.

Table 3. NMR Data for Nahuoic Acids D (4) and E (5) Recorded in DMSO-*d*₆ at 600 MHz

position	nahuoic acid D (4)		nahuoic acid E (5)	
	δ_C	δ_H , multiplicity (J Hz)	δ_C	δ_H , multiplicity (J Hz)
1	169.2		169.2	
2	124.3		124.5	
3	149.1	6.41, d (11.1)	149.1	6.37 bd (11.2)
4	36.1	3.54 ^a	35.5	3.40 ^a
5	50.1	1.52, dd (11.5, 2.6)	48.9	1.34, bd (12.0)
6	38.3	1.91 ^a	24.6	2.41, m
7 _{ax}	66.2	3.51, td (11.0, 4.1)	32.1	1.61 ^a
7 _{eq}				1.16, bd (13.7)
8 _{ax}	39.9	1.62 ^a	71.0	4.64, bs
8 _{eq}		1.87, bd (9.9)		
9	72.7	3.47, bs	73.7	3.21, bs
10	41.1		40.7	
11	132.4	5.15, bs	133.6	5.14, bs
12	132.4		131.6	
13	56.8	2.22, bd (9.0)	56.2	2.23, bd (9.5)
14	135.0		135.1	
15	125.2	4.98, m	125.2	4.98, m
16a	36.8	1.92 ^a	36.9	1.92 m
16b		2.02, m		2.03, m
17	66.8	3.61, m	66.9	3.61, m
18	44.0	1.28, m	44.0	1.29, td (8.7, 2.1)
		1.28, m		1.29, td (8.7, 2.1)
19	65.9	3.75, m	66.0	3.76 ^a
20a	42.3	1.42, bt (6.4)	42.4	1.42, bt (6.6)
20b		1.42, bt (6.4)		1.42 bt (6.6)
21	72.0	3.72, m	72.0	3.72, m
22	38.6	1.49 ^a	38.7	1.49, m
23	78.1	3.14, dd (7.1, 4.1)	78.2	3.14, m
24	30.3	1.64, m	30.4	1.64, m
25	19.5	0.77, d (6.9)	19.6	0.78, d (6.8)
26	12.9	1.58, s	13.0	1.58, bs
27	18.1	0.85, d (5.7)	22.0	0.80, d (7.3)
28	27.6	1.01, s	27.6	1.14, s
29	21.6	1.46, bs	21.7	1.46, bs
30	12.2	1.39, bs	12.2	1.40, bs
31	7.1	0.77, d (6.9)	7.1	0.78, d (6.8)
32	18.3	0.84, d (6.3)	18.4	0.84, d (6.5)
1-COOH		NO		NO
7-OH		4.28–4.39		
8-OH				4.64 bs
9-OH		4.28–4.39		4.29 bs
17-OH		4.28–4.39		4.29 bs
19-OH		4.28–4.39		4.39 bs
21-OH		4.28–4.39		4.51 bs
23-OH		4.28–4.39		4.32bs

^aMultiplicity not determined due to overlapping signals; chemical shifts determined from 2D data. NO: not observed.

that the structural differences in **1** and **4** were in the acyclic side chain attached at C-13 of the decalin ring system (Figure 2). In the gCOSY60 NMR spectrum the methylene multiplet at δ 1.28 (H-18) correlated to both the methine resonance of the additional secondary alcohol at δ 3.75 (H-19) and to the resonance at δ 3.61 assigned to the carbinol methine of C-17. H-19 in turn showed vicinal coupling to the methylene resonance at δ 1.42 that was assigned to H₂-20 (Table 3). The ¹H and ¹³C NMR chemical shifts and the ¹H scalar coupling patterns assigned to the fragment from H₂-20 to Me-25, including the resonances for Me-31 and Me-32, in **4** were very similar to those observed for the corresponding fragment extending from H₂-18

to Me-23 including Me-29 and Me-30 in **1** (Tables 1–3), indicating that these fragments were closely related in **1** and **4**. The observed scalar coupling constants and tROESY data demonstrated that the relative configurations about the decalin ring system and the configurations of the $\Delta^{2,3}$ and $\Delta^{14,15}$ olefins in **4** were the same as in **1**.⁸

Nahuoic acid D (**4**) was treated with 2,2-dimethoxypropane and PPTS, and the crude reaction mixture was treated with *p*-bromophenacyl bromide and Et₃N in DMF as shown in Scheme 1 to give ester **7** as a major product in an attempt to make a crystalline derivative for X-ray diffraction analysis. Unfortunately, ester **7** failed to crystallize. The Me-42, Me-43, Me-45,

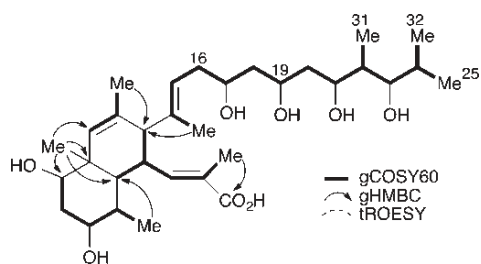


Figure 2. Selected gCOSY60 and gHMBC correlations observed for nahuoic acid D (4).

and Me-46 methyl carbons of the C-17/C-19 and the C-21/C-23 acetonides in **7** were assigned the ^{13}C NMR chemical shifts δ 25.2, 25.1, 19.8, and 30.5 (C_6D_6) (Supporting Information), respectively, which according to Rychnovsky's rules demonstrated that the C-17 and C-19 alcohols in **4** were *anti* while those at C-21 and C-23 were *syn*.⁹ tROESY data obtained for ester **7** confirmed that the C-21/C-23 dioxane ring was in a chair conformation as predicted from the ^{13}C NMR data according to Rychnovsky's rules (Figure 3).⁹ The scalar coupling observed in the H-23 resonance (dd, $J = 9.6, 1.3$ Hz) of **7** was identical to the scalar coupling in the corresponding H-21 resonance (dd, $J = 9.6, 1.7$ Hz) of the C-19/C-21 acetonide of nahuoic acid A (**1**),⁸ which has an axial methyl at C-20 and the 19*R*,20*S*,21*S* configuration. Me-31 has a carbon chemical shift of δ 5.4 in **7**, confirming that it is axial. Therefore, the relative configurations at C-21, C-22, and C-23 in **7** were assigned as 21*R**,22*S**,23*S** (Figure 3).

Comparison of the ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts for the C-13–C-17 fragments of nahuoic acids A (**1**) and D (**4**) showed that they were virtually identical, indicating that the configurations at C-13 and C-17 were 13*R*,17*S* in both **1**⁸ and **4** (Tables 1–3 and Figure 4). As outlined above, Rychnovsky's rules showed that the C-17 and C-19 hydroxy substituents in **4** were *anti*, leading to the assignment of the C-19 configuration as *R*. The Rychnovsky acetonide analysis of ester **7** described above also established the relative configurations at C-21 to C-23 as 21*R**,22*S**,23*S** in **4**, which is identical to their relative configurations in **1**.⁸ Comparison of the ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts for the C-17 to C-23 fragment in nahuoic acid A (**1**) with the chemical shifts for the corresponding C-19–C-25 fragment in **4** (Figure 4) shows that they are significantly different at C-21 (4)/C-19 (**1**) and C-22 (4)/C-20 (**1**) consistent with opposite relative configurations between C-17 and C-19 in **1** (*anti*) and

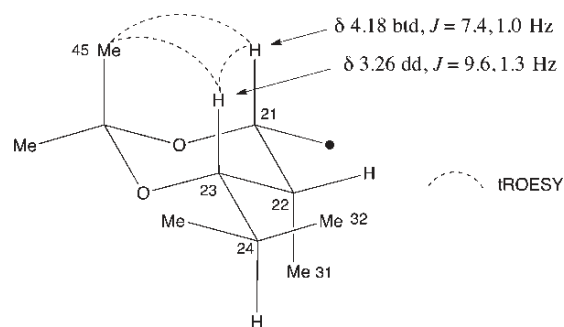


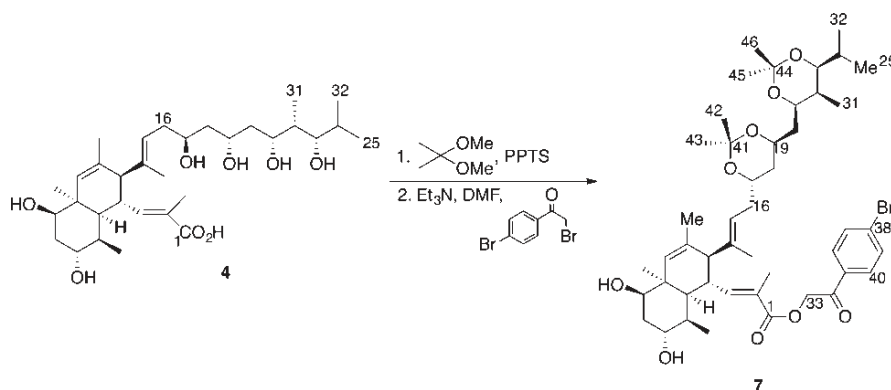
Figure 3. Selected scalar coupling and tROESY correlations in the C-25 to C-21 fragment of the bisacetonide ester **7**.

C-19 and C-21 in **4** (*syn*). Nahuoic acids A (**1**) and D (**4**) are both polyketides whose putative biogenesis starts with an isobutyrate unit followed by condensation of a propionate residue to generate identical terminal side-chain fragments in **1** (C-19 to C-23 and C-29/C-30) and in **4** (C-21 to C-25 and C-31/C-32). The pathways diverge at this point, with one extra acetate unit providing the source of the C-19 and C-20 carbons in **4**. From there, the remainder of the pathways to **1** and **4** leading to the linear side chain C-14 to C-18 fragments (including C-28 in **1** and C-30 in **4**), the decalin ring systems, and the C-4 side chain substituents are identical. The above biogenetic arguments require that the side chain stereogenic centers at C-21, C-22, and C-23 in **4** have the same relative configurations compared with the decalin fragment as was previously determined for the C-19, C-20, and C-21 side-chain stereogenic centers and the decalin fragment in nahuoic acid A (**1**) using Mosher ester analysis at C-7 and C-17 in the C-19/C-21 monoacetonide derivative of **1**.⁸ This led to the complete absolute configuration assignment of 4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,10*R*,13*R*,17*S*,19*R*,21*R*,22*S*,23*S* for nahuoic acid D (**4**) (Figure 4).

Nahuoic acid E (**5**) was obtained as an optically active oil that gave a $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion in the HRESIMS at m/z 589.3710 appropriate for a molecular formula of $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_8$, the same as nahuoic acid D (**4**). The NMR spectra obtained for **5** were remarkably similar to the spectra obtained for **4**, except that in **5** there was now hydroxylation at C-8 rather than C-7. In all other respects, **5** was the same as **4** with the C-8 hydroxy axial as in **2** (Table 3; Supporting Information) and the absolute configuration 4*R*,5*S*,6*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,17*R*,19*S*,21*R*,22*S*,23*S*.

Table 4 shows the IC_{50} values for in vitro inhibition of the histone methyltransferase SETD8 by nahuoic acids A–E (**1**–**5**).

Scheme 1. Derivatization of Nahuoic Acid D (**4**)



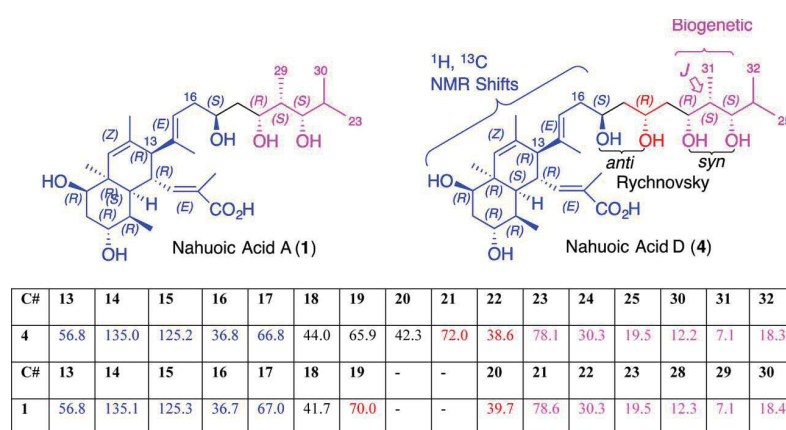


Figure 4. Assignment of the absolute configuration of nahuoic acid D (**4**) using (i) a comparison of ^1H , ^{13}C NMR chemical shifts and NOE data between nahuoic acids A (**1**) and D (**4**) (blue fragment), (ii) Rychnovsky's acetonide analysis, and (iii) biogenetic arguments (magenta fragment).

Table 4. In Vitro Inhibition of SETD8 by Nahuoic Acids A–E (1–5)

compd	IC ₅₀ (μM)	hill slope
nahuoic acid A (1)	8	1.4
nahuoic Acid B (2)	27	1.7
nahuoic Acid C (3)	41	1.5
nahuoic Acid D (4)	76	1.7
nahuoic Acid E (5)	13	1.7

There is roughly 1 order of magnitude difference in IC₅₀ values between the most active inhibitor nahuoic acid A (**1**) and the weakest inhibitor nahuoic acid D (**4**).

Given the ability of nahuoic acid A (**1**) to inhibit SETD8 in vitro, we sought to determine whether this natural product has cytotoxic activity in human cancer cells. To address this question, growth inhibition assays were performed by exposing osteosarcoma U2OS cells to increasing concentrations of nahuoic acid A (**1**), as loss of SETD8 activity in U2OS cells is known to trigger cell proliferation defects.^{10,11} The effects of the prodrug versions nahuoic acid A pentaacetate (**8**) and methylnahuoic acid A pentaacetate (**9**), prepared in an attempt to improve cell permeability of the natural product, were also evaluated. As shown in Figure 5 (upper panel), exposure to the nahuoic acid A (**1**) or the nahuoic acid A pentaacetate (**8**) results in a significant decrease in U2OS cell proliferation with an apparent IC₅₀ value of $65 \pm 2 \mu\text{M}$ for nahuoic acid A (**1**) and $39 \pm 4 \mu\text{M}$ for nahuoic acid A pentaacetate (**8**). In contrast, treatment with the methylnahuoic acid A pentaacetate (**9**) has a weak effect on cell proliferation, indicating that this prodrug version was largely inactive. Interestingly, the cytotoxic effect of the nahuoic acid A compounds was not specific to U2OS cells as it was also observed in SUM159 (IC₅₀ = $45 \mu\text{M}$) and MDA-MB-436 (IC₅₀ = $85 \mu\text{M}$) breast cancer cell lines for the nahuoic acid A pentaacetate (**8**) (Figure 5, lower panel).

We next determined whether the cytotoxicity of nahuoic acid A (**1**) is related to its ability to inhibit SETD8 activity. To this end, we measured the levels of histone H4-K20 methylation by immunoblotting with specific antibodies. SETD8 is the unique enzyme responsible for the monomethylation of histone H4-K20 (H4K20me1), which exists on its own in active chromatin and also serves as a substrate for the lysine methyltransferases SUV4-20H to induce H4-K20 trimethylation (H4K20me3) in heterochromatin regions.¹² Depletion of SETD8 upon

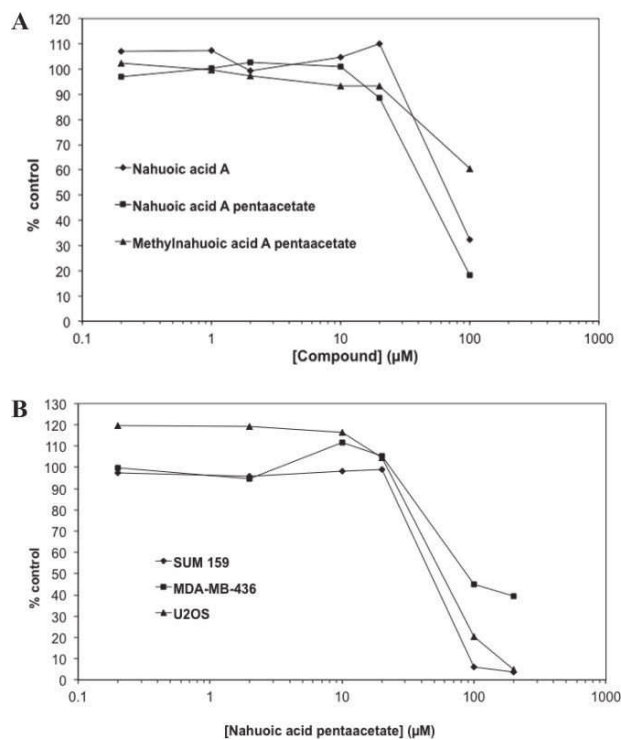


Figure 5. (A) Representative cytotoxicity curves in U2OS osteosarcoma cell line upon exposure to increasing concentrations of nahuoic acid A (**1**) and its derivatives nahuoic acid A pentaacetate (**8**) and methylnahuoic acid A pentaacetate (**9**). (B) Cytotoxicity curves in U2OS osteosarcoma cell line (**▲**), SUM159 (**◆**), and MDA-MB-436 (**■**) breast cancer cell lines upon exposure to increasing concentrations of nahuoic acid A pentaacetate. Cytotoxicity was evaluated using the sulforhodamine B technique.

siRNA treatment leads to a decrease in both H4K20me1 and H4K20me3 levels.^{10,11} Similarly, treatment of U2OS cells with $65 \mu\text{M}$ of nahuoic acid A (**1**) led to a significant decrease in the levels of both H4K20me1 and H4K20me3 within 48 h, whereas no significant change was observed for other methylated histone marks such as H3K4me3 and H3K27me3 at this time (Figure 6). These results indicate that this natural product can penetrate into human cancer cells and can induce a partial but specific inhibition of SETD8 activity.

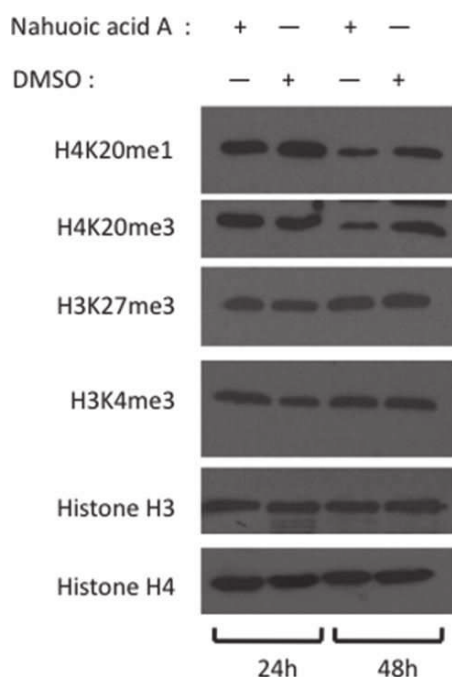


Figure 6. Immunoblot analysis of the levels of histones H3 and H4 and the levels of H4K20me1, H4k20me3, H3K27me3, and H3K4me3 chromatin marks, 24 and 48 h after exposure to 65 μM (IC_{50}) of nahuic acid A or DMSO.

To determine whether the SETD8 inhibition induced by the nahuic acid A (**1**) is sufficient to perturb the cellular functions of this enzyme and perhaps explain the cellular toxicity of this product, the cell-cycle profiles of U2OS cells were analyzed for BrdU incorporation and DNA content by flow cytometry 3 days after DMSO or nahuic acid A (**1**) treatment. Previous studies have shown that a decrease in levels of H4K20me upon RNAi-mediated SETD8 depletion is characterized by defects in DNA replication (S phase) initiation and progression.^{10,11} Consistent with these previous results and compared to control DMSO-treated cells, we observed that U2OS treated with nahuic acid A (**1**) displayed an abnormal accumulation at the entry of S phase, which is observed by the increase in percentage of BrdU-positive cells with a 2N DNA content (Figure 7). This S-phase phenotype is characteristic of defects in DNA replication process observed in SETD8 depleted U2OS cells,^{10,11} thereby suggesting that the cellular toxicity of nahuic acid A is likely linked to its ability to inhibit SETD8 activity.

CONCLUSIONS

Nahuic acids B–E (**2–5**) represent new members of the nahuic acid family of polyketides. They differ from nahuic acid A (**1**) in the hydroxylation patterns on the decalin ring system and in the length and functionality of the C-13 side chain. Nahuic acid A (**1**) has previously been shown to be a selective SAM competitive inhibitor of the histone methyl transferase SETD8, and the data presented above show that nahuic acids B–E (**2–5**) also inhibit SETD8 with an order of magnitude range of potencies. Given the emerging role of SETD8 in cancer biology, the further characterization of the potential of nahuic acid A (**1**) and its derivatives to act as a cell biology tools and therapeutic leads becomes of great interest. As part of our continuing exploration of the biological activity of nahuic acid

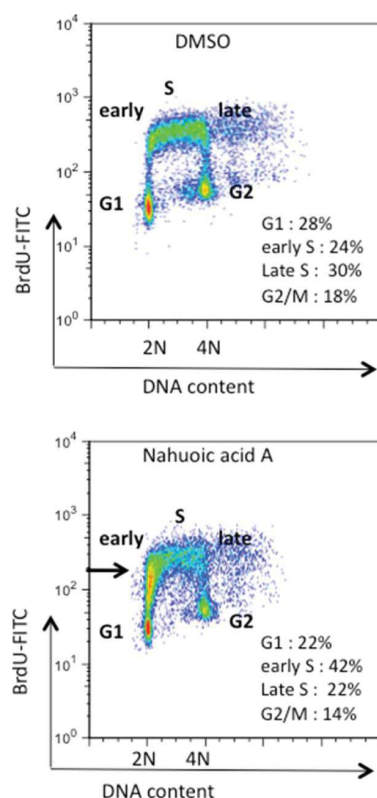


Figure 7. Cell-cycle profile of U2OS cells with DNA content (*x* axis) and BrdU incorporation levels (*y* axis) revealed by BrdU-FITC antibody, 3 days after treatment with DMSO or nahuic acid A (65 μM). G1 cells appeared as cells with 2N DNA content and negative for BrdU, while G2/M cells appeared as cells with 4N DNA content and negative BrdU. Replicating (S phase) cells appear as BrdU positive cells in early S (2N DNA content) and late S (4N DNA content) stages. The black arrow points to the accumulation of U2OS cells at the S phase entry upon nahuic acid A treatment. The percentage of cells in different cell-cycle phases is indicated for each panel.

A (**1**), it has been shown that **1** and its pentaacetate analogue **8** inhibit proliferation of several cancer cell lines in vitro with modest potencies. Furthermore, at the IC_{50} for inhibition of cancer cell proliferation, nahuic acid A (**1**) showed selective inhibition of SETD8 in U2OS osteosarcoma cells that reflected its selectivity against a panel of pure histone methyl transferases. A cell-cycle analysis revealed that the cellular toxicity of nahuic acid A (**1**) is likely linked to its ability to inhibit SETD8 activity. There are no other known SAM competitive selective SETD8 inhibitors.^{13–16} Therefore, despite their relative lack of potency, nahuic acid A (**1**) and the new analogues B–E (**2–5**) represent interesting lead compounds for the development of more potent SETD8 inhibitory cell biology tools and experimental therapeutic agents.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Methods. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a 600 MHz spectrometer with a 5 mm cryoprobe. ¹H chemical shifts are referenced to the residual C₆D₆, DMSO-*d*₆, or C₃D₅N (δ 7.15, 2.49, and 7.22 ppm, respectively), and ¹³C chemical shifts are referenced to the C₆D₆, DMSO-*d*₆, or C₃D₅N solvent peak (δ 128.0, 39.5, and 123.87 ppm, respectively). Low- and high-resolution MS were recorded using ESI ionization and a TOF mass analyzer. Merck type 5554 silica gel plates and Whatman MKC18F plates were used for

analytical thin-layer chromatography. All solvents used for HPLC were HPLC grade.

Extraction of *Streptomyces* sp. and Isolation of Nahuoic Acids A–E (1–5). As described previously,⁸ the strain RJA2928 was cultured on 60 pans of solid agar, equivalent to 24 L volume of the marine medium 1 (10.0 g of soluble starch, 4.0 g of yeast extract, 2.0 g of peptone, 0.001 g of FeSO₄·7H₂O, 0.001 g of KBr, 18.0 g of agar, 1 L pf seawater) at rt for 14 days. The mature cultures were sliced into small squares containing the streptomyces biomass and the media and extracted twice with EtOAc. The combined EtOAc extracts were concentrated in vacuo and partitioned between H₂O (900 mL) and EtOAc (3 × 300 mL). The EtOAc-soluble material was chromatographed on Sephadex LH20 with 4:1 methanol/CH₂Cl₂ as eluent. An early eluting fraction, responsible for the MRSA inhibitory activity, was found to contain a mixture of elaiophyllin and nigericin acetyl methyl ester and related analogues. A later eluting fraction was subjected to Si gel flash chromatography (step gradient: 19:1 hexanes/EtOAc to EtOAc to 1:9 MeOH/EtOAc, 2 g of Sep pak). The 1:1 hexanes/EtOAc fraction contained derivative 7. A pure sample of 7 (<0.1 mg) was obtained from this fraction via C₁₈ reversed-phase HPLC using a CSC-Inertsil 150A/ODS 2.5 μm 25 × 0.94 cm column with 85:15 MeCN/H₂O as eluent.

Nahuoic Acid B (2). Isolated as a pale yellow oil: $[\alpha]_D^{25}$ likely positive but unable to confidently assign a value at the concentration used (c 0.8, MeOH); UV [3:1 (0.05%TFA/H₂O)/MeCN] λ_{\max} 227 nm; ¹H NMR, see Table 1; ¹³C NMR, see Table 2; positive-ion HRESIMS [M + Na]⁺ m/z 545.3455 (calcd for C₃₀H₅₀O₇Na, 545.3454).

Nahuoic Acid C (3). Isolated as a pale yellow oil: $[\alpha]_D^{25}$ -6.6 (c 1.4, MeOH); UV [77:33 (0.05%TFA/H₂O)/MeCN] λ_{\max} 227 nm; ¹H NMR, see Table 1; ¹³C NMR, see Table 2; positive-ion HRESIMS [M + Na]⁺ m/z 561.3398 (calcd for C₃₀H₅₀O₈Na, 561.3403).

Nahuoic Acid D (4). Isolated as a pale yellow oil: $[\alpha]_D^{25}$ -5.9 (c 1.0, MeOH); UV [7:3 (0.05%TFA/H₂O)/MeCN] λ_{\max} 227 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 3; positive-ion HRESIMS [M + Na]⁺ m/z 589.3712 (calcd for C₃₂H₅₄O₈Na, 589.3716).

Nahuoic Acid E (5). Isolated as a pale yellow oil: $[\alpha]_D^{25}$ +53.5 (c 0.3, MeOH); UV [3:1 (0.05%TFA/H₂O)/MeCN] λ_{\max} 227 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 3; positive-ion HRESIMS [M + Na]⁺ m/z 589.3710 (calcd for C₃₂H₅₄O₈Na, 589.3716).

Preparation of the Pentaacetate of Nahuoic Acid B (6). On our first attempt to isolate the nahuoic acids, nahuoic acid B (2) (<0.8 mg, <1.5 μmol) was collected as a single sharp peak; however, in our hands, the sample was contaminated with coeluting material. In order to aid the purification, nahuoic acid B (2) was treated with acetic anhydride in pyridine (1:1, 1 mL) along with a catalytic amount of DMAP and stirred at rt for 17 h. After drying, the resulting gum was purified via C₁₈ reversed-phase HPLC using an InertSustain, 5 μm, 25 × 0.46 cm column, with 3:2 MeCN/(0.05% TFA/H₂O) as eluent to yield 0.1 mg of the pentaacetate 6.

Nahuoic Acid B Pentaacetate (6). Isolated as a clear glass: $[\alpha]_D^{25}$ +166.7° (c 0.07, MeOH); UV (3:2 MeCN/(0.05%TFA/H₂O)) λ_{\max} 227 nm; ¹H NMR, see Table 1; ¹³C NMR, see Table 2; negative ion HRESIMS [M - H]⁻ m/z 731.4016 (calcd for C₄₀H₅₉O₁₂, 731.4007).

Preparation of Ester Derivative 7. Nahuoic acid D (4) (0.2 mg, 0.4 μmole) along with a catalytic amount of pyridinium *p*-toluenesulfonate (~0.1 mg) was dissolved in a 0.8 mL solution of 1:1 dimethoxypropane/CH₂Cl₂ and stirred at 37–40 °C for 17 h. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO₃, and the resulting solution extracted with EtOAc (3 × 0.5 mL). The combined EtOAc extracts were evaporated to dryness and without purification

the resulting residue was stirred with *p*-bromophenacyl bromide (1.0 mg) dissolved in 7:3 DMF/Et₃N (1.0 mL) at 45–50 °C for 17 h. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and the resulting solution extracted with EtOAc (3 × 0.75 mL). The EtOAc soluble material was fractionated by Si gel flash chromatography (step gradient: 19:1 hexanes/EtOAc to EtOAc to 1:9 MeOH/EtOAc, 2 g of Sep pak). The 1:1 hexanes/EtOAc fraction contained derivative 7. A pure sample of 7 (<0.1 mg) was obtained from this fraction via C₁₈ reversed-phase HPLC using a CSC-Inertsil 150A/ODS 2.5 μm 25 × 0.94 cm column with 85:15 MeCN/H₂O as eluent.

Ester Derivative 7. Isolated as a clear glass; UV (7:3 (MeCN/H₂O)) λ_{\max} 257 nm; ¹H NMR (C₆D₆) δ 7.26 (d J = 8.4 Hz) (H-36/40), 7.09 (d J = 8.4 Hz) (H-37–39), 6.89 (bd J = 10.1 Hz) (H-3), 5.33 (bt J = 6.8 Hz) (H-15), 5.04 (d J = 16.4 Hz) (H-33b), 4.89 (bs) (H-11), 4.89 (d J = 16.4 Hz) (H-33a), 4.18 (btd J = 7.4, 1.0 Hz) (H-21), 4.14 (dddd J = 6.2, 6.2, 6.2, 6.2 Hz) (H-19), 3.95 (dddd J = 7.4, 7.4, 7.4, 7.4 Hz) (H-17), 3.88 (td J = 11.3, 4.2 Hz) (H-7), 3.59 (ddd J = 10.1, 10.1, 10.1 Hz) (H-4), 3.37 (bs) (H-9), 3.26 (dd J = 9.6, 1.3 Hz) (H-23), 2.44 (m) (H-16b), 2.29 (8_{eq}), 2.27 (H-16a), 2.26 (H-13), 2.12 (dt, J = 13.6, 7.4 Hz) (20b), 2.02 (bs) (H-26), 2.01 (H-6), 1.75 (H-24), 1.74 (H-18b), 1.67 (H-18a), 1.66 (H-20a), 1.65 (8_{ax}), 1.50 (bs) (H-29), 1.50 (s) (H-46), 1.49 (H-5), 1.48 (s) (H-43), 1.47 (H-22), 1.46 (bs) (H-30), 1.43 (s) (H-42), 1.34 (s) (H-45), 1.22 (d J = 7.3 Hz) (H-27), 1.05 (d J = 6.8 Hz) (H-25), 0.95 (d J = 6.8 Hz) (H-31), 0.87 (s) (H-28), 0.68 (d J = 6.8 Hz) (H-32) ppm; ¹H NMR (C₅D₅N) δ 7.98 (d J = 8.4 Hz) (H-36/40), 7.67 (d J = 8.4 Hz) (H-37–39), 7.16 (bd J = 10.5 Hz) (H-3), 5.79 (d J = 16.4 Hz) (H-33b), 5.74 (d J = 16.4 Hz) (H-33a), 5.44 (H-11), 5.42 (H-15), 4.46 (td J = 10.3, 4.0 Hz) (H-7), 4.28 (bt J = 6.4 Hz) (H-21), 4.22 (H-19), 4.21 (H-4), 4.04 (dddd J = 6.5, 6.5, 6.5, 6.5 Hz) (H-17), 4.00 (bs) (H-9), 3.42 (bd J = 10.0 Hz) (H-23), 2.74 (bd J = 13.5 Hz) (8_{eq}), 2.56 (bd J = 8.1 Hz) (H-13), 2.52 (H-6), 2.51 (H-16b), 2.38 (m) (H-16a), 2.30 (ddd J = 13.5, 10.3, 3.8 Hz) (8_{ax}), 2.14 (ddd, J = 13.3, 6.4, 6.4 Hz) (20b), 2.02 (bs) (H-26), 1.80–1.88 (H-18a/18b), 1.77 (bs) (H-30), 1.75 (H-24), 1.75 (H-20a), 1.72 (bs) (H-29), 1.60 (H-22), 1.90 (bdd J = 11.3, 3.5 Hz) (H-5), 1.60 (d J = 7.1 Hz) (H-27), 1.51 (bs) (H-43), 1.51 (bs) (H-46), 1.47 (bs) (H-42), 1.47 (s) (H-45), 1.25 (s) (H-28), 1.04 (d J = 6.4 Hz) (H-25), 0.96 (d J = 6.8 Hz) (H-31), 0.77 (d J = 6.7 Hz) (H-32) ppm; a complete ¹³C NMR spectrum is not available due to limited material; partial ¹³C NMR (data obtained from HSQC and HMBC data, C₆D₆) δ 150.6 (C-3), 132.0 (C-37/39), 130.9 (C-11), 129.4 (C-36/40), 126.3 (C-15), 79.6 (C-23), 74.2 (C-9), 69.9 (C-21), 68.1 (C-7), 66.9 (C-17), 66.1 (C-33), 63.5 (C-19), 56.6 (C-13), 49.9 (C-5), 39.3 (C-20), 38.9 (C-6), 38.4 (C-8), 38.4 (C-18), 36.9 (C-4), 35.2 (C-16), 32.6 (C-22), 30.5 (C-46), 29.6 (C-24), 27.2 (C-28), 25.2 (C-42), 25.1 (C-43), 21.9 (C-29), 20.0 (C-25), 19.8 (C-45), 18.2 (C-27), 17.5 (C-32), 13.7 (C-26), 12.6 (C-30), 5.1 (C-31) ppm; ¹³C NMR (C₅D₅N) δ 152.3 (C-3), 133.5 (C-11), 133.0 (C-37/39), 130.4 (C-36/40), 125.7 (C-15), 79.8 (C-23), 74.6 (C-9), 70.3 (C-21), 67.9 (C-7), 67.4 (C-17), 67.2 (C-33), 64.1 (C-19), 57.7 (C-13), 51.2 (C-5), 41.2 (C-8), 40.2 (C-6), 39.6 (C-20), 38.7 (C-18), 37.6 (C-4), 35.6 (C-16), 32.8 (C-22), 30.7 (C-46), 29.8 (C-24), 28.2 (C-28), 25.5 (C-42), 25.4 (C-43), 22.5 (C-29), 21.2 (C-25), 21.1 (C-45), 19.3 (C-27), 17.6 (C-32), 13.9 (C-26), 13.1 (C-30), 5.4 (C-31) ppm; positive-ion HRESIMS [M + Na]⁺ m/z 865.3852 (calcd for C₄₆H₆₇O₉BrNa, 865.3866).

Preparation of the Pentaacetate of Nahuoic Acid A (8). Nahuoic acid A (1) (1.0 mg, 1.9 μmol) was treated with acetic anhydride in pyridine (1:1, 1 mL) along with a catalytic amount of DMAP and stirred at rt for 5 days. After drying, the resulting gum was purified via C₁₈ reversed-phase using an InertSustain, 5 μm, 25 × 0.46 cm column, with 3:2 MeCN/(0.05% TFA/H₂O) as eluent to yield 0.5 mg of the pentaacetate 8.

Nahuoic Acid A Pentaacetate (8). Isolated as a clear glass; UV (3:2 MeCN/(0.05%TFA/H₂O)) λ_{\max} 227 nm; ¹H NMR spectrum see the Supporting Information; a ¹³C NMR spectrum is not available due to limited material; positive-ion HRESIMS [M + Na]⁺ m/z 755.3999 (calcd for C₄₀H₆₀O₁₂Na, 755.3982).

Preparation of the Methyl Ester of the Pentaacetate of Nahuoic Acid A (9). Nahuoic acid A (1) (0.6 mg, 1.2 μmole) was treated with acetic anhydride in pyridine (1:1, 1 mL) along with a catalytic amount of DMAP and stirred at rt for 16 h. After drying

and without further purification, the resulting gum was treated with diazomethane that was generated in situ by the addition of 0.5 mL of 2.0 M trimethylsilyldiazomethane in hexanes to 0.5 mL of anhydrous MeOH in 0.6 mL of C₆H₆. The reaction mixture was allowed to stir for 16 h at rt. After evaporation of the reagents, the sample was purified via C₁₈ reversed-phase HPLC using a InertSustain, 5 μm, 25 × 0.46 cm column, with 7:3 MeCN/(0.05% TFA/H₂O) as eluent to yield 0.5 mg of the methyl ester of the pentaacetate of nahuic acid A (9).

Methyl Ester of the Pentaacetate of Nahuic Acid A (9). Isolated as a clear glass: UV (7:3 MeCN/(0.05%TFA/H₂O)) λ_{max} 226 nm; ¹H NMR, see the Supporting Information; ¹³C NMR, not available due to limited material; positive-ion HRESIMS [M + Na]⁺ m/z 769.4131 (calcd for C₄₁H₆₂O₁₂Na, 769.4139).

IC₅₀'s for in Vitro SETD8 Inhibition. See reference 8, Supporting Information.

Cell Culture. U2OS and MDA-MB-436 Cells were grown in DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) with 10% fetal bovine serum supplemented with penicillin and streptomycin. SUM159 cells were grown in Ham's F-12 with 5% FBS and supplemented with glutamine, insulin (10 μg/mL), hydrocortisone (1 μg/mL), and penicillin and streptomycin. For the treatment with nahuic acid A (1) and its derivatives, these products were resuspended in DMSO at 0.5 mg/mL and directly diluted into culture medium at the appropriate concentration.

Immunoblot Analysis. After treatment with nahuic acid A (1) or DMSO, cells were harvested and washed with phosphate-buffered saline (PBS) before lysis in Laemmli SDS-PAGE buffer and protein quantification by Bradford assay. Equal amounts of protein were then resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with the following antibodies: anti-histone H4, H4K20me1, and anti-K20me3 (1:1000; cell signaling), anti-histone H3 (1:5000, Diagenode), anti-H3K4me3 and anti-H3K27me3 (1:1000, cell signaling).

Flow Cytometry. Cells were incubated with 50 μM BrdU for 1 h, fixed with a 70% ethanol solution, and then permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min. Cells were then treated with 0.2 N HCl before staining with mouse antibody to BrdU (1:30 diluted in PBS with 0.2% Tween20, 1% bovine serum albumin) for 1 h at room temperature, followed by 2 h incubation with an FITC-conjugated antibody (BD; 1:300). DNA was then counterstained by overnight incubation with 7-aminoactinomycin D (7AAD, 1:50) in the presence of RNase (50 μg/mL). Cell cycle profiles were acquired with a flow cytometer and analyzed with the FlowJo software.

Cytotoxicity Assay. Cytotoxicity studies were performed using the sulforhodamine B assay based on the percentage of cell growth compared to a control after exposure to increasing drug concentrations. The cytotoxicity of each drug was evaluated by the IC₅₀ value. On day 1, 2000 U2OS or SUM159 cells and 4000 MDA-MB-436 cells were seeded onto 96-well plates in a volume of 150 μL medium per well. On day 2, they were exposed to increasing (0.5–100 μM) concentrations of nahuic acid A (1) and its derivatives for 24 h. After drug exposure, the medium in control and treated wells was removed, and cells were washed with PBS and grown in fresh medium for three doubling times. Cells were then fixed overnight with ice-cold 12.5% trichloroacetic acid, washed with tap water, and air-dried. Fixed cells were dyed with 0.4% sulforhodamine B in 1% acetic acid solution, washed with 1% acetic acid, and air-dried. Sulforhodamine B was then extracted with 10 mM Tris buffer (pH 10.5), and 540 nm optical density was quantitated using a microplate reader.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.joc.5b02569.

1D and 2D NMR spectra for 2–9 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: raymond.andersen@tbc.ca.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by a grant to R.J.A. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. F.I. was supported by a fellowship from the French Ligue Nationale Contre le Cancer. The work of S.A., F.I., and E.J. was supported by the institutional support from CNRS and INSERM, and the EPIG2013-13 grant from the French Plan-Cancer 2009/2013.

■ REFERENCES

- Arrowsmith, C. H.; Bountra, C.; Fish, P. V.; Lee, K.; Schapira, M. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 384–400.
- Nishioka, K.; Rice, J. C.; Sarma, K.; Erdjument-Bromage, H.; Werner, J.; Wang, Y.; Chuikov, S.; Valenzuela, P.; Tempst, P.; Steward, R.; Lis, J. T.; Allis, C. D.; Reinberg, D. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 1201–1213.
- Fang, J.; Feng, Q.; Ketel, C. S.; Wang, H.; Cao, R.; Xia, L.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Simon, J. A.; Zhang, Y. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1086–1099.
- Shi, X.; Kachirskaja, I.; Yamaguchi, H.; West, L. E.; Wen, H.; Wang, E. W.; Dutta, S.; Appella, E.; Gozani, O. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 636–646.
- Takawa, M.; Cho, H. S.; Hayami, S.; Toyokawa, G.; Kogure, M.; Yamane, Y.; Iwai, Y.; Maejima, K.; Ueda, K.; Masuda, A.; Dohmae, N.; Field, H. I.; Tsunoda, T.; Kobayashi, T.; Akasu, T.; Sugiyama, M.; Ohnuma, S. I.; Atomi, Y.; Ponder, B. A.; Nakamura, Y.; Hamamoto, R. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3217–3227.
- Yang, F.; Sun, L.; Li, Q.; Han, X.; Lei, L.; Zhang, H.; Shang, Y. *EMBO J.* **2012**, *31*, 110–123.
- Takawa, M.; Cho, H.-S.; Hayami, S.; Toyokawa, G.; Kogure, M.; Yamane, Y.; Iwai, Y.; Maejima, K.; Ueda, K.; Masuda, A.; Dohmae, H.; Field, H. I.; Tsunoda, T.; Kobayashi, T.; Akasu, T.; Sugiyama, M.; Ohnuma, S.; Atomi, Y.; Ponder, B. A. J.; Nakamura, Y.; Hamamoto, R. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3217–3227.
- Williams, D. E.; Dalisay, D. S.; Li, F.; Amphlett, J.; Maneerat, W.; Chavez, M. A. G.; Wang, Y. A.; Matainaho, T.; Yu, W.; Brown, P. J.; Arrowsmith, C. H.; Vedadi, M.; Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 414–417.
- Rychnovsky, S. D.; Rogers, B.; Yang, G. J. *Org. Chem.* **1993**, *58*, 3511–3515.
- Tardat, M.; Murr, R.; Herceg, Z.; Sardet, C.; Julien, E. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 1413–1426.
- Jørgensen, S.; Elvers, I.; Trelle, M. B.; Menzel, T.; Eskildsen, M.; Jensen, O. N.; Helleday, T.; Helin, K.; Sørensen, C. S. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 1337–1345.
- Brustel, J.; Tardat, M.; Kirsh, O.; Grimaud, C.; Julien, E. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 452–460.
- Blum, G.; Ibanez, G.; Rao, X. J.; Shum, D.; Radu, C.; Djaballah, H.; Rice, J. C.; Luo, M. K. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2471–2478.
- Ma, A. Q.; Yu, W. Y.; Li, F. L.; Bleich, R. M.; Herold, J. M.; Butler, K. V.; Norris, J. L.; Korboukh, V.; Tripathy, A.; Janzen, W. P.; Arrowsmith, C. H.; Frye, S. V.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Jin, J. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6822–6833.
- Ma, A. Q.; Yu, W. Y.; Xiong, Y.; Butler, K. V.; Brown, P. J.; Jin, J. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1892–1898.
- Kaniskan, H. Ü.; Konze, K. D.; Jin, J. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1596–1629.
- Padanamide A and actinoramide A have the same structure, and they were reported simultaneously. See: (a) Nam, S. J.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6707–6712. (b) Williams, D. E.; Dalisay, D. S.; Patrick, B. O.; Matainaho, T.; Andrusiak, K.; Deshpande, R.; Myers, C. L.; Piotrowski, J. S.; Boone, C.; Yoshida, M.; Andersen, R. J. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3936–3939.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de mes résultats montre que la voie H4K20 constitue une voie de signalisation clé dans la régulation coordonnée entre la réplication de l'ADN et la structure de la chromatine. De façon plus spécifique, nous pouvons proposer le modèle selon lequel :

- La réapparition de PR-Set7 en fin de phase S permet de réguler le dépôt de mono-méthylation H4K20 au niveau des origines (Tardat et al., 2010) qui sera convertie en tri-méthylation H4K20 au niveau des régions d'hétérochromatine (Brustel et al., 2017). Ceci permettra le recrutement spécifique des protéines ORC et MCM sur certaines origines *via* une reconnaissance des marques par ORCA/LRWD1 suivie d'une activation tardive de ces origines (Article 1, Brustel et al., 2017). Les différents niveaux de méthylation H4K20 permettent ainsi de coordonner dans le temps l'activation des origines de réplication en distinguant les régions tardives des régions précoces.

- PR-Set7 semble aussi réguler la structure de la chromatine pour limiter un licensing non spécifique des composants du pre-RC à l'ADN (Article 2, Shoaib et al.,). Cette régulation de la structure de la chromatine permet d'empêcher l'apparition de dommages ADN dus à une activation inappropriée des protéines MCMs.

- De façon concomitante, PR-Set7 pourrait participer au processus de maturation de la chromatine (Article 3, Izard et al.). Ainsi, la stabilisation de PR-Set7 en phase de réplication conduit à une augmentation prématurée de la mono-méthylation H4K20 convertie en tri-méthylation H4K20 par les Suv4-20h et provoque une compaction anormale de la chromatine naissante. Cette maturation semble être dépendante d'une reconnaissance de la marque H4K20me3 par la protéine ORCA/LRWD1 et implique les autres facteurs de l'hétérochromatine HP1 α et HP1 β .

Ainsi, au moment de la réplication, PR-Set7 est dégradée par le protéasome et le niveau de méthylation H4K20 diminue de façon globale (Tardat et al., 2010). Cette dégradation permet de empêcher la réactivation des origines de réplication au cours d'un même cycle cellulaire et d'empêcher une maturation anormale de la chromatine naissante.

Ce modèle est cohérent avec le fait que la déplétion de PR-Set7 entraîne des défauts à la fois de structure de la chromatine mais aussi de recrutement du pre-RC et de réplication et, globalement, conduit à une instabilité génomique. PR-Set7 est fortement impliqué dans le cancer et notamment dans le myélome multiple. J'ai pu montrer que son inhibition chimique pourrait avoir un grand intérêt thérapeutique.

Il est étonnant de constater que dans une autre étude, la surexpression de PR-Set7^{PIPMUT} conduit à une décompaction tardive de la chromatine due à une répression transcriptionnelle des gènes histones (Abbas et al., 2010). Ce phénotype peut toutefois concorder avec notre modèle si on considère que la re-réplication consécutive à la réactivation des origines entraîne une augmentation de la quantité d'ADN. Cette augmentation de la quantité d'ADN couplée à une diminution de la transcription des histones pourrait effectivement entraîner une décompaction due à une carence en histone.

Ce processus pourrait aussi expliquer l'apparition de dommages ADN qui pourraient être la conséquence de l'apparition d'ADN nu dans le noyau. Toutefois, plusieurs questions se posent encore concernant la façon donc tous ces processus s'articulent entre eux et quels sont les mécanismes impliqués dans ces différentes fonctions. L'objectif de cette discussion sera de tenter de répondre à ces questions. Nous verrons aussi quelles futures approches peuvent être envisagées pour poursuivre ce travail de thèse.

1. LE RÔLE DE PR-SET7 DANS LA REPLICATION ET LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE DEPEND DE LA METHYLATION H4K20

1.1. LA METHYLATION H4K20 CONTROLE L'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION

Le rôle de la méthylation H4K20 dans la réplication de l'ADN a été questionné suite à l'étude montrant que la mutation H4K20A est viable chez la Drosophile et n'entraîne pas de défauts de réplication (McKay et al., 2015). Dans l'article 1 (Brustel et al., 2017), nous avons pu montrer par des expériences de surexpression de l'histone H4 présentant la mutation H4K20A que la fonction de PR-Set7 et des Suv4-20hs dans l'activation des origines de réplication dépendait de la méthylation H4K20 chez les mammifères. Mais cette approche ne nous permet pas d'exclure que PR-Set7 et les Suv4-20h n'exercent pas cette fonction *via* d'autres substrats non-histone. Les Drosophiles mutantes pour les Suv4-20h et les cellules de Drosophiles déplétées pour PR-Set7 ne présentent pas de défauts d'activation des origines de réplication (Li et al., 2016; Sakaguchi et al., 2008). Le rôle de la méthylation H4K20 dans l'activité des origines de réplication semble donc spécifique aux mammifères. De plus, les origines de réplication présentent des caractéristiques différentes entre les Drosophiles et les mammifères tant au niveau de la séquence d'ADN que de la concentration en nucléosomes (Comoglio et al., 2015; Lombraña et al., 2013). Le fait que la mutation H4K20A soit viable chez la Drosophile nous pousse à nous poser la question de l'existence d'une fonction non-enzymatique de PR-Set7 chez cet organisme. Cet aspect a été discuté dans le laboratoire d'accueil et fait l'objet d'un article qui utilise la drosophile comme modèle et qui est en cours de révision (*Cell-cycle regulation of non-enzymatic functions of the Drosophila methyltransferase PR-Set7*, NAR, Zouaz et al., 2017). Cet article démontre en effet l'existence d'une fonction non enzymatique de l'orthologue Drosophile de PR-Set7 qui serait également importante pour coordonner le niveau de compaction de la chromatine avec l'initiation de la réplication à la transition G1/S.

En séquençant des échantillons de gliomes pédiatriques l'équipe de David Allis a mis en évidence une mutation de la lysine 27 de l'histone H3 (K27M) (Lewis et al., 2013). De façon intéressante cette mutation conduit à une inhibition de l'activité enzymatique de PRC2 (complexe protéique contenant l'activité enzymatique de méthylation H3K27). Les auteurs ont montré que le substrat muté K<M cible le site catalytique de l'enzyme et abolit

sa fonction enzymatique en entrant en compétition avec les substrats non mutés. On peut ainsi se demander si dans nos expériences la mutation H4K20A n'altérerait pas la fonction des enzymes PR-Set7 et Suv4-20h, par exemple en modifiant la liaison des enzymes à la chromatine. Les effets observés suite à la surexpression de H4K20A pourraient alors aussi être la conséquence d'une perte de la fonction de PR-Set7 sur des substrats non-histones. Cela peut être contredit par le fait que chez la drosophile la mutation H4K20A est viable et n'a pas d'effet sur la réplication alors que la perte de l'enzyme est létale (Karachentsev et al., 2005; McKay et al., 2015). Il faudrait toutefois étudier si la mutation H4K20A a des effets sur la localisation de PR-Set7 à la chromatine par exemple par des expériences de fractionnement biochimique. Pour savoir si la mutation H4K20A altère la fonction de PR-Set7 il serait aussi intéressant d'évaluer les niveaux de méthylation des autres substrats de PR-Set7.

1.2. LES NIVEAUX DE METHYLATION H4K20 REGULENT L’AFFINITE DES PROTEINES ORC A LA CHROMATINE

La compaction de la chromatine induite par PR-Set7 régule le licensing des composants du pre-RC à la chromatine et prévient ainsi l'apparition de dommages ADN (Article 2 (Shoaib et al.,)). En outre, le laboratoire d'accueil avait déjà démontré que PR-Set7 permettait le licensing des composants du pre-RC sur les origines de réplication et que PR-Set7 déposait de la mono-méthylation H4K20 au niveau de certaines origines de réplication (Tardat et al., 2010). Comment ces deux processus s'articulent-ils ? Nous avons pu démontrer que la fonction de PR-Set7 dans le contrôle de l'activation des origines de réplication dans les régions hétérochromatiniennes dépendait d'une conversion de H4K20me1 en H4K20me3 (Article1 (Brustel et al., 2017)). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que PR-Set7 dépose de la mono-méthylation de façon globale sur le génome. Celle-ci va être convertie en tri-méthylation H4K20 spécifiquement dans les régions hétérochromatiniennes grâce à l'action des Suv4-20h. La tri-méthylation sera reconnue par ORCA/LRWD1 qui permettra la fixation des ORCs et l'activation des origines de réplication dans les régions tardives. Ainsi, on peut penser que la tri-méthylation H4K20 permet de créer des sites de forte affinité pour les protéines du pre-RC et empêche la fixation non spécifique des ORCs et des MCMs sur l'ADN dans l'euchromatine. Cette création de sites de forte affinité pour les complexes ORC associés à ORCA/LRWD1 pourrait être nécessaire pour activer les origines de réplication dans ces régions peu accessibles. L'intérêt d'un tel mécanisme pourrait aussi être de séquestrer les protéines de l'hétérochromatine et ainsi de réguler indirectement le recrutement du pre-RC dans l'euchromatine. Cela pourrait expliquer pourquoi en absence de PR-Set7 on observe un recrutement anormal des ORC en G1 (Shoaib et al., Article 2). En outre, la marque H4K20me2 est spécifiquement reconnue par ORC1 (Kuo et al., 2012) via son domaine BAH, mais le lien entre ce système de fixation de ORC1 et le timing de réplication n'a pas été démontré. En effet, la marque H4K20me2 est très abondante sur le

génomique puisqu'elle est présente sur environ 80% des histones H4 (Young et al., 2009), ainsi il est peu probable qu'elle puisse participer à différencier les régions précoces des régions tardives.

1.3. METHYLATION H4K20 DANS LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE

La fonction de la méthylation H4K20 dans la structure de la chromatine a été étudiée par la même approche de surexpression d'histones H4 mutées non méthylables. Deux mutants ont été testés, le mutant H4K20A et le mutant H4K20R (Données complémentaires). La mutation H4K20R a été réalisée dans le but d'éviter la modification de charge consécutive à la mutation K20A qui pourrait modifier la structure des nucléosomes et entraîner des effets non spécifiquement dus à l'absence de méthylation. Comme lorsqu'on déplete PR-Set7 par siRNA, la diminution de méthylation H4K20 par surexpression des deux mutants conduit à une décompaction massive de la chromatine observée en FRET/FLIM. Ainsi, la perte de l'enzyme PR-Set7 entraîne le même phénotype que la diminution de méthylation H4K20, ce qui laisse à penser que la décondensation anormale observée après déplétion de PR-Set7 pourrait être la conséquence d'une diminution de la méthylation H4K20. En outre, la compaction induite par PR-Set7^{PIP MUT} dépend des Suv4-20h et la lysine 20 de l'histone H4 est le seul substrat commun entre les deux enzymes. Cela nous pousse à émettre l'hypothèse que la lysine 20 de l'histone H4 est le substrat principal de PR-Set7 dans sa fonction de régulation de la structure de la chromatine.

2. ROLE DE LA VOIE DE METHYLATION H4K20 DANS LA FORMATION D'HÉTÉROCHROMATINE DERRIÈRE LES FOURCHES DE REPLICATION

Les résultats présentés dans le manuscrit Izard et al., (Article 3) montrent que la surexpression de PR-Set7 conduit à une compaction de la chromatine anormale en phase S. En effet, l'expression d'une forme stable de PR-Set7 induit uniquement une compaction de la chromatine lorsque les fourches de réplication sont actives et conduisent à l'assemblage d'une chromatine non encore maturée. De plus, la surexpression de la protéine PR-Set7 WT qui est dégradée au moment de la phase S n'a pas d'effet sur la compaction de la chromatine (Article 3, Izard et al.,). Ces résultats suggèrent que PR-Set7 pourrait être impliqué dans la maturation de la chromatine après la réplication. Cela est cohérent avec le fait que la perte de PR-Set7 entraîne un défaut de profil de marques hétérochromatiniennes (Article 3) et l'apparition de cassures massives de l'ADN lors de la réplication (Tardat et al., 2007) qui pourraient dans ce cas être la conséquence (en plus de la conséquence d'une activation anormale des MCMs) d'une chromatine fragilisée par une mauvaise maturation de la chromatine .

2.1. LA FONCTION DE PR-SET7 DANS LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE DEPEND DE ORCA/LRWD1

La formation de l'hétérochromatine semble impliquer ORCA/LRWD1 qui lie les marques répressives H3K9me3, H4K20me3 et H3K27me3 et les histones méthyltransférases responsable de ces marques (Giri and Prasanth, 2016; Giri et al., 2015). De façon intéressante, la déplétion d'ORCA/LRWD1 avant l'entrée en phase S empêche la compaction induite par la stabilisation de PR-Set7 (mutant PIP) (Article 3, Izard et al.,). De plus, cette stabilisation entraîne des modifications du profil des protéines HP1 α et β et ces protéines semblent nécessaires à la compaction induite par PR-Set7^{PIP^{MUT}}. Des expériences d'immunofluorescence ont montré que la stabilisation et la déplétion de PR-Set7 altèrent le profil de marques hétérochromatiniennes. Tous ces résultats suggèrent que la compaction induite par la stabilisation de PR-Set7 contribue à créer de l'hétérochromatine de façon dépendante d'ORCA/LRWD1 (Figure 15). Il serait intéressant de regarder si la surexpression de PR-Set7^{PIP^{MUT}} modifie la localisation d'ORCA/LRWD1 à la chromatine.

La surexpression d'ORCA/LRWD1 conduit à une compaction anormale de la chromatine. Comme dans le cas de la surexpression de PR-Set7^{PIP^{MUT}}, cette compaction s'accompagne d'une augmentation de la tri-méthylation H4K20. On peut penser que cette compaction anormale de la chromatine fait intervenir les mêmes mécanismes que celle observée après surexpression de PR-Set7^{PIP^{MUT}}. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle la forte surexpression de ORCA/LRWD1 entraîne une apparition de la protéine dans l'euchromatine et qu'elle va y diriger Suv4-20h. Par la suite les Suv4-20h vont y convertir la mono-méthylation en tri-méthylation H4K20, ce qui explique l'augmentation de H4K20me3 observée. Cela suggère que la compaction observée serait la conséquence d'une transformation de l'euchromatine en hétérochromatine, mais cela reste à démontrer notamment par des approches de ChiP-seq H3K9me3 avant et après l'induction du mutant PR-Set7^{PIP^{MUT}}. Une autre approche intéressante pour répondre à cette question serait de réaliser des expériences d'ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing) (Buenrostro et al., 2015). Cette technique permet d'étudier l'accessibilité de la chromatine en utilisant une transposase hyperactive qui va préférentiellement agir dans les régions de chromatine ouvertes. La réaction de transposition est couplée à la ligation de séquences spécifiques adaptatrices à l'ADN coupé. L'ADN ligué à la séquence adaptatrice sera isolé, amplifié par PCR et séquencé. Ainsi, il serait intéressant de regarder si la surexpression de PR-Set7^{PIP^{MUT}} entraîne la conversion de zones ouvertes de chromatine en zones plus compactes ou au contraire si elle agit sur des zones déjà hétérochromatiniennes qui adopteraient une structure encore plus fermée. Comment la présence d'ORCA/LRWD1 favoriserait la formation d'hétérochromatine ? Comme déjà mentionné, ORCA/LRWD1 lie les marques répressives H3K9me3, H4K20me3

et H3K27me3 et les histones méthyltransférases responsables de ces marques (Giri and Prasanth, 2016; Giri et al., 2015). On peut imaginer que la stabilisation de PR-Set7 favorise ainsi la formation d'hétérochromatine *via* ORCA/LRWD1 selon le mécanisme suivant : PR-Set7 dépose de la mono-méthylation H4K20 au niveau des nucléosomes de la chromatine naissante, cette marque sera convertie en tri-méthylation par les Suv4-20h selon une boucle de rétro-action où la protéine ORCA/LRWD1 reconnaît la tri-méthylation H4K20 et y dirige Suv4-20h avec laquelle elle forme un complexe (Figure 15). Les Suv4-20h convertiront ainsi les marques H4K20me1 en H4K20me3 sur les nucléosomes voisins, selon le même principe que la boucle impliquant la tri-méthylation H3K9, HP1 et les Suv39h. On peut aussi penser que le recrutement sur H4K20me3 du complexe contenant ORCA/LRWD1 et les méthyltransférases répressives pourrait favoriser le ciblage de Suv39h à la chromatine naissante. Ce mécanisme pourrait contribuer à la propagation de l'hétérochromatine. Cela est cohérent avec le fait que le KO conditionnel des Suv4-20h conduit à une diminution de la quantité de ORCA/LRWD1 à la chromatine (Brustel et al., 2017). Toutefois ce mécanisme doit être démontré. Une approche intéressante serait de tester si la déplétion des Suv4-20h ou le traitement avec un inhibiteur chimique des Suv4-20h a un effet sur la compaction anormale de la chromatine induite par la surexpression de ORCA/LRWD1. Une question à laquelle il sera aussi intéressant de répondre sera de savoir si la compaction anormale de la chromatine induite par la surexpression d'ORCA/LRWD1 est spécifique de la phase de réplication comme c'est le cas pour celle induite par PR-Set7. Ainsi, on peut penser que la déplétion de ORCA/LRWD1 dans nos expériences abolit le complexe que la protéine forme avec les méthyltransférases et que la localisation des Suv4-20h à l'hétérochromatine est perturbée. Il serait intéressant de répondre à cette question en réalisant des expériences de fractionnement biochimique, d'immunofluorescence ou d'immunoprécipitation de chromatine.

La stabilisation de PR-Set7 (et donc le maintien de H4K20me1) a donc deux conséquences majeures, une compaction de la chromatine liée possiblement à une maturation anormale de la chromatine naissante suivi d'une re-réplication. On peut se demander comment ces deux phénotypes peuvent être compatibles. Cette compaction pourrait impliquer un recrutement *via* ORCA/LRWD1 des protéines ORCs à l'hétérochromatine, qui plus tardivement pourraient faciliter l'activation de nouvelles origines de réplication et entraîner un phénotype de re-réplication. Ce modèle corrèle avec une étude qui a montré que le processus de re-réplication, par déplétion de la géminine par exemple, concernait préférentiellement les régions hétérochromatiniennes chez la Drosophile (Ding and MacAlpine, 2010). Dans cette étude, les auteurs proposent que la forte densité de ORC à l'hétérochromatine, qui y interagit avec HP1 (Huang et al., 1998; Pak et al., 1997), pourrait stimuler le réassemblage préférentiel du pre-RC sur ces séquences et entraîner de la re-réplication. Dans notre cas il serait intéressant de déterminer si la re-réplication de la chromatine est dépendante d'une compaction préalable de celle-ci, par exemple en

examinant en cytométrie de flux des cellules qui surexpriment PR-Set7^{PIPMUT} mais qui auront été déplétées pour les protéines HP1.

Est-ce que cette fonction de PR-Set7 dans la structure de la chromatine mise en évidence dans l'Article 2 (Shoib et al.,) est liée à celle mise en évidence dans l'Article 3 (Izard et al.,)? Des expériences d'immunofluorescence ont montré que la déplétion de PR-Set7 par siRNA altère le profil de marques hétérochromatiniennes, ce qui laisse à penser que la décompaction observée dans l'Article 2 (Shoib et al.,) est due à une mauvaise remise en place des marques après la réplication, comme suggéré dans l'Article 3 (Izard et al.,). Le travail de Centore et al., (Centore et al., 2010) avait suggéré que la mono-méthylation H4K20 déposée par PR-Set7 pouvait servir de site de fixation au complexe condensine II. Ainsi, on ne peut toutefois pas exclure qu'un mauvais recrutement des condensines pendant la mitose puisse aussi affecter les marques hétérochromatiniennes. Toutefois, nos données de FRET/FLIM montrent que la compaction anormale induite par PR-Set7 en phase S ne dépend pas des condensines comme cela avait été préalablement proposé (Centore et al., 2010).

2.2. IMPLICATION DE LA DEACÉTYLATION DES HISTONES A LA CHROMATINE NAISSANTE

En utilisant un système *in vitro* d'assemblage de la chromatine à partir d'extraits d'embryons de drosophile, l'équipe d'Axel Imhof a constaté que les nucléosomes, une fois incorporés à l'ADN, sont rapidement mono-méthylés sur H4K20 (Scharf et al., 2009). Cette méthylation semble requise pour enlever les marques d'acétylation H4K5 et H4K12 présentes sur les histones néo-synthétisées. Des données de co-immunoprécipitation indiquent que PR-Set7 interagit directement avec la déacétylase HDAC3 responsable de la déacétylation H3K9, H3K14, H4K5 et H4K12 (données complémentaires). Dans notre étude, la déplétion de HDAC3 n'abolit pas la compaction de la chromatine induite par PR-Set7^{PIPMUT} (données complémentaires) mais on peut penser que d'autres HDACs peuvent compenser la perte de HDAC3. Ainsi, la compaction de la chromatine induite par PR-Set7^{PIPMUT} nécessite l'activité de plusieurs HDACs puisque le traitement à la Trichostatine A (un inhibiteur des HDACs) abolit cette compaction (données complémentaires) (Figure 15). Si PR-Set7 régule la formation d'hétérochromatine, on peut aussi se demander si ce mécanisme est lié à l'exclusion mutuelle H4K16Ac/H4K20me décrite par le laboratoire de Danny Reinberg (Nishioka et al., 2002). Une approche intéressante pour étudier la fonction de PR-Set7 dans la maturation de la chromatine derrière les fourches de réplication pourrait consister à combiner une purification des protéines sur l'ADN néo-synthétisé (approche iPOND, (Dungrawala and Cortez, 2015)) avec un pulse-chase à la thymidine. Cette méthode nous permettrait d'étudier la dynamique spatio-temporelle des modifications d'histones et des facteurs hétérochromatiniens quand les cellules surexpriment PR-Set7. En particulier, il serait intéressant de regarder les marques d'acétylation d'histone pour

voir si la stabilisation de PR-Set7 en phase S modifie le profil d'acétylation de la chromatine naissante.

2.3. IMPLICATION DE L3MBTL1

Un aspect qui n'a pas été étudié au cours de ma thèse concerne le lien entre la mono-méthylation H4K20 et la protéine L3MBTL1. L3MBTL1 est une protéine qui peut reconnaître plusieurs marques d'histones, dont H4K20me1, de façon simultanée, et ainsi promeut une compaction de la chromatine (Trojer et al., 2007). Il aurait été intéressant de savoir si les

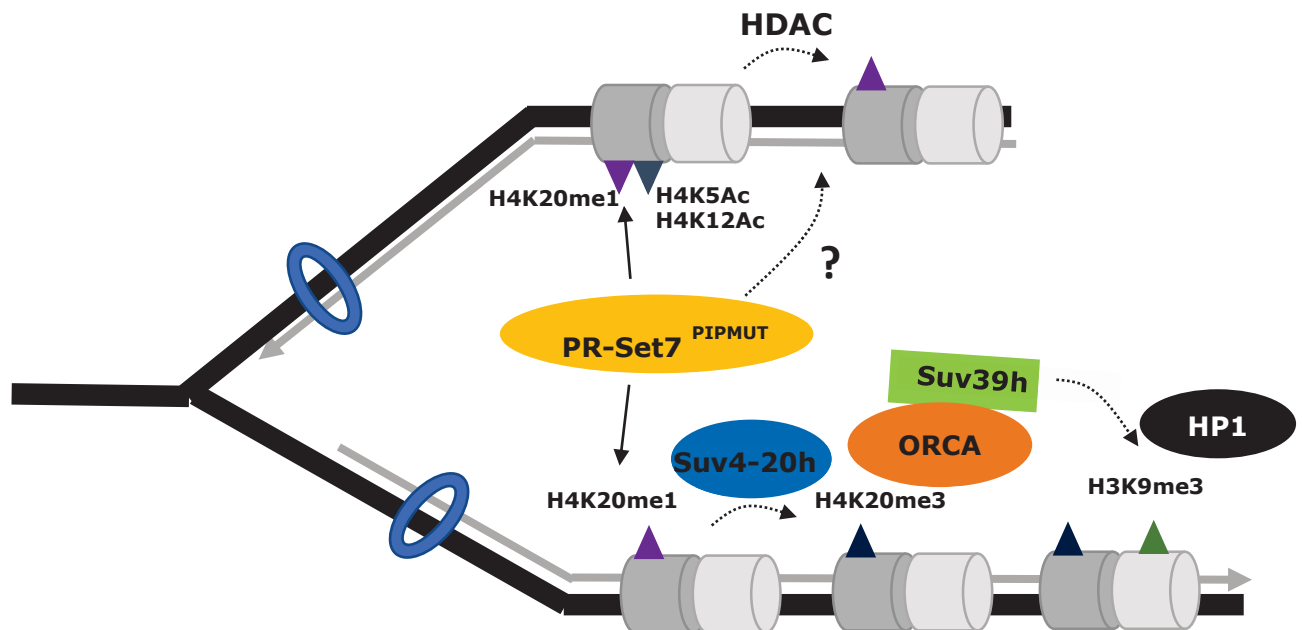


Figure 15 : La stabilisation de PR-Set7 en phase de réplication conduit à un dépôt anormal de K20me1 qui pourrait participer au processus de déacétylation des histones néo-synthétisées. De plus, cette marque H4K20me1 sera convertie en H4K20me3 par les Suv4-20h. La marque H4K20me3 recrutera ensuite la protéine ORCA/LRWD1 impliquée dans la formation d'hétérochromatine.

altérations de la structure de la chromatine observées après stabilisation ou déplétion de PR-Set7 corrélerent avec une modification du recrutement de L3MBTL1 à la chromatine. L'hypothèse d'une implication de H4K20me1 et de L3MBTL1 dans la reformation de la structure de la chromatine derrière les fourches est appuyée par le fait que selon l'article de l'équipe de SD Nimer (Kalakonda et al., 2008), L3MBTL1, comme la mono-méthylation H4K20, s'associe à la chromatine en fin de phase S. De plus, la déplétion par siRNA de L3MBTL1 conduit à des défauts de réplication et l'apparition de dommages ADN des cellules qui répliquent leur génome (Gurvich et al., 2010).

2.4. DEGRADATION PROTEOLYTIQUE DE PR-SET7 SUITE A UN DOMMAGE ADN LIEE A SES FONCTIONS DANS LA LA REPONSE AUX DOMMAGES ADN ET LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ?

En réponse à un dommage ADN, PR-Set7 est dirigé par PCNA vers les sites des dommages, ce qui va permettre le recrutement de 53BP1 et favoriser la voie NHEJ (Botuyan et al., 2006; Dulev et al., 2014; FitzGerald et al., 2009; Pellegrino et al., 2017). Par la suite, PR-Set7 est dégradé par le protéasome par le même mécanisme que celui responsable de sa dégradation en phase S (Oda et al., 2010). Quel est l'intérêt d'une dégradation de PR-Set7 suite à un dommage ADN ? Aucune explication n'est encore disponible mais nous pouvons émettre l'hypothèse que cette dégradation pourrait être nécessaire pour assurer une décompaction de la chromatine permissive pour les mécanismes de réparation de l'ADN. Il serait intéressant d'étudier si les mécanismes de réparation des dommages ADN sont perturbés par la stabilisation de PR-Set7 en phase de réplication. Une autre hypothèse envisageable est que la dégradation de PR-Set7 suite à un dommage ADN puisse empêcher le démarrage du processus de réplication *via* une inhibition du licensing des origines. Cela pourrait être un processus de contrôle en cas de stress pour arrêter le cycle cellulaire le temps que les dommages ADN soient réparés.

3. LIEN ENTRE LES ROLES DE LA VOIE H4K20 DANS LA REPLICATION ET LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET LE CANCER

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle de PR-Set7 dans le processus de tumorigénèse *via* ses fonctions liées à des protéines non-histones comme Numb, p53 et PCNA (Dhami et al., 2013; Shi et al., 2007; Takawa et al., 2012). A l'inverse, de nombreux cancers sont caractérisés par une diminution du niveau de H4K20me3 (Behbahani et al., 2012; Broeck et al., 2008; Fraga et al., 2005; Yokoyama et al., 2014).

3.1. EST-CE QUE LA FONCTION DE PR-SET7 DANS LE CANCER DEPEND DE SON ROLE DE REGULATEUR DE LA REPLICATION ET DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ?

Les résultats de ma thèse ont permis de mettre en évidence des fonctions naturelles de PR-Set7 et des Suv4-20h dans les cellules en prolifération liées à la méthylation H4K20. Il n'y a pas de preuve directe de l'implication de ces processus dans le rôle des enzymes H4K20 dans la tumorigénèse. Toutefois, l'efficacité de l'inhibition de PR-Set7 dans le traitement du myélome multiple ne semble pas dépendre de p53 puisque les cellules de myélome présentant une mutation de p53 sont toujours sensibles à l'inhibition de PR-Set7 (donnée non publiée du laboratoire de Jérôme Moreaux). Par ailleurs, beaucoup d'études ont montré que la dérégulation de la voie H4K20 *via* des surexpressions ou des déplétions de PR-Set7 altère la réponse aux dommages ADN, la réplication, la structure de la chromatine et donc l'intégrité génomique. Nous savons en effet qu'une réplication altérée peut être liée à la tumorigénèse et qu'une instabilité génétique associée à une altération du processus de réplication est souvent retrouvée dans les premiers stades du

développement cancéreux. Ainsi, de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme des histones ou dans l'assemblage de la chromatine sont mutées dans les tumeurs (Burgess and Zhang, 2013). C'est le cas par exemple des protéines chaperonnes d'histones FACT, Asf1 et CAF-1 qui sont souvent surexprimées et sont requises pour la prolifération tumorale (Corpet et al., 2011; Gasparian et al., 2011; Polo et al., 2010). La mauvaise coordination entre la réplication de l'ADN et l'assemblage de la chromatine derrière les fourches de réplication en réponse à un stress réplicatif pourrait aussi entraîner des modifications du profil épigénétique qui pourraient contribuer au développement cancéreux. Il n'existe pas de démonstration de l'existence de mutations gain ou perte de fonction de PR-Set7 et des Suv4-20h dans les cellules cancéreuses qui pourraient expliquer leur implication dans la tumorigénèse mais on peut penser que l'altération des niveaux des enzymes par d'autres mécanismes pourrait accélérer le cycle cellulaire et la prolifération. Le complexe E3 ligase CRL4^{CDT2}, en plus de réguler la dégradation de PR-Set7, est aussi responsable de la dégradation de p21 en phase de réplication. Cette dégradation constitue un second mécanisme pour éviter la réactivation des mêmes origines plusieurs fois par cycle cellulaire. De façon intéressante, le laboratoire de Tarek Abbas a montré que la stabilisation de PR-set7 et de p21 en phase de réplication par inhibition de CDT2 entraînait une re-réplication et une sénescence des cellules cancéreuses du mélanome (Benamar et al., 2016).

3.2. CAS DU MYELOME MULTIPLE

Est-ce que l'efficacité thérapeutique de l'inhibition de PR-Set7 dans le myélome est la conséquence d'une décondensation de la chromatine comme on peut l'observer avec un inhibiteur de HDAC ? Cette question est intéressante et la suite du projet pourrait consister à insérer le système d'étude de la compaction de la chromatine par FRET/FLIM dans des cellules dérivées de patients présentant un myélome multiple. Cela nous permettrait dans un premier temps de savoir si les cellules cancéreuses présentent des modifications de la structure de la chromatine par rapport aux cellules saines. Par la suite, il faudrait déterminer si le traitement à l'UNC0379 conduit à une décondensation de la chromatine. Le traitement avec des inhibiteurs de HDACs a pour but de rétablir un programme transcriptionnel normal. Il serait intéressant de savoir si le profil transcriptionnel des cellules traitées à l'inhibiteur UNC0379 est modifié, ce travail est en cours de réalisation par Laurie Herviou (étudiante en thèse dans l'équipe de Jérôme Moreaux). Le myélome multiple qui se caractérise donc par une surexpression de PR-Set7 n'est toutefois pas un cancer caractérisé par une forte prolifération cellulaire qui pourrait dans ce cas nécessiter PR-Set7 pour l'avancée dans le cycle cellulaire. Le décès qui survient chez les patients atteints de myélome implique surtout un défaut de production d'anticorps par les cellules normales. Ainsi, on peut se demander si l'efficacité de l'inhibition de PR-Set7 dans ce cancer n'est pas due à d'autres fonctions de PR-Set7 que celles de contrôle de la réplication

et de la structure de la chromatine au cours du cycle cellulaire. Cette inhibition pourrait par exemple générer des dommages ADN qui seraient nocifs pour les cellules. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'UNC0379 combiné à du melphalan augmente la capacité du melphalan à générer des dommages ADN.

3.3. ROLE DE LA PERTE DE TRI-METHYLATION H4K20 DANS LE DEVELOPPEMENT CANCEREUX

Concernant la tri-méthylation H4K20, il a été suggéré que la structure de la chromatine constitue une barrière au développement cancéreux en régulant la susceptibilité aux carcinogènes (García-Nieto et al., 2017). De façon plus spécifique, ces auteurs ont montré que la sensibilité des régions génomiques aux carcinogènes est inversement corrélée avec l'accessibilité génomique. Ainsi, les régions les plus compactes péri-nucléaires (domaines associés aux lamines LADs) semblent plus sensibles aux carcinogènes. Les raisons pour lesquelles ces régions sont plus enclines à acquérir des lésions sont peu claires. Les auteurs suggèrent que, dans le même sens qu'un modèle qui avait déjà été proposé (l'hypothèse du bouclier, Hsu, 1975), la chromatine périphérique pourrait « absorber » les dommages de sources exogènes et ainsi faire bouclier pour protéger le centre du noyau qui présente de l'euchromatine riche en gènes actifs. Ainsi, on pourrait penser que des modifications du niveau de H4K20me3 pourraient, en altérant la structure de l'hétérochromatine, contribuer à sensibiliser les cellules à des agents carcinogènes. En outre, le récepteur aux lamines B interagit in vitro avec la marque H4K20me2 (Hirano et al., 2012). Toutefois, cette marque est distribuée sur tout le génome et n'est pas spécifique aux LADs (Barski et al., 2007). De plus, la tri-méthylation H4K20 est plutôt enrichie sur l'ADN satellite péri-centromérique qui ne lie pas toujours l'enveloppe nucléaire (Schotta et al., 2004) et les cellules de souris KO pour les Suv4-20h ne présentent pas de défauts majeurs de l'hétérochromatine péri-nucléaire (Eberhart et al., 2013). Les cellules dérivées de souris KO pour les Suv4-20h présentent toutefois une sensibilité au stress accrue et des défauts de réparation des dommages ADN, qui sont des caractéristiques des cellules cancéreuses (Schotta et al., 2008).

En conclusion, la régulation protéolytique de PR-Set7 au moment de la réplication est critique pour coordonner le dépôt de méthylation H4K20 au cours du cycle cellulaire. Ce système de contrôle permet d'empêcher une maturation précoce de la chromatine ainsi qu'une re-réplication due à un recrutement anormal du pre-RC. Au cours de ces deux processus la marque H4K20me1 va être convertie en H4K20me3 et sera reconnue par la protéine ORCA/LRWD1 qui va à la fois réguler la formation d'hétérochromatine et permettre le recrutement des protéines ORC au niveau des origines. Ce travail de thèse a permis de comprendre plus précisément le rôle de PR-Set7 dans le contrôle de la structure de la chromatine au cours de l'avancée du cycle cellulaire.

ANNEXE

Chromatin structure and domains

Fanny.Izard et Charlotte Grimaud

Encyclopedia of Life Sciences, 2017

Chromatin Structure and Domains

Fanny Izard, *Institute of Cancer Research of Montpellier (IRCM), Montpellier, France*

Charlotte Grimaud, *Institute of Cancer Research of Montpellier (IRCM), Montpellier, France*

Based in part on the previous versions of this eLS article 'Chromatin Structure and Domains' (2005, 2011).

In eukaryotes, the deoxyribonucleic acid (DNA) molecule is associated with nuclear proteins called histones to form chromatin. This structure is not only essential to compact DNA to fit into the cell nucleus but also contributes to the regulation of DNA- dependent molecular mechanisms. Epigenetic modifications such as post-translational modifications of histones and also precise spatial organisation of chromosomes are now recognised as important features for chromatin dynamics, allowing proper transcription regulation, a major issue of cell differentiation during the development of multicellular organisms.

Introduction

First observed at the end of the nineteenth century, chromatin has been for very long considered as a static entity, only necessary for condensing of the extremely long deoxyribonucleic acid (DNA) molecules (e.g. 2 m long in a human cell) into the eukaryotic nucleus of approximately 10 μm . Now we know that chromatin is actually a highly dynamic structure that is able to adopt different types of organisation in order to control DNA-dependent molecular processes such as transcription, replication or repair and furthermore to propagate (epi)genetic information from one cell to its daughter cells. Indeed, proper transmission of chromatin states is necessary for the development of multicellular organisms.

Chromatin structure starts with the assembly of a basic unit, called nucleosome, composed of an octamer of proteins called histones (H2A, H2B, H3, H4) around which 146 bases pairs (bp) of DNA are able to wrap. Connection of nucleosomes by short DNA sequences (called linker DNA) allowing their positioning

eLS subject area: Molecular Biology

How to cite:

Izard, Fanny and Grimaud, Charlotte (March 2017) Chromatin Structure and Domains. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

DOI: 10.1002/9780470015902.a0005279.pub3

Advanced article

Article Contents

- Introduction
- Regulation of Chromatin Structure at the Nucleosome Level
- Regulation of Chromatin in the Nucleus
- Spatial Organisation of the Genome
- Conclusion

Online posting date: 20th March 2017

along the DNA molecule forms the so-called 'beads on the string' structure and a primary fibre of approximately 11 nm in diameter. From this first level of organisation, subsequent fibre–fibre interconnections along the chromatin structure will allow the formation of higher order chromatin structures with different degrees of compaction that are essential for proper packaging of DNA into the cell nucleus and for proper segregation of DNA during mitosis. See also: [Nucleosomes: Structure and Function](#); [Chromatin in the Cell Nucleus: Higher-order Organisation](#)

Because of the detection in the last 40 years, of numbered factors that can modify histones and nucleosome structure, attention has been primarily focused on this first level of chromatin structure. Indeed, a large repertoire of enzymes have been identified that are able to induce or remove post-translational modifications (PTM) on specific aminoacid residues of histones (**Figure 1**) (Bannister and Kouzarides, 2011). In 2001, Allis and Jenuwein proposed that genetic information is not only interpreted in 'cis', via the genetic code of DNA, but is also tightly controlled in 'trans' via, what they named the 'histone code' (Jenuwein and Allis, 2001). This 'histone code' underlies that a given modification on a specific histone residue determines subsequent modifications, either on the same histone or on another histone molecule and that the different possible combinations of histone marks generating an epigenetic 'language' can lead to a large spectrum of regulatory responses necessary for genome plasticity throughout development (Rothbart and Strahl, 2014).

However, going beyond the nucleosomes, thanks to the explosion of highly resolute microscopy techniques and more recently to the development of molecular technologies, allowing the analysis of specific DNA interactions within the nucleus, it appeared clearly that higher-order chromatin structures (more generally chromosomes) are not randomly organised in the cell nucleus and even though that nuclear organisation and specific compartmentalisation of chromosomes could influence the pattern of expression of our genome (Cavalli and Misteli, 2013).

Regulation of Chromatin Structure at the Nucleosome Level

Determination of a nucleosome's structure by high-resolution X-ray revealed that the highly basic *N*-terminal tails of histones protrude from their own nucleosome, make contacts with adjacent nucleosomes and could contribute to the regulation of chromatin

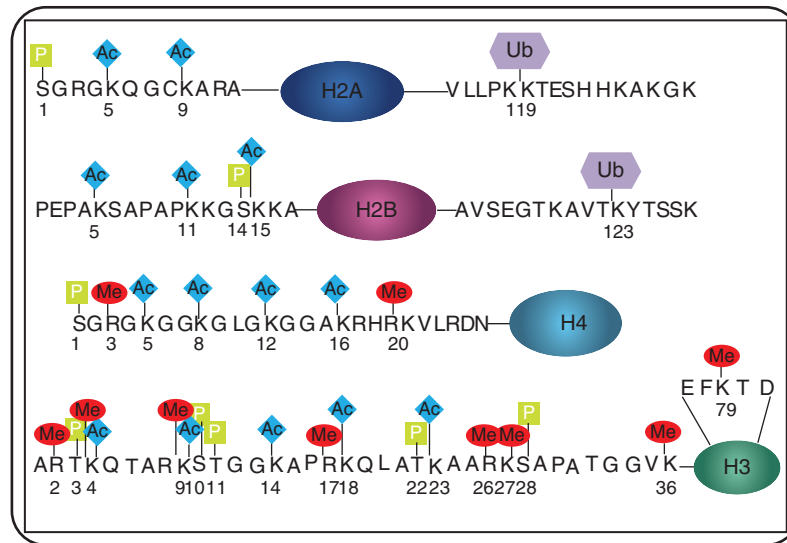


Figure 1 Schematic representation of different post-translational modifications identified on histones. Methylation is marked in red, acetylation in blue, phosphorylation in green and ubiquitination in purple. Position of each amino acid modified is indicated below.

structure. An assumption that has been confirmed thanks to the discovery of numerous different enzymes responsible for the appearance (also called writers) or the disappearance (also called erasers) of specific PTMs on histones. Indeed, PTMs such as acetylation, methylation, phosphorylation or ubiquitination (or other less characterised modifications, Bannister and Kouzarides, 2011) that occurs on specific residues on histones contribute to the regulation of DNA-dependent processes and are determinants for the type of chromatin formed (i.e. relaxed or condensed).

Histone's Modifications that occur mainly in the *N*-terminal tail and also in the core of histones (Tessarz and Kouzarides, 2014) modulate the structure of chromatin either by changing the interaction between histone octamers and DNA (i.e. acetylation) or by serving as recognition signal for the recruitment of effectors complexes (also called readers) that are able to interpret a modification (or a combination of modifications) and to direct changes in chromatin structure.

Apart from PTM on histones, the structure of nucleosomes can also be modified by DNA methylation (particularly in mammals) or by the deposition of specific histone variants. These proteins differ from their canonical counterparts from few amino acids (e.g. H3.3: an histone variant of H3) up to the addition of large nonhistone domains (e.g. macroH2A). Deposition of these histone variants, which can also be submitted to PTMs, strongly increases the possible interpretation of each histone's mark (Zink and Hake, 2016).

In contrast to DNA mutations, that are transmitted from generation to generation, PTMs on histones can be reversibly changed during each cell cycle, rendering them particularly suitable to regulate the plasticity of gene expression necessary for the development of multicellular organisms. **See also: Chromatin Structure and Modification: Defects**

Histone acetylation

One of the first demonstrations that histone modifications could participate in the regulation of chromatin structure and could affect DNA molecular process such as transcription came from the characterisation of the first histone-modifying enzyme, a histone acetyltransferase (HAT), in ciliates. This HAT is homologous of the transcriptional co-activator GCN5 in yeast (Brownell *et al.*, 1996). Since then, dozens of HATs or histone deacetylases (HDAC) that are able to remove an acetyl group have been identified in multiple model organisms and confirmed that histone acetylation is generally associated with gene activation (Seto and Yoshida, 2014). One obvious example that histone acetylation is associated with gene transcription is the process of dosage compensation in *Drosophila*. In this organism, dosage compensation is achieved through a global up-regulation of genes present on the single X chromosome in males in order to achieve similar gene expression levels to that in females that bear two X chromosomes. A global acetylation of lysine 16 of histone H4 is observed on the single X chromosome of males and is crucial to this global up-regulation of transcription. Indeed, acetylation of lysine (K) is rather conducting to a more 'open' chromatin structure by neutralising the positive charge of the target lysine that can directly weaken histone–DNA interaction (Imhof and Wolffe, 1998), thus making DNA more accessible. They can also serve as binding sites for complexes containing proteins with bromodomains. Among these different proteins, some are parts of chromatin remodelling machineries that directly modulate nucleosome positioning along fibres of chromatin and some are necessary for the proper assembly of the transcriptional machinery (Mizzen *et al.*, 1996; Hassan *et al.*, 2001). The importance of the specific fluctuation in histone acetylation during normal cell growth is supported by the frequent alterations in the structure or expression of HATs

and HDACs in many cancers. A number of inhibitors of HDACs are currently used as anticancer agents (Yen *et al.*, 2016).

Histone methylation

In contrast to acetylation, histone methylation that occurs on lysine (K) and arginine (R) residues does not modify the charge of nucleosomes but rather participates in the recruitment of specific readers. Because lateral chains of R can be mono-, symmetrically or asymmetrically di-methylated (Litt *et al.*, 2009) and lateral chains of K can be mono-, di- or tri-methylated, very diverse cellular responses can be assigned to each histone methylation. Indeed, symmetrical and asymmetrical methylation of the arginine 3 on histone H4, exhibit contrasting effects on transcription regulation. Therefore, whereas PRMT1-mediated asymmetrical methylation correlates with transcriptional activation through a specific interplay with histone acetylation, PRMT5-mediated symmetrical methylation is linked to transcriptional repression (Huang *et al.*, 2005). Although, arginine methylation needs to be dynamically regulated, only two types of enzymes responsible for the removal of methyl groups on arginine have been characterised. One, called PAD-4, is responsible for the conversion of methyl-R into citrullin *via* its Peptidyl-R-deaminase activity. The other, called JMJD6, which belongs to the Jumonji domain-containing proteins, is capable of removing methyl groups of specific arginines on histones (H3R2, H4R3, see **Figure 1**).

Concerning lysine methylation, identification of different enzymes responsible for lysine methylation, called lysine methyltransferases (KMT), and of protein complexes that recognise specifically every methylation status on specific histones clearly showed that methylation on histones leads to a wide range of chromatin structure (from relaxed to highly compacted) and plays contrasting functions on the regulation of DNA-dependent processes like transcription. Trimethylation of the lysine 4 (H3K4me3) or of lysine 36 (H3K36me3) on histone H3 is necessary for transcriptional activation and elongation, respectively, whereas trimethylation of lysine 9 or of lysine 27 on H3 (H3K9me3, H3K27me3) is associated with transcriptional silencing. In the latter case, H3K9me3 and H3K27me3 marks attract the structural chromodomain-containing proteins HP1 and Polycomb (PC) responsible for the formation of constitutive and facultative heterochromatin, respectively (Lachner *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002), two distinct condensed chromatin states. Genome-wide mapping studies of histone modifications that combine chromatin immunoprecipitation (ChIP) with microarrays or direct sequencing have allowed the high-resolution mapping of many histone marks (Barski *et al.*, 2007). These studies have shown that repressive and active marks are not always mutually exclusive (Bernstein *et al.*, 2006). Indeed, both H3K4me3 and H3K27me3 have been observed in the so-called bivalent domain on developmentally important gene loci in embryonic stem (ES) cells, indicating that an epigenetic state can be primed for either activation or repression. In the same way, many other undiscovered bivalent (or multivalent) methylation states are likely to exist in the cell. Besides its important function in transcriptional regulation, lysine methylation marks also play

crucial roles in DNA replication and DNA repair throughout cell cycle (Tardat *et al.*, 2010).

Until recently, methylation of K was considered to be an irreversible mark and was supposed to be essential for transmission of chromatin states during the cell cycle. However, it has recently been demonstrated that lysine methylation is dynamically regulated by specific lysine demethylases (KDM). The first KDM identified, called LSD1 (lysine specific demethylase 1), was, originally found in a transcriptional co-repressor complex important for repression of neuronal genes in non-neuronal cells. This enzyme is able to catalyse de-methylation of H3K4me1/2 (Shi *et al.*, 2004) that leads to transcriptional repression. Since the discovery of LSD1, an exponential number of KDM specific for other lysine marks as well as another class of de-methylase (Jumonji Class), more specific for tri-methylated marks, have been identified (Shi *et al.*, 2007). These novel enzymes that are frequently mutated in cancers are now under intense investigations as they could in the future serve as new drug targets in therapeutics.

Histone phosphorylation

The phosphorylation of histone H3 at serine 10 has been particularly well studied. This epigenetic mark appears at two distinct cell-cycle stages. During G2 a wave of H3 phosphorylation initiates in pericentromeric domains and then proceeds down the chromosome arms. This contributes to mitotic chromosome condensation and chromosome segregation (Hsu *et al.*, 2000). Conversely, during the immediate-early response of mammalian cells to mitogens, H3 is transiently phosphorylated and this correlates with the induction of expression of immediate-early genes (Labrador and Corces, 2003). The dual function of the same epigenetic mark underlines the variability of interpretation for the same epigenetic mark according to the cell state. This effect is due to the specific interplay with other epigenetic marks in these two distinct cell-cycle stages. In the case of chromosome condensation in mitosis, together with H3Ser10P, other phosphorylated marks on the serine 28 and on threonine 11 of histone H3 facilitate the recruitment of condensins and subsequent chromosome segregation.

Histone ubiquitination

Protein mono- or polyubiquitination modification plays a critical role in a variety of cellular processes including protein degradation, cell cycle regulation, protein trafficking, stress response, signal transduction and transcriptional regulation (Zhang, 2003). To date, two sites of ubiquitination have been characterised on histones. Ubiquitination on lysine 123 of histone H2B (H2BK123ub) that occurs on active genes and ubiquitination on lysine 119 of histone H2A (H2AK119ub) is important for Polycomb group (PcG) dependent silencing, for X inactivation in mammals or for DNA damage response. H2BK123ub is an example that illustrates the interplay between different histone modifications. Indeed, this ubiquitinated form of H2B serves as a docking platform for the recruitment of Set1-COMPASS that drives H3K4 methylation and Dot1 responsible for H3K79 methylation (Vitaliano-Prunier *et al.*, 2008).

Concerning H2AK119ub, catalysis is principally driven by the E3 ligase Ring1b protein a component of the PcG complex PRC1 (De Napoles *et al.*, 2004). However, characterisation of others enzymes responsible for H2A and/or H2B ubiquitination showed that this specific epigenetic modification can also orchestrate the DNA damage response by inducing checkpoint protein assembly (Ginjala *et al.*, 2011). As other histone modifications, ubiquitination of histones is dynamically controlled by the action of deubiquitinating enzymes (DUB) that are able to remove ubiquitin moiety. Dynamic balance of histone ubiquitination is necessary for fine-tuning of transcriptional regulation. Indeed, Ubp8-dependent H2B deubiquitination is supposed to downregulate H3K4me3 by Set1 and at the same time to promote the acquisition of the elongating mark H3K36me3 deposited by Set2 (Henry *et al.*, 2003).

Regulation of Chromatin in the Nucleus

Based on their morphology in optical and electronic microscopy, two types of chromatins have been rapidly defined: euchromatin, which corresponds to sites of 'opened' or 'less condensed' chromatin and active regions, and heterochromatin, which corresponds to highly condensed chromatin and silenced regions. Within heterochromatin, according to specific epigenetic features (H3K9me3 or H3K27me3) and the type of structural chromatin proteins recruited, two subdomains have been described. One, called facultative heterochromatin, corresponds to PcG-dependent silencing domains, and the other, called constitutive heterochromatin, occurs where the DNA sequence is composed of large tandem arrays of simple, repetitive sequences, and corresponds to HP1-binding domains. Interestingly, more and more data suggest that the correlation between chromatin structure and gene function is less simple than first thought. Indeed, a global analysis of chromatin fractionated into open, bulk and closed chromatin fibres showed that the chromatin structure is more closely linked to the nature of the gene than to its activation status. Open chromatin fibres correlate with the highest gene density, but not with gene expression levels, whereas compact chromatin fibres generally have a low gene density, but can also contain active genes. This means that it is not the location of a gene in heterochromatic or euchromatic chromatin domains that regulates gene activity, but rather, other factors such as epigenetic modifications. An integrative analysis of genome-wide binding maps of 53 chromatin components in *Drosophila* cells revealed that five principal chromatin types could be distinguished. Each type of chromatin can be defined by a unique combination of proteins and corresponds to specific subdomains that can extend over 100 kb. Apart from the PcG and HP1 subdomains, a novel repressive chromatin type composed of highly repetitive elements, and two types of more opened chromatin (euchromatin) that differ mainly in their expression levels have been found to regulate different sets of genes. These different subdomains of chromatin organisation were then proposed to target-specific DNA-binding factors to specific genomic regions (Filion *et al.*, 2010). **See also: Eukaryotic Chromosomes; Heterochromatin and Euchromatin**

Spatial Organisation of the Genome

A large number of experiments suggest that precise spatial organisation of the genome in the cell nucleus could contribute to the maintenance of proper patterns of gene expression across cell generations. Indeed, microscopy techniques such as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) that allow to visualise DNA into the nucleus and more recently the different molecular approaches such as chromosome capture conformation (3C and its high throughput derivatives) that can determine the frequency of interactions between DNA fragments, demonstrated a striking correlation between higher-order chromatin (or chromosome) organisation in the nucleus and underlying gene expression. Indeed, chromosomes fold into discrete chromosome territories (CT) that occupy precise localisation into the nuclear space. Moreover, each chromosome is compartmentalised into large domains that segregate according to their transcriptional activity and/or their timing of DNA replication. Finally, each chromosomal compartment is folded into specific blocks of dense chromatin now called topological associated domains (TAD) that partition genome into distinct functional units along chromosomes.

Nonrandom organisation of chromosomes

The study of cell division in *Salamander* provided the first evidence that chromosomes are spatially organised within the nucleus. In this configuration, named 'Rabl Configuration', centromeres and telomeres of each chromosome occupy symmetrically opposed positions in the nucleus, being positioned at the apical and basal poles, respectively (**Figure 2a,b**). This specific chromosome organisation, which resembles that occurring during the mitotic anaphase, was later observed in different organisms and is particularly pronounced in early stages of *Drosophila* development (Marshall *et al.*, 1997). In mammals, chromosomes adopt a completely different configuration. They occupy different and distinct positions called CT (**Figure 2c**). This nonrandom organisation of chromosomes was elegantly demonstrated using UV-inducing DNA damage, and subsequent analysis of damage sites on metaphase chromosomes. DNA damage was preferentially observed in discrete chromosomal regions, reinforcing the idea that chromosomes adopt a specific nuclear shape (Cremer *et al.*, 1982). Consolidated by the development of the 'chromosome painting' technique, which allows the visualisation of specific chromosomes it has been possible to show that CT are positioned in the nucleus according to specific criteria. Gene density on each chromosome influences its radial positioning in the nucleus (**Figure 2c**). For example, chromosome 18 (gene-poor) is located more frequently at the nuclear periphery than chromosome 19 (gene rich) (Croft *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2001). This specific nuclear positioning has been later confirmed by the characterisation of DNA regions that are able to interact with Lamin, a component of nuclear envelope (Guelen *et al.*, 2008). These large DNA sequences also called LAD (for lamin associated domain) correspond to gene poor regions of chromosomes that

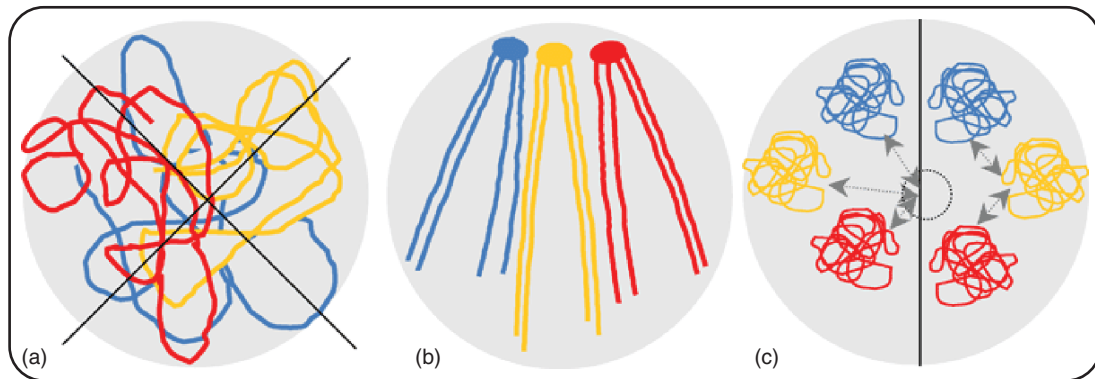


Figure 2 Different chromosome organisations. (a) Chromosomes do not globally intermingle in the nucleus during interphase, (b) Rab1 configuration of chromosomes. Centromeres of each chromosome are connected at the apical pole of the nucleus and formed the chromocenter, whereas telomeres are preferentially found in the basal pole of the nucleus, (c) radial (left) and relative (right) positioning of human chromosomes. In the radial positioning, distances are measured according to the centre of the nucleus (arrows), and in the relative positioning, distances are measured between chromosomes (arrows).

are preferentially enriched in repressive marks such as H3K9me3. During differentiation, radial positioning may change according to the expression of genes. Interestingly, it has been elegantly shown that movement of genes toward nuclear envelope upon their expression is mainly dependent on chromatin remodelling rather than on active transcription (Therizols *et al.*, 2014).

Relative positioning of chromosomes with respect to the other chromosomes is also not completely random. A striking example is observed in *Drosophila*, where homologous chromosomes in somatic cells tend to pair, a specific nuclear organisation that has important consequences on the regulation of genes (Duncan, 2002). In mammals, homologous chromosomes do not pair. However, relative positioning of each chromosome is nevertheless not completely random. This chromosomal organisation, which changes according to tissue specific chromosomal patterns of expression (Figure 2c), is thought to favour the chromosomal translocations frequently observed in cancer cells (Parada *et al.*, 2004). **See also: Homologous DNA Interactions in Interphase; Spatial Organization of Interphase Nucleus; Cell Nucleus; Chromosomes and Chromatin**

Non-random loci positioning

Since chromosomes are not randomly arranged in the nucleus, it is not surprising that the gene loci that they harbour are also positioned in a nonrandom manner. CT has been considered as a zone of exclusion for large multiprotein complexes necessary for gene regulation, suggesting that when a locus needs to be regulated it should localise to the surface (or even outside) of the CT. Indeed, a large number of studies have shown that a specific delocalisation of loci occurs upon transcription, forming specific looping out of the CT. Through the analysis of the developmentally regulated locus Hox-B, it has been proposed that deposition of active histone marks, such as H3K4me2 or H3K9ac would favour the acquisition of a decondensed structure that could participate in its delocalisation (Chambeyron and Bickmore, 2004) (Figure 3a). However, it remains unclear whether chromatin decondensation is an absolute prerequisite to the looping out of the CT, since

delocalised Hox-D clusters do not always display a decondensed structure (Morey *et al.*, 2007). In contrast to these observations, some actively transcribed loci have been found inside the CT (Ferrai *et al.*, 2010). Highly resolved fluorescent microscopy has revealed that the CT is not a solid structure but adopts a sponge-like structure in which DNA-free channels facilitate proteins intrusions (Albiez *et al.*, 2006).

A consequence of the looping out from CT is that a certain degree of chromosomal intermingling is possible in the cell nucleus, which could facilitate inter-chromosomal connections (Figure 3b). For example, ribosomal-ribonucleic acid (RNA) encoding DNA, located on the short arms of chromosomes 13, 14, 15, 21 and 22, has been shown to interconnect in the nucleus to form the nucleolus (Figure 3c). In a similar fashion, preferential co-localisations of co-regulated genes into RNA polymerase factories (Schoenfelder *et al.*, 2010), or co-localisation of co-repressed genes into PcG nuclear bodies have been observed (Figure 3d). These long-distance chromosomal interactions also called ‘chromosome kissing’ are present in different organisms where they participate in the fine-tuning of gene regulation.

Functional organisation of chromatin: topological associated domains

Thanks to the development of innovative molecular approaches, such as 3C until its more recent coupling with high-throughput sequencing (Hi-C) (Belton *et al.*, 2012), nuclear conformation of chromatin has been systematically studied in different model organisms (Nora *et al.*, 2012; Dixon *et al.*, 2012; Sexton *et al.*, 2012; Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Metazoan chromosomes can be subdivided into two large compartments: A compartment (resembling euchromatin) that is enriched in genes, in active histone modifications like H3K4me3 and more active at the transcription level. In contrast the second compartment is considered as an inactive compartment (resembling heterochromatin) as it is rather enriched in H3K9me3 or H3K27me3 and correspond to late replicating domains (Ryba *et al.*, 2010) (Figure 4a).

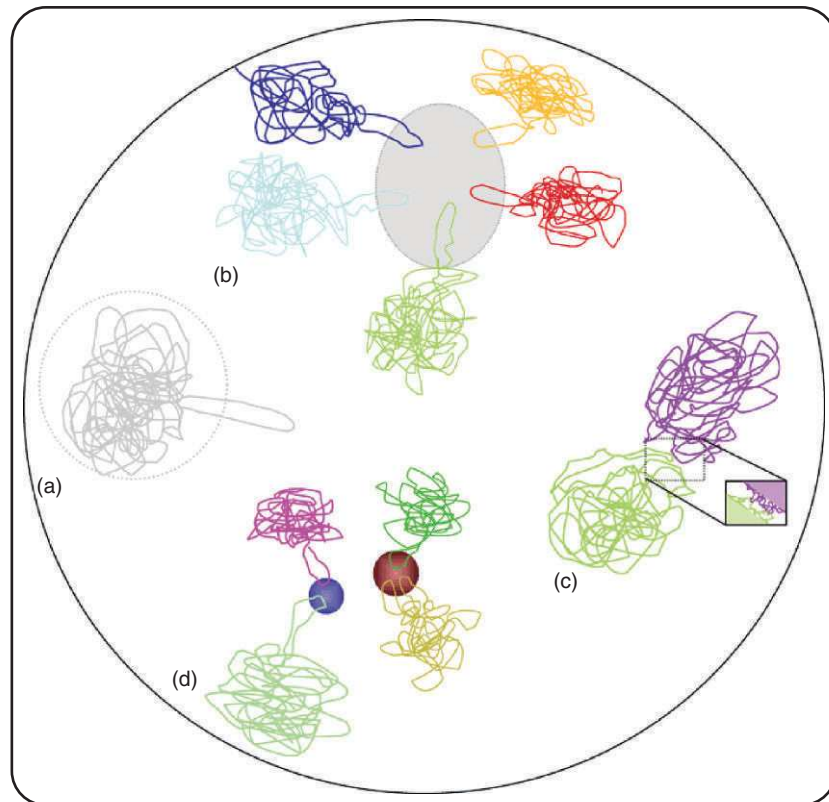


Figure 3 Nuclear positioning of genes: (a) looping out of specific locus upon activation, (b) concentration of rDNA loci located on different chromosomes to form nucleolus, (c) natural intermingling between different chromosome territories and (d) long-distance chromosomal interactions between two loci into repressive bodies (blue, e.g. Polycomb bodies), or into active RNA factories (red).

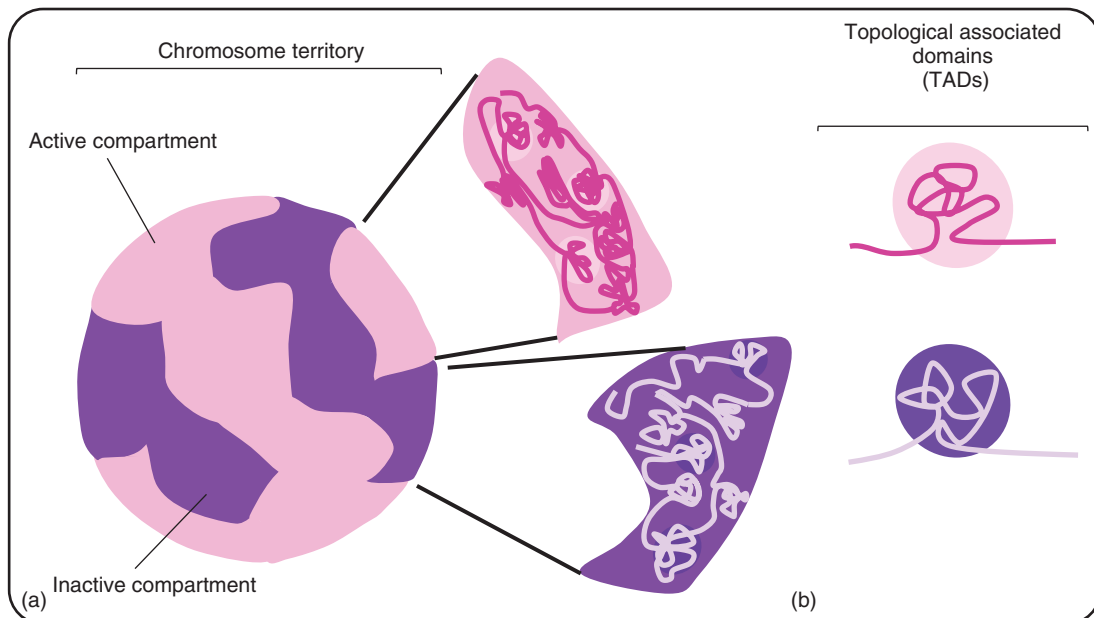


Figure 4 Functional organisation of chromatin in the nucleus. (a) Chromosome territory is composed of active (pink) and inactive (purple) compartment. (b) Each chromatin compartment is organised in sub-regions of important genomic interactions. These regions also called topological associated domains (TADs) are necessary for partitioning genomic DNA of each chromosome.

More precisely, each compartment (active or inactive) folds into distinct specific blocks of chromatin that have been called TADs. TADs define different modules of strong genomic interactions along chromosomes that are thought to precisely demarcate each chromosome into specific functional domains (**Figure 4b**). Indeed, TADs correlate well with specific epigenetic features. In *Drosophila*, TADs present in an active compartment are enriched in H3K4me3 and/or H3K36me3 whereas TADs in an inactive compartment are enriched in H3K9me3 or H3K27me3. TADs were shown to bring together genes located at distant sites to favour their co-regulation (Noordermeer *et al.*, 2014). Moreover, TADs organisation correlates nicely with the replication timing of chromosomes (Pope *et al.*, 2014). Finally, a comparative analysis of TADs organisation in different human and mouse cell lines revealed that TAD structures are similar from one cell type to another and tend to be conserved between the human and the mouse genome, thus suggesting that TADs could reflect a conserved mode for nuclear chromatin organisation (Dixon *et al.*, 2012). It is important to note that this kind of chromosomal organisation seems to be specific to higher eukaryotes and animal species. Indeed, it is not observed in bacteria, in yeast or in plants.

Since TAD organisation does not seem to be random, attention has also been focused on the features corresponding to borders of TADs. TADs borders (or boundaries) correspond mainly to active housekeeping genes and they are enriched in boundary proteins such as CTCF, in proteins of the Cohesin complex and in proteins of the mediator complex involved in transcription activation (Phillips-Cremins *et al.*, 2013). The precise function of these proteins at TADs borders is still unknown. It seemed that CTCF could play a direct structural role in TAD organisation rather than in the precise demarcation of TADs. In the same way, a depletion of a specific TAD border sequence on the X chromosome in mammals, led to TAD re-organisation and only to partial fusions TADs. Dynamic regulation of chromatin during cell differentiation seems to occur mainly inside each TAD generating different sub-TADs conformation (Noordermeer *et al.*, 2014).

Conclusion

In summary, the highly dynamic structure of chromatin represents an extremely important and exciting field of research aiming to understand how cells can adapt to the plasticity of gene expression imposed by the development of multicellular organism. Thanks to systematic high-throughput technologies, together with *in vivo* microscopy and highly resolutive molecular techniques, a clearer picture of nuclear chromosome organisation has recently emerged. In the future, it will be to clarify how such a specific chromatin organisation is dynamically controlled during development and to determine to which extent a mis-organisation of chromatin or a deregulation of chromatin domain organisation could lead to diseases.

References

- Albiez H, Cremer M, Tiberi C, *et al.* (2006) Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Research* **14** (7): 707–733.
- Bannister AJ and Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21** (3): 381–395.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, *et al.* (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129** (4): 823–837.
- Belton JM, McCord RP, Gibcus JH, *et al.* (2012) Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods* **58** (3): 268–276.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, *et al.* (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125** (2): 315–326.
- Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, *et al.* (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Human Molecular Genetics* **10** (3): 211–219.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, *et al.* (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84** (6): 843–851.
- Cao R, Wang L, Wang H, *et al.* (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298** (5595): 1039–1043.
- Cavalli G and Misteli T (2013) Functional implications of genome topology. *Nature Structural and Molecular Biology* **20** (3): 290–299.
- Chambeyron S and Bickmore WA (2004) Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes and Development* **18** (10): 1119–1130.
- Cremer T, Cremer C, Schneider T, *et al.* (1982) Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Human Genetics* **62** (3): 201–209.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, *et al.* (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *Journal of Cell Biology* **145** (6): 1119–1131.
- De Napolés M, Mermoud JE, Wakao R, *et al.* (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Developmental Cell* **7** (5): 663–676.
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, *et al.* (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485** (7398): 376–380.
- Duncan IW (2002) Transvection effects in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics* **36**: 521–556.
- Ferrai C, Xie SQ, Luraghi P, *et al.* (2010) Poised transcription factories prime silent uPA gene prior to activation. *PLoS Biology* **8** (1): e1000270.
- Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, *et al.* (2010) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* **143** (2): 212–224.
- Ginjala V, Nacerddine K, Kulkarni A, *et al.* (2011) BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Molecular and Cellular Biology* **31** (10): 1972–1982.
- Guelen L, Pagie L, Brasset E, *et al.* (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* **453**: 948–951.
- Hassan AH, Neely KE and Workman JL (2001) Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* **104** (6): 817–827.

- Henry KW, Wyce A, Lo WS, *et al.* (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes and Development* **17** (21): 2648–2663.
- Hsu JY, Sun ZW, Li X, *et al.* (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102** (3): 279–291.
- Huang S, Litt M and Felsenfeld G (2005) Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes and Development* **19** (16): 1885–1893.
- Imhof A and Wolffe AP (1998) Transcription: gene control by targeted histone acetylation. *Current Biology* **8** (12): R422–R424. Review.
- Jenuwein T and Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293** (5532): 1074–1080. Review.
- Labrador M and Corces VG (2003) Phosphorylation of histone H3 during transcriptional activation depends on promoter structure. *Genes and Development* **17** (1): 43–58.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, *et al.* (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410** (6824): 116–120.
- Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, *et al.* (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* **326** (5950): 289–293.
- Litt M, Qiu Y and Huang S (2009) Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Bioscience Reports* **29** (2): 131–141.
- Marshall WF, Fung JC and Sedat JW (1997) Deconstructing the nucleus: global architecture from local interactions. *Current Opinion in Genetics and Development* **7** (2): 259–263. Review.
- Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, *et al.* (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87** (7): 1261–1270.
- Morey C, Da Silva NR, Perry P and Bickmore WA (2007) Nuclear reorganisation and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to Hox gene activation. *Development* **134** (5): 909–919.
- Noordermeer D, Leleu M, Schorderet P, *et al.* (2014) Temporal dynamics and developmental memory of 3D chromatin architecture at Hox gene loci. *eLife* **3**: e02557.
- Nora EP, Lajoie BR, Schulz EG, *et al.* (2012) Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* **485** (7398): 381–385.
- Parada LA, McQueen PG and Misteli T (2004) Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biology* **5** (7): R44.
- Phillips-Cremins JE, Sauria ME, Sanyal A, *et al.* (2013) Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment. *Cell* **153** (6): 1281–1295.
- Pope BD, Ryba T, Dileep V, *et al.* (2014) Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* **515** (7527): 402–405.
- Rothbart SB and Strahl BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta* **1839** (8): 627–643. Review.
- Ryba T, Hiratani I, Lu J, *et al.* (2010) Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Research* **20** (6): 761–770.
- Schoenfelder S, Sexton T, Chakalova L, *et al.* (2010) Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nature Genetics* **42** (1): 53–61.
- Seto E and Yoshida M (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6** (4): a018713. Review.
- Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, *et al.* (2012) Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell* **148** (3): 458–472.
- Shi Y, Lan F, Matson C, *et al.* (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119** (7): 941–953.
- Shi Y, Lan F, Matson C, *et al.* (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Molecular Cell* **25** (1): 1–14. Review.
- Tardat M, Brustel J, Kirsh O, *et al.* (2010) The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nature Cell Biology* **12** (11): 1086–1093.
- Therizols P, Illingworth RS, Courilleau C, *et al.* (2014) Chromatin decondensation is sufficient to alter nuclear organization in embryonic stem cells. *Science* **346** (6214): 1238–1242.
- Tessarz P and Kouzarides T (2014) Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15** (11): 703–708. Review.
- Vitaliano-Prunier A, Menant A, Hobeika M, *et al.* (2008) Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation. *Nature Cell Biology* **10** (11): 1365–1371.
- Yen CY, Huang HW, Shu CW, *et al.* (2016) DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. *Cancer Letters* **373** (2): 185–192. Review.
- Zhang Y (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes and Development* **17** (22): 2733–2740. Review.
- Zink LM and Hake SB (2016) Histone variants: nuclear function and disease. *Current Opinion in Genetics and Development* **37**: 82–89. Review.

Further Reading

- Allis D, Jenuwein T and Reinberg D (2007) *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Elgin SCR and Workman JL (2000) *Chromatin Structure and Gene Expression*, 2nd edn. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Gilbert DM and Fraser P (2015) Three dimensional organization of the nucleus: adding DNA sequences to the big picture. *Genome Biology* **16**: 181 Special issue. DOI: 10.1186/s13059-015-0751-9.
- Roger D Kornberg and Yahli Lorch (2007) Focus on Chromatin: Chromatin rules. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**: 986–988. DOI: 10.1038/nsmb1107-986-988.
- Turner BM (2007) Chromatin and Gene Regulation: Mechanisms in Epigenetics. 10.1002/9780470750629
- Van Steensel B and Dekker J (2010) Genomics tools for unraveling chromosome architecture. *Nature Biotechnology* **28** (10): 1089–1095.
- Wolffe A (1998) *Chromatin: Structure and Function*, 3rd edn. London, UK: Academic Press.

LISTE DES ABREVIATIONS

53BP1 : p53-Binding protein 1	MBT : Malignant brain tumor
ADN : Acide desoxyribonucléique	MCM : Mini-chromosome maintenance
APC : Anaphase promoting complex	MDC1 : Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
ASF1 : Anti-silencing function protein 1	MEFs : Mouse embryonic fibroblasts
ATM : ataxia telangiectasia mutated	MOF : Males-absent on the first protein
ATP : Adénosine triphosphate	MRN : Complexe MRE11–Rad50–NBS1
ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3 related	NAP1 : Nucleosome assembly protein 1-like 1-A
BET : Bromodomain and extra-terminal family protein	NHEJ : Re-ligation par jonction d'extrémités non homologues
BRCA : Breast Cancer 1	NPAT : Nuclear protein, ataxia–telangiectasia locus
CAF-1 : Chromatin assembly factor 1	NuRD : Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex
CDC : Cell division cycle	ORC : Origin recognition complex
CDK : Cyclin-dependent kinase	ORCA/LRWD1 : ORC associated, Leucine-rich repeats and WD40 repeat domain containing protein 1
CDT1 : CDC10 dependent transcript 1	P53 : 53kDa protein
ChIP : Immunoprécipitation de chromatine	P97/VCP : ATP-driven chaperone valosin-containing protein
CMG : CDC45, MCM2–7, GINS	PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase
DDK : Dbf4-dependent kinase	PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
DDR : Réponse aux dommages ADN	PHF8 : PHD finger protein 8
DSB : Cassure double brin de l'ADN	PIP : PCNA interacting protein
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse	PP1 : Protein phosphatase 1
EZH2 : Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit	PP2A : Protein phosphatase 2A
FACT : Facilitating chromatin transcription complex	pRB : Retinoblastoma protéine
GCN5 : General control of amino acid synthesis protein 5-like 2	PRC : Polycomb repressive complex
GINS : go-ichi-ni-san, soit 5,1,2,3 en japonais en référence aux 4 sous-unités du complexe: Sld5, Psf1, Psf2, and Psf3	Pre-RC : complexe de pré-réplication
GLP : G9a-like protein	PR-Set7 : SET domain-containing protein 7
H3K9/27/...: Lysines 9/27 de l'histone H3	PTM : modification post-traductionnelle
H4K4/16/20/...: Lysines 4/16/20 de l'histone H4	RPA : Replication protein A
HAT : Histone acétyl transférase	SAM : S-adenosyl methionine
HBO1 : Histone acetyltransférase binding to ORC1	SET : Suvar; Enhancer of Zeste; Trothorax
HBP : Hairpin binding protein	SETDB1 : SET domain bifurcated 1
HDAC : Histone déacétylase	SMARCD1 : SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1
HDACi : Inhibiteur de HDAC	SMC : Structural maintenance of chromosomes
HDM : Histone déméthylase	SNF2 : Sucrose non fermentation 2
HKMT : Histone lysine méthyl transférase	Suv4-20h1/2 : Suppressor of variegation 4-20 homolog 1/2
HMT : Histone méthyltransférase	SV40 : Simian virus 40
HP1 : Heterochromatin protein 1	SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermenta
HR : Recombinaison homologue	
KDM : Lysines deméthylase	
KMT : Lysine méthyltransférase	
KO : Knock-out	
L3MBTL1 : Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, T., Shibata, E., Park, J., Jha, S., Karnani, N., and Dutta, A. (2010). CRL4(Cdt2) regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Mol. Cell* *40*, 9–21.
- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011a). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* *25*, 863–874.
- Abe, T., Sugimura, K., Hosono, Y., Takami, Y., Akita, M., Yoshimura, A., Tada, S., Nakayama, T., Murofushi, H., Okumura, K., et al. (2011b). The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates. *J. Biol. Chem.* *286*, 30504–30512.
- Abu-Farha, M., Lanouette, S., Elisma, F., Tremblay, V., Butson, J., Figeys, D., and Couture, J.-F. (2011). Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J. Mol. Cell Biol.* *3*, 301–308.
- Acs, K., Luijsterburg, M.S., Ackermann, L., Salomons, F.A., Hoppe, T., and Dantuma, N.P. (2011). The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1345–1350.
- Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C., and Carmena, M. (2001). Essential Roles of *Drosophila* Inner Centromere Protein (Incenp) and Aurora B in Histone H3 Phosphorylation, Metaphase Chromosome Alignment, Kinetochore Disjunction, and Chromosome Segregation. *J. Cell Biol.* *153*, 865.
- Ait-Si-Ali, S., Guasconi, V., Fritsch, L., Yahi, H., Sekhri, R., Naguibneva, I., Robin, P., Cabon, F., Polesskaya, A., and Harel-Bellan, A. (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *EMBO J.* *23*, 605–615.
- Alabert, C., and Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 153–167.
- Alabert, C., Barth, T.K., Reverón-Gómez, N., Sidoli, S., Schmidt, A., Jensen, O.N., Imhof, A., and Groth, A. (2015). Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes Dev.* *29*, 585–590.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). The Initiation and Completion of DNA Replication in Chromosomes.
- Aller, G.S.V., Reynoird, N., Barbash, O., Huddleston, M., Liu, S., Zmoos, A.-F., McDevitt, P., Sinnamon, R., Le, B., Mas, G., et al. (2012). Smyd3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation. *Epigenetics* *7*, 340–343.
- Almouzni, G., and Cedar, H. (2016). Maintenance of Epigenetic Information. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* *410*, 120–124.

- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S.C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-Interacting Proteins Regulated by DNA and Histone Methylation. *Cell* 143, 470–484.
- Beck, D.B., Oda, H., Shen, S.S., and Reinberg, D. (2012a). PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev.* 26, 325–337.
- Beck, D.B., Burton, A., Oda, H., Ziegler-Birling, C., Torres-Padilla, M.-E., and Reinberg, D. (2012b). The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h. *Genes Dev.* 26, 2580–2589.
- Behbahani, T.E., Kahl, P., von der Gathen, J., Heukamp, L.C., Baumann, C., Gütgemann, I., Walter, B., Hofstädter, F., Bastian, P.J., von Ruecker, A., et al. (2012). Alterations of global histone H4K20 methylation during prostate carcinogenesis. *BMC Urol.* 12, 5.
- Benamar, M., Guessous, F., Du, K., Corbett, P., Obeid, J., Gioeli, D., Slingluff, C.L., and Abbas, T. (2016). Inactivation of the CRL4-CDT2-SET8/p21 ubiquitylation and degradation axis underlies the therapeutic efficacy of pevonedistat in melanoma. *EBioMedicine* 10, 85–100.
- Bhaskara, S., Knutson, S.K., Jiang, G., Chandrasekharan, M.B., Wilson, A.J., Zheng, S., Yenamandra, A., Locke, K., Yuan, J.-L., Bonine-Summers, A.R., et al. (2010). Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell* 18, 436–447.
- Blum, G., Ibáñez, G., Rao, X., Shum, D., Radu, C., Djaballah, H., Rice, J.C., and Luo, M. (2014). Small-molecule inhibitors of SETD8 with cellular activity. *ACS Chem. Biol.* 9, 2471–2478.
- Bonne-Andrea, C., Wong, M.L., and Alberts, B.M. (1990). In vitro replication through nucleosomes without histone displacement. *Nature* 343, 719–726.
- Booth, D.G., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C.P., Tollervey, D., Earnshaw, W.C., et al. (2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *ELife* 3.
- Boros, J., Arnoult, N., Stroobant, V., Collet, J.-F., and Decottignies, A. (2014). Polycomb Repressive Complex 2 and H3K27me3 Cooperate with H3K9 Methylation To Maintain Heterochromatin Protein 1a at Chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 34, 3662–3674.
- Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.-E., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361–1373.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597–601.
- Broeck, A.V.D., Brambilla, E., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., Khochbin, S., and Gazzeri, S. (2008). Loss of Histone H4K20 Trimethylation Occurs in Preneoplasia and Influences Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 7237–7245.

- Brown, M.A., Sims, R.J., Gottlieb, P.D., and Tucker, P.W. (2006). Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol. Cancer* 5, 26.
- Brustel, J., Tardat, M., Kirsh, O., Grimaud, C., and Julien, E. (2011). Coupling mitosis to DNA replication: The emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol.* 21, 452–460.
- Brustel, J., Kirstein, N., Izard, F., Grimaud, C., Prorok, P., Cayrou, C., Schotta, G., Abdelsamie, A.F., Déjardin, J., Méchali, M., et al. (2017). Histone H4K20 tri-methylation at late-firing origins ensures timely heterochromatin replication. *EMBO J.*
- Buenrostro, J., Wu, B., Chang, H., and Greenleaf, W. (2015). ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Ed. Frederick M Ausubel AI 109, 21.29.1-21.29.9.
- Burgess, R.J., and Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 14–22.
- Burke, T.W., Cook, J.G., Asano, M., and Nevins, J.R. (2001). Replication Factors MCM2 and ORC1 Interact with the Histone Acetyltransferase HBO1. *J. Biol. Chem.* 276, 15397–15408.
- Cadoret, J.-C., Meisch, F., Hassan-Zadeh, V., Luyten, I., Guillet, C., Duret, L., Quesneville, H., and Prioleau, M.-N. (2008). Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15837–15842.
- Campanero, M.R., Armstrong, M.I., and Flemington, E.K. (2000). CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6481–6486.
- Campbell, J.E., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Warholic, N.M., Keilhack, H., Wigle, T.J., Raimondi, A., Klaus, C.R., Rioux, N., Yokoi, A., et al. (2015). EPZ011989, A Potent, Orally-Available EZH2 Inhibitor with Robust in Vivo Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 491–495.
- Cardoso, M.C., Leonhardt, H., and Nadal-Ginard, B. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* 74, 979–992.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Vigneron, A., Stanojic, S., Ganier, O., Peiffer, I., Rivals, E., Puy, A., Laurent-Chabalier, S., Desprat, R., et al. (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res.* 21, 1438–1449.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D’Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 26, 52–64.
- Centore, R.C., Havens, C.G., Manning, A.L., Li, J.-M., Flynn, R.L., Tse, A., Jin, J., Dyson, N.J., Walter, J.C., and Zou, L. (2010). CRL4(Cdt2)-mediated destruction of the histone methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase. *Mol. Cell* 40, 22–33.
- Chambers, A.L., and Downs, J.A. (2012). The RSC and INO80 chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 110, 229–261.
- Chan, K.M., Zhang, H., Malureanu, L., van Deursen, J., and Zhang, Z. (2011). Diverse factors are involved in maintaining X chromosome inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16699–16704.

- Chang, H.-W., Pandey, M., Kulaeva, O.I., Patel, S.S., and Studitsky, V.M. (2016). Overcoming a nucleosomal barrier to replication. *Sci. Adv.* *2*, e1601865.
- Chan-Penebre, E., Armstrong, K., Drew, A., Grassian, A.R., Feldman, I., Knutson, S.K., Kuplast-Barr, K., Roche, M., Campbell, J., Ho, P., et al. (2017). Selective Killing of SMARCA2- and SMARCA4-deficient Small Cell Carcinoma of the Ovary, Hypercalcemic Type Cells by Inhibition of EZH2: In Vitro and In Vivo Preclinical Models. *Mol. Cancer Ther.* *16*, 850–860.
- Chen, C.-C., Carson, J.J., Feser, J., Tamburini, B., Zabaronick, S., Linger, J., and Tyler, J.K. (2008). Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair. *Cell* *134*, 231–243.
- Cheng, D., Valente, S., Castellano, S., Sbardella, G., Di Santo, R., Costi, R., Bedford, M.T., and Mai, A. (2011). Novel 3,5-bis(bromohydroxybenzylidene)piperidin-4-ones as coactivator-associated arginine methyltransferase 1 inhibitors: enzyme selectivity and cellular activity. *J. Med. Chem.* *54*, 4928–4932.
- Chernikova, S.B., Razorenova, O.V., Higgins, J.P., Sishc, B.J., Nicolau, M., Dorth, J.A., Chernikova, D.A., Kwok, S., Brooks, J.D., Bailey, S.M., et al. (2012). Deficiency in mammalian histone H2B ubiquitin ligase Bre1 (Rnf20/Rnf40) leads to replication stress and chromosomal instability. *Cancer Res.* *72*, 2111–2119.
- Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to Chromatin through Histone Modifications. *Cell* *103*, 263–271.
- Chiappella, A., Santambrogio, E., Castellino, A., Nicolosi, M., and Vitolo, U. (2017). Integrating novel drugs to chemoimmunotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. *Expert Rev. Hematol.* 1–9.
- Chibazakura, T., Kamachi, K., Ohara, M., Tane, S., Yoshikawa, H., and Roberts, J.M. (2011). Cyclin A promotes S-phase entry via interaction with the replication licensing factor Mcm7. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 248–255.
- Comoglio, F., Schlumpf, T., Schmid, V., Rohs, R., Beisel, C., and Paro, R. (2015). High-resolution profiling of *Drosophila* replication start sites reveals a DNA shape and chromatin signature of metazoan origins. *Cell Rep.* *11*, 821–834.
- Congdon, L.M., Houston, S.I., Veerappan, C.S., Spektor, T.M., and Rice, J.C. (2010). PR-Set7-mediated monomethylation of histone H4 lysine 20 at specific genomic regions induces transcriptional repression. *J. Cell. Biochem.* *110*, 609–619.
- Conti, C., Leo, E., Eichler, G.S., Sordet, O., Martin, M.M., Fan, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2010). Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage. *Cancer Res.* *70*, 4470–4480.
- Cornacchia, D., Dileep, V., Quivy, J.-P., Foti, R., Tili, F., Santarella-Mellwig, R., Antony, C., Almouzni, G., Gilbert, D.M., and Buonomo, S.B.C. (2012). Mouse Rif1 is a key regulator of the replication-timing programme in mammalian cells. *EMBO J.* *31*, 3678–3690.
- Corpet, A., De Koning, L., Toedling, J., Savignoni, A., Berger, F., Lemaître, C., O’Sullivan, R.J., Karlseder, J., Barillot, E., Asselain, B., et al. (2011). Asf1b, the necessary Asf1 isoform for proliferation, is predictive of outcome in breast cancer. *EMBO J.* *30*, 480–493.
- Costelloe, T., Louge, R., Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Martini, E., Khadaroo, B., Dubois, K., Wiegant, W.W., Thierry, A., Burma, S., et al. (2012). The yeast Fun30 and human SMARCA1 chromatin remodellers promote DNA end resection. *Nature* *489*, 581–584.

- Dai, J., Sullivan, B.A., and Higgins, J.M.G. (2006). Regulation of Mitotic Chromosome Cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev. Cell* *11*, 741–750.
- Daley, J.M., and Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 1380–1388.
- Dambacher, S., Hahn, M., and Schotta, G. (2013). The compact view on heterochromatin. *Cell Cycle Georget. Tex* *12*, 2925–2926.
- DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J.R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4215–4224.
- Dekker, J., and Mirny, L. (2016). The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication. *Cell* *164*, 1110–1121.
- Dellino, G.I., Cittaro, D., Piccioni, R., Luzi, L., Banfi, S., Segalla, S., Cesaroni, M., Mendoza-Maldonado, R., Giacca, M., and Pelicci, P.G. (2013). Genome-wide mapping of human DNA-replication origins: Levels of transcription at ORC1 sites regulate origin selection and replication timing. *Genome Res.* *23*, 1–11.
- DeRan, M., Pulvino, M., Greene, E., Su, C., and Zhao, J. (2008). Transcriptional Activation of Histone Genes Requires NPAT-Dependent Recruitment of TRRAP-Tip60 Complex to Histone Promoters during the G1/S Phase Transition. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 435–447.
- Devbhandari, S., Jiang, J., Kumar, C., Whitehouse, I., and Remus, D. (2017). Chromatin Constrains the Initiation and Elongation of DNA Replication. *Mol. Cell* *65*, 131–141.
- Dhami, G.K., Liu, H., Galka, M., Voss, C., Wei, R., Muranko, K., Kaneko, T., Cregan, S.P., Li, L., and Li, S.S.-C. (2013). Dynamic methylation of Numb by Set8 regulates its binding to p53 and apoptosis. *Mol. Cell* *50*, 565–576.
- Diffley, J.F.X. (2011). Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *366*, 3545.
- Ding, Q., and MacAlpine, D.M. (2010). Preferential re-replication of Drosophila heterochromatin in the absence of geminin. *PLoS Genet.* *6*, e1001112.
- DING, C., LI, R., PENG, J., LI, S., and GUO, Z. (2012). A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3' untranslated region of the SET8 gene is associated with the outcome of small-cell lung cancer. *Exp. Ther. Med.* *3*, 689–692.
- Djakbarova, U., Marzluff, W.F., and Köseoğlu, M.M. (2014). Translation regulation and proteasome mediated degradation cooperate to keep Stem-loop binding protein, a major player in histone mRNA metabolism, low in G1-phase. *J. Cell. Biochem.* *115*, 523–530.
- Dominski, Z., and Marzluff, W.F. (1999). Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* *239*, 1–14.
- Duan, Q., Chen, H., Costa, M., and Dai, W. (2008). Phosphorylation of H3S10 blocks the access of H3K9 by specific antibodies and histone methyltransferase. Implication in regulating chromatin dynamics and epigenetic inheritance during mitosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 33585–33590.
- Dulev, S., Tkach, J., Lin, S., and Batada, N.N. (2014). SET8 methyltransferase activity during the DNA double-strand break response is required for recruitment of 53BP1. *EMBO Rep.* *15*, 1163–1174.

- Dungrawala, H., and Cortez, D. (2015). Purification of proteins on newly synthesized DNA using iPOND. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1228, 123–131.
- Eberhart, A., Feodorova, Y., Song, C., Wanner, G., Kiseleva, E., Furukawa, T., Kimura, H., Schotta, G., Leonhardt, H., Joffe, B., et al. (2013). Epigenetics of eu- and heterochromatin in inverted and conventional nuclei from mouse retina. *Chromosome Res.* 21, 535–554.
- Elsheikh, S.E., Green, A.R., Rakha, E.A., Powe, D.G., Ahmed, R.A., Collins, H.M., Soria, D., Garibaldi, J.M., Paish, C.E., Ammar, A.A., et al. (2009). Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 69, 3802–3809.
- English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E.A., and Tyler, J.K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* 127, 495–508.
- ERKMANN, J.A., SÁNCHEZ, R., TREICHEL, N., MARZLUFF, W.F., and KUTAY, U. (2005). Nuclear export of metazoan replication-dependent histone mRNAs is dependent on RNA length and is mediated by TAP. *RNA* 11, 45–58.
- Escamilla-Del-Arenal, M., Rocha, S.T. da, and Heard, E. (2011). Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Hum. Genet.* 130, 307–327.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T.J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E.E., Stein, A., Woodcock, C.L., and Skoultchi, A.I. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* 123, 1199–1212.
- Farkash-Amar, S., and Simon, I. (2010). Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 18, 115–125.
- Fazio, T.G., and Panning, B. (2010). Condensin complexes regulate mitotic progression and interphase chromatin structure in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 188, 491–503.
- Fernandez-Vidal, A., Guitton-Sert, L., Cadoret, J.-C., Drac, M., Schwob, E., Baldacci, G., Cazaux, C., and Hoffmann, J.-S. (2014). A role for DNA polymerase θ in the timing of DNA replication. *Nat. Commun.* 5, ncomms5285.
- Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L.L., and Harel-Bellan, A. (2001). Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep.* 2, 794–799.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1–chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116–1122.
- FitzGerald, J.E., Grenon, M., and Lowndes, N.F. (2009). 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 897–904.
- Foreman, K.W., Brown, M., Park, F., Emtage, S., Harriss, J., Das, C., Zhu, L., Crew, A., Arnold, L., Shaaban, S., et al. (2011). Structural and Functional Profiling of the Human Histone Methyltransferase SMYD3. *PLOS ONE* 6, e22290.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., et al. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37, 391–400.

- Fritsch, L., Robin, P., Mathieu, J.R.R., Souidi, M., Hinaux, H., Rougeulle, C., Harel-Bellan, A., Ameyar-Zazoua, M., and Ait-Si-Ali, S. (2010). A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol. Cell* *37*, 46–56.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., and Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat. Genet.* *24*, 88–91.
- Galm, O., Wilop, S., Reichelt, J., Jost, E., Gehbauer, G., Herman, J.G., and Osieka, R. (2004). DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* *18*, 1687–1692.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D., and Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell Biol.* *8*, 358–366.
- Garapaty-Rao, S., Nasveschuk, C., Gagnon, A., Chan, E.Y., Sandy, P., Busby, J., Balasubramanian, S., Campbell, R., Zhao, F., Bergeron, L., et al. (2013). Identification of EZH2 and EZH1 small molecule inhibitors with selective impact on diffuse large B cell lymphoma cell growth. *Chem. Biol.* *20*, 1329–1339.
- García-Nieto, P.E., Schwartz, E.K., King, D.A., Paulsen, J., Collas, P., Herrera, R.E., and Morrison, A.J. (2017). Carcinogen susceptibility is regulated by genome architecture and predicts cancer mutagenesis. *EMBO J.*
- Gasparian, A.V., Burkhart, C.A., Purmal, A.A., Brodsky, L., Pal, M., Saranadasa, M., Bosykh, D.A., Commene, M., Guryanova, O.A., Pal, S., et al. (2011). Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF- κ B and activate p53 by targeting FACT. *Sci. Transl. Med.* *3*, 95ra74.
- Gasser, R., Koller, T., and Sogo, J.M. (1996). The stability of nucleosomes at the replication fork. *J. Mol. Biol.* *258*, 224–239.
- Gatchalian, J., Gallardo, C.M., Shinsky, S.A., Ospina, R.R., Liendo, A.M., Krajewski, K., Klein, B.J., Andrews, F.H., Strahl, B.D., M. van Wely, K.H., et al. (2016). Chromatin condensation and recruitment of PHD finger proteins to histone H3K4me3 are mutually exclusive. *Nucleic Acids Res.* *44*, 6102–6112.
- Ge, X.Q., and Blow, J.J. (2010). Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J. Cell Biol.* *191*, 1285–1297.
- Ge, Z., Nair, D., Guan, X., Rastogi, N., Freitas, M.A., and Parthun, M.R. (2013). Sites of Acetylation on Newly Synthesized Histone H4 Are Required for Chromatin Assembly and DNA Damage Response Signaling. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 3286–3298.
- Giet, R., and Glover, D.M. (2001). Drosophila Aurora B Kinase Is Required for Histone H3 Phosphorylation and Condensin Recruitment during Chromosome Condensation and to Organize the Central Spindle during Cytokinesis. *J. Cell Biol.* *152*, 669–682.
- Giri, S., and Prasanth, S.G. (2016). Association of ORCA/LRWD1 with repressive histone methyl transferases mediates heterochromatin organization. *Nucleus* *6*, 435–441.
- Giri, S., Aggarwal, V., Pontis, J., Shen, Z., Chakraborty, A., Khan, A., Mizzen, C., Prasanth, K.V., Ait-Si-Ali, S., Ha, T., et al. (2015). The preRC protein ORCA organizes heterochromatin by assembling histone H3 lysine 9 methyltransferases on chromatin. *ELife* *4*, e06496.

- Girish, T.S., McGinty, R.K., and Tan, S. (2016). Multivalent Interactions by the Set8 Histone Methyltransferase With Its Nucleosome Substrate. *J. Mol. Biol.* *428*, 1531–1543.
- Gong, F., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Legube, G., and Miller, K.M. (2017). Histone demethylase KDM5A regulates the ZMYND8-NuRD chromatin remodeler to promote DNA repair. *J. Cell Biol.*
- Goren, A., and Cedar, H. (2003). Replicating by the clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 25–32.
- Goren, A., Tabib, A., Hecht, M., and Cedar, H. (2008). DNA replication timing of the human β -globin domain is controlled by histone modification at the origin. *Genes Dev.* *22*, 1319–1324.
- Green, L.C., Kalitsis, P., Chang, T.M., Cipetic, M., Kim, J.H., Marshall, O., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Vagnarelli, P., Samejima, K., et al. (2012). Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. *J Cell Sci* *125*, 1591–1604.
- Greeson, N.T., Sengupta, R., Arida, A.R., Jenuwein, T., and Sanders, S.L. (2008). Di-methyl H4 lysine 20 targets the checkpoint protein Crb2 to sites of DNA damage. *J. Biol. Chem.* *283*, 33168–33174.
- Groth, A., Corpet, A., Cook, A.J.L., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., and Almouzni, G. (2007). Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* *318*, 1928–1931.
- Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., Gao, S., Wu, R., Chen, C., Li, X., Zhou, L., et al. (2011). Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat. Genet.* *43*, 875–878.
- Guillou, E., Ibarra, A., Coulon, V., Casado-Vela, J., Rico, D., Casal, I., Schwob, E., Losada, A., and Méndez, J. (2010). Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories. *Genes Dev.* *24*, 2812–2822.
- Guo, Z., Wu, C., Wang, X., Wang, C., Zhang, R., and Shan, B. (2012). A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3'-untranslated region of the histone methyltransferase SET8 is associated with hepatocellular carcinoma outcome. *Int. J. Cancer* *131*, 1318–1322.
- Gurvich, N., Perna, F., Farina, A., Voza, F., Menendez, S., Hurwitz, J., and Nimer, S.D. (2010). L3MBTL1 polycomb protein, a candidate tumor suppressor in del(20q12) myeloid disorders, is essential for genome stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 22552–22557.
- Hagstrom, K.A., Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R., and Meyer, B.J. (2002). *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* *16*, 729–742.
- Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A.Y., Eck, S., Wörz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J.-P., Maiser, A., et al. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev.* *27*, 859–872.
- Halmer, L., and Gruss, C. (1996). Effects of cell cycle dependent histone H1 phosphorylation on chromatin structure and chromatin replication. *Nucleic Acids Res.* *24*, 1420–1427.

- Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M., Iimura, Y., Silva, F.P., Li, M., Yagyu, R., and Nakamura, Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat. Cell Biol.* *6*, 731–740.
- Hammond, C.M., Strømme, C.B., Huang, H., Patel, D.J., and Groth, A. (2017). Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 141–158.
- Hammond, S.L., Byrum, S.D., Namjoshi, S., Graves, H.K., Dennehey, B.K., Tackett, A.J., and Tyler, J.K. (2014). Mitotic phosphorylation of histone H3 threonine 80. *Cell Cycle Georget. Tex* *13*, 440–452.
- Han, X., Han, Y., Zheng, Y., Sun, Q., Ma, T., Zhang, J., and Xu, L. (2017). Chaetocin induces apoptosis in human melanoma cells through the generation of reactive oxygen species and the intrinsic mitochondrial pathway, and exerts its anti-tumor activity in vivo. *PLoS One* *12*, e0175950.
- Hansen, J.C. (2012). Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *EMBO J.* *31*, 1621–1623.
- Hatakeyama, M., and Weinberg, R.A. (1995). The role of RB in cell cycle control. *Prog. Cell Cycle Res.* *1*, 9–19.
- Hégarat, N., Rata, S., and Hochegger, H. (2016). Bistability of mitotic entry and exit switches during open mitosis in mammalian cells. *BioEssays* *38*, 627–643.
- Hiebert, S.W., Chellappan, S.P., Horowitz, J.M., and Nevins, J.R. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* *6*, 177–185.
- Higgins, G.S., Prevo, R., Lee, Y.-F., Helleday, T., Muschel, R.J., Taylor, S., Yoshimura, M., Hickson, I.D., Bernhard, E.J., and McKenna, W.G. (2010). A small interfering RNA screen of genes involved in DNA repair identifies tumor-specific radiosensitization by POLQ knockdown. *Cancer Res.* *70*, 2984–2993.
- Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes Dev.* *26*, 1659–1678.
- Hirano, Y., Hizume, K., Kimura, H., Takeyasu, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2012). Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *J. Biol. Chem.* *287*, 42654–42663.
- Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* *117*, 6435–6445.
- Hoek, M., and Stillman, B. (2003). Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12183–12188.
- Houlard, M., Berlivet, S., Probst, A.V., Quivy, J.-P., Héry, P., Almouzni, G., and Gérard, M. (2006). CAF-1 is essential for heterochromatin organization in pluripotent embryonic cells. *PLoS Genet.* *2*, e181.
- Houston, S.I., McManus, K.J., Adams, M.M., Sims, J.K., Carpenter, P.B., Hendzel, M.J., and Rice, J.C. (2008). Catalytic Function of the PR-Set7 Histone H4 Lysine 20 Monomethyltransferase Is Essential for Mitotic Entry and Genomic Stability. *J. Biol. Chem.* *283*, 19478–19488.

- Hsu, T.C. (1975). A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics* 79 *Suppl*, 137–150.
- Huang, D.W., Fanti, L., Pak, D.T., Botchan, M.R., Pimpinelli, S., and Kellum, R. (1998). Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J. Cell Biol.* 142, 307–318.
- Hudson, D.F., Vagnarelli, P., Gassmann, R., and Earnshaw, W.C. (2003). Condensin Is Required for Nonhistone Protein Assembly and Structural Integrity of Vertebrate Mitotic Chromosomes. *Dev. Cell* 5, 323–336.
- Hühn, D., Bolck, H.A., and Sartori, A.A. (2013). Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss Med. Wkly.* 143, w13837.
- Hunt, C.R., Ramnarain, D., Horikoshi, N., Iyengar, P., Pandita, R.K., Shay, J.W., and Pandita, T.K. (2013). Histone Modifications and DNA Double-Strand Break Repair after Exposure to Ionizing Radiations. *Radiat. Res.* 179, 383–392.
- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* 29, 1446–1457.
- Iizuka, M., and Stillman, B. (1999). Histone Acetyltransferase HBO1 Interacts with the ORC1 Subunit of the Human Initiator Protein. *J. Biol. Chem.* 274, 23027–23034.
- Iizuka, M., Matsui, T., Takisawa, H., and Smith, M.M. (2006). Regulation of Replication Licensing by Acetyltransferase Hbo1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1098–1108.
- Ikura, M., Furuya, K., Matsuda, S., Matsuda, R., Shima, H., Adachi, J., Matsuda, T., Shiraki, T., and Ikura, T. (2015). Acetylation of Histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 Histone Acetyltransferase Complex Is Essential for the Dynamic Binding of NBS1 to Damaged Chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 35, 4147–4157.
- Isham, C.R., Tibodeau, J.D., Jin, W., Xu, R., Timm, M.M., and Bible, K.C. (2007). Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood* 109, 2579–2588.
- Ishimi, Y., Komamura, Y., You, Z., and Kimura, H. (1998). Biochemical function of mouse minichromosome maintenance 2 protein. *J. Biol. Chem.* 273, 8369–8375.
- Izard, F., Grimaud, C., Izard, F., and Grimaud, C. (2017). Chromatin Structure and Domains, Chromatin Structure and Domains. In *ELS, ELS*, (John Wiley & Sons, Ltd, John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Jack, A.P.M., Bussemer, S., Hahn, M., Pünzeler, S., Snyder, M., Wells, M., Csankovszki, G., Solovei, I., Schotta, G., and Hake, S.B. (2013). H3K56me3 Is a Novel, Conserved Heterochromatic Mark That Largely but Not Completely Overlaps with H3K9me3 in Both Regulation and Localization. *PLOS ONE* 8, e51765.
- Jeong, Y.S., Cho, S., Park, J.S., Ko, Y., and Kang, Y.-K. (2010). Phosphorylation of serine-10 of histone H3 shields modified lysine-9 selectively during mitosis. *Genes Cells* 15, 181–192.
- Jones, P.A., Issa, J.-P.J., and Baylin, S. (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat. Rev. Genet.* 17, 630–641.

- Jónsson, Z.O., Dhar, S.K., Narlikar, G.J., Auty, R., Wagle, N., Pellman, D., Pratt, R.E., Kingston, R., and Dutta, A. (2001). Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes. *J. Biol. Chem.* *276*, 16279–16288.
- Jørgensen, S., Elvers, I., Trelle, M.B., Menzel, T., Eskildsen, M., Jensen, O.N., Helleday, T., Helin, K., and Sørensen, C.S. (2007). The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *J. Cell Biol.* *179*, 1337–1345.
- Jørgensen, S., Schotta, G., and Sørensen, C.S. (2013). Histone H4 Lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* *41*, 2797–2806.
- Kalakonda, N., Fischle, W., Bocconi, P., Gurvich, N., Hoya-Arias, R., Zhao, X., Miyata, Y., MacGrogan, D., Zhang, J., Sims, J., et al. (2008). Histone H4 lysine 20 monomethylation promotes transcriptional repression by L3MBTL1. *Oncogene* *27*, 4293–4304.
- Kalitsis, P., Zhang, T., Marshall, K.M., Nielsen, C.F., and Hudson, D.F. (2017). Condensin, master organizer of the genome. *Chromosome Res.* *25*, 61–76.
- Kaniskan, H.Ü., and Jin, J. (2015). Chemical probes of histone lysine methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* *10*, 40–50.
- Kanwal, R., and Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* *81*, 303–311.
- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., and Steward, R. (2005). PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev.* *19*, 431–435.
- Karlić, R., Chung, H.-R., Lasserre, J., Vlahovicek, K., and Vingron, M. (2010). Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2926–2931.
- Kim, K.H., and Roberts, C.W.M. (2016). Targeting EZH2 in cancer. *Nat. Med.* *22*, 128–134.
- Kimura, H., and Cook, P.R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J. Cell Biol.* *153*, 1341–1353.
- Kinoshita, K., Kobayashi, T.J., and Hirano, T. (2015). Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. *Dev. Cell* *33*, 94–106.
- Kireeva, N., Lakonishok, M., Kireev, I., Hirano, T., and Belmont, A.S. (2004). Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J. Cell Biol.* *166*, 775–785.
- Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C.J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., et al. (2013). Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7922–7927.
- Knutson, S.K., Kawano, S., Minoshima, Y., Warholic, N.M., Huang, K.-C., Xiao, Y., Kadowaki, T., Uesugi, M., Kuznetsov, G., Kumar, N., et al. (2014). Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 842–854.
- Kodama, T., 龍彦児玉, Tanaka, T., 田中十志也, Kawamura, T., 川村猛, Wada, Y., 和田洋一郎, Sugiyama, A., 杉山暁, et al. (2010). Inhibiteur de la pr-set7.

- Komatsu, S., Imoto, I., Tsuda, H., Kozaki, K., Muramatsu, T., Shimada, Y., Aiko, S., Yoshizumi, Y., Ichikawa, D., Otsuji, E., et al. (2009). Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 30, 1139–1146.
- Koseoglu, M.M., Dong, J., and Marzluff, W.F. (2010). Coordinate regulation of histone mRNA metabolism and DNA replication: cyclin A/cdk1 is involved in inactivation of histone mRNA metabolism and DNA replication at the end of S phase. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 3857–3863.
- Koundrioukoff, S., Jónsson, Z.O., Hasan, S., de Jong, R.N., van der Vliet, P.C., Hottiger, M.O., and Hübscher, U. (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 22882–22887.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705.
- Kovalchuk, O., Tryndyak, V.P., Montgomery, B., Boyko, A., Kutanzi, K., Zemp, F., Warbritton, A.R., Latendresse, J.R., Kovalchuk, I., Beland, F.A., et al. (2007). Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications and aberrant microRNA expression. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 2010–2018.
- Krishnan, S., Smits, A.H., Vermeulen, M., and Reinberg, D. (2017). Phospho-H1 Decorates the Inter-chromatid Axis and Is Evicted along with Shugoshin by SET during Mitosis. *Mol. Cell*.
- Kschonsak, M., and Haering, C.H. (2015). Shaping mitotic chromosomes: From classical concepts to molecular mechanisms. *BioEssays* 37, 755–766.
- Kuipers, M.A., Stasevich, T.J., Sasaki, T., Wilson, K.A., Hazelwood, K.L., McNally, J.G., Davidson, M.W., and Gilbert, D.M. (2011). Highly stable loading of Mcm proteins onto chromatin in living cells requires replication to unload. *J. Cell Biol.* 192, 29–41.
- Kuo, A.J., Song, J., Cheung, P., Ishibe-Murakami, S., Yamazoe, S., Chen, J.K., Patel, D.J., and Gozani, O. (2012). The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome. *Nature* 484, 115–119.
- Kurat, C.F., Yeeles, J.T.P., Patel, H., Early, A., and Diffley, J.F.X. (2017). Chromatin Controls DNA Replication Origin Selection, Lagging-Strand Synthesis, and Replication Fork Rates. *Mol. Cell* 65, 117.
- Lachner, M., O’Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116–120.
- Lademann, C.A., Renkawitz, J., Pfander, B., and Jentsch, S. (2017). The INO80 Complex Removes H2A.Z to Promote Presynaptic Filament Formation during Homologous Recombination. *Cell Rep.* 19, 1294–1303.
- Lande-Diner, L., Zhang, J., and Cedar, H. (2009). Shifts in replication timing actively affect histone acetylation during nucleosome reassembly. *Mol. Cell* 34, 767–774.
- Landsverk, H.B., Kirkhus, M., Bollen, M., Küntziger, T., and Collas, P. (2005). PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner. *Biochem. J.* 390, 709–717.

- Lans, H., Marteijn, J.A., and Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* 5, 4.
- Latt, S.A. (1975). Fluorescence analysis of late DNA replication in human metaphase chromosomes. *Somatic Cell Genet.* 1, 293–321.
- Lee, H.-S., Park, J.-H., Kim, S.-J., Kwon, S.-J., and Kwon, J. (2010). A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *EMBO J.* 29, 1434–1445.
- Leonard, A.C., and Méchali, M. (2013). DNA Replication Origins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a010116.
- Levy, A., and Jakob, K.M. (1978). Nascent DNA in nucleosome-like structures from chromatin. *Cell* 14, 259–267.
- Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., and Allis, C.D. (2013). Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science* 340, 857–861.
- Li, A., and Blow, J.J. (2005). Cdt1 downregulation by proteolysis and geminin inhibition prevents DNA re-replication in *Xenopus*. *EMBO J.* 24, 395–404.
- Li, X., and Dou, Y. (2010). New perspectives for the regulation of acetyltransferase MOF. *Epigenetics* 5, 185–188.
- Li, B., Su, T., Ferrari, R., Li, J.-Y., and Kurdistani, S.K. (2014). A unique epigenetic signature is associated with active DNA replication loci in human embryonic stem cells. *Epigenetics* 9, 257–267.
- Li, K.K., Luo, C., Wang, D., Jiang, H., and Zheng, Y.G. (2012). Chemical and Biochemical Approaches in the Study of Histone Methylation and Demethylation. *Med. Res. Rev.* 32, 815–867.
- Li, M., Jiang, L., and Kelleher, N.L. (2009). Global Histone Profiling by LC-FTMS after Inhibition and Knockdown of Deacetylases in Human Cells. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877, 3885–3892.
- Li, Q., Zhou, H., Wurtele, H., Davies, B., Horazdovsky, B., Verreault, A., and Zhang, Z. (2008). Acetylation of Histone H3 Lysine 56 Regulates Replication-Coupled Nucleosome Assembly. *Cell* 134, 244–255.
- Li, Y., Armstrong, R.L., Duronio, R.J., and MacAlpine, D.M. (2016). Methylation of histone H4 lysine 20 by PR-Set7 ensures the integrity of late replicating sequence domains in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 44, 7204–7218.
- Li, Z., Nie, F., Wang, S., and Li, L. (2011). Histone H4 Lys 20 monomethylation by histone methylase SET8 mediates Wnt target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3116–3123.
- Liang, Z., Zickler, D., Prentiss, M., Chang, F.S., Witz, G., Maeshima, K., and Kleckner, N. (2015). Chromosomes Progress to Metaphase in Multiple Discrete Steps via Global Compaction/Expansion Cycles. *Cell* 161, 1124–1137.
- Lieber, M.R. (2010). NHEJ and Its Backup Pathways: Relation to Chromosomal Translocations. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 393–395.

- Lin, Z., Luo, X., and Yu, H. (2016). Structural basis of cohesin cleavage by separase. *Nature* 532, 131–134.
- Ling, Y., Sankpal, U.T., Robertson, A.K., McNally, J.G., Karpova, T., and Robertson, K.D. (2004). Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 32, 598–610.
- Lipp, J.J., Hirota, T., Poser, I., and Peters, J.-M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J. Cell Sci.* 120, 1245–1255.
- Liu, E., Li, X., Yan, F., Zhao, Q., and Wu, X. (2004). Cyclin-dependent Kinases Phosphorylate Human Cdt1 and Induce Its Degradation. *J. Biol. Chem.* 279, 17283–17288.
- Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O.V., Zhou, T.Y., Gassmann, R., Liu, W.T., Ohgi, K.A., Benner, C., Garcia-Bassets, I., Aggarwal, A.K., et al. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466, 508–512.
- Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D.G., and Lamond, A.I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J. Cell Biol.* 187, 481–496.
- Llères, D., Bailly, A.P., Perrin, A., Norman, D.G., Xirodimas, D.P., and Feil, R. (2017). Quantitative FLIM-FRET Microscopy to Monitor Nanoscale Chromatin Compaction In Vivo Reveals Structural Roles of Condensin Complexes. *Cell Rep.* 18, 1791–1803.
- Lombraña, R., Almeida, R., Revuelta, I., Madeira, S., Herranz, G., Saiz, N., Bastolla, U., and Gómez, M. (2013). High-resolution analysis of DNA synthesis start sites and nucleosome architecture at efficient mammalian replication origins. *EMBO J.* 32, 2631–2644.
- Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L., and Chakravarti, D. (2009). Chromatin Binding of SRp20 and ASF/SF2 and Dissociation from Mitotic Chromosomes Is Modulated by Histone H3 Serine 10 Phosphorylation. *Mol. Cell* 33, 450–461.
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J.P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S.Y.R., and Almouzni, G. (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep.* 10, 769–775.
- Lu, J., Ruhf, M.-L., Perrimon, N., and Leder, P. (2007). A genome-wide RNA interference screen identifies putative chromatin regulators essential for E2F repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9381–9386.
- LUO, M., SANCHEZ, G.I., BLUM, G.J., Yang, L., and Research, S.-K.I.F.C. (2015). Naphthaquinone methyltransferase inhibitors and uses thereof.
- Ma, A., Yu, W., Li, F., Bleich, R.M., Herold, J.M., Butler, K.V., Norris, J.L., Korboukh, V., Tripathy, A., Janzen, W.P., et al. (2014). Discovery of a selective, substrate-competitive inhibitor of the lysine methyltransferase SETD8. *J. Med. Chem.* 57, 6822–6833.
- MacAlpine, H.K., Gordân, R., Powell, S.K., Hartemink, A.J., and MacAlpine, D.M. (2010). *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res.* 20, 201–211.

- Magalska, A., Schellhaus, A.K., Moreno-Andrés, D., Zanini, F., Schooley, A., Sachdev, R., Schwarz, H., Madlung, J., and Antonin, W. (2014). RuvB-like ATPases Function in Chromatin Decondensation at the End of Mitosis. *Dev. Cell* *31*, 305–318.
- Mai, A., Cheng, D., Bedford, M.T., Valente, S., Nebbioso, A., Perrone, A., Brosch, G., Sbardella, G., De Bellis, F., Miceli, M., et al. (2008). epigenetic multiple ligands: mixed histone/protein methyltransferase, acetyltransferase, and class III deacetylase (sirtuin) inhibitors. *J. Med. Chem.* *51*, 2279–2290.
- Maison, C., Bailly, D., Roche, D., de Oca, R.M., Probst, A.V., Vassias, I., Dingli, F., Lombard, B., Loew, D., Quivy, J.-P., et al. (2011). SUMOylation promotes de novo targeting of HP1 α to pericentric heterochromatin. *Nat. Genet.* *43*, 220–227.
- Mallette, F.A., Mattioli, F., Cui, G., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K., and Richard, S. (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J.* *31*, 1865–1878.
- Martin, R.M., and Cardoso, M.C. (2010). Chromatin condensation modulates access and binding of nuclear proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 1066–1072.
- Marzluff, W.F. (1992). Histone 3' ends: essential and regulatory functions. *Gene Expr.* *2*, 93–97.
- Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., and Maltais, L.J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* *80*, 487–498.
- Massip, L., Caron, P., Iacovoni, J.S., Trouche, D., and Legube, G. (2010). Deciphering the chromatin landscape induced around DNA double strand breaks. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 2963–2972.
- Matsuda, K., Makise, M., Sueyasu, Y., Takehara, M., Asano, T., and Mizushima, T. (2007). Yeast two-hybrid analysis of the origin recognition complex of *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between subunits and identification of binding proteins. *FEMS Yeast Res.* *7*, 1263–1269.
- Mazur, P.K., Reynoird, N., Khatri, P., Jansen, P.W.T.C., Wilkinson, A.W., Liu, S., Barbash, O., Van Aller, G.S., Huddleston, M., Dhanak, D., et al. (2014). SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature* *510*, 283–287.
- McCord, R.A., Michishita, E., Hong, T., Berber, E., Boxer, L.D., Kusumoto, R., Guan, S., Shi, X., Gozani, O., Burlingame, A.L., et al. (2009). SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging* *1*, 109–121.
- McKay, D.J., Klusza, S., Penke, T.J.R., Meers, M.P., Curry, K.P., McDaniel, S.L., Malek, P.Y., Cooper, S.W., Tatomer, D.C., Lieb, J.D., et al. (2015). Interrogating the function of metazoan histones using engineered gene clusters. *Dev. Cell* *32*, 373–386.
- Messner, S., and Hottiger, M.O. (2011). Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends Cell Biol.* *21*, 534–542.
- Milite, C., Feoli, A., Viviano, M., Rescigno, D., Cianciulli, A., Balzano, A.L., Mai, A., Castellano, S., and Sbardella, G. (2016). The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clin. Epigenetics* *8*, 102.
- Milutinovic, S., Zhuang, Q., and Szyf, M. (2002). Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification. *J. Biol. Chem.* *277*, 20974–20978.

- Miotto, B., and Struhl, K. (2008). HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes Dev.* *22*, 2633–2638.
- Miotto, B., and Struhl, K. (2010). HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Mol. Cell* *37*, 57–66.
- Miotto, B., Ji, Z., and Struhl, K. (2016). Selectivity of ORC binding sites and the relation to replication timing, fragile sites, and deletions in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E4810–E4819.
- Mitchell, L.H., Boriack-Sjodin, P.A., Smith, S., Thomenius, M., Rioux, N., Munchhof, M., Mills, J.E., Klaus, C., Totman, J., Riera, T.V., et al. (2016). Novel Oxindole Sulfonamides and Sulfamides: EPZ031686, the First Orally Bioavailable Small Molecule SMYD3 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* *7*, 134–138.
- Montgomery, R.L., Davis, C.A., Potthoff, M.J., Haberland, M., Fielitz, J., Qi, X., Hill, J.A., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2007). Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* *21*, 1790–1802.
- Muntean, A.G., and Hess, J.L. (2012). The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu. Rev. Pathol.* *7*, 283–301.
- Nair, N., Shoaib, M., and Sørensen, C.S. (2017). Chromatin Dynamics in Genome Stability: Roles in Suppressing Endogenous DNA Damage and Facilitating DNA Repair. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Naumova, N., Imakaev, M., Fudenberg, G., Zhan, Y., Lajoie, B.R., Mirny, L.A., and Dekker, J. (2013). Organization of the Mitotic Chromosome. *Science* *342*, 948–953.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 220–228.
- Ng, M.H., Chung, Y.F., Lo, K.W., Wickham, N.W., Lee, J.C., and Huang, D.P. (1997). Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* *89*, 2500–2506.
- Nguyen, C.T., Weisenberger, D.J., Velicescu, M., Gonzales, F.A., Lin, J.C.Y., Liang, G., and Jones, P.A. (2002). Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* *62*, 6456–6461.
- Nishikawaji, T., Akiyama, Y., Shimada, S., Kojima, K., Kawano, T., Eishi, Y., Yuasa, Y., and Tanaka, S. (2016). Oncogenic roles of the SETDB2 histone methyltransferase in gastric cancer. *Oncotarget* *7*, 67251–67265.
- Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., et al. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* *9*, 1201–1213.
- Nozaki, T., Imai, R., Tanbo, M., Nagashima, R., Tamura, S., Tani, T., Joti, Y., Tomita, M., Hibino, K., Kanemaki, M.T., et al. (2017). Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging. *Mol. Cell* *67*, 282–293.e7.
- van Nuland, R., and Gozani, O. (2016). Histone H4 Lysine 20 (H4K20) Methylation, Expanding the Signaling Potential of the Proteome One Methyl Moiety at a Time. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *15*, 755–764.

- Ochs, F., Somyajit, K., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, J., and Lukas, C. (2016). 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 714–721.
- Oda, H., Okamoto, I., Murphy, N., Chu, J., Price, S.M., Shen, M.M., Torres-Padilla, M.E., Heard, E., and Reinberg, D. (2009). Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol. Cell Biol.* *29*, 2278–2295.
- Oda, H., Hübner, M.R., Beck, D.B., Vermeulen, M., Hurwitz, J., Spector, D.L., and Reinberg, D. (2010). Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage. *Mol. Cell* *40*, 364–376.
- Okuhara, K., Ohta, K., Seo, H., Shioda, M., Yamada, T., Tanaka, Y., Dohmae, N., Seyama, Y., Shibata, T., and Murofushi, H. (1999). A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Curr. Biol. CB* *9*, 341–350.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* *115*, 109–121.
- Oomen, M.E., and Dekker, J. (2017). Epigenetic Characteristics of the Mitotic Chromosome in 1D and 3D. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *52*, 185–204.
- Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* *400*, 284–288.
- Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D.W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., and Botchan, M.R. (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* *91*, 311–323.
- Papamichos-Chronakis, M., and Peterson, C.L. (2013). Chromatin and the genome integrity network. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 62–75.
- Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L., You, Z., and Lou, Z. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* *470*, 124–128.
- Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M.L., George, J., Seidel, D., Kasper, L.H., Plenker, D., Leenders, F., Sun, R., Zander, T., et al. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* *44*, 1104–1110.
- Pellegrino, S., Michelena, J., Teloni, F., Imhof, R., and Altmeyer, M. (2017). Replication-Coupled Dilution of H4K20me2 Guides 53BP1 to Pre-replicative Chromatin. *Cell Rep.* *19*, 1819–1831.
- Perry, C.A., and Annunziato, A.T. (1991). Histone acetylation reduces H1-mediated nucleosome interactions during chromatin assembly. *Exp. Cell Res.* *196*, 337–345.
- Pesavento, J.J., Yang, H., Kelleher, N.L., and Mizzen, C.A. (2008). Certain and Progressive Methylation of Histone H4 at Lysine 20 during the Cell Cycle. *Mol. Cell Biol.* *28*, 468–486.
- Petrova, B., Dehler, S., Kruitwagen, T., Hériché, J.-K., Miura, K., and Haering, C.H. (2013). Quantitative Analysis of Chromosome Condensation in Fission Yeast. *Mol. Cell Biol.* *33*, 984–998.

Pinheiro, I., Margueron, R., Shukeir, N., Eisold, M., Fritsch, C., Richter, F.M., Mittler, G., Genoud, C., Goyama, S., Kurokawa, M., et al. (2012). Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* 150, 948–960.

Piskadlo, E., and Oliveira, R.A. (2016). Novel insights into mitotic chromosome condensation. *F1000Research* 5.

Polo, S.E., Theocharis, S.E., Grandin, L., Gambotti, L., Antoni, G., Savignoni, A., Asselain, B., Patsouris, E., and Almouzni, G. (2010). Clinical significance and prognostic value of chromatin assembly factor-1 overexpression in human solid tumours. *Histopathology* 57, 716–724.

Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L.C., Steffensen, S., Ferreira, F., Grimaldi, M., Gilbert, N., Ferreira, J., and Varga-Weisz, P.D. (2004). The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nat. Cell Biol.* 6, 1236–1244.

Poot, R.A., Bozhenok, L., Berg, D.L.C. van den, Hawkes, N., and Varga-Weisz, P.D. (2005). Chromatin Remodelling by WSTF-ISWI at the Replication Site: Opening a Window of Opportunity for Epigenetic Inheritance? *Cell Cycle* 4, 543–546.

Prasanth, S.G., Prasanth, K.V., Siddiqui, K., Spector, D.L., and Stillman, B. (2004). Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *EMBO J.* 23, 2651–2663.

Prasanth, S.G., Shen, Z., Prasanth, K.V., and Stillman, B. (2010). Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15093–15098.

Price, B.D., and D'Andrea, A.D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 152, 1344–1354.

Prickaerts, P., Niessen, H.E., Mouchel-Vielh, E., Dahlmans, V.E., van den Akker, G.G., Geijselaers, C., Adriaens, M.E., Spaapen, F., Takihara, Y., Rapp, U.R., et al. (2012). MK3 controls Polycomb target gene expression via negative feedback on ERK. *Epigenetics Chromatin* 5, 12.

Putiri, E.L., and Robertson, K.D. (2010). Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin. Epigenetics* 2, 299–314.

Qian, J., Lesage, B., Beullens, M., Van Eynde, A., and Bollen, M. (2011). PP1/Repo-Man Dephosphorylates Mitotic Histone H3 at T3 and Regulates Chromosomal Aurora B Targeting. *Curr. Biol.* 21, 766–773.

Ramadan, K., Bruderer, R., Spiga, F.M., Popp, O., Baur, T., Gotta, M., and Meyer, H.H. (2007). Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature* 450, 1258–1262.

Ramsperger, U., and Stahl, H. (1995). Unwinding of chromatin by the SV40 large T antigen DNA helicase. *EMBO J.* 14, 3215–3225.

Reinberg, D., and Sims, R.J. (2006). de FACTo nucleosome dynamics. *J. Biol. Chem.* 281, 23297–23301.

Reinberg, D., Trojer, P., Sbardella, G., Med, U.N.J., Reinberg, D., Trojer, P., and Sbardella, G. (2007). Inhibiteurs sélectifs pour les transférases.

- Reynoird, N., Mazur, P.K., Stellfeld, T., Flores, N.M., Lofgren, S.M., Carlson, S.M., Brambilla, E., Hainaut, P., Kaznowska, E.B., Arrowsmith, C.H., et al. (2016). Coordination of stress signals by the lysine methyltransferase SMYD2 promotes pancreatic cancer. *Genes Dev.* *30*, 772–785.
- Rhind, N., and Gilbert, D.M. (2013). DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Rice, J.C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D., and Allis, C.D. (2002). Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* *16*, 2225–2230.
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., and Wolffe, A.P. (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* *25*, 338–342.
- Robinson, P.J.J., An, W., Routh, A., Martino, F., Chapman, L., Roeder, R.G., and Rhodes, D. (2008). 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. *J. Mol. Biol.* *381*, 816–825.
- Rodgers, K., and McVey, M. (2016). Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Physiol.* *231*, 15–24.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* *146*, 905–916.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., and Baylin, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* *25*, 269–277.
- Rowbotham, S.P., Barki, L., Neves-Costa, A., Santos, F., Dean, W., Hawkes, N., Choudhary, P., Will, W.R., Webster, J., Oxley, D., et al. (2011). Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCAD1. *Mol. Cell* *42*, 285–296.
- Rowlands, H., Dhavarasa, P., Cheng, A., and Yankulov, K. (2017). Forks on the Run: Can the Stalling of DNA Replication Promote Epigenetic Changes? *Front. Genet.* *8*.
- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J., and Allfrey, V.G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* *190*, 117–128.
- Sakaguchi, A., Karachentsev, D., Seth-Pasricha, M., Druzhinina, M., and Steward, R. (2008). Functional characterization of the *Drosophila* Hmt4-20/Suv4-20 histone methyltransferase. *Genetics* *179*, 317–322.
- Sakaguchi, A., Joyce, E., Aoki, T., Schedl, P., and Steward, R. (2012). The Histone H4 Lysine 20 Monomethyl Mark, Set by PR-Set7 and Stabilized by L(3)mbl, Is Necessary for Proper Interphase Chromatin Organization. *PLoS ONE* *7*, e45321.
- Sakamoto, L.H.T., Andrade, R.V. de, Felipe, M.S.S., Motoyama, A.B., and Pittella Silva, F. (2014). SMYD2 is highly expressed in pediatric acute lymphoblastic leukemia and constitutes a bad prognostic factor. *Leuk. Res.* *38*, 496–502.
- Saksouk, N., Simboeck, E., and Déjardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* *8*, 3.
- Salic, A., Waters, J.C., and Mitchison, T.J. (2004). Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* *118*, 567–578.

- Sánchez, R., and Marzluff, W.F. (2002). The stem-loop binding protein is required for efficient translation of histone mRNA in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7093–7104.
- Saredi, G., Huang, H., Hammond, C.M., Alabert, C., Bekker-Jensen, S., Forne, I., Reverón-Gómez, N., Foster, B.M., Mlejnkova, L., Bartke, T., et al. (2016). H4K20me0 marks post-replicative chromatin and recruits the TONSL–MMS22L DNA repair complex. *Nature* *534*, 714–718.
- Sawicka, A., and Seiser, C. (2014). Sensing core histone phosphorylation — A matter of perfect timing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1839*, 711–718.
- Scharf, A.N.D., Meier, K., Seitz, V., Kremmer, E., Brehm, A., and Imhof, A. (2009). Monomethylation of Lysine 20 on Histone H4 Facilitates Chromatin Maturation. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 57–67.
- Schodhetman, G., and Perry, R.P. (1972). Early appearance of histone messenger RNA in polyribosomes of cultured L cells. *J. Mol. Biol.* *63*, 591–596.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* *18*, 1251–1262.
- Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callén, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I.A., et al. (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev.* *22*, 2048–2061.
- Sekedat, M.D., Fenyö, D., Rogers, R.S., Tackett, A.J., Aitchison, J.D., and Chait, B.T. (2010). GINS motion reveals replication fork progression is remarkably uniform throughout the yeast genome. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 353.
- Sharma, G.G., So, S., Gupta, A., Kumar, R., Cayrou, C., Avvakumov, N., Bhadra, U., Pandita, R.K., Porteus, M.H., Chen, D.J., et al. (2010). MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3582–3595.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat. Cell Biol.* *6*, 648–655.
- Shen, Z., Sathyan, K.M., Geng, Y., Zheng, R., Chakraborty, A., Freeman, B., Wang, F., Prasanth, K.V., and Prasanth, S.G. (2010). A WD-Repeat Protein Stabilizes ORC Binding to Chromatin. *Mol. Cell* *40*, 99–111.
- Shi, L., Sun, L., Li, Q., Liang, J., Yu, W., Yi, X., Yang, X., Li, Y., Han, X., Zhang, Y., et al. (2011). Histone demethylase JMJD2B coordinates H3K4/H3K9 methylation and promotes hormonally responsive breast carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7541–7546.
- Shi, X., Kachirskaja, I., Yamaguchi, H., West, L.E., Wen, H., Wang, E.W., Dutta, S., Appella, E., and Gozani, O. (2007). Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol. Cell* *27*, 636–646.
- Shibata, A. (2017). Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutat. Res.*

- Shim, E.Y., Ma, J.-L., Oum, J.-H., Yanez, Y., and Lee, S.E. (2005). The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3934–3944.
- Shinchi, Y., Hieda, M., Nishioka, Y., Matsumoto, A., Yokoyama, Y., Kimura, H., Matsuura, S., and Matsuura, N. (2015). SUV420H2 suppresses breast cancer cell invasion through down regulation of the SH2 domain-containing focal adhesion protein tensin-3. *Exp. Cell Res.* *334*, 90–99.
- Shintomi, K., Inoue, F., Watanabe, H., Ohsumi, K., Ohsugi, M., and Hirano, T. (2017). Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science* *356*, 1284–1287.
- Siddiqui, K., On, K.F., and Diffley, J.F.X. (2013). Regulating DNA Replication in Eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Singh, R.K., Liang, D., Gajjalaiahvari, U.R., Kabbaj, M.-H.M., Paik, J., and Gunjan, A. (2010). Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell Cycle* *9*, 4236–4244.
- Sirbu, B.M., Couch, F.B., Feigerle, J.T., Bhaskara, S., Hiebert, S.W., and Cortez, D. (2011). Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. *Genes Dev.* *25*, 1320–1327.
- Smith, S., and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* *58*, 15–25.
- Sobel, R.E., Cook, R.G., and Allis, C.D. (1994). Non-random acetylation of histone H4 by a cytoplasmic histone acetyltransferase as determined by novel methodology. *J. Biol. Chem.* *269*, 18576–18582.
- Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T., and Allis, C.D. (1995). Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1237–1241.
- Song, F., Zheng, H., Liu, B., Wei, S., Dai, H., Zhang, L., Calin, G.A., Hao, X., Wei, Q., Zhang, W., et al. (2009). An miR-502-binding site single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the SET8 gene is associated with early age of breast cancer onset. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 6292–6300.
- Song, Y., He, F., Xie, G., Guo, X., Xu, Y., Chen, Y., Liang, X., Stagljar, I., Egli, D., Ma, J., et al. (2007). CAF-1 is essential for *Drosophila* development and involved in the maintenance of epigenetic memory. *Dev. Biol.* *311*, 213–222.
- Sonneville, R., Craig, G., Labib, K., Gartner, A., and Blow, J.J. (2015). Both Chromosome Decondensation and Condensation Are Dependent on DNA Replication in *C. elegans* Embryos. *Cell Rep.* *12*, 405–417.
- Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 435–459.
- Strober, B.E., Dunaief, J.L., Guha, and Goff, S.P. (1996). Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1576–1583.

- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226.
- Sugimoto, N., Yugawa, T., Iizuka, M., Kiyono, T., and Fujita, M. (2011). Chromatin remodeler sucrose nonfermenting 2 homolog (SNF2H) is recruited onto DNA replication origins through interaction with Cdc10 protein-dependent transcript 1 (Cdt1) and promotes pre-replication complex formation. *J. Biol. Chem.* 286, 39200–39210.
- Sugimura, K., Takebayashi, S., Taguchi, H., Takeda, S., and Okumura, K. (2008). PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J. Cell Biol.* 183, 1203–1212.
- Sun, Z.-W., and Allis, C.D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104–108.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* 21, 421–434.
- Taddei, A., Roche, D., Sibarita, J.-B., Turner, B.M., and Almouzni, G. (1999). Duplication and Maintenance of Heterochromatin Domains. *J. Cell Biol.* 147, 1153–1166.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., and Almouzni, G. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.* 3, 114–120.
- Takahashi, Y., Rayman, J.B., and Dynlacht, B.D. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 14, 804–816.
- Takawa, M., Cho, H.-S., Hayami, S., Toyokawa, G., Kogure, M., Yamane, Y., Iwai, Y., Maejima, K., Ueda, K., Masuda, A., et al. (2012). Histone Lysine Methyltransferase SETD8 Promotes Carcinogenesis by Deregulating PCNA Expression. *Cancer Res.* 72, 3217–3227.
- Talasz, H., Lindner, H.H., Sarg, B., and Helliger, W. (2005). Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *J. Biol. Chem.* 280, 38814–38822.
- Tandon, N., Ramakrishnan, V., and Kumar, S.K. (2016). Clinical use and applications of histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 8, 35–44.
- Tang, Z., Sun, Y., Harley, S.E., Zou, H., and Yu, H. (2004). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 18012–18017.
- Tardat, M., Murr, R., Herceg, Z., Sardet, C., and Julien, E. (2007). PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *J. Cell Biol.* 179, 1413–1426.
- Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefevbre, C., Callanan, M., Sardet, C., and Julien, E. (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 12, 1086–1093.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.-M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4546–4556.

Thomae, A.W., Pich, D., Brocher, J., Spindler, M.-P., Berens, C., Hock, R., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2008). Interaction between HMGA1a and the origin recognition complex creates site-specific replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1692–1697.

Thomson, A.M., Gillespie, P.J., and Blow, J.J. (2010). Replication factory activation can be decoupled from the replication timing program by modulating Cdk levels. *J. Cell Biol.* *188*, 209–221.

Trinkle-Mulcahy, L., Andersen, J., Lam, Y.W., Moorhead, G., Mann, M., and Lamond, A.I. (2006). Repo-Man recruits PP1 γ to chromatin and is essential for cell viability. *J. Cell Biol.* *172*, 679–692.

Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., Vaquero, A., Kalakonda, N., Bocconi, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D., et al. (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* *129*, 915–928.

Trujillo, K.M., and Osley, M.A. (2012). A role for H2B ubiquitylation in DNA replication. *Mol. Cell* *48*, 734–746.

Tryndyak, V.P., Kovalchuk, O., and Pogribny, I.P. (2006). Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 65–70.

Turner, B.M., Birley, A.J., and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* *69*, 375–384.

Tuzon, C.T., Spektor, T., Kong, X., Congdon, L.M., Wu, S., Schotta, G., Yokomori, K., and Rice, J.C. (2014). Concerted activities of distinct H4K20 methyltransferases at DNA double-strand breaks regulate 53BP1 nucleation and NHEJ-directed repair. *Cell Rep.* *8*, 430–438.

Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amiot, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (2001). Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6574–6584.

Vagnarelli, P. (2012). Mitotic chromosome condensation in vertebrates. *Exp. Cell Res.* *318*, 1435–1441.

Vagnarelli, P., Ribeiro, S., Sennels, L., Sanchez-Pulido, L., de Lima Alves, F., Verheyen, T., Kelly, D.A., Ponting, C.P., Rappsilber, J., and Earnshaw, W.C. (2011). Repo-Man Coordinates Chromosomal Reorganization with Nuclear Envelope Reassembly during Mitotic Exit. *Dev. Cell* *21*, 328–342.

Valente, S., Lepore, I., Dell'Aversana, C., Tardugno, M., Castellano, S., Sbardella, G., Tomassi, S., Di Maro, S., Novellino, E., Di Santo, R., et al. (2012). Identification of PR-SET7 and EZH2 selective inhibitors inducing cell death in human leukemia U937 cells. *Biochimie* *94*, 2308–2313.

Valieva, M.E., Armeev, G.A., Kudryashova, K.S., Gerasimova, N.S., Shaytan, A.K., Kulaeva, O.I., McCullough, L.L., Formosa, T., Georgiev, P.G., Kirpichnikov, M.P., et al. (2016). Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 1111–1116.

Valk-Lingbeek, M.E., Bruggeman, S.W.M., and van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* *118*, 409–418.

- Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.-L., Alt, F.W., Serrano, L., Sternglanz, R., and Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* *20*, 1256–1261.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J., and Walter, J.C. (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* *17*, 1894–1908.
- Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., et al. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* *142*, 967–980.
- Vestner, B., Waldmann, T., and Gruss, C. (2000). Histone octamer dissociation is not required for in vitro replication of simian virus 40 minichromosomes. *J. Biol. Chem.* *275*, 8190–8195.
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J., and Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol. Cell* *10*, 1223–1233.
- Vorobyeva, N.E., Mazina, M.U., Golovnin, A.K., Kopytova, D.V., Gurskiy, D.Y., Nabirochkina, E.N., Georgieva, S.G., Georgiev, P.G., and Krasnov, A.N. (2013). Insulator protein Su(Hw) recruits SAGA and Brahma complexes and constitutes part of Origin Recognition Complex-binding sites in the *Drosophila* genome. *Nucleic Acids Res.* *41*, 5717–5730.
- Wakabayashi, K., Okamura, M., Tsutsumi, S., Nishikawa, N.S., Tanaka, T., Sakakibara, I., Kitakami, J., Ihara, S., Hashimoto, Y., Hamakubo, T., et al. (2009). The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3544–3555.
- Wang, C., Guo, Z., Wu, C., Li, Y., and Kang, S. (2012). A polymorphism at the miR-502 binding site in the 3' untranslated region of the SET8 gene is associated with the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Genet.* *205*, 373–376.
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.-Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell* *22*, 383–394.
- Wang, Y., Khan, A., Marks, A.B., Smith, O.K., Giri, S., Lin, Y.-C., Creager, R., MacAlpine, D.M., Prasanth, K.V., Aladjem, M.I., et al. (2017). Temporal association of ORCA/LRWD1 to late-firing origins during G1 dictates heterochromatin replication and organization. *Nucleic Acids Res.* *45*, 2490–2502.
- Weichert, W. (2009). HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett.* *280*, 168–176.
- Wilkins, B.J., Rall, N.A., Ostwal, Y., Kruitwagen, T., Hiragami-Hamada, K., Winkler, M., Barral, Y., Fischle, W., and Neumann, H. (2014). A Cascade of Histone Modifications Induces Chromatin Condensation in Mitosis. *Science* *343*, 77–80.
- Williams, D.E., Dalisay, D.S., Li, F., Amphlett, J., Maneerat, W., Chavez, M.A.G., Wang, Y.A., Maitainaho, T., Yu, W., Brown, P.J., et al. (2013). Naphthoic acid A produced by a *Streptomyces* sp. isolated from a marine sediment is a selective SAM-competitive inhibitor of the histone methyltransferase SETD8. *Org. Lett.* *15*, 414–417.

- Williams, D.E., Izard, F., Arnould, S., Dalisay, D.S., Tantapakul, C., Maneerat, W., Matainaho, T., Julien, E., and Andersen, R.J. (2016). Structures of Nahuoic Acids B to E Produced in Culture by a *Streptomyces* sp. Isolated from a Marine Sediment and Evidence for the Inhibition of the Histone Methyl Transferase SETD8 in Human Cancer Cells by Nahuoic Acid A. *J. Org. Chem.*
- Winters, A.C., and Bernt, K.M. (2017). MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches. *Front. Pediatr.* 5.
- Wittmeyer, J., and Formosa, T. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4178–4190.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C., and Dutta, A. (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290, 2309–2312.
- Wong, P.G., Glozak, M.A., Cao, T.V., Vaziri, C., Seto, E., and Alexandrow, M.G. (2010). Chromatin unfolding by Cdt1 regulates MCM loading via opposing functions of HBO1 and HDAC11-geminin. *Cell Cycle* 9, 4351–4363.
- Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D.A., and Blow, J.J. (2006). Excess Mcm2–7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J Cell Biol* 173, 673–683.
- Worcel, A., Han, S., and Wong, M.L. (1978). Assembly of newly replicated chromatin. *Cell* 15, 969–977.
- Wu, S., Yang, Z., Ye, R., An, D., Li, C., Wang, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, H., Li, F., et al. (2016). Novel variants in MLL confer to bladder cancer recurrence identified by whole-exome sequencing. *Oncotarget* 7, 2629–2645.
- Xie, A., Hartlerode, A., Stucki, M., Odate, S., Puget, N., Kwok, A., Nagaraju, G., Yan, C., Alt, F.W., Chen, J., et al. (2007). Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol. Cell* 28, 1045–1057.
- Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* 48, 723–733.
- Yamazaki, S., Ishii, A., Kanoh, Y., Oda, M., Nishito, Y., and Masai, H. (2012). Rif1 regulates the replication timing domains on the human genome. *EMBO J.* 31, 3667–3677.
- Yan, Q., Dutt, S., Xu, R., Graves, K., Juszczynski, P., Manis, J.P., and Shipp, M.A. (2009). BBAP Monoubiquitylates Histone H4 at Lysine 91 and Selectively Modulates the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 36, 110–120.
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., and Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* 31, 110–123.
- Yao, L., Li, Y., Du, F., Han, X., Li, X., Niu, Y., Ren, S., and Sun, Y. (2014). Histone H4 Lys 20 methyltransferase SET8 promotes androgen receptor-mediated transcription activation in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 692–696.

- Ye, J., Ai, X., Eugeni, E.E., Zhang, L., Carpenter, L.R., Jelinek, M.A., Freitas, M.A., and Parthun, M.R. (2005). Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Mol. Cell* *18*, 123–130.
- Yeeles, J.T.P., Janska, A., Early, A., and Diffley, J.F.X. (2017). How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Mol. Cell* *65*, 105–116.
- Yin, S., Li, Z., Huang, J., Miao, Z., Zhang, J., Lu, C., Xu, H., and Xu, H. (2017). Prognostic value and clinicopathological significance of proliferating cell nuclear antigen expression in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *OncoTargets Ther.* *10*, 319–327.
- Yokoyama, Y., Matsumoto, A., Hieda, M., Shinchi, Y., Ogihara, E., Hamada, M., Nishioka, Y., Kimura, H., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., et al. (2014). Loss of histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with invasive activity. *Breast Cancer Res.* *16*, R66.
- Young, N.L., DiMaggio, P.A., Plazas-Mayorca, M.D., Baliban, R.C., Floudas, C.A., and Garcia, B.A. (2009). High Throughput Characterization of Combinatorial Histone Codes. *Mol. Cell. Proteomics* *8*, 2266–2284.
- Yu, N., Huangyang, P., Yang, X., Han, X., Yan, R., Jia, H., Shang, Y., and Sun, L. (2013). microRNA-7 Suppresses the Invasive Potential of Breast Cancer Cells and Sensitizes Cells to DNA Damages by Targeting Histone Methyltransferase SET8. *J. Biol. Chem.* *288*, 19633–19642.
- Zhang, H.S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* *101*, 79–89.
- Zhang, J., Xu, F., Hashimshony, T., Keshet, I., and Cedar, H. (2002). Establishment of transcriptional competence in early and late S phase. *Nature* *420*, 198–202.
- Zhang, J., Hou, W., Chai, M., Zhao, H., Jia, J., Sun, X., Zhao, B., and Wang, R. (2016a). MicroRNA-127-3p inhibits proliferation and invasion by targeting SETD8 in human osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *469*, 1006–1011.
- Zhang, T., Paulson, J.R., Bakhrebah, M., Kim, J.H., Nowell, C., Kalitsis, P., and Hudson, D.F. (2016b). Condensin I and II behaviour in interphase nuclei and cells undergoing premature chromosome condensation. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* *24*, 243–269.
- Zhao, J., Kennedy, B.K., Lawrence, B.D., Barbie, D.A., Matera, A.G., Fletcher, J.A., and Harlow, E. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* *14*, 2283–2297.
- Zhu, Q., and Wani, A.A. (2010). Histone Modifications: Crucial Elements for Damage Response and Chromatin Restoration. *J. Cell. Physiol.* *223*, 283–288.
- Zimmermann, M., and de Lange, T. (2014). 53BP1: Pro Choice in DNA Repair. *Trends Cell Biol.* *24*, 108–117.

Study of Histone H4 Lysine 20 methyltransferases functions in chromatin dynamics during the cell cycle

Summary: In eukaryotic cells, the organization of DNA into chromatin not only ensures its compaction into nucleus, but also serves as a dynamic structure that offers a range of possibilities for regulating DNA transactions, such as transcription, DNA replication and repair. The basic unit of chromatin is the nucleosome, which is constituted of 147 bp of DNA wrapped with an octamer composed of histone proteins. This nucleosome structure is versatile showing distinct variations, including post-translational modifications of histone proteins. Histone modifications contribute to the regulation of genome functions by altering directly the nucleosome structure or through the recruitment of specific chromatin-binding proteins. In this regard, the lysine 20 of histone H4 (H4K20) can be modified to generate three different methylation states: mono- (me1), di- (me2), and trimethylation (me3), with a unique activity being coupled to the specific extent of methylation on this lysine residue. PR-Set7 (also known as SET8 or SETD8) is the sole enzyme that catalyzes H4K20me1, whereas H4K20me2 and H4K20me3 occur through the action of Suv4-20h, which requires PR-Set7-induced H4K20me1 as a substrate. These enzymes are essential since knockout studies have shown that both PR-Set7 and Suv4-20h are required for mouse development and their loss causes DNA damage and cell cycle defects. However, the functions of different H4K20 methylation states and the associated enzymes still remain poorly understood. The work carried out during this thesis reveals that the concerted activity of PR-Set7 and Suv4-20h is required for the timely control of (i) heterochromatin assembly on nascent DNA and (ii) the licensing of a critical subset of late-firing origins necessary for the replication of heterochromatin regions in the following cell cycle. Both functions depend on the conversion of H4K20me1 to H4K20me3 and the specific recruitment of the H4K20me-binding protein ORCA/LRWD1. Accordingly, siRNA-mediated PR-Set7 depletion triggers a defective interphase chromatin compaction in cells that exit of mitosis, which in turn favor a non-specific chromatin loading of ORC and MCMs subunits of pre-replication complexes. Finally and consistent with a key role of H4K20 methylation in heterochromatin formation and replication, my thesis work contributes to reveal that up-regulation of PR-Set7 is a poor prognosis factor in multiple myeloma and that its inhibition by specific chemical compounds might be a great interest for cancer treatment in near future.

Key words: Replication, Compaction, Chromatin, Histones, Cell Cycle, cancer.

Etude du rôle des méthyltransférases de la Lysine 20 de l'Histone H4 dans la dynamique de la chromatine au cours du cycle cellulaire

Résumé: Dans les cellules eucaryotes l'organisation de l'ADN en chromatine n'assure pas seulement la compaction de l'ADN dans le noyau mais sert aussi de structure dynamique qui permet la régulation des processus pour lesquels l'ADN est une matrice comme la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome qui est constitué de 147pb d'ADN qui s'enroulent autour d'un octamère d'histones. Le nucléosome possède une structure flexible régulée par les modifications post-traductionnelles d'histones. Les modifications d'histones contribuent à la régulation des fonctions du génome en modérant directement la structure de la chromatine ou bien *via* le recrutement de protéines spécifiques liant la chromatine. La lysine 20 de l'histone H4 (H4K20) peut être modifiée pour générer 3 niveaux de méthylation : mono- (me1), di- (me2), et tri-méthylation (me3), chaque niveau de méthylation est associé à des fonctions spécifiques. PR-Set7 (aussi appelée Set8, Setd8 ou KMT5A) est l'unique enzyme connue pour catalyser la mono-méthylation H4K20. Les niveaux de di- et tri-méthylation sont le résultat de l'activité des enzymes Suv4-20h qui requièrent la mono-méthylation H4K20 induite par PR-Set7 comme substrat. Ces enzymes sont essentielles puisque des études de Knock-Out ont montré que PR-Set7 et les Suv4-20h sont requises pour le développement de la souris et que leur perte dans des modèles cellulaires conduit à des dommages ADN et des défauts de cycle cellulaire. Toutefois, les fonctions des différents niveaux de méthylation et des enzymes associées restent peu claires. Le travail réalisé pendant cette thèse a révélé que l'action concertée des enzymes PR-Set7 et Suv4-20h est requise pour le contrôle (i) de l'assemblage de l'hétérochromatine sur l'ADN naissant, (ii) de la liaison du pre-RC sur un groupe d'origines de réplication tardives nécessaires pour la réplication de régions d'hétérochromatine dans le cycle cellulaire suivant. Les deux fonctions dépendent de la conversion de la mono-méthylation H4K20 en tri-méthylation H4K20 et du recrutement spécifique de la protéine liant la méthylation H4K20 ORCA/LRWD1. Ainsi, la déplétion de PR-Set7 par siRNA entraîne des défauts de compaction de la chromatine en interphase des cellules qui sortent de mitose, ce qui favorise la fixation non spécifique des sous-unités MCMs et ORCs des complexes pre-RC. Finalement et étant donné le rôle clé de la méthylation H4K20 dans la formation de l'hétérochromatine et la réplication, mon travail de thèse a contribué à révéler que la surexpression de PR-Set7 est un facteur de mauvais pronostic dans le myélome multiple et que l'inhibition de cette enzyme par des composés chimiques pourrait dans le futur avoir un grand intérêt pour le traitement du cancer.

Mots clés : Réplication, Compaction, Chromatine, Histones, Cycle cellulaire, cancer.

Equipe chromatine et cancer, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (U1194) Campus Val d'Aurelle 34298 Montpellier cedex 5 FRANCE