



Implication de l'ADN polymérase spécialisée zêta au cours de la réplication de l'hétérochromatine dans les cellules de mammifères

Sana Ahmed-Seghir

► To cite this version:

Sana Ahmed-Seghir. Implication de l'ADN polymérase spécialisée zêta au cours de la réplication de l'hétérochromatine dans les cellules de mammifères. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T052 . tel-01880505

HAL Id: tel-01880505

<https://theses.hal.science/tel-01880505>

Submitted on 25 Sep 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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : *UMR8200 Stabilité génétique et oncogénèse*
Equipe : *polymérases translesionnelles et cancer Gustave*
Roussy

THÈSE DE DOCTORAT

ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

Sana AHMED-SEGHIR

IMPLICATION DE L'ADN POLYMERASE SPECIALISEE ZETA AU
COURS DE LA REPLICATION DE L'HETEROCHROMATINE DANS
LES CELLULES DE MAMMIFERES

Date de soutenance : 24/09/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :

Dr. Patricia KANNOUCHE

Directrice de thèse

Rapporteurs :

Pr. Giuseppe BALDACCI
Dr. Jean-Sébastien HOFFMANN

Rapporteur
Rapporteur

Examineurs :

Dr. Yegor VASSETZKY
Dr. Jean-Charles CADORET
Dr. Jean-Pierre QUIVY
Pr. François DAUTRY

Examineur
Examineur
Examineur

Président :

Président du jury

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Patricia, je tiens à te remercier de m'avoir accueillie dans ton équipe durant toutes ces années (et oui, depuis le master 1 !). Tu m'as fait confiance, m'as appris un grand nombre de techniques et m'as toujours poussée à aller plus loin. Malgré tes responsabilités de chef d'unité, tu as toujours trouvé du temps pour discuter avec moi de mes projets et je te souhaite plein de jolies découvertes encore sur Rev3.

Je tiens à remercier toute ma super équipe de choc avec qui j'ai passé des moments fantastiques, la team TLS. Plus que des collègues, j'y ai trouvé des amis. Merci à Caroline, « la reine du Western » pour ta gentillesse et ton aide si précieuse, merci à Noémie, « le reflet de mon âme tourmentée », comme disait si bien Baudelaire, pour toutes ces discussions passionnantes (même sur Marcel) et toutes nos discussions scientifiques sur le fameux ChIP ; merci à Emma, « Catwoman », pour les sorties, nos discussions passionnantes (scientifiques ou non) comme pour toutes tes précieuses corrections. Merci à Yann, « l'Annunaki » pour tes conseils scientifiques mais aussi toutes nos discussions ghetto style. Merci également à Agathe, « Agathethepower », de m'avoir formée, d'avoir été si patiente avec moi et d'avoir été ma co-bureau pendant tout ce temps. Je tiens aussi à remercier José « McGyver » pour ta gentillesse, ton humour de tous les instants ainsi que son aide sur le projet Rev3, merci à Nikola, « le padawan » d'avoir passé des weekends à bosser comme un dingue avec moi. Merci à Imenne, « la reine du shopping » pour sa bonne humeur constante et ses conseils avisés. Merci également à Mégane pour son aide sur le projet Rev3 mais aussi pour sa gentillesse et son sourire constant. Enfin, merci à tous les membres de l'équipe passés et présents : Leila, Loélia, Florian, Teddy, Charlène, Séverine, Antony...

Je remercie également tous les membres de l'UMR8200. Merci à mes copines : Camille, ma coloc fan de T-Rex qui a été là depuis le début pour tes encouragements et ton amitié ; Indiana (déjà avec ton prénom, on était faite pour s'entendre), pour ta bonne humeur permanente et ton grain de folie, Eloooooo, pour toutes les sorties et les sms envoyés pour savoir si tu étais bien rentrée ; Anne pour ton smile à toute épreuve et nos séances ciné ; Lele pour ton accent chantant et tes cours de brésilien, Lilia et nos soirées microscopes. Merci à la team Lopez (Bernard, Sandrine, Josée, Tangui) pour toutes ces pauses déjeuner pleines d'humour avec vous ; merci à la team Rosselli, notamment Xavier, mon compagnon de thèse, Valéria et ses conseils sur les UFBs (et les pâtes !), Patrycja, la reine des cellules de souris, Philippe et son humour cinglant, Julie et Emilie pour leur gentillesse et nos discussions à la cafétéria. Merci à la team Dupuy notamment Rabbi et Naïma, qui ont passé de nombreux weekends au labo avec moi, Raphaël, Ilya. Merci à la team Sapaarbaev, Sacha et Ibtissam pour votre aide pour la purification des sondes radiomarquées. Bien entendu, je n'oublie pas les chefs d'équipe : Filippo, Said, Corine, Murat et Olivier ainsi que nos secrétaires de choc : Françoise et Christelle ! Merci à Jean-Claude pour toutes tes corrections (souvent de dernière minute) et tes précieux conseils. Et puis, notre fameux Jacques pour ses « naaannn » et son cynisme légendaire.

J'aimerais aussi remercier Jean-Charles Cadoret (Institut Jacques Monod) pour sa collaboration sur l'article consacré à Rev3 et Agnès Cordonnier (ESBS) pour sa collaboration sur l'article consacré à Poln. Merci aussi à Yann Lecluse (plate-forme imagerie et cytométrie de Gustave Roussy).

Mes derniers remerciements professionnels vont à l'Association pour la recherche sur le Cancer, au CNRS, au Ministère de l'Enseignement Supérieur pour avoir financé mes 5 années de thèse. Je remercie aussi la faculté de médecine de Kremlin-Bicêtre ainsi que mes anciens collègues de monitorat (hein Charles-Henry ?).

Je veux maintenant remercier de tout mon cœur ma famille qui m'a toujours épaulée et encouragée, même si ça a été long, ça en valait la peine ! Saw, tu auras appris PCNA ! Et puis Nono, à toi de battre mon record d'années d'études !

Merci à tous mes amis de toujours (ou presque) : le trio infernal Dianou, Bibi et Vince, vous ne vous débarrasserez pas de moi comme ça, vous allez voir ! Céline, Ilain, Julie, même si on ne se voit pas beaucoup, je ne vous oublie pas. Les amis d'amis qui finalement deviennent des amis, Ballouche, Maxime et Mumu, Soso, Sab, Jessy, Cyril, Kévin, Vomito...

Pardon à tous ceux que j'ai oublié.

Table des matières

Liste des abréviations et anglicismes	8
PARTIE I.....	10
Avant-propos.....	11
Introduction.....	12
A) La chromatine	12
1) Organisation structurale de la chromatine	12
1.1) Le nucléosome, unité structurale de la chromatine	12
1.2) Les histones canoniques.....	12
1.3) Les variants d'histones	13
1.4) De la fibre de 10 nm à la fibre de 30 nm	14
2) Modifications de la chromatine et remodelage.....	16
2.1) Les modifications des histones.....	16
a) La méthylation.....	17
b) L'acétylation	17
c) Le code histone.....	17
2.2) La méthylation de l'ADN	17
2.3) Les complexes de remodelage de la chromatine.....	18
3) Architecture nucléaire : les territoires chromosomiques	18
3.1) Preuves expérimentales de l'existence des territoires chromosomiques	18
3.2) Organisation spatiale de la chromatine et des territoires chromosomiques	19
4) Les domaines structuraux de la chromatine	20
4.1) L'euchromatine	20
4.2) L'hétérochromatine.....	21
a) Propriétés générales	21
b) L'hétérochromatine constitutive	21
(i) Séquences associées à l'hétérochromatine constitutive	21
(ii) Marques épigénétiques associées à l'hétérochromatine constitutive et HP1	23
Chez la levure	25
Chez la souris.....	26
Chez l'Homme	27
c) L'hétérochromatine facultative.....	27
(i) Mise en évidence	27

(ii) Hétérochromatine facultative et développement : les gènes <i>Hox</i>	28
Les gènes <i>Hox</i> : de la drosophile aux vertébrés	28
Régulation transcriptionnelle des gènes <i>Hox</i> : importance des marques épigénétiques et de la conformation de la chromatine.....	28
(iii) Hétérochromatine facultative et développement : les gènes soumis à empreinte parentale	30
Mise en évidence et rôle	30
Régulation épigénétique des gènes soumis à empreinte génétique : méthylation de l'ADN et marques histones.....	32
B) La réplication.....	33
1) Reconnaissance et activation des origines de réplication	33
1.1) Définition et reconnaissance des origines de réplication	33
1.2) Assemblage du complexe pré-répliatif au niveau des origines de réplication	35
1.3) Initiation de la réplication et sa régulation	35
1.4) Régulation de l'initiation : pourquoi?	37
a) Eviter une double réplication du génome au cours d'un même cycle.....	38
(i) Les CDK et la régulation des protéines ORC.....	38
(ii) Les CDK et la régulation de Cdt1	38
(iii) Les CDK et la régulation de Cdc6.....	39
b) Eviter une réplication incomplète.....	39
1.5) Ouverture de la chromatine et élongation	40
1.6) Terminaison de la réplication.....	40
2) Les ADN polymérases répliquatives et leur cofacteur PCNA.....	42
2.1) L'ADN polymérase alpha ($Pol\alpha$)	42
2.2) Les ADN polymérases epsilon et delta ($Pol\epsilon$ et $Pol\delta$).....	43
2.3) PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	44
3) Régulation spatio-temporelle de la réplication	44
3.1) Régulation spatiale du programme de réplication.....	45
3.2) Régulation temporelle du programme de réplication	45
a) Les différentes méthodes d'analyse du programme de réplication	45
(i) Variation du nombre de copies.....	45
(ii) Enrichissement en loci marqués au BrdU	45
b) Caractéristiques des régions précoces, tardives et de transition	46
c) Domaines en forme de « U » et modèles d'activation des origines	47
d) Conservation et modification du timing de réplication	48

4) Duplication de la chromatine	50
C) Problèmes au cours de la réplication de l'ADN: causes et conséquences du stress réplicatif	52
1) Les causes du stress réplicatif	52
1.1) Les lésions endogènes et exogènes de l'ADN et leur prise en charge au cours de la phase S	52
a) Les lésions exogènes de l'ADN	53
(i) Les rayonnements ultraviolets	53
(ii) Les rayonnements ionisants.....	54
(iii) Les agents chimiques	54
b) Les lésions endogènes de l'ADN.....	54
c) Signalisation des lésions de l'ADN au cours de la phase S	55
(i) Généralités sur le point de contrôle intra S du cycle cellulaire	55
(ii) ATR et Chk1 : signalisation des fourches de réplication bloquées.....	56
d) Mécanismes de tolérance aux lésions : généralités.....	57
e) La synthèse translésionnelle et les polymérases translésionnelles	58
1.2) Les obstacles naturels de la réplication	60
a) Les collisions transcription/réplication	60
b) Les structures secondaires de l'ADN.....	61
(i) Les structures en épingle à cheveux ou cruciformes	61
(ii) La structure ADN-Z	62
(iii) La structure en triple hélice ADN-H.....	62
(iv) La structure en G-quadruplex.....	62
c) Comment ces structures non-B peuvent-elles perturber la réplication ?	63
2) Les conséquences du stress réplicatif	64
2.1) Les conséquences génétiques d'un stress réplicatif : l'exemple des sites fragile communs.	64
a) Qu'est-ce qu'un site fragile commun ?	64
b) La réplication des sites communs fragiles et le stress réplicatif	65
c) Maintenance et conséquences d'une réplication incomplète des SFCs	66
2.1) Les conséquences épigénétiques d'un stress réplicatif : perturbation du recyclage des histones	68
3) Réplication de l'ADN structuré.....	69
3.1) Rôle des hélicases dans la réplication de l'ADN structuré	69
a) Généralités	69
b) L'hélicase FANCI	70
c) Les hélicases WRN et BLM.....	71

2.2) Rôle émergent des ADN polymérases translésionnelles (TLS) dans la réplication de l'ADN structuré	72
a) Rev1 et la réplication des G-quadruplex	72
b) Polη et la réplication des sites fragiles communs	73
D) Polζ: une nouvelle ADN polymérase répliquative?	74
1) Présentation	74
1.1) Polζ chez <i>S. cerevisiae</i>	74
1.2) Polζ chez les eucaryotes supérieurs	77
a) Généralités sur Rev3L	77
b) Rev3L chez la souris et chez l'Homme	78
2) Vers un nouveau rôle de Polζ dans la réplication de l'ADN non endommagé ?	80
Projet de thèse	82
Résumé de l'article 1	83
Discussion et perspectives	84
1) Réplication de l'ADN en absence de Polζ.....	84
a) Conséquences sur la stabilité génétique et épigénétique	84
(i) Instabilité génétique	84
(ii) Instabilité épigénétique	86
b) Conséquences sur le programme de réplication de l'ADN	87
2) Impact de l'absence de Rev3L sur les gènes impliqués dans le développement embryonnaire..	88
3) Recrutement de Rev3L sur l'hétérochromatine péricentromérique : Rôle possible ?	89
4) Polζ : un « driver » de l'évolution des génomes?	90
Bibliographie.....	94
PARTIE II	121
Avant-propos.....	122
A) Le xeroderma pigmentosum de type variant (XP-V).....	123
2) Physiopathologie.....	123
2) Mutations fréquentes de Polη et les cellules XP-V	123
B) L'ADN polymérase spécialisée èta (Polη).....	123
1) Fonction.....	123
2) Structure et localisation cellulaire de Polη	124
3) Polη est localisée au niveau des lésions de l'ADN non réparées au cours de la réplication.....	125
C) Régulations de Polη : rôles et modalités.....	125
1) La régulation de Polη : accès à la chromatine.....	125

a) Mono-ubiquitination de Polη et accès à la chromatine	125
b) Interaction avec PCNA mono-ubiquitiné	126
c) Rad18 et Hsp90 guident Polη au fourches bloquées après UV	126
2) La régulation de Polη après le franchissement de la lésion.....	127
a) Dissociation passive de Polη en aval de la lésion	127
b) Dissociation active de Polη via DVC1/ Spartan	127
c) Mécanisme d'action/ dégradation de Polη (POLH-1 chez <i>C. elegans</i>)	127
d) Ubiquitination et dégradation de Polη dans les cellules humaines en réponse aux UV	128
D) Résumé de l'article 1	129
E) Résumé de l'article 2	130
Bibliographie.....	131

Liste des figures

Figure 1 : La structure du nucléosome.	13
Figure 2 : Modèles d'organisation de la fibre de 30 nm.....	15
Figure 3 : Chromosome métaphasique dépourvu d'histones observé par microscopie électronique....	16
Figure 4: Principales modifications post-traductionnelles des queues des histones formant le cœur du nucléosome.....	16
Figure 5 : Territoires chromosomiques.	19
Figure 6 : Les différents niveaux hiérarchiques d'organisation de la chromatine dans un noyau de mammifère.....	20
Figure 7 : Euchromatine et hétérochromatine au sein d'un noyau.....	20
Figure 8 : Structure de la protéine HP1.....	24
Figure 9 : Organisation de l'hétérochromatine péricentromérique chez la souris et la levure.....	24
Figure 10 : Organisation des centromères et péricentromères chez la levure.....	25
Figure 11 : Organisation de l'hétérochromatine péricentromérique chez la souris et schéma d'un chromosome murin.....	26
Figure 12 : Organisation des centromères et des péricentromères chez l'Homme et la souris.....	27
Figure 13 : Schéma récapitulatif des gènes Hox chez les mammifères et la colinéarité.....	30
Figure 14 : Schéma récapitulatif des gènes soumis à empreinte parentale et leur effet sur la croissance de l'embryon.....	31
Figure 15 : Modèle simplifié de la réplication eucaryote.....	33
Figure 16 : Représentation schématique du chargement des hélicases au niveau des origines de réplication.....	37
Figure 17 : Deux hypothèses expliquant le raccourcissement des télomères.....	42
Figure 18 : Protocole d'étude du timing de réplication.....	46
Figure 19 : Propriétés des régions répliquées en début de phase S (précoces) et des régions répliquées en fin de phase S (tardives) dans les cellules humaines K562.....	47
Figure 20 : Deux modèles d'activation des origines.....	48
Figure 21 : Duplication de la chromatine au cours de la réplication.....	51
Figure 22 : Schéma simplifié des points de contrôle dépendant d'ATR et d'ATM.....	56
Figure 23 : Régulation des voies de tolérance chez <i>S. cerevisiae</i>	57
Figure 24 : Structure des domaines des ADN polymérases de la famille Y.....	59
Figure 25 : Modèle du switch de polymérase lors de la synthèse translésionnelle.....	60
Figure 26 : Multiplicité des structures d'ADN non-B.....	63
Figure 27 : Exemple de gaps et de cassures au niveau des sites fragiles communs sur un étalement métaphasique de cellule humaine.....	65
Figure 28 : Les domaines chromatiniens enrichis en 53BP1 en G1 protègent les lésions ADN générées par une réplication incomplète au niveau des SFCs.....	68
Figure 29 : Modèle pour expliquer la perte de l'information épigénétique sur les brins néosynthétisés en absence de Rev1.....	73
Figure 30 : Modèle de la synthèse translésionnelle opérée par le complexe Rev1-Rev3-Rev7.....	76
Figure 31 : Schémas des protéines Rev3 de levure et Rev3L humaine.....	78
Figure 32 : Modèle des complexes Polδ et Polζ4 chez <i>S.cerevisiae</i>	81
Figure 33 : Modèle des conséquences d'une absence de Rev3L chez les vertébrés supérieurs.....	92
Figure 34 : Recrutement de Polζ4 au niveau des régions hétérochromatiniennes.....	93

Figure 35 : Polζ un driver de l'évolution des génomes?.....	93
Figure 36: Représentation schématique de Polη	124
Figure 37: Localisation de la protéine Polη dans une cellule irradiée localement.....	125
Figure 38: Représentation schématique du domaine de régulation en C-terminal de Polη et des lysines ubiquitinables.....	126
Figure 39: Modèle d'action/ dégradation de POLH-1 chez <i>C. elegans</i>	128

Liste des abréviations et anglicismes

53BP1 : p53 Binding Protein 1
6-4 PP: adduits 6-4 pyrimidines-pirimidones
AAA+: ATPase Associated with diverse cellular Activities
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANT-C: Antennapedia
APH : aphidicoline
ARNnc : ARN non codant
ARNt : ARN transfert
ARNr : ARN ribosomaux
ARS : Autonomous Replicating Sequence
Asf1: Anti-silencing factor 1
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP: Adenosine Triphosphate
ATR: Ataxia telangiectasia and Rad-5-related
BX-C: Bithorax
BER : réparation par excision de base
BLM: hélicase Bloom (BLooM syndrom protein)
BrdU : Bromodésoxyuridine
CAF-1: Chromatin Assembly Factor 1
Cdc45: Cell Division Cycle 45
Cdkn1c: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C
CENPA: Centromere Protein A
CHD: Chromdomain Helicase DNA binding
Chk1: CHeckpoint Kinase 1
CHO : cellules d'ovaires d' hamster chinois (Chinese Hamster Ovary)
CMG: Cdc45, MCM 2-7 et GINS
cnt : domaine central
CPD: cyclobutane dimères de pyrimidines
CDB : cassure double brin
DAP : Damage Avoidance Pathway
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DDK: Dbf4 et Drf1-dependent kinase
Dlk1: Delta-Like 1 Homolog 1
DNMT1: DNA methyl transferase 1
DR : répétitions directes
DRIM : mutagenèse induite par le réplisome (Defective-Replisome-Induced Mutagenesis)
DT40 : lignée cellulaire B aviaire
DUE-1: DNA unwinding element
ERCC1: Excision Repair Cross-Complementation Group 1
FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting
FANCD2 (Fanconi Anemia group J)
FEN1: Flap Endo-Nuclease I
Fe-S: Fer-Soufre
G4 : G-quadruplex
GEMC1: Geminin coiled-coil containing protein
Grb10: Growth Factor Receptor-Bound Protein 10
H19: imprinted maternally expressed transcript
HAT : Histones acétyltransférases
HDAC: Histones désacétylase
HIRA: Histone Regulatory Homolog A
HMT : Histones méthyltransférases Hox
: gene homéotique (Homeobox) HP1:
Heterochromatin Protein 1
HU : hydroxyurée
ICL : pontages inter-brins
Igf2 : Insulin-Growth Factor 2
Igfr2: Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor
imr : séquences répétées inversées (inner repeats)
INO80-SWR1: INOsitol requiring 80-SWitch Related complex
ISWI: Imitation Switch 1
KO: Knock-out
LINE: Long INterspersed Elements
MBD: methyl-CpG binding domain
MCM: Minichromosome Maintenance
MR : mirror sequence
MRT: Mean Replication Timing
NER: réparation par excision de nucléotide
NHEJ : jonction d'extrémités non homologues (Non-Homologous End-Joining)
NLS : Nuclear Localization Signal
OGRE: Origin G-rich Repeat Elements
ORC: Origin Recognition Complex
ORF: cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame)
Pb : Paire de base

PcG : Complexes du groupe Polycomb
 PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
 Peg1-3: Paternally-Expressed Gene 1-3
 PI3K: Plk1-interacting checkpoint helicase
 PIP : PCNA-Interacting Protein
 Pol : Polymérase
 pré-IC : pré-initiation
 pré-RC : complexe pré-répliatif
 RFC : Replication Factor C
 RH : recombinaison homologue
 RI : rayonnements ionisants
 RNase H: Ribonucléase H
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 RPA: Replication Protein A
 S-CDK: S-phase Cyclin-Dependent Kinase
 SCE : échanges entre chromatides sœurs (Sister Chromatid Exchange)
 SFC : sites fragiles communs
 SINE: Short INterspersed Elements
 S/MAR : Scaffold Matrix Attachment Regions
 SWI/SNF: Switching defective/Sucrose nonfermenting
 TC : territoire chromosomique
 TLS : synthèse translésionnelle
 TOPBP1: Topoisomerase-binding protein 1
 TRF1-2: Telomeric Repeat binding Factor 1-2
 TSS: Transcription Start Site
 UBZ : Ubiquitin-Binding Zinc finger
 UFB : pont anaphasique ultrafin (Ultra-Fine Bridge)
 UV : Ultraviolets
 WRN : Werner syndrom
 XP : Xeroderma Pigmentosum
 XP-V : Xeroderma Pigmentosum de type Variant

PARTIE I

Implication de l'ADN polymérase spécialisée zêta au cours de la
réplication de l'hétérochromatine dans les cellules de mammifères

Avant-propos

L'information épigénétique est dupliquée au cours de la réplication et est transmise aux cellules filles au même titre que l'information génétique. Or, le génome contient des séquences intrinsèquement difficiles à répliquer par les polymérases répliquatives conventionnelles : l'hétérochromatine, qui comporte de nombreuses marques épigénétiques spécifiques à la compaction de l'ADN, des séquences d'ADN non-B pouvant former des structures secondaires, ainsi que des séquences répétées. L'hétérochromatine, répliquée en fin de phase S, constitue une grande fraction du génome eucaryote et exerce un rôle important dans la stabilité du génome, la répression transcriptionnelle, la ségrégation des chromosomes et l'organisation nucléaire. Sachant que les régions hétérochromatiques sont en grande partie constituées de séquences d'ADN répétées et restent compactées au cours du cycle cellulaire (Taddei et al., 2001), nous ne connaissons pas les processus utilisés par la machinerie répliquative pour dupliquer ces régions. Il a été montré que l'ADN polymérase répliquative delta (Pol δ) fait des pauses et peut se décrocher de la chromatine lorsqu'elle rencontre des séquences répétées (Walsh et al., 2013). Une hypothèse est que d'autres ADN polymérases moins fidèles, dites spécialisées, pourraient prendre le relais (Bétous et al., 2009; Sarkies et al., 2010). Cependant, les mécanismes régissant leur implication dans la réplication de zones génomiques structurées ne sont pas clairement élucidés.

Nous nous sommes intéressés à l'ADN polymérase spécialisée zêta (ζ) qui est constituée de deux sous-unités : Rev3, sous-unité catalytique, et Rev7, sous-unité régulatrice. Jusqu'ici, la fonction principale de Pol ζ était de catalyser l'extension d'un mésappariement en face d'une lésion d'ADN. Il est important de noter que chez la levure la mutagenèse spontanée ou induite dépend presque exclusivement de Rev3 (Quah et al., 1980). Très récemment, il a été rapporté que Pol ζ interagit avec Pol31 et Pol32 (respectivement p50 et p66 chez l'Homme) deux sous-unités de Pol delta (Pol δ), pour former un complexe très stable appelé Pol ζ_4 constitué de quatre sous-unités (Rev3-Rev7-Pol31-Pol32) (Baranovskiy et al., 2012; Johnson et al., 2012; Lee et al., 2014; Makarova et al., 2012). Le rôle de ce complexe reste indéterminé. La délétion de *Rev3* n'est pas létale chez la levure. En revanche, l'inactivation du gène *Rev3L* chez la souris est létale à l'état embryonnaire, contrairement aux autres ADN polymérases spécialisées. Ceci suggère que Pol ζ_4 a acquis des fonctions essentielles au cours de l'évolution qui restent inconnues à ce jour. Les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) *Rev3L*^{-/-} présentent une grande instabilité génétique associée à une forte augmentation de cassures, de translocations chromosomiques associées à une expression des sites fragiles communs, indiquant que Pol ζ est directement impliquée dans le maintien de la stabilité du génome (Bhat et al., 2013; Wittschieben et al., 2006). **Notre hypothèse est donc que Pol ζ exerce un rôle dans la réplication « normale » du génome des régions difficiles à répliquer**

Introduction

A) La chromatine

Il est désormais bien établi que l'ADN n'est pas nu dans le noyau mais qu'il est accompagné de protéines formant la chromatine. Celle-ci a été mise en évidence en 1879 par les travaux du Dr Fleming qui observa, juste avant la division cellulaire, des corps marqués par coloration de l'ADN avec l'aniline. Le mot chromosome est employé pour la première fois par Waldeyer en 1888 pour mettre en évidence la continuité entre la chromatine observée dans les noyaux en interphase et les bâtonnets observés au cours de la mitose. Il faudra attendre le début du 20ème siècle et les travaux de Heitz sur les chromosomes de plantes pour que soient introduites les notions d'euchromatine et d'hétérochromatine. L'hétérochromatine est définie selon cet auteur comme étant des régions qui restent condensées tout au long du cycle cellulaire. Afin de mieux comprendre les modalités de réplication de l'hétérochromatine et plus globalement de la chromatine, il est utile de rappeler comment elle est organisée.

1) Organisation structurale de la chromatine

1.1) Le nucléosome, unité structurale de la chromatine

Les travaux d'Hemwish et Burgoyne ont mis en évidence que la digestion ménagée de la chromatine avec des endonucléases donne différents fragments d'ADN multiples de 200 pb sur gel de polyacrylamide (Hewish and Burgoyne, 1973). Des extraits de noyaux ont ensuite été analysés au microscope électronique avec des concentrations salines différentes et une structure en « collier de perles », dans laquelle les perles étaient reliées les unes aux autres par de l'ADN de liaison (ADN linker), a pu être visualisée (Olins and Olins, 1974). Cette unité fondamentale qui constitue la chromatine a été nommée nucléosome et fait 10 nm de diamètre (Oudet et al., 1975). Ce cœur d'octamère d'histones comprend deux dimères d'histones H3-H4 et H2A-H2B autour duquel s'enroule 147 pb d'ADN (soit 1,7 tours) en une hélice gauche (Fig.1). C'est l'histone de liaison H1 qui s'associe à un fragment de l'ADN linker et qui va fixer deux tours d'ADN autour du nucléosome en interagissant avec la surface de l'octamère d'histones [pour revue, (Kornberg and Lorch, 1999)]. La cristallographie aux rayons X a pu montrer que le cœur octamérique d'histones prend une forme de disque (Luger et al., 1997).

1.2) Les histones canoniques

Les histones canoniques H3, H4, H₂A et H₂B constituant le cœur du nucléosome sont essentielles et très conservées au cours de l'évolution. Elles sont principalement synthétisées au cours de la phase S du cycle cellulaire. L'invalidation de l'histone de liaison H1 n'est pas

létale, mais cette histone semble jouer un rôle dans l'organisation structurale de la chromatine [pour revue, (Khochbin, 2001)]. Les histones du cœur sont constituées d'une partie N-terminale non structurée et d'un domaine structuré dit « histone-fold » qui est composé de trois hélices alpha reliées entre elles par de courtes boucles afin que les histones puissent se dimériser (Campos and Reinberg, 2009). Les extrémités (ou queues) N-terminales de ces histones ne sont pas directement impliquées dans le maintien de la structure du nucléosome. Elles participent plutôt à la dynamique locale de la chromatine puisqu'elles peuvent être modifiées de manière post-traductionnelle et interagir avec les queues des histones des nucléosomes adjacents. Ces modifications seront présentées plus loin dans l'exposé.

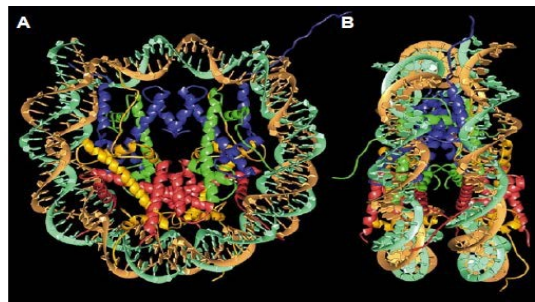


Figure 1 : La structure du nucléosome.

La double hélice d'ADN (en vert et marron) s'enroule autour de l'octamère d'histones. (A) vue parallèle et (B) vue perpendiculaire à l'axe de la double hélice ADN. D'après Luger *et al*, 1997.

1.3) Les variants d'histones

Outre les histones dites « canoniques », il existe des variants d'histones qui sont retrouvés dans des contextes chromatinien particuliers ou chez certains organismes seulement. Ils présentent des variations de séquence par rapport aux histones canoniques, ce qui leur permet de remplir des fonctions particulières affectant des activités telles que la transcription, la traduction, la ségrégation des chromatides sœurs ou encore la réparation (Campos and Reinberg, 2009; Jin et al., 2005). On peut citer par exemple CENPA (CenH3) qui est le variant de l'histone H3 au niveau des centromères et qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage des kinétochores. Il est conservé de la levure à l'Homme. Des études effectuées sur les néocentromères, c'est-à-dire des centromères nouvellement formés suite à une cassure ou à un réarrangement, ont permis de mieux comprendre les modalités de fixation de CENPA à la chromatine. Chez l'Homme, les néocentromères se forment dans des régions dépourvues de séquences répétées caractéristiques des centromères, appelées satellites alpha, mais capables de fixer les principales protéines du kinétochore et donc de permettre la ségrégation lors de la mitose et de la méiose. Ces régions présentent néanmoins un plus grand nombre de séquences AT par rapport au reste du génome et sont parfois enrichies en séquences LINE (pour Long Interspersead Nuclear Element, un type de séquences répétées dispersées associé à l'hétérochromatine et sur lequel je reviendrai ultérieurement) (Marshall et al., 2008). Cela a

permis de mettre en évidence le fait que les centromères, comme les néocentromères, se forment grâce à la convergence de plusieurs facteurs. Chez l'Homme, l'assemblage des centromères nécessite la fixation d'une autre variante histone, CENPB, sur les séquences CENPB-boxes. Des variants d'histones H3, H₂A et H₂B ont d'ores et déjà été identifiés mais aucun pour l'histone H4. Le variant de H2A, H2AX, peut être phosphorylée sur sa sérine 139 (γH2AX), notamment par la protéine ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) (Kinner et al., 2008). Cette modification du variant d'histone H2A a été mise en évidence chez la levure puisque la perte de la partie C-terminale de H2A contenant la sérine 129 (correspondant à la sérine 139 chez les mammifères) entraînait des problèmes de réparation par le NHEJ (Downs et al., 2000). La visualisation de foyers discrets de γH2AX est utilisée comme marqueur fiable et sensible des cassures double brin (CDBs).

1.4) De la fibre de 10 nm à la fibre de 30 nm

La longueur totale de l'ADN (2m) équivalant à environ 100 000 fois la taille de la cellule, on comprend aisément la nécessité de sa compaction. Celle-ci est assurée par le repliement à différents niveaux de la chromatine et ce, de manière hiérarchisée (Woodcock and Dimitrov, 2001). Tout comme pour les protéines, il existe une structure primaire, secondaire et tertiaire de la chromatine.

La structure primaire correspond à la répétition de l'unité de base de la chromatine, à savoir le nucléosome, espacée par de l'ADN linker. C'est ce qu'on appelle aussi la fibre de 10 nm de diamètre. Cependant, cette structure n'est visible que lorsqu'on étudie la chromatine isolée dans des tampons à faible concentration saline.

La structure secondaire est une forme fibrillaire de 30 nm de diamètre, et elle est visualisable lorsqu'on étudie la chromatine isolée à une concentration saline physiologique. Cette fibre de 30 nm est formée par les interactions entre les nucléosomes et H1 qui semblent jouer un rôle important dans le maintien de cette structure (Thoma Koller,T & Klug,A, 1979). Deux hypothèses pour la structure de la fibre 30 nm ont été proposées: le modèle « solénoïde », consistant en une fibre enroulée en solénoïde sur un axe virtuel autour duquel s'enroulent les nucléosomes successifs (Fig. 2B), et le modèle « zigzag » dans lequel l'ADN linker traverse l'axe d'enroulement, conduisant à un agencement des nucléosomes en zigzag (Fig. 2A) [pour revue, (Hübner et al., 2013)]. Bien que sa structure ait été beaucoup étudiée *in vitro*, cette fibre de 30 nm n'a pu être observée *in vivo* que dans deux modèles cellulaires enrichis en chromatine condensée, ce qui suggère qu'elle est impliquée dans la condensation hétérochromatinienne (Scheffer et al., 2011; Woodcock, 1994).

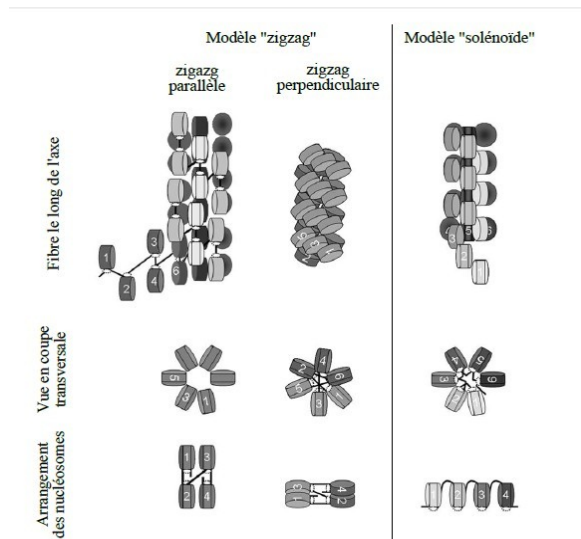


Figure 2 : Modèles d'organisation de la fibre de 30 nm.

Deux modèles, (A) de type « zigzag » et (B) de type « solénoïde », sont le plus souvent proposés. D'après Szerlong & Hansen, 2011.

Enfin la structure tertiaire correspond à l'interaction entre plusieurs fibres de 30 nm permettant la formation de boucles de plusieurs centaines de kb et d'un diamètre de 100 à 300 nm. L'un des exemples de ces larges boucles est retrouvé dans les ovocytes d'amphibiens, en fin de mitose, dans lesquels on peut observer des chromosomes en écouvillons. Ceux-ci consistent en de larges boucles chromatiniennes fixées à un squelette central et qui sont actives transcriptionnellement. Néanmoins, ces boucles chromatiniennes semblent avoir des stabilités différentes selon le rôle qu'elles ont à exercer. On peut par exemple citer le rapprochement d'une séquence enhancer avec un promoteur grâce à cette structure en boucle qui doit être de nature transitoire. Les travaux du laboratoire de Laemmli ont mis en évidence que lorsqu'on expose des noyaux isolés à de faibles doses d'une drogue permettant l'éviction des histones de la chromatine, on observe des halos d'ADN qui, de manière intéressante, conservent leur structure superenroulée (Fig. 3) (Adolph et al., 1977; Paulson and Laemmli, 1977). Cela suggère donc que, même sans nucléosomes, cet ADN reste fixé à une structure nucléaire. Ce qui va de pair avec le fait que l'on ait identifié des séquences d'ADN appelées S/MAR (Scaffold Matrix Attachment Regions) qui se fixent à la matrice nucléaire, permettant ainsi l'ancrage des boucles chromatiniennes. Il a été montré que les sites d'attachement à la matrice nucléaire encadrant une boucle interagissent *in vivo* ce qui pourrait favoriser des réarrangements intra-chromosomiques. Ces réarrangements seraient dépendants des endonucléases ainsi que la TopoII (Eivazova et al., 2009).

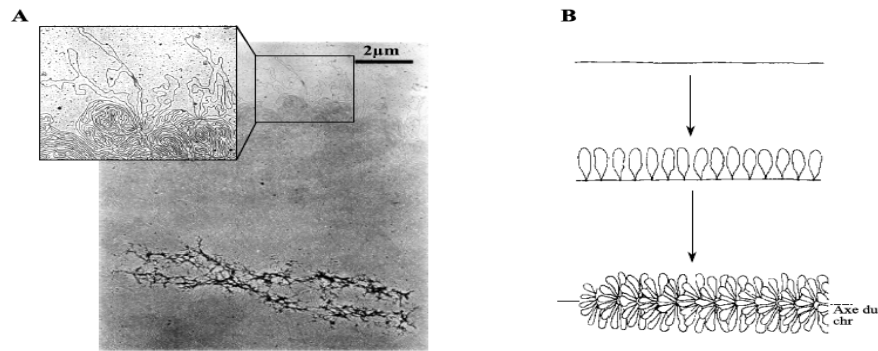


Figure 3 : Chromosome métaphasique dépourvu d'histones observé par microscopie électronique.

(A) Observation des chromosomes. (B) Modèle proposé par Marsden & Laemmli, 1979, montrant les boucles d'ADN ancrées dans la matrice nucléaire. D'après Paulson & Laemmli, 1977.

2) Modifications de la chromatine et remodelage

Bien entendu, la chromatine est une structure flexible et la fixation de protéines capables de modifier l'ADN ou des histones va permettre de moduler sa structure.

2.1) Les modifications des histones

Neuf types de modifications des histones ont été mis en évidence (Fig. 4) [pour revues, (Portela and Esteller, 2010; Young et al., 2010)] :

- sur les lysines : méthylation, acétylation, ubiquitination, SUMOylation et biotinylation
- sur les arginines : méthylation, citrullination et ADP-ribosylation
- sur l'acide glutamique : ADP-ribosylation
- sur les sérines et thréonines : phosphorylation
- sur les prolines : isomérisation *cis-trans*

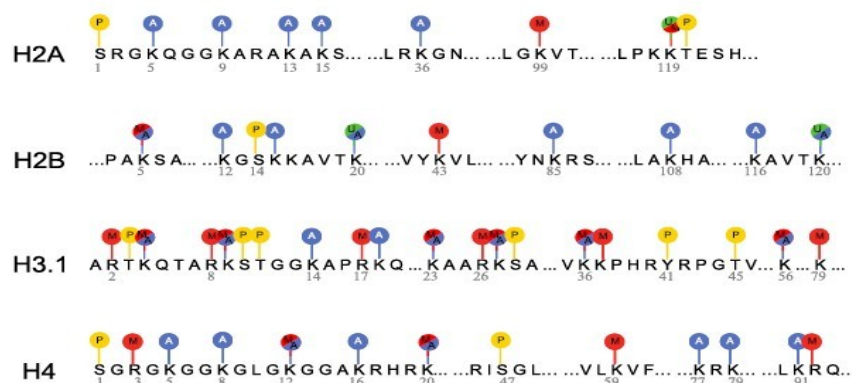


Figure 4: Principales modifications post-traductionnelles des queues des histones formant le cœur du nucléosome.

a) La méthylation

La méthylation consiste en la fixation d'un ou plusieurs groupements méthyles par des histones méthyltransférases (HMT) sur un résidu lysine ou arginine, à différentes positions possibles. Ces marques peuvent être enlevées par des histones déméthylases.

Les marques H3K4me3 et H3K36me3 sont associées à des régions chromatinienne ouverte et active. En revanche, les marques H3K9me, H3K27me et H4K20me correspondent à des régions compactes et transcriptionnellement silencieuses.

La di/tri méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est catalysée par l'histone méthyltransférase Su(var)3-9h 1/2 (SUV39H 1/2) chez les mammifères. Cette modification de l'histone H3 permet de recruter la protéine HP1 qui va aider à la compaction et l'organisation de l'hétérochromatine. La di/tri méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est effectuée par des complexes du groupe Polycomb (PcG), PRC1 et PRC2. Ce recrutement est nécessaire à l'extinction de gènes impliqués dans le développement ou la différenciation [pour revue, (Beisel and Paro, 2011)] .

b) L'acétylation

Lorsqu'un groupement acétyle est ajouté sur une lysine, il neutralise partiellement les charges positives des histones et va permettre le relâchement de l'interaction ADN-histones et faciliter l'accès des facteurs de transcription (Wade et al., 1997; Wolffe and Pruss, 1996). Ce sont les histones acétyltransférases (HAT) qui ajoutent le groupement acétyle et celui-ci peut être retiré par les histones désacétylases (HDAC).

c) Le code histone

L'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones constitue un code appelé « code histone », compréhensible par la cellule et qui permet d'associer à chaque combinaison de modifications un état particulier de la chromatine (pour revue, (Rando, 2012)). Cela nécessite des protéines capables d'établir le code (« writers »), de lire le code (« readers ») et de l'effacer (« erasers »). A l'heure actuelle, on connaît les protéines impliquées dans ces trois phénomènes pour la plupart des modifications post-traductionnelles des histones.

2.2) La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN s'opère de manière exclusive sur le carbone 5 des cytosines précédant des guanines. Les régions riches en répétitions cytosines et guanines sont appelées îlots CpG. La méthylation de ces îlots est le plus souvent associée à une répression transcriptionnelle puisque, en se fixant dans le grand sillon de la double hélice d'ADN, elle va créer un encombrement stérique qui empêche le recrutement des facteurs de transcription

(Watt and Molloy, 1988). Les méthylases responsables de la méthylation de l'ADN sont classées en deux catégories : les méthylases de maintenance, à savoir DNMT1 (DNA Methyl Transferase 1) qui copie le profil de méthylation préexistant sur l'ADN nouvellement synthétisé (Bestor, 2000), et les méthylases *de novo* comme DNMT3a et DNMT3b qui peuvent nouvellement méthyliser certains sites (Okano et al., 1999).

2.3) Les complexes de remodelage de la chromatine

Les complexes de remodelage, de par leur capacité à mobiliser les nucléosomes, vont pouvoir remodeler la chromatine. Leur action consiste à déplacer le nucléosome en *cis* par glissement, en *trans* par transfert ou à l'éliminer de la chromatine. Les complexes de remodelage de la chromatine sont des complexes ATP-dépendants. Ce système de remodelage de la chromatine intervient notamment au cours de processus comme la réplication afin que la fourche de réplication puisse progresser ou encore la transcription pour que les facteurs de transcription puissent se fixer à l'ADN (Becker and Hörz, 2002).

Il existe quatre grandes familles de complexes de remodelage de la chromatine classés en fonction de domaines additionnels présents au sein de l'unité contenant l'activité catalytique ATPase : SWI/SNF (Switching Defective/Sucrose NonFermenting), ISWI (Imitation Switch), CHD (Chromodomain, Helicase, DNA binding) et INO80-SWR1 (INOitol requiring 80-Switch Related complex 1).

3) Architecture nucléaire : les territoires chromosomiques

Les boucles d'ADN ne sont pas dispersées de manière aléatoire dans le noyau en interphase mais la chromatine de chaque chromosome occupe un espace bien défini appelé territoire chromosomique (TC).

3.1) Preuves expérimentales de l'existence des territoires chromosomiques

Afin de mettre en évidence l'existence des TCs, des cellules de hamster chinois (CHO) en interphase ont été irradiées localement avec un laser puis mises en culture avec de la thymidine radiomarquée afin de visualiser les endroits réparés. Les étalements métaphasiques de ces cellules sont ensuite analysés (Fig. 4). De manière très surprenante, seuls quelques chromosomes sont radiomarqués, ce qui montre que chacun d'entre eux occupe une place bien particulière au sein du noyau (Zorn et al., 1979). Il est désormais possible de visualiser ces TCs grâce à la technique du chromosome painting qui consiste à utiliser des sondes ADN fluorescentes afin de visualiser simultanément les chromosomes et leurs emplacements dans le noyau (Fig. 5) (Meaburn and Misteli, 2007).

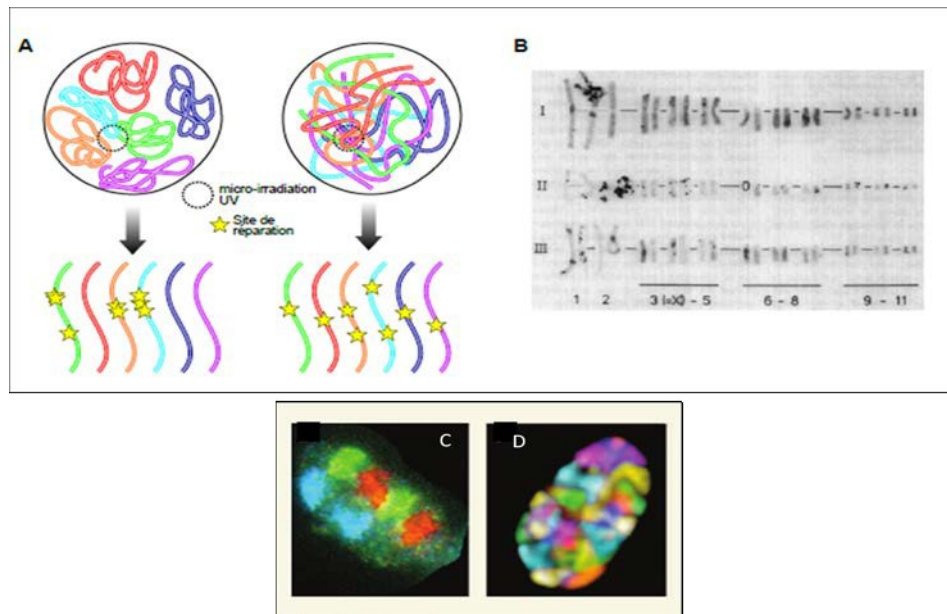


Figure 5 : Territoires chromosomiques.

(A) Protocole utilisé pour les expériences d'irradiation des cellules par Zorn *et al.*, 1979. (B) Caryotypes obtenus montrant les endroits ayant incorporé de la thymidine tritiée. (C) et (D) Exemples de chromosome painting permettant de visualiser les territoires chromatinien. D'après Meaburn & Misteli, 2007.

3.2) Organisation spatiale de la chromatine et des territoires chromosomiques

De manière remarquable, il a été observé que les chromosomes humains de petite taille et riches en gènes sont plutôt regroupés au centre du noyau tandis que les plus grands chromosomes pauvres en gènes sont plutôt observés à la périphérie (Boyle *et al.*, 2001; Francastel *et al.*, 2000). Cependant, il faut rester prudent avec ce genre de corrélations car l'agencement des TCs peut varier en fonction du type cellulaire, du tissu ou encore du stade de différenciation ou de développement (Parada *et al.*, 2004). Un lien entre l'agencement des chromosomes dans le noyau et l'activité transcriptionnelle a aussi été mis en évidence (Finlan *et al.*, 2008). Une exception à cette règle veut que l'activation transcriptionnelle entraîne une sortie du TC pour les gènes *HoxD* (Homeobox D) organisés en cluster sur un même chromosome (Morey *et al.*, 2007). Il semblerait que l'activation de ces gènes n'entraîne pas une sortie du TC, ce qui signifierait que l'expression d'un locus ne va pas forcément de pair avec une relocalisation hors du TC.

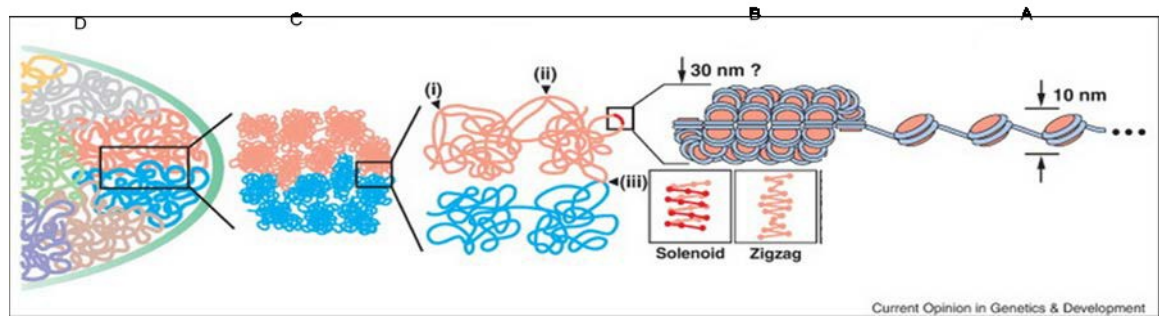


Figure 6 : Les différents niveaux hiérarchiques d'organisation de la chromatine dans un noyau de mammifères.

(A) Le nucléofilament constitué de nucléosomes avec la forme caractéristique en collier de perles. (B) Organisation d'ordre supérieur des nucléosomes en fibre de 30nm. Modèles solénoïde ou en zig-zag. (C) La chromatine est organisée en domaines de l'ordre de la Mb en formant des boucles qui peuvent interagir ensemble. (D) Les chromosomes sont organisés en territoires chromosomiques dans le noyau. D'après Hübner *et al*, 2013.

4) Les domaines structuraux de la chromatine

Les observations cytologiques effectuées par Heinz au début du siècle dernier sur des cellules de plantes ont mis en évidence des régions qui restent condensées durant tout le cycle cellulaire. C'est ainsi que sont apparues les notions d'euchromatine, qui correspond à de l'ADN qui se décondense pendant l'interphase, et d'hétérochromatine qui correspond à de l'ADN toujours condensé (Fig. 7) [pour revue, (Grewal and Jia, 2007)].

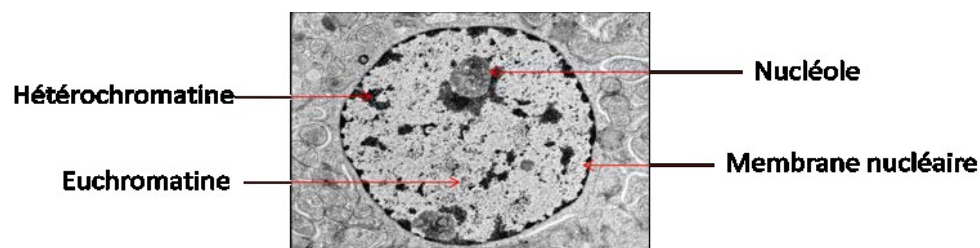


Figure 7 : Euchromatine et hétérochromatine au sein d'un noyau.

D'après http://medcell.med.yale.edu/histology/cell_lab/images/euchromatin_and_heterochromatin.jpg.

4.1) L'euchromatine

L'euchromatine correspond à des régions chromatiniennes qui sont condensées pendant la mitose mais décondensées en interphase. Cette décondensation va de pair avec une chromatine permissive pour la transcription puisque plus accessible aux facteurs de

transcription. Les régions euchromatiniennes sont donc souvent enrichies en gènes, corrélées avec des marques histones activatrices telles que H3K4me ou encore H3K9/14ac (Bernstein et al., 2005; Santos-Rosa et al., 2002) et de l'ADN hypométhylé au niveau des îlots CpG.

4.2) L'hétérochromatine

a) Propriétés générales

L'hétérochromatine correspond à des régions chromatinienues qui restent condensées tout au long du cycle cellulaire. C'est d'ailleurs ainsi qu'elles ont été identifiées par observations cytologiques. De manière générale, l'hétérochromatine correspond à un état fermé de la chromatine, réfractaire à la réparation, la transcription et la recombinaison. Néanmoins, cette chromatine est transcrite à un faible niveau et ces transcrits jouent un rôle dans l'organisation et la compaction de l'hétérochromatine (Martens et al., 2005). Les régions hétérochromatiniennes sont dépourvues de marques histones acétylées et sont, en revanche, riches en marques histones répressives, notamment H3K9me3, H3K27me3 ainsi que H4K20me3. L'importance de la méthylation de l'ADN dans la compaction de l'hétérochromatine a été mise en évidence grâce à l'utilisation d'un analogue de la cytidine, le 5 aza-cytidine qui empêche la méthylation de l'ADN. Lorsqu'il est utilisé sur des cellules, il entraîne une hypométhylation au niveau des régions hétérochromatiniennes suivie de leur décompaction (De Capoa et al., 1996).

Longtemps, on a considéré l'hétérochromatine comme de l'« ADN poubelle » (« Junk DNA ») car on pensait qu'elle ne codait pour rien. Aujourd'hui, on sait qu'elle est primordiale dans différents processus comme la réplication, la ségrégation des chromatides sœurs ou encore la transcription. En effet, la plupart des régions hétérochromatiniennes se situent au niveau des centromères et des régions péracentromériques ainsi qu'au niveau des télomères. Le maintien de ces régions, qui sont riches en séquences répétées, est primordial que ce soit pour la ségrégation des chromosomes [pour revue, (Bloom, 2014)] ou la protection des extrémités des chromosomes [pour revue, (Schoeftner and Blasco, 2009)]. Depuis peu, on a mis en évidence que dans certains cancers, notamment le cancer du sein, l'organisation de l'hétérochromatine est compromise, entraînant des problèmes de morphologie cellulaire ainsi que de ségrégation (Carone and Lawrence, 2013; Zhu et al., 2011).

Deux types d'hétérochromatine existent : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative.

b) L'hétérochromatine constitutive

(i) Séquences associées à l'hétérochromatine constitutive

On parle d'hétérochromatine constitutive lorsque l'état de compaction est permanent, tout au long des cycles cellulaires d'une cellule, et qu'il est transmissible à la génération suivante.

Cette hétérochromatine est riche en régions répétées (qui représentent environ 55% du génome) : en tandem (appelés satellites, environ 10% du génome) ou dispersées (transposons ou rétrotransposons, environ 45% du génome), et pauvre en gènes (Rae and Franke, 1972). Chez l'Homme, les séquences répétées en tandem sont réparties en trois catégories : les satellites, les minisatellites et les microsatellites. Les satellites ont été identifiées il y a 50 ans par centrifugation sur gradient de chlorure de césium (Corneo et al., 1968a, 1968b, 1970; Kit, 1961), et ce, chez tous les eucaryotes supérieurs. Les monomères (unités répétées), qui font en moyenne 200 paires de bases, sont généralement répétées des centaines, voire des milliers de fois. C'est ce qui fait des satellites le composant majeur de l'hétérochromatine. Les ADN satellites représentent jusqu'à 20% du génome chez les plantes, 50% chez les insectes et moins de 5% chez les humains (Lander et al., 2001; Macas et al., 2010). Chez les eucaryotes, les satellites sont le plus souvent localisés aux centromères, aux péricentromères et aux télomères mais peuvent aussi être retrouvées dans les régions hétérochromatiniennes présentes sur les chromosomes sexuels. On retrouve aussi dans le génome des séquences répétées de plus petite taille appelées, les minisatellites, constitués de motifs de 9 à 100 pb. Ils représentent 1% du génome. Ces séquences présentent un polymorphisme élevé, ce qui explique leur utilisation dans les tests de paternité par exemple. Deux catégories de minisatellite ont été mises en évidence :

- les séquences minisatellites hypervariables à la fois dans la taille des motifs et le nombre de répétitions. Ces séquences font de 9 à 24 pb et partagent une séquence commune (GGGCAGGANG).
- les séquences télomériques composées d'un motif hexanucléotidique répété chez l'Homme et les vertébrés (TTAGGG) qui auraient pour rôle de protéger les extrémités chromosomiques (Meyne et al., 1989).

Les séquences microsatellites sont des répétitions en tandem de moins de 9 pb, les motifs étant généralement répétés de 5 à 40 fois. Elles sont utilisées notamment comme marqueur pour calculer des distances génétiques entre des populations ou des individus. Elles sont aussi impliquées dans de nombreuses pathologies humaines comme la maladie de Huntington, la dystrophie myotonique ou encore le syndrome de X fragile qui présentent un nombre important de répétitions des trinuécléotides CAG, CGG, GAA ou CTG [pour revue, (López-Flores and Garrido-Ramos, 2012)].

D'autre part, les séquences répétées dispersées, qui représentent 45% du génome humain, sont des séquences capables de se déplacer d'une position chromosomique à une autre. Elles sont communément appelées transposons. Ces déplacements se font soit sous la forme ADN, soit sous la forme ARN (on parle alors de rétrotransposons). Parmi ces rétrotransposons, deux catégories sont présentes au niveau de l'hétérochromatine : les éléments de quelques nucléotides appelés SINE (Short INterspersed Elements) et les éléments de plusieurs milliers de nucléotides appelés LINE (Long INterspersed Elements).

Les LINEs représentent 21% du génome humain et 19% chez la souris. Leur longueur est comprise entre 3 et 7 kb et sont capables de se rétrotransposer de manière autonome. Pour cela, les LINEs contiennent deux ORF (Open Reading Frame), l'ORF1 qui code pour une

protéine capable de se fixer à l'ARN et ayant une activité protéine chaperon (l'équivalent de Gag pour les rétrovirus) et l'ORF2 codant pour une reverse transcriptase ainsi que pour une RNase H (Ribonucléase H) et une endonucléase. Ces éléments LINEs sont préférentiellement localisés dans les séquences riches en AT, notamment au niveau des centromères (López-Flores and Garrido-Ramos, 2012). De par leur capacité à se rétrotransposer de manière aléatoire dans le génome, notamment dans des gènes ou à proximité, les LINEs sont à l'origine de certaines maladies humaines. Ainsi le premier LINE humain actif a été mis en évidence dans un cas d'hémophilie où le gène du facteur VII était inactivé suite à une rétrotransposition (Dombroski et al., 1991). On sait maintenant que la rétrotransposition est à l'origine de multiples maladies telles que la neurofibromatose et la β -thalassémie. Les SINEs sont quant à eux des éléments qui n'excèdent pas 600 pb et représentent 10% du génome humain. Ce sont des éléments non autonomes car ils ne codent pour aucune protéine. Ils sont donc dépendants des LINEs pour leur rétrotransposition (Smit, 1996).

Ces séquences répétées sont transcrites de manière infime et peuvent intervenir dans des processus de régulation d'expression de gène ou de conformation de l'hétérochromatine.

(ii) Marques épigénétiques associées à l'hétérochromatine constitutive et HP1

Au niveau moléculaire, l'hétérochromatine constitutive est enrichie en ADN méthylé, en histones hypo-acétylées, en marques histones répressives H3K9me3 et H4K20me3, en protéines de compaction de l'ADN comme HP1 (Heterochromatin Protein One chez les mammifères) ainsi qu'en ARN non codant (ARNnc). Chez les mammifères, la marque H3K9me3 est dépendante des histones méthyltransférases SUV39H1/2 et est spécifique de l'hétérochromatine péricentromérique puisqu'une perte de fonction de ces protéines n'a de répercussion que sur la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine K9 au niveau des péricentromères (Lehnertz et al., 2003; Peters et al., 2001, 2003). Cette perte est aussi associée à une légère augmentation de la transcription des régions péricentromériques (Martens et al., 2005). Néanmoins, il a été montré que la protéine du groupe polycomb SUZ12, qui appartient au complexe histone méthyltransférase EED/EZH2 et qui est responsable de la marque d'hétérochromatine facultative H3K27me3, a un impact sur la marque H3K9me3. En effet, une inactivation de SUZ12 dans des cellules humaines entraîne non seulement une diminution de la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 mais aussi, de manière inattendue, de la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (Boros et al., 2014a). La marque H3K9me3 est importante pour la compaction de la chromatine au niveau des régions hétérochromatiniennes puisqu'elle permet le recrutement des protéines HP1 (HP1 α , β et γ) *via* leurs chromodomaines situés en N-terminal (Fig. 8) (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001).

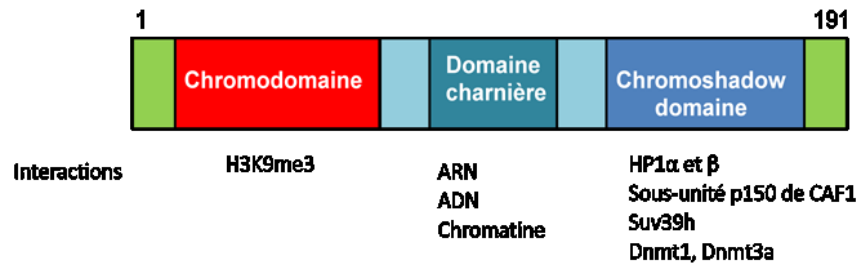


Figure 8 : Structure de la protéine HP1.

HP1 est composée de 3 domaines : le chromodomaine qui permet de contacter H3K9me3, le domaine charnière permettant l'interaction avec la chromatine et enfin le domaine chromoshadow permettant d'interagir avec d'autres protéines HP1 mais aussi avec la sous-unité p150 de CAF-1 ou encore les modificateurs d'histone et d'ADN que sont Suv39h et les DNMT. Adapté de Maison et *al*, 2004.

D'ailleurs, la perte d'activité de SUV39H1 empêche la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 ainsi que la relocalisation d'HP1 au niveau des péricentromères (Bannister et al., 2001). La protéine HP1 possède des homologues chez différents organismes comme *D. melanogaster*, chez qui elle a été identifiée en premier ou encore *S. pombe* (Swi6). Les protéines HP1 sont capables d'interagir les unes avec les autres *via* leur domaine chromoshadow situé en C-terminal ainsi qu'avec SUV39H, ce qui permettrait une propagation de l'hétérochromatine. En effet, lorsque l'histone H3 est triméthylée sur la lysine 9, il y a un recrutement de HP1 qui a son tour permet le recrutement de SUV39H pour trimétyler l'histone à proximité (Fig. 9A). De plus, SUV39H est aussi capable d'interagir avec H3K9me3. HP1 recrute les ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3a permettant ainsi une méthylation de l'ADN et une compaction accrue de la chromatine au niveau des péricentromères. Chez *S. pombe*, c'est l'HMT Ctr4 qui va méthyler la lysine 9 de l'histone H3 et permettre le recrutement des orthologues de HP1 que sont Swi6 et Chp2 (Fig.8B). De même que chez les mammifères, il a été proposé que le recrutement séquentiel des différents acteurs permettrait la propagation des marques hétérochromatiniennes (Grewal and Moazed, 2003; Nakayama et al., 2001).

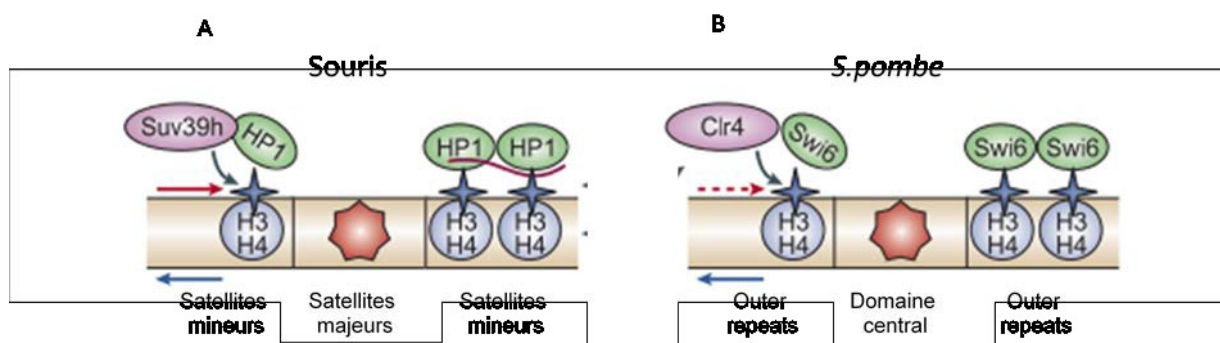


Figure 9 : Organisation de l'hétérochromatine péricentromérique chez la souris et la levure.

(A) Chez la souris, l'HMT Suv39h trimétyler l'histone H3 sur la lysine 9, ce qui crée un site de fixation pour HP1 qui reconnaît cette modification histone *via* son chromodomaine. (B) Chez *S.pombe*, c'est la protéine Ctr4

qui modifie l'histone H3 sur la lysine 9 et permet le recrutement de l'orthologue d'HP1 chez la levure, Swi6. Ces modifications locales se propagent rapidement pour conférer à l'hétérochromatine constitutive son organisation. D'après Maison et *al*, 2004.

De manière intéressante, l'autre marque histone spécifique de l'hétérochromatine constitutive H4K20me3, est dépendante d'H3K9me3 mais l'inverse n'est pas vrai. C'est une autre HMT, SUV420H, qui est responsable de la triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (Schotta et al., 2004). Bien que la fonction de cette marque reste peu comprise, il semblerait qu'elle puisse jouer un rôle dans la cohésion des chromatides sœurs au niveau des péricentromères en interagissant avec des protéines du complexe cohésine (Hahn et al., 2013).

iii) Centromères et péricentromères chez les eucaryotes

Comme il a été dit précédemment, la présence d'hétérochromatine à proximité des centromères est importante pour le bon fonctionnement de la ségrégation des chromosomes ainsi que pour le maintien de l'intégrité de ces régions. En effet, le fait que les régions centromériques soient compactées empêche l'expression de séquences qui sont susceptibles de perturber l'attachement des microtubules à leurs sites de fixation, entraîne le recrutement d'une grande quantité de cohésines et de condensines, et enfin, permet au chromosome de mieux supporter localement la force exercée lors de la ségrégation des chromatides sœurs [pour revue, (Bloom, 2014)].

Chez la levure

Le centromère le plus simple est retrouvé chez *S. cerevisiae*. Il a été bien caractérisé puisque *S. cerevisiae* est la seule espèce chez laquelle l'élaboration du kinétochore ne dépend que de la séquence primaire en ADN. On parle donc de «centromère ponctuel». Le centromère est organisé en unités de 125 pb divisées en trois éléments, CDEI-II-III. CDEI et CDEIII sont des sites de fixation des protéines Cbf1 et CBF3 respectivement (Fig. 10A). Une fois fixées, ces protéines maintiennent cenH3(Cse4) au niveau du motif CDEII, riche en répétitions AT. Les régions entourant le centromère de *S.cerevisiae* ne sont pas des régions hétérochromatiniennes et aucun homologue de HP1 n'a été identifié. Néanmoins, ces régions sont tout de même compactes et résistantes aux nucléases (Kenna et al., 1988). De plus, il a été montré que des changements dans la chromatine entourant les centromères peuvent affecter la formation du kinétochore et perturber la ségrégation des chromosome au cours de la mitose (Pinto and Winston, 2000).

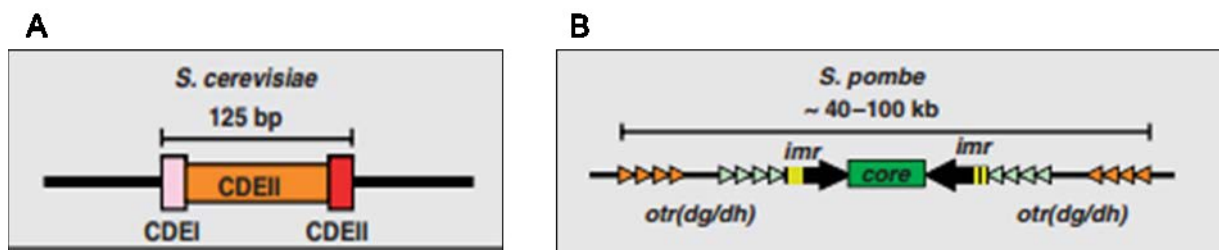


Figure 10 : Organisation des centromères et péricentromères chez la levure.

D'après Torras-Llort et al, 2009.

Chez *S. pombe* la structure des centromères comprend un domaine central (cnt), auquel s'associe CenH3/Cnp1, entouré de deux séquences répétées inversées (imr pour inner repeats) qui sont uniques pour chacun des trois chromosomes (Fig. 10B). Ces séquences sont nécessaires au bon fonctionnement du centromère ainsi qu'à la fixation du fuseau mitotique (Nakaseko et al., 2001; Polizzi and Clarke, 1991). Enfin, aux extrémités des centromères se trouvent les « outer repeats » composées d'éléments répétés appelés dg et dh (Bjerling and Ekwall, 2002). Ces séquences sont disposées tête-bêche l'une par rapport à l'autre et sont symétriques par rapport au centromère. De plus, elles forment des régions hétérochromatiniennes importantes pour le fonctionnement des centromères (Torras-Llort et al., 2009).

Chez la souris

De nombreuses études ont été axées sur l'hétérochromatine chez la souris, et ce pour plusieurs raisons : d'une part, il est intéressant de pouvoir travailler sur des KO (Knock-Out) pour certaines protéines clés de l'hétérochromatine comme HP1 et, d'autre part, les cellules murines présentent la particularité d'avoir leurs régions hétérochromatiniennes visualisables par marquage au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Fig. 11A). On peut alors observer dans les noyaux interphasiques des spots correspondant au regroupement de régions péri-centromériques de plusieurs chromosomes appelés chromocentres (Fig. 11B) (Maison and Almouzni, 2004). Les régions centromériques chez la souris se composent de répétitions riches en AT appelées satellites mineurs (minor satellites) et localisées à proximité des centromères (Fig. 11C). Ces satellites sont composés d'environ 2 000 copies d'une unité de base de 120 pb, ce qui correspond à ~ 0,4% du génome. Ils sont répliqués à la fin de la phase S (Guenatri et al., 2004). Les régions péri-centromériques sont, elles aussi, riches en répétitions AT et sont appelées satellites majeurs. Ces séquences font 234 pb et sont au nombre d'environ 10 000 copies. Cela représente 3% du génome murin (Martens et al., 2005). Ces satellites majeurs sont répliqués dès le milieu de la phase S (Guenatri et al., 2004).

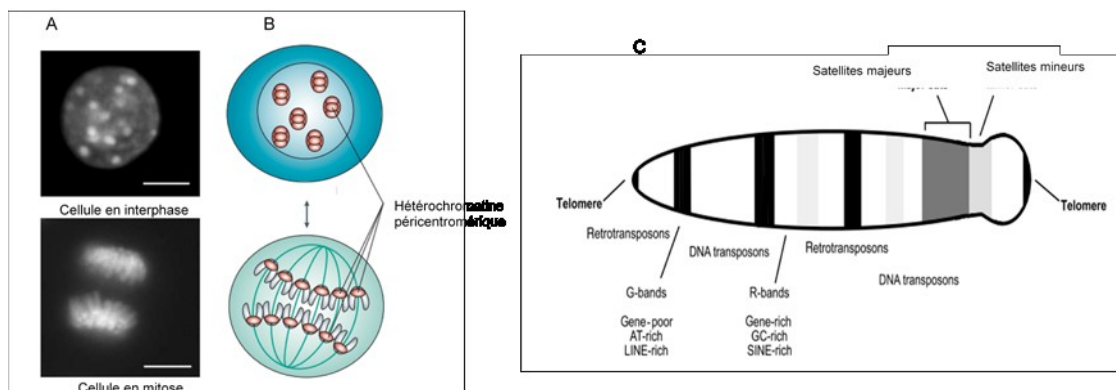


Figure 11 : Organisation de l'hétérochromatine péri-centromérique chez la souris et schéma d'un chromosome murin.

(A) Images de noyaux de cellules de souris en interphase et en métaphase marqué au DAPI. On observe des spots plus intensément marqués par le DAPI qui correspondent à de l'hétérochromatine péricentromérique. (B) Schéma de ce qui est visualisé sur les images. (C) Schéma simplifié d'un chromosome murin. D'après Maison et al, 2004 et Martens et al, 2005.

Chez l'Homme

Les centromères humains sont composés de différents motifs de type répétitions alpha satellites de 171 pb (Choo et al., 1991). Ces régions satellites interagissent en grande partie avec CENPA puisqu'on estime à environ 400 le nombre de molécules CENPA présentes sur un centromère humain (Bodor et al., 2014). CENPB est lui aussi recruté, mais de manière moins importante au niveau de certains centromères, en se liant à des régions de 17pb appelées CENP-B boxes. Ce recrutement aiderait au positionnement du centromère sur le chromosome (Masumoto et al., 2004).

Les péricentromères humains, quant à eux, sont composés de trois types de séquences répétées : les satellites I, II et III (Fig.12). Ceux-ci ont été les premières séquences répétées en tandem identifiées dans le génome humain dans les années 80, notamment en procédant à des digestions enzymatiques (Prosser et al., 1986).

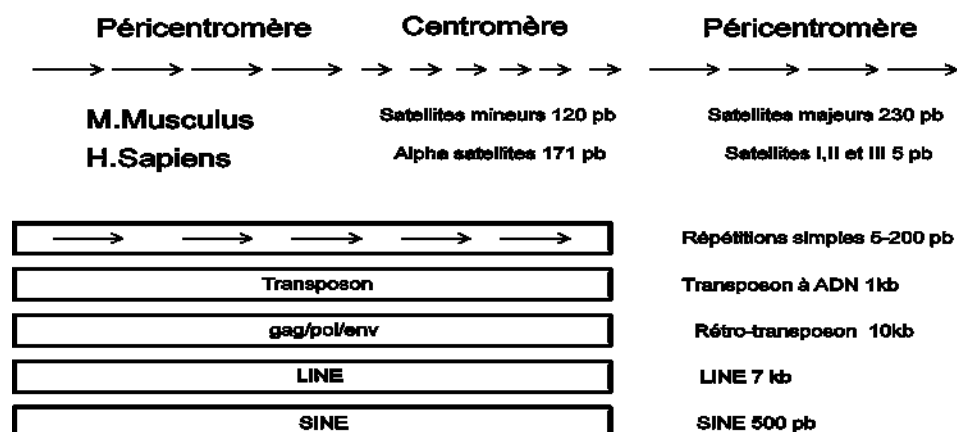


Figure 12 : Organisation des centromères et des péricentromères chez l'Homme et la souris.

Adapté de Saksouk et al, 2015.

c) L'hétérochromatine facultative

(i) Mise en évidence

L'hétérochromatine facultative correspond à des régions chromatiniennes qui peuvent adopter soit une conformation fermée, soit une conformation ouverte en fonction du contexte spatial ou temporel. Cette sous-structure de l'hétérochromatine a été mise en évidence pour la première fois par Brown en 1966 grâce au microscope électronique (Brown, 1966). Néanmoins, Muller en 1930 avait déjà, sans le savoir, identifié l'hétérochromatine facultative

en étudiant le changement de couleur des yeux de drosophile après irradiation aux UV des embryons. Cet effet fut par la suite directement attribué au fait que, après réparation par recombinaison homologue, le gène responsable de la pigmentation rouge des yeux de drosophile peut se retrouver inactivé en étant relocalisé à proximité ou dans une région d'hétérochromatine facultative [pour revue, (Elgin and Reuter, 2013)]. C'est ce qui a été appelé par la suite la variégation (Position-effect variegation en anglais). L'hétérochromatine facultative est retrouvée au niveau de gènes du développement, à savoir les gènes *Hox* (Homeotic genes) et les gènes soumis à empreinte parentale, c'est-à-dire des gènes dont un seul des deux allèles parentaux s'exprime.

(ii) Hétérochromatine facultative et développement : les gènes *Hox*

Les gènes Hox : de la drosophile aux vertébrés

Au cours du développement, l'expression de certains gènes doit se faire de manière séquentielle à un moment bien précis. Les gènes *Hox* ont été identifiés chez la drosophile sous forme de deux clusters de gènes : les complexes Antennapedia et Bithorax (*ANT-C* et *BX-C*) (Lewis, 1978; Lewis and Kaufman, 1980). Les premières études ont permis de montrer chez la drosophile adulte que les gènes *Hox* sont impliqués dans le développement et l'identité des segments le long de l'axe antéro-postérieur. En effet, des mutants pour certains gènes *Hox* présentaient des anomalies de développement, notamment des transformations homéotiques. Le clonage des gènes *BX-C* et leur analyse a permis de mettre en évidence que les gènes *Hox* sont exprimés de manière séquentielle le long de l'axe antéro-postérieur, et ce, en suivant l'ordre des gènes au niveau du cluster de 3' en 5' (Akam, 1987; Bender et al., 1983; Harding et al., 1985). C'est ce que l'on appelle le principe de colinéarité (Fig. 13A). Les orthologues des gènes *Hox* ont été identifiés chez la souris dans les années 1980. Il a été montré que ces gènes sont également organisés sous forme de cluster et que leur expression suit un schéma similaire à celui de la drosophile (Duboule and Dollé, 1989; Graham et al., 1989). La plupart des vertèbres possèdent au moins quatre clusters de gènes *Hox* qui résultent sans doute de la duplication d'un cluster ancestral (Hurley et al., 2005).

Régulation transcriptionnelle des gènes Hox : importance des marques épigénétiques et de la conformation de la chromatine

Au début du développement, les gènes *Hox* ne sont pas exprimés et s'activent progressivement de manière séquentielle en fonction de la position des gènes dans le cluster (Kmita and Duboule, 2003). Cette régulation temporelle de l'expression des gènes *Hox* est importante puisque, lorsque l'on modifie l'ordre dans lequel ils s'expriment normalement, on observe de graves altérations phénotypiques (Juan and Ruddle, 2003; Kondo and Duboule, 1999).

Ces gènes vont donc devoir s'exprimer puis s'éteindre au cours du développement. Ceci explique pourquoi, au niveau moléculaire, on retrouve à la fois des marques d'histone

répressives comme H3K27me3 mais aussi activatrices comme H3K4me3 (Guenther et al., 2007; Mikkelsen et al., 2007). Dans les cellules souches embryonnaires murines associées au stade le plus précoce du développement, les gènes *Hox* sont associés en majeure partie à la marque histone H3K27me3 et très peu associés à la marque H3K4me3 : on parle alors de bivalence chromatinienne (Bernstein et al., 2006; Soshnikova and Duboule, 2009). En étudiant le cluster *HoxD* chez la souris, il a été montré qu'au cours du développement, la marque histone H3K27me3 disparaît au profit de la marque H3K4me3 (Fig. 13B) (Soshnikova and Duboule, 2009). Cela suggère que la temporalité de l'activation des gènes *Hox* est dépendante des changements épigénétiques au niveau du cluster. Ces modifications des marques épigénétiques au niveau des clusters *Hox* sont dues aux complexes PcG PRC1 et 2. L'un des composants du complexe PRC2, Ezh2 est capable de triméthyliser la lysine 27 de l'histone H3. Des techniques d'analyse pangénomiques ont mis en évidence une colocalisation de la marque H3K27me3 et des protéines composant les complexes PRC1 et PRC2 dans des cellules ES murines et humaines (Boyer et al., 2006; Lee et al., 2006). De plus, une inactivation du complexe PRC2 entraîne la perte de la marque H3K27me3 et une levée de la répression de l'expression des gènes *Hox* (Boyer et al., 2006). Le recrutement de PRC1 au niveau des marques H3K27me3 accentue d'avantage la répression des gènes *Hox* puisqu'il va permettre l'ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119 et ainsi empêcher le recrutement de l'ARN polymérase II nécessaire à la transcription (Stock et al., 2007; Wang et al., 2004). De plus, des délétions dans les gènes composant le complexe PRC1 sont à l'origine de transformations homéotiques (Mallo and Alonso, 2013). Néanmoins, on ne connaît pas exactement les modalités de recrutement des complexes PcG au niveau des gènes *Hox*. Il semblerait que plusieurs facteurs interviennent comme la richesse en GC des promoteurs de ces gènes ainsi qu'une interaction préférentielle des complexes PcG avec de longs ARN non codants. C'est le cas d'un ARN non codant Hotair, transcrit en 5' du gène *HoxC*, qui est capable d'interagir avec Suz12 (complexe PRC2) et de réprimer des gènes du cluster *HoxD* dans des cellules en culture (Davidovich et al., 2013; Kaneko et al., 2014; Schorderet and Duboule, 2011).

L'analyse de la localisation subnucléaire des complexes PRC chez la drosophile a montré qu'ils sont confinés dans des régions appelées « Polycomb bodies » (Buchenau et al., 1998). Grâce à la technique de capture de la conformation des chromosomes (3C) dans des cellules ES de souris ainsi que dans des cellules cancéreuses humaines où les gènes *Hox* sont réprimés, il a été mis en évidence un regroupement de ces gènes au sein de territoires chromatinien bien définis (Ferrauiolo et al., 2010; Noordermeer et al., 2011). En revanche, dans des tissus exprimant certains gènes *Hox*, les clusters de gènes actifs apparaissent sous forme de compartiment distinct de celui des gènes inactifs (Fig. 13C) (Noordermeer et al., 2011). Bien qu'on ne comprenne pas encore les modalités de compartimentalisation des gènes *Hox* actifs et inactifs, on pense que les marques épigénétiques spécifiques d'activation de ces gènes y jouent un rôle primordial.

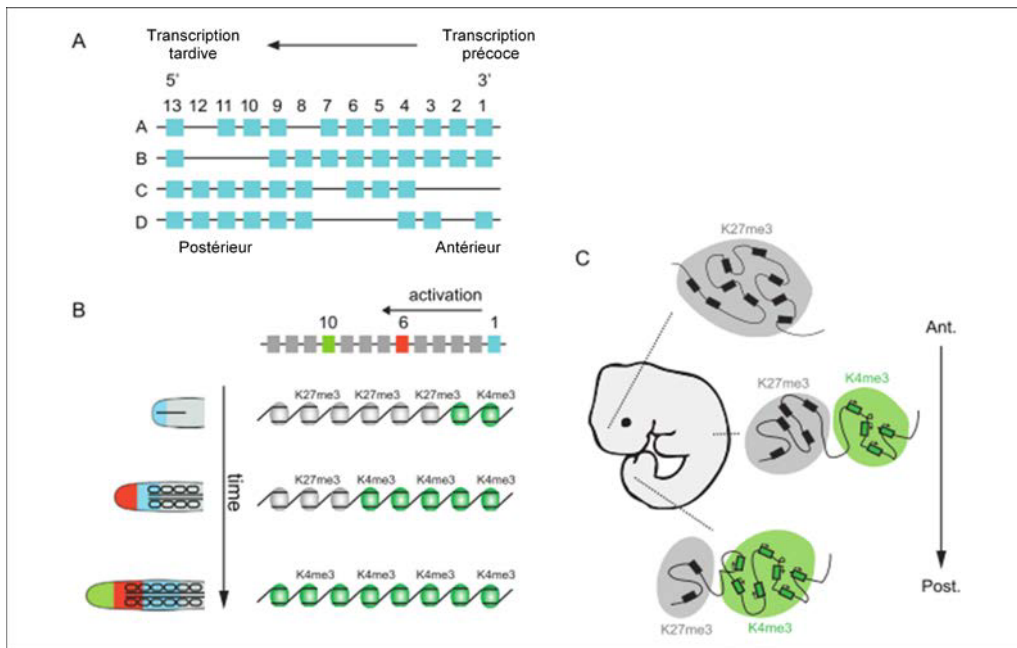


Figure 13 : Schéma récapitulatif des gènes *Hox* chez les mammifères et la colinéarité.

(A) Chez les mammifères, les gènes *Hox* sont classés en 4 grands clusters de A à D. Ces gènes sont exprimés du 3' vers le 5' et ce, de manière antéro-postérieure (principe de colinéarité). (B) et (C) On observe la dynamique de la chromatine au niveau des gènes *Hox*. Au fur et à mesure que les gènes sont exprimés au cours du développement, on assiste à une disparition des marques épigénétiques répressive (H3K9me3) au profit des marques activatrices (H3K4me3). D'après Montavon et *al*, 2014.

(iii) Hétérochromatine facultative et développement : les gènes soumis à empreinte parentale

Mise en évidence et rôle

L'importance de l'expression de gènes maternels ou paternels a été mise en évidence dans des études cytogénétiques sur les chromosomes d'arthropodes dans les années 1930, notamment dans le déterminisme du sexe de l'individu (Metz, 1938). Dans les années 1960, l'inactivation entière d'un des deux chromosomes X dans les cellules femelles de marsupiaux et de souris a pu être mis en évidence (Brown and Chandra, 1973; LYON, 1962). Cela permet de compenser les différences quantitatives du fait qu'il y n'ait un seul chromosome X dans les cellules mâles. Le choix du chromosome inactivé dans chaque cellule se fait de manière aléatoire et précoce au cours du développement de l'individu femelle. C'est aussi à cette époque que le terme d'empreinte génétique parentale apparaît. Il désigne le processus réversible d'expression différentielle d'un ou plusieurs gènes en fonction de son origine paternelle ou maternelle chez les mammifères placentaires. Les travaux du laboratoire de D. Solter sur les transferts nucléaires permettant d'échanger les noyaux issus des spermatozoïdes et des ovocytes dans des œufs de souris fécondés ont permis de mieux comprendre l'empreinte parentale génétique (McGrath and Solter, 1984). Pour cela, des gynogénètes,

composés de deux noyaux femelles, et des androgénotes, composés de deux noyaux mâles, ont été obtenus mais les embryons n'étaient pas capables de se développer jusqu'à terme. Néanmoins, les embryons développaient des caractéristiques particulières en fonction de leur origine soit gynogénote ou androgénote. En effet, quand les embryons gynogénotes présentaient un développement relativement normal et une atrophie des annexes embryonnaires, les embryons androgénotes présentaient un développement très limité tandis que les annexes embryonnaires étaient normales. Il a donc été proposé que les génomes mâles et femelles apportent une contribution complémentaire au développement des embryons et ce, malgré leur constitution génétique identique. D'autres études, réalisées à partir de croisements de souris ayant subi des remaniements chromosomiques afin d'obtenir des individus possédant une paire de chromosome d'un seul des deux parents, ont mis en évidence une centaine de gènes soumis à empreinte parentale. Ces expériences ont permis de dresser une carte génétique des régions soumises à empreinte chez la souris qui continue de s'affiner. Les gènes soumis à empreinte sont principalement situés sur les chromosomes 6, 7, 11, 14, 15 et 20. Parmi eux, on trouve des gènes impliqués dans la croissance de l'embryon et du placenta. De manière intéressante, les gènes exprimés par l'allèle du père tels que *Igf2* (Insulin-growth factor2), *Peg1* (Paternally-expressed gene 1), *Peg3* (paternally –expressed gene 3) et *Dlk1* (Delta-Like 1 Homolog 1) favorisant la croissance quand les gènes exprimés par l'allèle de la mère comme *Igfr2* (Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor), *Cdkn1c* (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C), *H19* (imprinted maternally expressed transcript) et *Grb10* (Growth Factor Receptor-Bound Protein 10) l'inhibant (Fig. 14). L'inactivation de ces gènes se produit le plus souvent pendant la vie embryonnaire et se prolonge plus ou moins longtemps après la naissance par des mécanismes de méthylation de l'ADN.

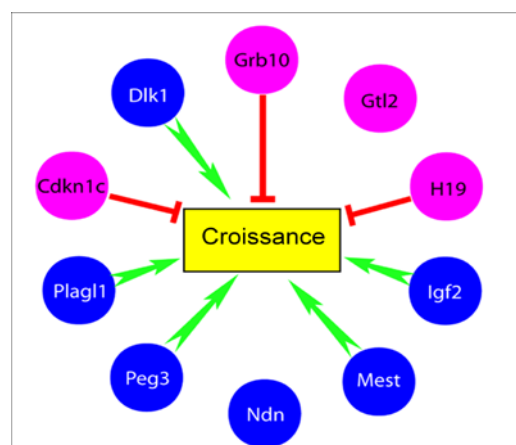


Figure 14 : Schéma récapitulatif des gènes soumis à empreinte parentale et leur effet sur la croissance de l'embryon.

En rose les gènes exprimés par l'allèle maternel et en bleu les gènes exprimés par l'allèle paternel. Flèche verte : favorisant la croissance. Flèche rouge : inhibant la croissance. D'après Berg et *al*, 2011.

Il est intéressant de noter que près de 80% des gènes identifiés comme étant soumis à empreinte sont retrouvés sous forme de clusters contenant au moins deux gènes (Wan and Bartolomei, 2008). Sept de ces clusters ont été particulièrement bien étudiés. Les gènes situés sur un même cluster partagent une région d'ADN qui sert d'élément régulateur pour l'empreinte : on parle d'« imprint control element » dont la taille varie de 2 kb chez la souris à 5 kb chez l'Homme. Cette région est méthylée au cours de la gamétogenèse soit dans le spermatozoïde, soit dans l'ovocyte et cette méthylation est maintenue dans les cellules diploïdes de l'embryon (Barlow, 2011). Des défauts de méthylation de l'ADN causés par des mutations dans la famille des gènes *Dnmt* (les ADN méthyltransférase *de novo* *Dnmt3a*, de maintenance *Dnmt1* et le cofacteur *Dnmt3L*) altèrent l'expression des gènes soumis à empreinte et donc le développement des embryons (Li et al., 1993). Bien que la méthylation de l'ADN soit l'un des mécanismes fondamentaux permettant la modulation de l'expression des gènes soumis à empreinte, les modifications d'histones *via* les complexe PcG jouent elles aussi un rôle très important. En effet, la présence des protéines du complexe PRC2 et de la marque d'hétérochromatine facultative H3K27me3 a été mise en évidence au niveau des loci soumis à empreinte dans des cellules souches embryonnaire et dans des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (Boyer et al., 2006). Des embryons *Eed*^{-/-}, déficients en protéine du complexe PRC2, présentent des défauts sévères de développement et meurent entre 5 à 8 jours post-coït (Mager et al., 2003). L'analyse de l'expression des gènes soumis à empreinte a mis en évidence une expression bi-allélique de certains de ces gènes comme *Ascl2*, *Grb10* ou *Cdknc1* (Faust et al., 1995; Wang et al., 2002). De manière surprenante, aucun changement global du niveau de méthylation de l'ADN n'a été mis en évidence. On note toutefois des changements locaux. Une autre histone méthyltransférase, EHMT2, connue pour méthyliser H3 sur la lysine 9 est nécessaire à la répression de certains gènes soumis à empreinte mais uniquement dans le placenta (Nagano et al., 2008). De même que pour les gènes *Hox*, on retrouve une bivalence des marques épigénétiques au niveau des clusters des gènes soumis à empreinte puisqu'on trouve aussi, associées au gènes actifs de ces clusters la marque H3K4me3 [pour revue, (Trojer and Reinberg, 2007)].

L'ADN d'une cellule qui, comme nous l'avons vu, n'est pas nu dans le noyau, doit être répliqué intégralement dans sa séquence mais les marques épigénétiques portées doivent elles aussi être dupliquées afin de conserver l'identité cellulaire, le programme de réplication ainsi que l'organisation chromatinienne. Nous allons donc présenter les modalités de la réplication permettant de conserver l'intégrité de l'information génétique mais aussi épigénétique.

B) La réplication

La duplication de la chromatine a pour fonction de conserver l'information génétique et épigénétique d'une cellule mère aux cellules filles. Chez les eucaryotes, on sait que la réplication s'opère au niveau de milliers de fourches de réplication individuelles qui vont être activées ou non par une combinaison de facteurs, et ce, de manière très ordonnée. Elle s'opère au cours de la phase S du cycle cellulaire en trois grandes étapes clés que sont : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La machinerie de réplication comprend des polymérases qui assurent la duplication fidèle du génome et d'autres protéines qui assurent le maintien de l'intégrité génomique (Fig. 15).

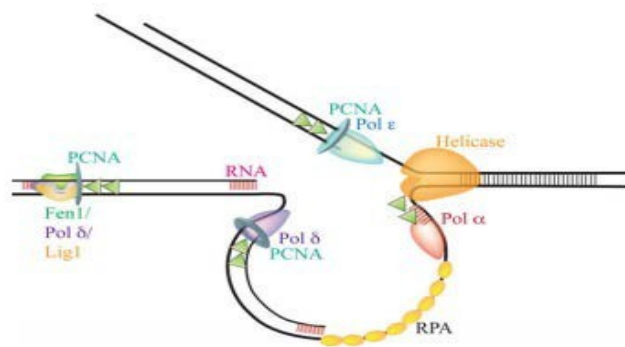


Figure 15 : Modèle simplifié de la réplication eucaryote.

L'hélicase (MCM 2-7) déroule le double brin d'ADN en amont de la fourche. Le brin continu est répliqué par Pol ε accompagnée de PCNA tandis que le brin discontinu est répliqué par Pol δ également accompagnée de PCNA. Pol α polymérise les amorces ARN/ADN. RPA, qui a une forte affinité pour l'ADN simple brin, se fixe pour éviter que ces régions mises à nu ne soient dégradées. Le complexe Fen1/Pol δ/Ligase I permet de relier les fragments d'Okazaki entre eux. D'après Prindle and Loeb, 2012.

1) Reconnaissance et activation des origines de réplication

1.1) Définition et reconnaissance des origines de réplication

Une origine de réplication est un site où est initiée la réplication du génome. Néanmoins, elle possède des caractéristiques différentes selon l'organisme étudié.

Chez *E.coli*, une seule origine de réplication, *oriC*, est impliquée dans la duplication du génome. Elle fait en moyenne 250 pb et contient de nombreuses répétitions de la séquence consensus de fixation de la protéine DnaA qui est de 9 pb (Fuller et al., 1984). L'homooligomérisation de DnaA combinée à son activité ATPase permet localement l'ouverture de la chromatine et donc le recrutement des hélicases (Bramhill and Kornberg, 1988).

Chez la levure et les mammifères, des protéines de la famille ORC (Origin Recognition Complex, composé de six sous-unités) se fixent sur les origines de réplication (Bell & Stillman, 1992; Gavin *et al*, 1995; pour revue, Duncker *et al*, 2009). Le mécanisme de recrutement est cependant différent chez la levure et les mammifères.

Chez *S. cerevisiae*, le complexe ORC se fixe sur des séquences consensus nommées ARS (Autonomous Replicating Sequence) parce qu'elles ont la capacité d'induire la réplication lorsqu'elles sont insérées dans un plasmide. Cependant, elles ne se suffisent pas à elles-mêmes puisque sur 12 000 ARS identifiées chez *S. cerevisiae*, seules 400 sont fonctionnelles [pour revue (Méchali, 2010)]. Chez *S. pombe*, les régions ARS existent aussi mais ne ressemblent pas à celles de *S. cerevisiae*. Elles font au moins 500 pb et ont la particularité d'être riches en séquences AT (Dai *et al*, 2005). Une étude pangénomique des origines de réplifications chez *S. pombe* a mis en évidence environ 400 origines fortes et 500 origines putatives plus faibles (Heichinger *et al*, 2006). Chez les mammifères, on estime qu'il existe 30 à 50 000 origines de réplication activées au cours de la réplication. Bien qu'aucune séquence consensus n'ait pu être identifiée chez les mammifères, et plus généralement chez les métazoaires, il semble néanmoins que les origines de réplication fortes partagent des caractéristiques communes. Ce sont en général des régions riches en îlots CpG non méthylés, proches des sites de démarrage de la transcription (Transcription Start Site, TSS), donc proches de sites de fixation de l'ARN polymérase II dans un contexte chromatinien appauvri en nucléosomes (Cadoret *et al*, 2008; Cayrou *et al*, 2011; Delgado *et al*, 1998). Néanmoins, on retrouve aussi au niveau des origines de réplication des régions riches en séquences AT (Karnani Neerja, Christopher M. Taylor, Ankit Malhotra, 2009). Il a aussi été montré qu'en amont de beaucoup d'origines de réplication chez la souris et la drosophile se trouvent des séquences riches en G, appelées OGRE (Origin G-rich Repeat Elements), capable de former des structures G-quadruplex (Cayrou *et al*, 2011, 2012; Delgado *et al*, 1998). Ces origines de réplifications sont corrélées aussi avec des marques histones typiques de la chromatine ouverte et notamment la marque H3K4 di- ou triméthylée ainsi que la marque H3 acétylée (Karnani *et al*, 2010). Récemment, il a été mis en évidence que les marques H3K27me3 et H4K20me1 étaient associées aux origines répliquées en milieu de phase S (Picard *et al*, 2014). Près de 60% des origines de réplication possèdent une ou ces deux marques histone et les régions où elles sont associées sont corrélées à une augmentation de la vitesse et de l'efficacité de la réplication ainsi qu'à une augmentation de la densité d'origines. Les auteurs suggèrent un rôle crucial des marques H3K27me3 et H4K20me3 dans le contrôle du programme de réplication chez l'Homme.

L'absence de séquence consensus pour les origines de réplication chez les organismes pluricellulaires pourrait s'expliquer par le fait que celles-ci sont modulables d'un type cellulaire à un autre. En effet, on sait que certaines origines de réplication sont activées de manière ubiquitaire dans tous les types cellulaires tandis que d'autres ne le sont que dans certains types cellulaires ou à un stade précis du développement.

1.2) Assemblage du complexe pré-répliatif au niveau des origines de réplication

Les protéines de la famille ORC se fixent en premier sur les origines de réplication en G1. Les protéines Orc 1-5 existent chez la levure comme chez les métazoaires (Bell & Stillman, 1992; Gavin *et al*, 1995; pour revue, voir Duncker *et al*, 2009). Ces protéines présentent un domaine AAA+ (ATPase Associated with diverse cellular Activities) et sont donc capables d'hydrolyser l'ATP. Cependant, seules certaines sous-unités hydrolysent effectivement l'ATP dans les premières étapes de la réplication : il s'agit d'orc1 et 5 chez la levure, et d'Orc 1, 4 et 5 chez l'Homme (Klemm and Bell, 2001; Siddiqui et al., 2013). Une sixième protéine Orc a été identifiée mais elle est peu conservée entre la levure et la plupart des eucaryotes et elle ne contient pas le domaine AAA+. Cependant, son rôle semble majeur dans l'initiation de la réplication chez la levure puisqu'en absence d'Orc 6, on observe une inhibition des origines de réplication (Semple et al., 2006). Le complexe ORC reste chargé sur l'ADN tout au long du cycle cellulaire à l'exception d'Orc 1 qui est dégradée durant la transition entre la phase S et la phase M (Li and DePamphilis, 2002).

Une fois le complexe ORC chargé sur la chromatine, le recrutement des hélicases MCM 2-7 (Minichromosome Maintenance) peut s'effectuer. Les hélicases MCM ont été identifiées dans des travaux sur des mutants de *S. cerevisiae* déficients dans le maintien des minichromosomes qui sont des plasmides autonomes pour la réplication possédant une séquence ARS (Maine et al., 1984). Depuis, il a été montré que ces hélicases appartenant à la famille AAA+ se fixent sur la chromatine sous forme de double hexamère et déroulent l'ADN afin de permettre la progression de la fourche de réplication (Duzdevich et al., 2015; Tica et al., 2015). Le rôle de ce complexe MCM 2-7 semble essentiel puisque, dans des extraits d'œufs de xénope déplétés en MCM3, il est impossible d'observer une synthèse d'ADN (Kubota et al., 1997). Le chargement du complexe sur la chromatine est finement régulé par les protéines Cdc6 et Cdt1 qui sont recrutées à la transition M/G1. La protéine Cdc6, qui est aussi une ATPase de la famille AAA+ , partage une homologie de séquence avec la protéine Orc1 et interagit avec elle chez la levure et chez l'Homme (Hori et al., 1996; Saha et al., 1998; Wang et al., 1999). Elle agit de concert avec la protéine Cdt1, retrouvée chez *S. cerevisiae* et l'Homme mais pas chez *S. pombe* (Cook et al., 2004; Devault et al., 2002), afin d'aider au recrutement du complexe MCM 2-7. Les modalités de régulation de ces deux protéines sont décrites plus loin dans l'exposé. Une fois tous ces éléments assemblés, le complexe pré-répliatif (pré-RC) est prêt à être activé.

1.3) Initiation de la réplication et sa régulation

Le complexe MCM 2-7 chargé en G1 sur la chromatine est inactif. Durant la transition G1/S, Cdc45 (Cell Division Cycle 45) et GINS (complexe formé de quatre protéines : Sld5, Psf1, Psf2 et Psf3) sont recrutés au niveau du complexe MCM 2-7 par l'action des kinases CDK en phase S (S-phase cyclin-dependent kinase, S-CDK) et DDK (Dbf4 et Drf1-dependent kinase) [pour revue, (Labib, 2010; Remus and Diffley, 2009)]. Se forme alors le complexe CMG

(Cdc45, MCM 2-7 et GINS) qui constitue la forme active de l'hélicase répliquative nécessaire au bon déroulement de l'ADN, ainsi qu'à la mise en place et la progression des fourches de réplication (Fig. 17) [pour revue, (Sacco et al., 2012)].

Ce recrutement se fait en collaboration avec d'autres facteurs tels que MCM10 et Dpb11/TopBP1 (respectivement chez la levure et chez l'Homme). La protéine MCM10, retrouvée chez tous les eucaryotes, serait la première recrutée au niveau du complexe pré-RC en interagissant avec le complexe MCM 2-7 ainsi qu'avec les protéines ORC, et ce, chez la levure comme chez l'Homme (Izumi et al., 2000; Kawasaki et al., 2000; Merchant et al., 1997). De plus, elle semble jouer un rôle important dans la régulation et la stabilisation de l'ADN polymérase alpha (Pol α), la primase impliquée dans l'initiation de la réplication (Warren *et al*, 2009; Ricke & Bielsky, 2004; Chattopadhyay & Bielsky, 2007; Lee *et al*, 2010). Bien que MCM10 semble être importante pour le recrutement de Cdc45 chez la levure ainsi que chez le Xénope au niveau du complexe pré-RC (Gegan et al., 2003; Sawyer et al., 2004; Wohlschlegel et al., 2002), son rôle reste encore à définir [pour revue (Thu and Bielsky, 2013)]. Le recrutement du cofacteur Cdc45 se fait aussi chez la levure, d'une part, *via* la phosphorylation de MCM 2-7 par le complexe DDK et, d'autre part, *via* la phosphorylation de Sld3 (et peut-être de la Treslin chez les mammifères) par le complexe S-CDK (Tanaka et al., 2007).

Toujours chez la levure, le recrutement du complexe GINS sur la chromatine est précédé par la formation d'un complexe de pré-initiation (pré-IC) qui n'est pas encore fixé sur l'ADN et qui est composé de Sld2, Dpb11, GINS et l'ADN polymérase epsilon (Pol ϵ). Le recrutement du complexe pré-IC se fait après phosphorylation de Sld3 et Sld2, permettant ainsi au complexe GINS d'interagir directement avec MCM 2-7 et Cdc45 (Muramatsu et al., 2010). Chez l'Homme, on retrouve des homologues fonctionnels (bien que les séquences soient assez peu conservées) des facteurs régulant la formation du complexe CMG : TopBP1 pour Dpb11, RecQ4 pour Sld2 et Treslin pour Sld3, mais leurs rôles semblent moins essentiels que chez la levure [pour revue, (Tanaka and Araki, 2013)]. Néanmoins, ces protéines sont importantes pour lier la réplication de l'ADN au cycle cellulaire *via* les phosphorylations dépendantes du complexe S-CDK et DDK. Deux autres protéines nécessaires à l'assemblage du complexe CMG ont été mises en évidence uniquement chez les vertébrés : GEMC1 (geminin coiled-coil containing protein) et DUE-1 (DNA unwinding element) (Balestrini et al., 2010; Chowdhury et al., 2010). Les grandes étapes de l'activation d'une origine de réplication dans les cellules humaines sont résumées Fig. 16.

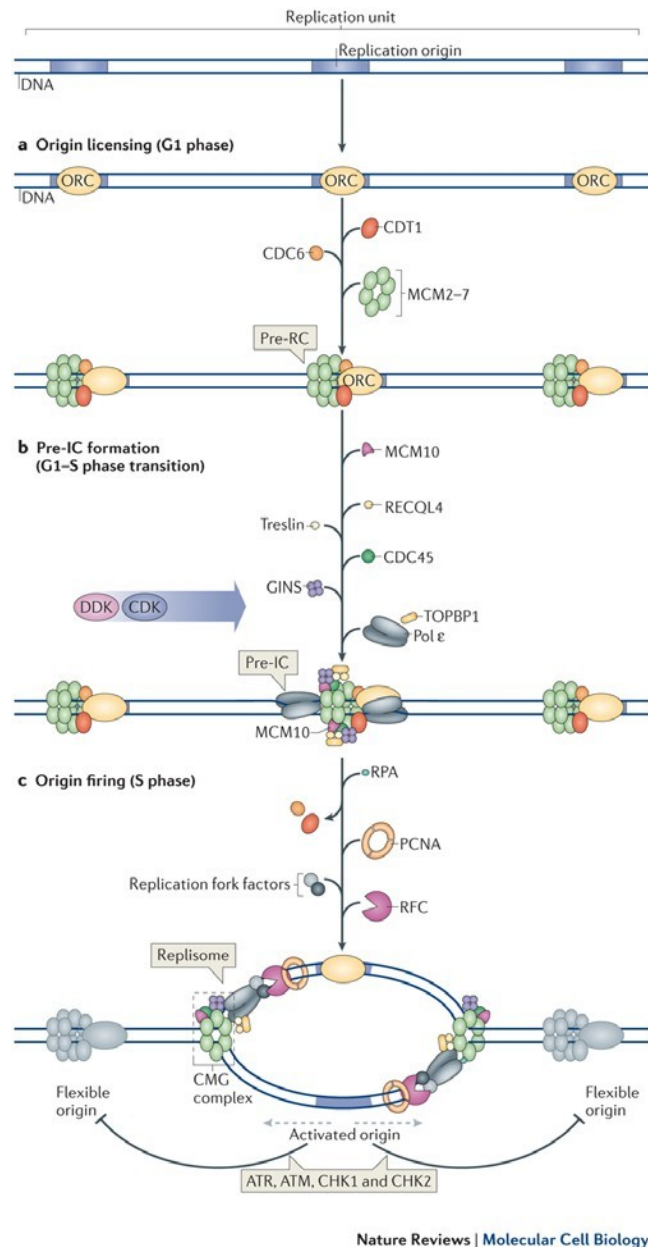


Figure 16 : Représentation schématique du chargement des hélicases au niveau des origines de réplication.

Chez les eucaryotes, le complexe ORC qui va se fixer en premier au niveau d'une origine de réplication puis les protéines Cdc6 et Cdt1 permettent de recruter le complexe MCM (2-7). Il se forme ainsi le complexe pré-RC. D'autres facteurs sont ensuite recrutés afin d'activer l'origine de réplication, comme CDC45 ou le complexe GINS. Ainsi, les ADN polymérases vont pouvoir être à leur tour recrutées. Une fois la cellule entrée en phase S, Cdt1 est inactivé pour éviter une nouvelle réplication. D'après Fragkos et *al*, 2015.

1.4) Régulation de l'initiation : pourquoi?

A chaque réplication, une cellule pourrait soit répliquer son génome de manière incomplète, soit le dupliquer plusieurs fois. Une réplication anormale peut entraîner des problèmes de ségrégation des chromatides sœurs en mitose et une activation des systèmes de réparation, ce qui peut altérer le matériel génétique de la cellule. La réplication est donc un système

extrêmement régulé, d'une part, pour l'activation des origines qui ne doit se faire qu'une seule fois par cycle et, d'autre part, par la fixation des complexes pré-RC en excès notamment sur des origines qui ne seront pas activées.

a) Eviter une double réplication du génome au cours d'un même cycle

Il est crucial que les origines de réplication ne soient activées qu'une seule fois au cours du cycle cellulaire. L'un des mécanismes clés assurant la réplication unique au cours du cycle réside dans le fait que la formation et la fixation du complexe pré-RC puis l'initiation de la réplication se font de manière séquentielle, dans deux phases différentes du cycle (respectivement en G1 et en S). Ce sont les CDK et leurs cyclines activatrices ou inhibitrices qui vont jouer un rôle majeur dans la régulation de trois éléments impliqués dans la réplication : les protéines ORC ainsi que les protéines Cdt1 et Cdc6.

(i) Les CDK et la régulation des protéines ORC

Chez la levure, la protéine Orc6 peut se fixer à la cycline Clb5 et être phosphorylée par le complexe Cdk1-Clb5, empêchant ainsi son recrutement dans le complexe pré-RC *via* son interaction avec Cdt1 (Chen and Bell, 2011). Cette interaction se fait après l'initiation de la réplication et persiste jusqu'à la mitose. Dans les cellules de mammifères, Orc 1 est phosphorylée par le complexe Cdk2-CycA puis exportée vers le cytoplasme au cours de la phase S [pour revue, (DePamphilis, 2005)]. Une autre fraction de la protéine Orc 1 peut être dégradée par le protéasome *via* le complexe à activité ubiquitine-ligase SCF^{Skp2} (Méndez et al., 2002; Tatsumi et al., 2003). D'autre part, il a été montré que l'inhibition de l'activité CDK dans des cellules en métaphase entraîne la fixation rapide et stable des protéines Orc1, Cdt1 et MCM sur la chromatine (Li et al., 2004). Cela implique que les CDK responsables de la progression en mitose sont aussi responsables de l'inactivation d'Orc.

(ii) Les CDK et la régulation de Cdt1

L'un des facteurs les plus importants permettant au complexe MCM 2-7 de se fixer sur la chromatine est la protéine Cdt1. Celle-ci fait donc l'objet d'une régulation toute particulière, toujours de manière CDK-dépendante. Une surexpression de Cdt1 provoque une réactivation et une re-réplication dans les cellules de mammifères.

Chez la levure, les protéines Cdt1 et MCM 2-7 forment un complexe stable dont la localisation subcellulaire est régulée au cours du cycle. Une fois le complexe pré-RC assemblé, il est exporté hors du noyau *via* une phosphorylation par Cdk1 de l'une des sous-unités MCM (Tanaka and Diffley, 2002). Dans les cellules de mammifères, Cdt1 est régulée de manière dépendante du cycle à savoir qu'elle est dégradée durant les phases S et G2 et exprimée en M et G1. Sa dégradation par le protéasome se fait *via* trois ubiquitine-ligases différentes :

- (i) le complexe SCF^{Skp2} lorsqu'elle est phosphorylé par CycA-Cdk2 ou CycE-Cdk2 (Li et al., 2003; Liu et al., 2004; Takeda et al., 2005)
 - (ii) le complexe Cul4-DDB1-Cdt2 et dépendant de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) car elle possède un motif PIP degron (Arias and Walter, 2005, 2006; Senga et al., 2006).
 - (iii) le complexe APC ubiquitine-ligase ciblant de manière directe et indirecte Cdt1. Il a été montré que Cdt1 interagit directement avec APC (Sugimoto et al., 2008)
- D'autre part, cette régulation est dépendante de la Gémnine qui est capable de se fixer à Cdt1 et ainsi d'inhiber la formation du complexe pré-RC. La Gémnine est aussi régulée par APC au cours du cycle cellulaire et elle dégradée par le protéasome en fin de phases M et G1 (McGarry and Kirschner, 1998; Wohlschlegel et al., 2000).

(iii) Les CDK et la régulation de Cdc6

Si chez la levure, l'assemblage de complexe pré-RC est dépendant de la protéine Cdc6 qui est accumulée uniquement lors de la transition M-G1, dans les cellules de mammifères, le rôle de Cdc6 dans la prévention de la re-réplication reste incertain. D'une part, des mutants Cdc6 qui ne sont plus phosphorylables par les CDK ne bloquent pas systématiquement l'initiation de la réplication et surtout ne provoquent pas de re-réplication (Pelizon et al., 2000). D'autre part, il a été montré que l'expression des formes ectopiques de Cdc6 dans des cellules au cours de la phase S, est suivie de leur export vers le cytoplasme de manière dépendante de la phosphorylation par CycA-Cdk2 (Alexandrow and Hamlin, 2004; Petersen et al., 1999). Cependant, ceci n'est pas observé pour le pool de protéines endogène restant. Il semblerait donc qu'une quantité résiduelle de Cdc6 reste fixée à la chromatine et que l'excédant soit exporté hors du noyau.

b) Eviter une réplication incomplète

On sait qu'un excès de complexes MCM se fixe à la chromatine avant le démarrage de la réplication, c'est ce que l'on appelle le paradoxe MCM (Hyrien et al., 2003). Cela signifie que certaines origines vont être allumées tandis que d'autres resteront dormantes. Ces origines dormantes sont donc des origines qui ne se sont pas allumées au cours d'une réplication normale mais qui peuvent être activées en réponse à un stress répliatif (Alver et al., 2014; Woodward et al., 2006). Il a été montré que la déplétion de MCM7 entraîne une activation du point de contrôle de la réplication Ataxia telangiectasia and rad-5-related (ATR) et Checkpoint kinase 1 (Chk1) dans des cellules cancéreuses humaines (Tsao et al., 2004). C'est ce même point de contrôle qui est activé lorsque l'on soumet les cellules à un stress répliatif. De manière intéressante, un faible stress répliatif entraîne l'inhibition de l'allumage des origines non encore activées du cluster des origines bloquées par ATR/Chk1 et permet l'allumage d'origines dormantes afin de permettre l'achèvement de la réplication (Ge and Blow, 2010). Peu de choses sont encore connues sur le rôle que joue Chk1 sur les origines de réplication mais il a été proposé qu'elle jouerait un rôle *via* son activité kinase en

phosphorylant un substrat particulier au niveau des origines dormantes qui doivent être activées. Cependant le rôle de Chk1 reste encore discuté dans la littérature [pour revue, (González Besteiro and Gottifredi, 2015)].

1.5) Ouverture de la chromatine et élongation

Une fois le complexe pré-IC activé pour son activité hélicase, la réplication peut démarrer, permettant l'ouverture de la double hélice d'ADN et son déroulement. La protéine RPA (Réplication protein A) se fixe sur l'ADN simple brin résultant de l'ouverture de la chromatine afin d'éviter qu'il ne soit clivé par des endonucléases (Iftode and Borowiec, 1998). C'est alors que Pol α peut entrer en jeu afin d'initier la réplication.

La réplication chez les eucaryotes se fait sur les deux brins d'ADN qui sont de polarités opposées. Or, les ADN polymérases sont incapables d'initier la synthèse d'ADN si une extrémité 3'-OH n'est pas disponible et synthétisent dans le sens 5'→3'. Les deux brins d'ADN sont donc synthétisés de manière différente : l'un est synthétisé de manière continue (brin précoce) tandis que l'autre l'est de manière discontinue (brin retardé) ce qui implique la formation de fragments d'Okazaki d'environ 200 pb qui sont ensuite reliés entre eux par une ADN ligase. L'initiation de la synthèse sur les deux brins obéit à un processus en deux étapes qui implique Pol α et son activité primase. Celle-ci synthétise un court fragment d'ARN qui est ensuite prolongé par un petit fragment d'ADN de 30 nucléotides synthétisés par l'activité polymérase de Pol α . Bien que sa processivité soit augmentée en présence de RPA (Maga et al., 2001), elle se dissocie après avoir synthétisé l'amorce. Ce sont les deux autres ADN polymérases répliquatives, les polymérases delta et epsilon (δ et ϵ) qui prennent en charge l'élongation. Ce changement de polymérase s'opère grâce au facteur de réplication C (RFC) qui permet de dissocier Pol α du complexe ARN-ADN en masquant l'extrémité 3'-OH. Les fragments d'Okazaki doivent finalement être maturés. La protéine FEN1 (Flap Endo-Nuclease 1) clive l'amorce ARN synthétisée par Pol α (Rumbaugh et al., 1997). Il est possible que l'amorce ADN soit elle aussi dégradée pour éviter que des mutations ne persistent dans le génome puisque Pol α ne possède pas d'activité exonucléase 3'→5' et est donc susceptible de faire des erreurs. Pol δ comble ensuite les brèches et l'ADN ligase I relie les fragments entre eux.

1.6) Terminaison de la réplication

La terminaison de la réplication correspond à la convergence de deux fourches de réplication. Chez *E.coli*, des séquences Ter reconnues par la protéine Tus ont été identifiées (pour revue, (Neylon et al., 2005)), ce qui n'est pas le cas chez les eucaryotes où aucune séquence n'a pu être identifiée. Chez la levure, il a été montré que des fourches convergentes peuvent s'accumuler à certains sites de pause naturels présents dans les régions de terminaison (Fachinetti et al., 2010). La topoisomérase II (Top2) s'associe à ces régions en phase S afin de décaténer les structures non résolues accumulées au niveau des sites de pause avant la ségrégation de l'ADN. Dans les mutants Top2, les régions de terminaisons accumulent des cassures et des réarrangements. Bien que l'on connaisse les modalités d'assemblage de

complexe CMG, on ne connaissait pas il y a peu la manière dont il se dissociait de la chromatine à la fin de la réplication. Il a été montré que le complexe CMG est ubiquitiné sur la protéine MCM7 chez *S.cerevisiae*, et ce, par l'ubiquitine ligase SCF^{Dia2}. Cette ubiquitination a lieu dans les dernières étapes de la réplication et entraîne la dissociation du complexe CMG (Maric et al., 2014). Néanmoins, une étude récente faite à partir d'extraits d'œufs de Xénope et de plasmide contenant un site de pause artificiel a montré que le complexe CMG se dissociait tardivement lors de la terminaison c'est-à-dire après la ligation du brin continu d'une des fourches et du brin discontinu de l'autre fourche. De plus, les auteurs ne constatent pas de ralentissement ou de pause de la synthèse d'ADN lorsque les fourches convergentes (Dewar et al., 2015).

Un autre problème mis en évidence lors de la terminaison de la réplication aux extrémités des chromosomes (télomères) résulte du fait que l'un des brins est synthétisé de manière discontinue. A terme, cela implique une diminution de la taille du chromosome au fur et à mesure des cycles cellulaires. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette diminution de la taille des télomères, basées sur l'étude de la réplication des phages ayant un ADN linéaire (Fig. 11) [pour revue, (Gilson and Géli, 2007)]:

- i) L'extrémité 3' du brin retardé ne peut pas être dupliquée parce que le dernier fragment d'Okazaki ne peut pas être synthétisé. Il persiste alors un trou d'environ 200 pb correspondant à la taille d'un fragment d'Okazaki (Fig. 17A).
- ii) Le dernier fragment d'Okazaki peut être synthétisé mais l'amorce ARN ne peut pas être convertie en ADN car cette resynthèse se fait normalement à partir de l'extrémité 3' OH du fragment d'Okazaki adjacent (Fig. 17B).

De récentes études effectuées chez la levure *S. cerevisiae* permettent de mieux comprendre la terminaison de la réplication en remettant en cause le modèle de terminaison basé sur la réplication des phages. Chez *S. cerevisiae*, la taille des extrémités 3'OH sortantes est de 10 à 14 nucléotides (Larrivée et al., 2004). Grâce à une technique combinant un marquage BrdU des télomères et une technique de visualisation des télomères très précise, il a été mis en évidence que le brin continu est celui qui subit le plus de modifications (Soudet et al., 2014). En effet, une fois la réplication du brin terminée, le brin parental est dégradé de 30 à 40 nucléotides avant d'être resynthétisé. Il persiste cependant un trou de 10 nucléotides en 3'OH sortant.

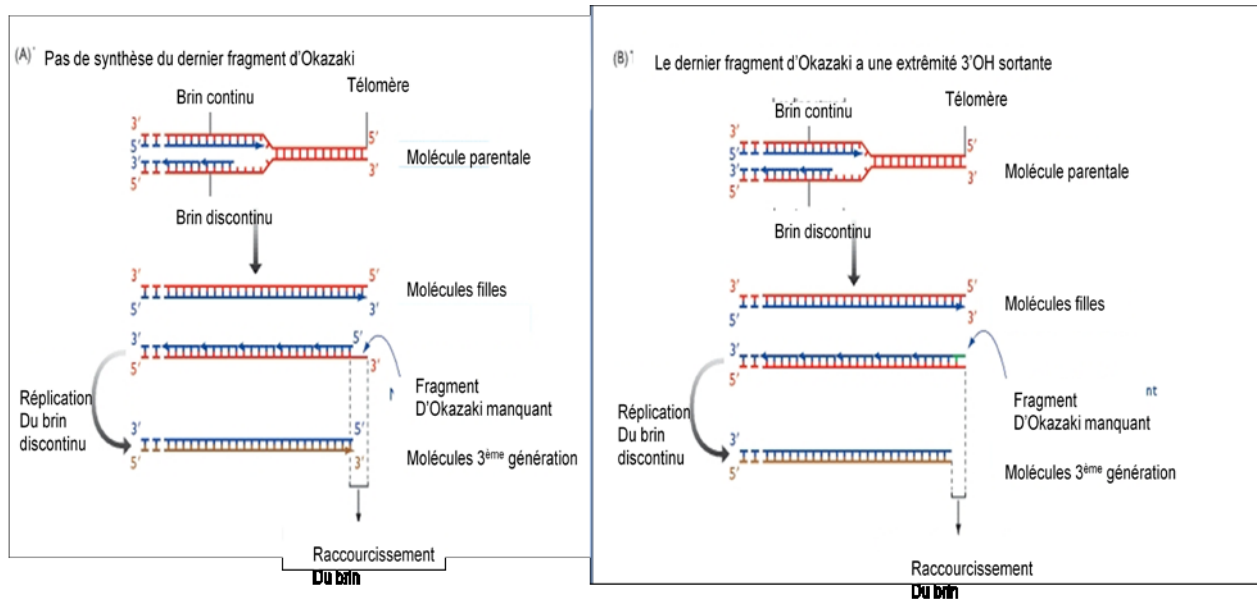


Figure 17 : Deux hypothèses expliquant le raccourcissement des télomères

(A) L'extrémité 3' du brin retardé ne peut pas être dupliquée car le dernier fragment d'Okazaki ne peut pas être synthétisé. Il persiste alors un trou d'environ 200 pb correspondant à la taille d'un fragment d'Okazaki. (B) Le dernier fragment d'Okazaki peut être synthétisé mais l'amorce ARN ne peut pas être convertie en ADN car cette resynthèse se fait normalement à partir de l'extrémité 3' OH du fragment d'Okazaki adjacent.

2) Les ADN polymérases répliquatives et leur cofacteur PCNA

Les ADN polymérases répliquatives sont des acteurs essentiels de la réplication puisque ce sont elles qui dupliquent l'ADN. Chez les eucaryotes, le réplisome contient trois polymérases répliquatives appartenant à la famille B : Pol α , Pol ϵ et Pol δ . Chacune de ces polymérases possède une sous-unité catalytique très conservée ainsi que deux à quatre sous-unités accessoires. Ces polymérases sont très processives lorsqu'elles sont associées au clamp PCNA.

2.1) L'ADN polymérase alpha (Pol α)

L'ADN polymérase alpha, appelée aussi primase, est une protéine comportant quatre sous-unités : (i) p180, qui est la sous unité polymérasique, possède un site d'interaction avec l'ADN. Elle est codée par le gène *POLA1* en copie unique sur le chromosome X, (ii) p48 est la sous-unité primase, (iii) p58 qui s'associe à p48 et pourrait être une autre sous-unité avec activité primase et (iv) p86 dont le rôle n'est pas encore bien défini et qui serait peut-être une sous-unité régulatrice [pour revue, (Johansson and Dixon, 2013; Muzi-Falconi et al., 2003)]. Toutes ces sous-unités sont conservées de la levure à l'Homme et sont indispensables à la viabilité cellulaire. Chez *S.cerevisiae*, l'analyse par cristallographie et microscopie électronique a montré que les complexe Pol11 et Pol12 (respectivement, p180 et p48) forment

deux domaines globulaires reliées par un linker (Klinge et al., 2009). L'hypothèse d'un changement entre les deux activités primase et polymérase lorsqu'une certaine taille d'amorce ARN est atteinte a été avancée. La protéine RPA (Replication Protein A) jouerait un rôle dans le maintien du complexe formant Pol α mais augmenterait aussi sa processivité (Maga et al., 2001). De plus, Pol α ne possède pas d'activité exonucléase 3'-5' contrairement aux deux autres polymérases répliquatives. Pol α sert à amorcer la réplication et ce sont les polymérases répliquatives Pol ϵ et Pol δ qui prennent le relais.

2.2) Les ADN polymérases epsilon et delta (Pol ϵ et Pol δ)

Les polymérases ϵ et δ sont toutes les deux composées de quatre sous-unités. Chez les mammifères, Pol ϵ comprend les sous-unités p261, p59, p17 et p12 et Pol δ les sous-unités p150, p66, p50 et p12. Les plus grosses sous-unités sont les sous-unités catalytiques de ces deux protéines. Le taux d'erreur de ces polymérases répliquatives au cours de la réplication n'est que de 10^{-6} à 10^{-8} , ce qui s'explique par leurs activités exonucléases 3' \rightarrow 5' (Morrison et al., 1991) et par le fait qu'elles sont capables de déceler si le nucléotide en cours d'incorporation est bien complémentaire à celui de la matrice [pour revues, (Johansson and Dixon, 2013; Kunkel, 2011)]. Pol ϵ et Pol δ possèdent toutes les deux des motifs conservés avec plusieurs cystéines (CysA et CysB) localisés dans la partie C-terminale de leurs sous-unités catalytiques. Longtemps, on a pensé que ces motifs permettaient la fixation de zinc afin de mieux contacter l'ADN. Récemment, il a été montré *in vivo* et *in vitro* pour Pol δ de levure que (i) le motif CysA comporte bien du zinc et est important pour interagir avec PCNA et (ii) le motif CysB est un cluster [4Fe-4S] important pour l'interaction avec les sous-unités accessoires Pol31-Pol32 (équivalent de p50 et p66 chez les mammifères) (Netz et al., 2012). Il est important de souligner que ces motifs CysA et B ont aussi été mis en évidence dans les autres polymérases de la famille B, à savoir Pol α et chez l'ADN polymérase translesionnelle Pol ζ sur laquelle nous reviendrons ultérieurement.

De nombreux travaux chez la levure ont mis en évidence que Pol ϵ permet de synthétiser le brin continu et Pol δ le brin discontinu (Nick McElhinny et al., 2008; Pursell et al., 2007). Pour cela, des mutants de Pol ϵ et de Pol δ ayant une fidélité moindre et des signatures moléculaires bien définies ont été testés sur des matrices portant un gène rapporteur. La position et le taux de mutations étant dépendants de l'orientation du gène rapporteur, le laboratoire de T.Kunkel a pu éclaircir la contribution de ces deux polymérases répliquatives au cours de la réplication. Une étude très récente effectuée chez *S. cerevisiae* dans le laboratoire de S. Prakash remet en cause ce dogme. En effet, cette étude suggère que Pol δ effectue la réplication du brin continu et discontinu et que Pol ϵ , *via* son activité exonucléase, et Exo1 seraient plutôt impliquées dans la correction des erreurs introduites par Pol δ (Johnson et al., 2015).

D'autre part, les modalités d'implication de ces deux polymérases dans la réplication restent encore floues, notamment en ce qui concerne la réplication de l'hétérochromatine. Certaines études ont montré que Pol ϵ est associé aux lamines et était localisée au niveau des régions correspondant à de l'hétérochromatine répliquée en fin de phase S (Fuss and Linn, 2002; Vaara et al., 2012). Une autre étude à, quant à elle, montré que c'était Pol δ et non Pol ϵ qui était associée aux régions répliquées tardivement (Rytkönen et al., 2006). L'idée que Pol δ ne

serait peut-être pas apte à répliquer correctement l'hétérochromatine va de pair avec une étude montrant que Pol δ fait des pauses et a tendance à se dissocier de sa matrice lorsque celle-ci contient beaucoup de séquences répétées (Walsh et al., 2013). Cette étude a été menée en utilisant la séquence nucléotidique du site fragile commun FRA3B qui, bien que n'étant pas situé dans une région hétérochromatinienne (Mulvihill and Wang, 2004), partage beaucoup de similitudes avec les séquences composant l'hétérochromatine.

2.3) PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

La protéine PCNA est un facteur important dans la réplication de l'ADN faisant partie de la famille des β -clamps et qui est conservé chez tous les eucaryotes. C'est un homotrimère formant un anneau capable d'entourer l'ADN (Krishna et al., 1994). Les différents monomères possèdent deux domaines globulaires et sont reliés les uns aux autres par une boucle appelée « interdomain connecting loop ». Cette protéine doit être chargée sur l'ADN par RFC, et ce, de manière dépendante de l'ATP (Majka et al., 2004). Comme il a été dit précédemment, RFC reconnaît spécifiquement les extrémités 3'-OH et permet le chargement de PCNA sur la chromatine *via* une interaction qui s'opère dans la partie C-terminale de PCNA. La dissociation du complexe RFC-PCNA est aussi ATP dépendante (Gomes and Burgers, 2001). La protéine PCNA a d'abord été identifiée comme facteur de processivité des polymérases répliquatives. Comme elle est dépourvue d'activité enzymatique, elle sert avant tout de plate-forme à différentes protéines soit en étant modifiée (Ubiquitination, SUMOylation, Phosphorylation...) soit en interagissant avec des partenaires contenant des motifs spécifiques d'interaction avec PCNA (PIP box, APIM...). Elle est impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN, l'assemblage de la chromatine, la progression dans le cycle cellulaire ou encore l'apoptose [pour revue, (Moldovan et al., 2007)].

3) Régulation spatio-temporelle de la réplication

De la levure à l'Homme, toutes les origines licenciées par le chargement du complexe pré-RC ne sont pas activées. L'activation des origines ne se fait pas de manière synchrone mais séquentielle tout au long de la phase S, comme visualisé lorsque l'on étudie par immunofluorescence des cellules qui ont incorporé l'analogue de base BrdU (Bromodésoxyuridine) à différents moments de la phase S. Cela ne veut pas forcément dire que les origines s'activent de manière aléatoire. Des origines tardives, donc activées à la fin de la phase S, ont été mises en évidence dans un premier temps chez *S. cerevisiae* (Ferguson et al., 1991) par des méthodes de gel d'électrophorèse 2D. Désormais, il est possible de déterminer à quel moment de la phase S un locus est répliqué en utilisant des puces à ADN et des études d'associations pangénomiques.

3.1) Régulation spatiale du programme de réplication

Il semble de plus en plus évident que l'allumage des origines de réplication soit lié à leur localisation subnucléaire. Chez la levure, il a été montré que les origines allumées tardivement se trouvent plutôt en périphérie du noyau en G1 quand les origines allumées précocement sont plus dispersées dans le noyau (Heun et al., 2001). Cependant, cette localisation en périphérie du noyau ne suffit pas à définir la réplication tardive d'une région puisque des expériences permettant de localiser de manière artificielle une région répliquée de manière précoce au niveau de l'enveloppe nucléaire ne suffisent pas à retarder sa réplication (Ebrahimi et al., 2010). Chez les mammifères, cette organisation chromatinienne est aussi importante pour la régulation du programme de réplication. Des expériences 4C permettant de visualiser le repliement de l'ADN dans le noyau ont mis en évidence que des régions répliquées de manière précoce, même éloignées sur les chromosomes, étaient retrouvées à proximité (Moindrot et al., 2012). De plus, on observe de fréquents réarrangements chromosomiques entre deux régions répliquées de manière précoce, chez la souris comme chez l'Homme (Yaffe et al., 2010). Tout ceci suggère un regroupement de domaines répliqués précocement ou tardivement au sein du noyau sous forme de clusters.

3.2) Régulation temporelle du programme de réplication

a) Les différentes méthodes d'analyse du programme de réplication

(i) Variation du nombre de copies

Cette première méthode est basée sur le fait que lorsqu'un locus est répliqué, il est présent en deux copies. Des cellules sont triées au FACS (Flow Cytometry) en G1 et en S. On marque ensuite les ADN purifiés avec deux couleurs différentes et on les cohybride sur puce à ADN. Les régions répliquées en début de phase S correspondent aux endroits où les spots ont un ratio S/G1 augmenté (Woodfine et al., 2004). Cette méthode a été utilisée avec succès sur le génome entier avec une résolution de 1 Mb puis sur le chromosome 6 (Woodfine et al., 2005).

(ii) Enrichissement en loci marqués au BrdU

Du BrdU est incorporé tout au long de la phase S puis les cellules sont triées au FACS, généralement en deux portions, début et fin de phase S, sachant que le milieu de phase S se retrouve dans les deux portions. L'ADN de ces cellules est ensuite extrait et immunoprécipité puis analysé sur puce à ADN (Fig. 18A). C'est l'abondance d'un locus dans une fraction qui permet de savoir s'il est plutôt répliqué de manière précoce ou tardive (Fig. 18B) (Hiratani et al., 2008).

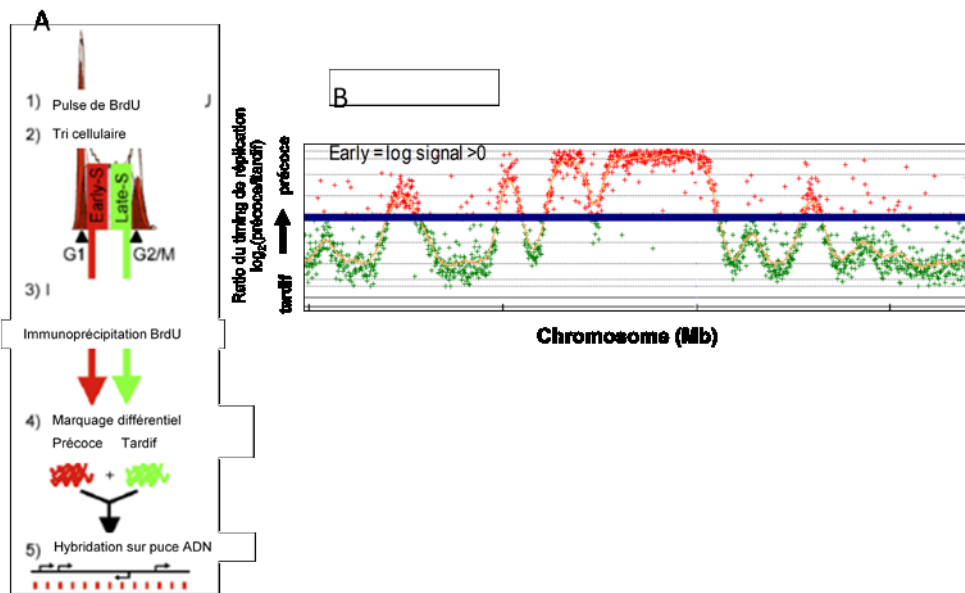


Figure 18 : Protocole d'étude du timing de répllication.

(A) Les cellules sont marquées au BrdU puis triées au FACS en fonction de leur contenu en ADN selon deux fractions, phase S précoce ou tardive. Après purification, l'ADN marqué au BrdU des deux fractions est immunoprécipité puis marqué avec deux fluorochromes différents. Ces ADN sont ensuite hybridés sur une puce à ADN. (B) Après analyse d'associations pangénomiques, on obtient les profils pour chaque chromosome, ce qui nous permet de savoir si un locus est répliqué de manière précoce ou tardive. D'après Hiratani *et al*, 2008.

b) Caractéristiques des régions précoces, tardives et de transition

Chez les organismes pluricellulaires, il existe une forte corrélation entre le timing de répllication, c'est-à-dire le moment de la phase S où un locus est répliqué, et les caractéristiques de la séquence d'ADN de ce locus. Les régions répliquées de manière précoce sont fortement corrélées avec des régions riches en GC, en gènes exprimés et en marques de chromatine active. Les régions répliquées tardivement, quant à elles, sont corrélées avec des régions pauvres en gènes, riches en AT et des marques histones répressives (Farkash-Amar *et al.*, 2008; Hiratani *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2014; Ryba *et al.*, 2010; Schübeler *et al.*, 2002; Woodfine *et al.*, 2004). Il ne faut cependant pas généraliser car certains gènes transcriptionnellement actifs et étant associés à des marques histones activatrices se trouvent dans des régions répliquées de manière tardive. De plus, l'hétérochromatine facultative possède un « double » marquage en ayant à la fois des marques histones répressives H3K27me3, et activatrices, H3K4me3 (Ryba *et al.*, 2010). C'est ce que l'on nomme les régions de transition (Fig. 19). Des analyses pangénomiques corrélés à des données de moyenne de temps de répllication (MRT, Mean Replication Timing) obtenues à partir de données de Repli-Seq ont permis de mettre en évidence quatre états de chromatine dans le génome humain (Julienne *et al.*, 2013):

C1, correspondant à de la chromatine transcriptionnellement active, répliquée de manière précoce et riche en protéines CTCF (insulator-binding protein) ; C2, correspondant à de la chromatine répliquée en milieu de phase S et fixée par des protéines PcG ; C3, correspondant à de la chromatine ne possédant pas de marques particulières et répliquée en fin de phase S et enfin C4, correspondant à de la chromatine marquée par HP1 et répliquée tardivement en phase S.

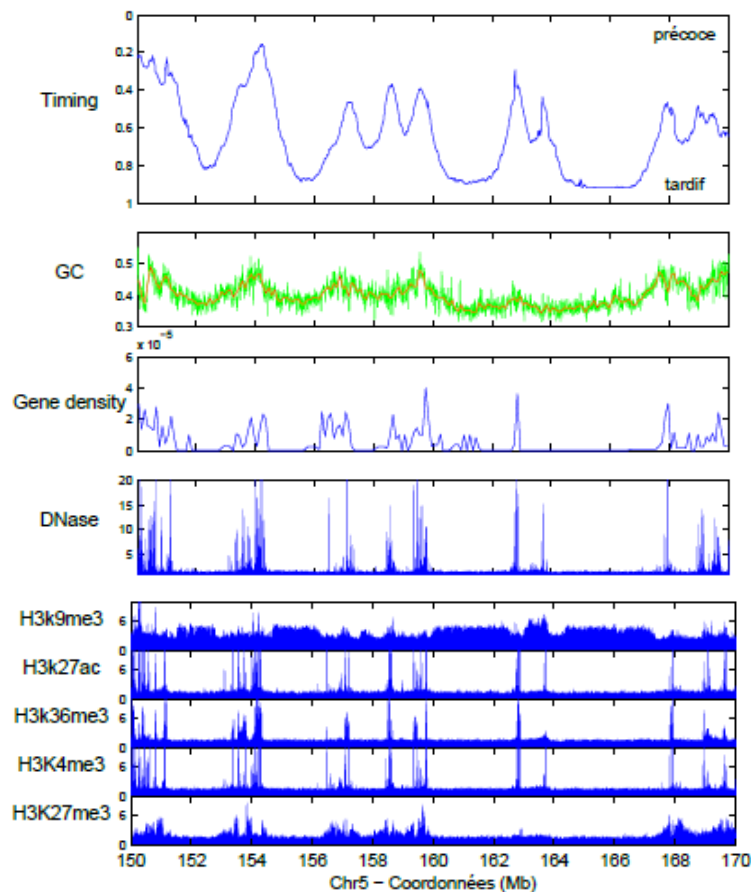


Figure 19 : Propriétés des régions répliquées en début de phase S (précoces) et des régions répliquées en fin de phase S (tardives) dans les cellules humaines K562.

Cette figure montre de haut en bas, pour de 20 Mb du chromosome 5 humain : le timing de réplication (précoce en haut et tardif en bas), la teneur en GC, la densité des gènes par paire de bases, la couverture des sites hypersensibles à la DNaseI, et cinq des modifications d'histones.

Les régions précoces sont enrichies en GC, et en gènes, sont sensibles à la DNaseI et riches en marques histones H3K4me3, H3K27Ac et H3K36me3. Les régions tardives sont pauvres en gènes, ne contiennent que peu de GC et sont riches en H3K9me3. D'après Benoit Moindrot avec des données de Hanser *et al*, 2010 et Baker *et al* 2012.

c) Domaines en forme de « U » et modèles d'activation des origines

Le long des chromosomes humains, il existe des domaines de réplication longs de plusieurs mégabases prenant la forme de « U », avec aux bords de ces domaines les régions répliquées

précocement et au centre les régions répliquées tardivement. Ces domaines ont été mis en évidence dans sept lignées différentes (Baker et al., 2012; Guilbaud et al., 2011; Moindrot et al., 2012). De manière intéressante, les zones d'initiation précoces sont significativement enrichies en marques d'hétérochromatine ouverte, suggérant que le programme de réplication à l'intérieur des domaines en « U » est médié par un gradient de chromatine ouverte. Il existe deux modèles pour expliquer la réplication le long de ces domaines (Fig. 20) :

- un modèle où les origines présentes le long du domaine s'activent de manière indépendante. Les origines fortes sont activées précocement et les origines plus faibles plus tard au cours de la phase S.

- un modèle où les origines fortes, une fois activées, simulent l'activation des origines adjacentes. Ce modèle « dominos » a été proposé par le laboratoire d'Olivier Hyrien (Guilbaud et al., 2011). De manière intéressante, les auteurs ont pu montrer que, dans des cellules HeLa, il y avait une augmentation de la vitesse d'allumage des origines au cours de la phase S, ce qui est en accord avec une activation des origines en cascade.

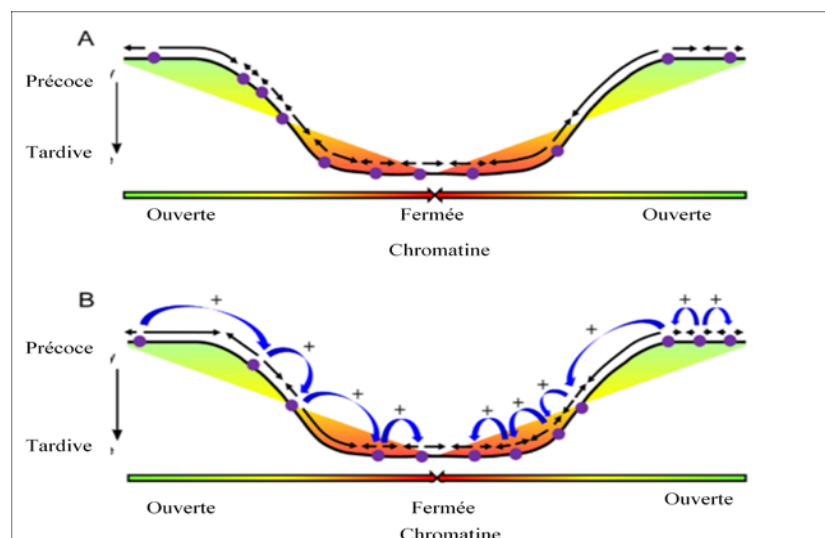


Figure 20 : Deux modèles d'activation des origines.

(A) Modèle d'activation des origines de réplication de manière indépendante. La réplication démarre au niveau des origines de réplication précoces. (B) Modèle d'activation des origines de réplication en "dominos". La réplication démarre aussi au niveau des origines de réplication précoces mais va permettre la stimulation des origines adjacentes. D'après Guilbaud et *al*, 2011.

d) Conservation et modification du timing de réplication

Le laboratoire de D. Gilbert a mis en évidence que, dans des types cellulaires relativement proches, le timing de réplication est plutôt bien conservé (Ryba et al., 2010). Par contre, lorsque l'on induit la différenciation de cellules souches embryonnaires murines en progéniteurs neuronaux, le pattern d'expression change et le timing de réplication aussi

(Hiratani et al., 2008). Une étude de Hansen *et al.* rapporte que 49% du timing de réplication est variable lorsque quatre lignées cellulaires sont comparées (Hansen et al., 2010).

Les changements de timing de réplication observés lors de la différenciation d'une cellule soulèvent beaucoup de questions, notamment celle de savoir si c'est le timing de réplication qui influence les marques épigénétiques ou si c'est le contraire. Cette question est vivement discutée dans la revue de Göndör & Ohlsson (2009).

Pour ne pas faciliter la tâche, les changements de timing de réplication sont difficiles à étudier. En effet, les premières études ont été faites chez la levure mais la plupart des mutants étudiés, s'ils ont certes un programme de réplication perturbé, n'ont aucun problème de viabilité (Cosgrove et al., 2002; Stevenson and Gottschling, 1999). De plus, si certains des gènes perturbant le timing de réplication sont létaux, il sera difficile de les identifier. Récemment, il a été montré que la délétion de Rif1 (Rap1 Interacting Factor 1), protéine d'abord identifiée chez la levure comme se fixant sur les télomères (Christopher and Shore, 1992), est capable de modifier le timing de réplication dans des cellules murines et humaines (Cornacchia et al., 2012; Yamazaki et al., 2012) : les régions qui sont normalement répliquées de manière précoce le sont en fin de phase S (EtoL pour early to late) et inversement (LtoE pour late to early). Ce rôle de Rif1 serait dû à sa capacité à se fixer à la matrice nucléaire afin d'organiser la chromatine sous forme de boucles, ce qui met en évidence le lien entre la structure de la chromatine et le timing de réplication.

Un changement d'expression de l'ADN polymérase θ (Pol θ) peut aussi modifier le timing de réplication dans des cellules humaines. Pol θ est une polymérase de 290 kDa possédant en plus de son domaine catalytique, un domaine central dont le rôle est encore inconnu ainsi qu'un domaine hélicase, qui ne présente pas d'activité (Hogg et al., 2012; Seki et al., 2003). De part son absence d'activité exonucléase 5'→3' et son taux d'erreur, elle fait partie des polymérases peu fidèles et a été mise en évidence dans la synthèse translésionnelle (TLS) ainsi que dans l'hypermutation somatique des gènes d'immunoglobuline (Arana et al., 2008; Seki et al., 2005). Pol θ interagit avec les protéines Orc2 et 4, appartenant au complexe ORC, qui se fixe sur les origines de réplication en G1, et régule le recrutement des hélicases Mcm (Fernandez-Vidal et al., 2014). Des changements de timing de réplication, semblables à ceux observés en absence de Rif1, à savoir EtoL et LtoE, sont constatés lorsque la protéine est sous-exprimée. L'hypothèse avancée par les auteurs serait que Pol θ se fixerait en G1 sur des origines activées tardivement pour les inhiber en empêchant le recrutement des hélicases Mcm. Ceci est en accord avec le fait que le timing de réplication semble régulé par le nombre de complexe Mcm chargés sur une origine de réplication (Das et al., 2015).

On peut aussi observer des modifications du timing de réplication dans des lignées cancéreuses humaines. Une récente étude pangénomique effectuée dans des cellules cancéreuses issues de leucémies a permis de mettre en évidence que 9 à 18% du génome ne sont pas répliqués de la même manière que dans des cellules contrôles (Ryba et al., 2010). Ces changements n'étaient pas cantonnés à certaines régions mais étaient retrouvés dans tout le génome. Beaucoup de ces changements de timing de réplication étaient néanmoins localisés dans des régions où des translocations avaient eu lieu.

L'ensemble de ces observations montre bien la complexité de la mise en place du timing de réplication et les conséquences que peuvent avoir des modifications de celui-ci.

4) Duplication de la chromatine

La réplication ne consiste pas uniquement en la duplication de la séquence d'ADN puisque l'on sait que l'ADN se trouve sous forme de chromatine plus ou moins porteuse de marques épigénétiques dans les cellules. Ces marques épigénétiques doivent être tout aussi maintenues que la séquence ADN au cours de la réplication. En plus des protéines du replisome, la fourche de réplication fait intervenir des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, la prise en charge et le dépôt des histones sur la chromatine ainsi que la méthylation de l'ADN.

Du fait que les polymérases répliquatives ont besoin de progresser sur l'ADN, l'organisation chromatinienne peut être un obstacle à cette progression, qu'il s'agisse d'un contexte euchromatinien ou hétérochromatinien. Il a été montré *in vitro* que les nucléosomes peuvent se désassembler au passage de la fourche de réplication (Gruss et al., 1993). Les nucléosomes sont dissociés en deux, un dimère H2A-H2B et un dimère H3-H4. Ils sont ensuite redistribués sur les brins néosynthétisés. On pense que cette dissociation est facilitée par l'intervention des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants.

En plus des histones parentales, de nouvelles histones sont aussi incorporées [pour revues, (Groth et al., 2007; Verreault, 2000)]. Dans le cas de l'hétérochromatine constitutive, ce ne sont pas que les histones qu'il faut déplacer mais aussi les protéines HP1 et les ARNnc aidant à la compaction de la chromatine. La protéine CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1), composée de 3 sous-unités (p150, sous unité catalytique, p60 et p48) joue un rôle déterminant dans la réplication et surtout le maintien de l'hétérochromatine (Kaufman et al., 1995; Verreault et al., 1996). CAF-1 se relocalise aux foyers de réplication dans des cellules humaines et ce, probablement *via* son interaction avec PCNA (Rolef Ben-Shahar et al., 2009; Shibahara and Stillman, 1999). Les protéines HP1 α et CAF-1 interagissent aussi ensemble *via* un motif PxVxL porté par la sous-unité p150. Les travaux du laboratoire du G. Almouzni, axés sur la réplication de l'hétérochromatine péricentromérique chez la souris, montrent l'importance de la protéine CAF-1 dans le réassemblage de l'hétérochromatine (Quivy et al., 2004). Les auteurs ont pu mettre en évidence deux pools bien distincts de protéines HP1 α : l'un en périphérie des chromocentres et associé à PCNA, CAF-1 et la marque d'histone néosynthétisée H4K5; l'autre dans le core du chromocentre associé à la marque histone H3K9me3. Une autre protéine importante dans le réassemblage des nucléosomes est la protéine Asf1 (Anti-silencing factor 1). Chez *S. cerevisiae*, la surexpression d'Asf1 induit un phénomène de dé-répression de gènes (Singer et al., 1998). Une délétion d'Asf1 seule n'a que très peu d'effet sur la répression, en revanche, lorsqu'elle est accompagnée d'une mutation de CAC1 (p150 chez les mammifères), la répression au niveau des régions qui doivent être maintenues silencieuses est fortement affectée (Tyler et al., 1999). Ceci suggère que ces deux protéines sont impliquées dans la même voie de maintien de l'hétérochromatine mais exercent des rôles différents. Plus récemment, une étude a montré que chez *S. pombe*, Asf1 en complexe avec la protéine HIRA (Histone Regulatory Homolog A) pourrait interagir avec Swi6/HP1 au niveau des régions hétérochromatiniennes afin de propager les marques de répression de la chromatine (Yamane et al., 2011). Des expériences de co-immunoprécipitation d'HIRA ont mis en évidence qu'elle interagit avec

des protéines impliquées dans le remodelage chromatinien (Pchelintsev et al., 2013). Rtt106, qui est aussi une protéine chaperon d'histone, intervient dans le maintien de l'hétérochromatine chez *S. cerevisiae* (Huang et al., 2005, 2007). Elle semble jouer un rôle dans la même voie que CAF-1 pour le maintien de l'hétérochromatine puisqu'une délétion de Rtt106 dans un contexte CAF-1 KO augmente les défauts de répression de la chromatine. Aucun homologue de Rtt106 n'a été mis en évidence chez les mammifères. Néanmoins, la protéine chaperon d'histones Daxx, impliquée dans le dépôt de l'histone variant H3.3, possède une région similaire à Rtt106.

Enfin, le maintien de la méthylation de l'ADN est aussi une phase importante de la duplication de la chromatine. Elle s'opère notamment grâce à Dnmt1 qui est recrutée à la fourche par PCNA (Chuang et al., 1997). La méthylation de certains sites par cette ADN méthyltransférase permet le recrutement des protéines modifiant les histones recrutées *via* un site MBD (methyl-CpG binding domain) afin de propager les marques d'hétérochromatine. La duplication de l'information épigénétique en parallèle de la duplication de l'information génétique est résumée Fig. 21.

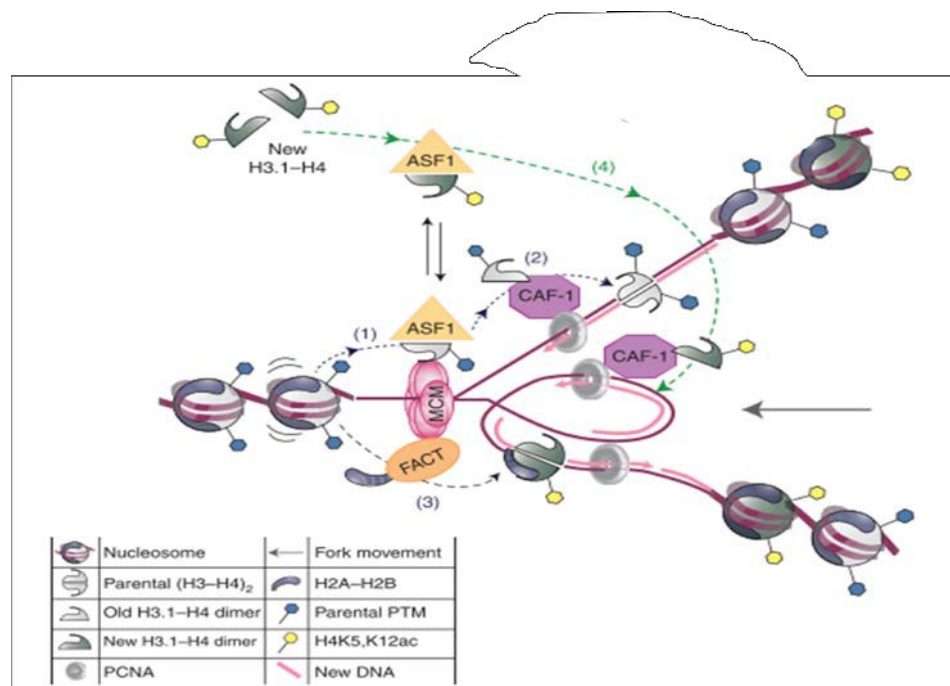


Figure 21 : Duplication de la chromatine au cours de la réplication.

La duplication de l'information épigénétique se fait en parallèle à la réplication de l'ADN par la machinerie de réplication. Les nucléosomes susceptibles de gêner la progression de la fourche de réplication sont désassemblés puis réassemblés après le passage de la fourche. L'assemblage des nouveaux nucléosomes nécessite l'apport des histones parentales ainsi que des histones néosynthétisées. De nombreuses protéines participent au maintien de l'information épigénétique comme la protéine chaperon d'histone Asf1 et CAF-1. D'après McAlpine & Almouzni, 2013.

La réplication est un processus périlleux pour la cellule puisque divers obstacles sont susceptibles d'être rencontrés par la fourche de réplication. Le stress réplcatif qui en découle,

s'il est persistant, peut perturber la coordination entre la machinerie de réplication et la machinerie de recyclage des histones et causer de l'instabilité génétique ainsi que des modifications du paysage chromatinien. Il existe toutefois de nombreuses voies capables de prendre en charge les problèmes rencontrés par le réplisome.

C) Problèmes au cours de la réplication de l'ADN: causes et conséquences du stress réplicatif

La machinerie de réplication doit pouvoir dupliquer le génome tout en s'accommodant de divers obstacles, endogènes ou exogènes, susceptibles d'être rencontrés sur l'ADN. Ces obstacles peuvent causer un stress réplicatif, à savoir un ralentissement ou un blocage de progression des fourches et/ou de la synthèse d'ADN. Bien souvent, la perturbation de la progression des fourches conduit à un découplage des activités hélicase et polymérase et donc à une accumulation d'ADN simple brin. Celle-ci permet le recrutement de facteurs impliqués dans la gestion du stress réplicatif. Néanmoins, lorsque ce stress n'est pas correctement pris en charge, la perturbation de la réplication peut entraîner une réplication incomplète du génome ainsi que des pertes génétiques et épigénétiques extrêmement délétères pour la cellule. Chez l'Homme, de nombreuses maladies sont liées à des défauts de prise en charge du stress réplicatif.

1) Les causes du stress réplicatif

Les causes du stress réplicatif peuvent être classées en deux catégories : les lésions endogènes ou exogènes de l'ADN qui n'ont pas été prises en charge par des mécanismes de réparation et les obstacles naturels rencontrés par la fourche au cours de la réplication.

1.1) Les lésions endogènes et exogènes de l'ADN et leur prise en charge au cours de la phase S

L'ADN étant porteur de l'information génétique, il est primordial de conserver son intégrité. Au cours de la synthèse d'ADN, le principal danger est la présence de lésions causées par des agents génotoxiques endogènes (espèces réactives de l'oxygène) ou exogènes (ultraviolets, rayons ionisants). Ces dommages peuvent altérer l'efficacité et la fidélité de la réplication et générer l'introduction de mutations ponctuelles, voire des remaniements chromosomiques, principale source d'instabilité génétique. Afin de garantir l'intégrité de l'information génétique, la cellule est capable de prendre en charge ces lésions avant et pendant la réplication.

a) Les lésions exogènes de l'ADN

L'intégrité de l'ADN de tous les organismes est tributaire de leur environnement. On peut classer les agents exogènes capables d'endommager l'ADN en trois grandes catégories : les rayonnements ultraviolets (UV), les rayonnements ionisants (RI) et les agents chimiques. Tous ces agents sont capables de générer différents types de lésions dans l'ADN qui vont pouvoir entraver la progression des polymérases lors de la réplication.

(i) Les rayonnements ultraviolets

Les rayonnements UV émis par le soleil sont capables de léser d'ADN et représentent la source majeure des cancers de la peau. Il existe trois types de rayonnements UV classés selon leur longueur d'onde : UVA (400-315 nm), UVB (315-280 nm) et UVC (280-100 nm). Les UVA représentent plus 90% et les UVB moins de 10% des rayons UV atteignant la surface de la Terre, les UVC étant arrêtés par la couche d'ozone. Les rayons UVA sont capables de pénétrer la peau jusqu'au derme et participent activement au photovieillissement cutané et à l'apparition de lésions précancéreuses et cancéreuses. Les UVA sont responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant endommager l'ADN [pour revue, (McMillan et al., 2008)]. De plus, il a été montré qu'ils peuvent induire la formation de photoproduits mais de façon très minoritaire par rapport aux UVB et UVC. Les radiations UVB et UVC sont, quant à elles, responsables de la formation de cyclobutane dimères de pyrimidines (CPD) et d'adduits 6-4 pyrimidines-pirimidones (6-4 PP) (Besaratina et al., 2011), capables de déformer l'ADN. La majeure partie du pouvoir cancérogène de la lumière solaire est attribuée aux UVB. Les photoproduits CPD et 6-4 PP sont pris en charge par le système de réparation par excision de nucléotides (NER) qui, lorsqu'il est défectueux, provoque trois syndromes : Xeroderma Pigmentosum (XP), syndrome de Cockayne et trichothiodystrophie. Les patients XP présentent une grande sensibilité aux rayons UV et une incidence de cancers cutanés 1 000 à 4 000 fois supérieure à celle de la population générale, environ 40 ans plus tôt. Ces deux symptômes s'accompagnent, chez 18% des patients, de dégénérescence neurologique progressive [pour revue, (Mareddy et al., 2013)]. Environ 25% des patients XP appartiennent à un groupe de complémentation dit variant (XP-V). Ces patients présentent certains symptômes cliniques du XP, incluant une prédisposition au développement des cancers cutanés sur les zones exposées au soleil mais plus tardivement, à un âge d'environ 30 à 40 ans. Les cellules XP-V ne sont pas déficientes en NER et sont très peu sensibles aux UV. Le syndrome XP-V implique des mutations de l'ADN polymérase translésionnelle η (Johnson et al., 1999; Lehmann et al., 1975; Masutani et al., 1999). Pol η est spécialisée dans le franchissement fidèle des TT-CPD en incorporant deux adénines en face de la lésion au cours d'un mécanisme de tolérance de lésions appelé TLS sur lequel nous reviendrons plus loin.

(ii) Les rayonnements ionisants

Les RI proviennent essentiellement des rayonnements cosmiques, de la radioactivité ainsi que de certains traitements médicaux comme les rayons X. Les RI provoquent des cassures simple ou double-brin de l'ADN et les molécules issues de la radiolyse de l'eau peuvent provoquer des désaminations, la formation de sites abasiques ainsi que des pontages ADN-protéines [pour revue, (Dizdaroglu, 2012)]. Les cassures sont réparées par les systèmes de recombinaison homologue (RH) ou de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).

(iii) Les agents chimiques

De nombreux agents chimiques utilisés en chimiothérapie causent diverses lésions sur l'ADN. On peut citer le méthyl méthanesulfonate et le témozolomide, qui fixent des groupements alkyles sur l'ADN, ou la mitomycine C et le cisplatine, qui induisent des pontages intra- ou interbrins. D'autres agents chimiques sont, quant à eux, retrouvés dans l'environnement comme le benzo[a]pyrène qui est contenu dans le goudron, la fumée de cigarette ou dans les gaz d'échappement automobile. Après inhalation, il est transformé en Bap-7,8-diol-9,10-époxyde capable d'interagir avec l'ADN et plus particulièrement avec les guanines (Stiborová et al., 2014). Beaucoup d'études s'intéressent aux effets du benzo[a]pyrène et il a d'ores et déjà été montré qu'il est particulièrement délétère pour les poumons et qu'il augmente les risques de cancer (Alexandrov et al., 2006; Perera et al., 2005).

b) Les lésions endogènes de l'ADN

Au sein même de la cellule, il existe des composés qui sont produits par le métabolisme oxydatif et les NADPH oxydases à savoir les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS sont capables de réagir non seulement avec les protéines mais aussi avec l'ADN. Malgré l'existence de systèmes de détoxification composés de différentes enzymes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase...), les ROS créent un stress oxydant dans la cellule lorsque les systèmes de détoxification sont submergés, ce qui est le cas quand une des enzymes est mutée par exemple. Les ROS réagissent avec l'ADN et induisent des cassures double-brin, des sites abasiques, des lésions oxydatives comme la 8-oxoguanine (8-oxo-G) (Fortini et al., 2003) ou encore des pontages ADN-protéines.

c) Signalisation des lésions de l'ADN au cours de la phase S

(i) Généralités sur le point de contrôle intra S du cycle cellulaire

Tout au long du cycle cellulaire, les cellules doivent faire face à divers problèmes qu'il s'agisse des dommages de l'ADN dus à des agents endogènes ou exogènes, des structures anormales causées par des interactions ADN/protéines ou encore à des structures secondaires adoptées par la séquence d'ADN localement. Or le cycle cellulaire est important pour la croissance et la prolifération des cellules, divers systèmes vont donc permettre aux cellules d'achever leur cycle cellulaire tout en préservant au mieux leur intégrité génétique. Pour cela, des systèmes capables de détecter et signaler d'éventuels problèmes tout au long du cycle cellulaire ont été mis en place par les cellules : on parle de points de contrôle du cycle cellulaire. Les protéines d'un point de contrôle permettent le recrutement de protéines capables de prendre en charge les problèmes rencontrés pour que la cellule puisse terminer son cycle. Il existe trois points de contrôle qui interviennent au niveau des transitions du cycle cellulaire, à savoir G1/S, S/G2 et métaphase/anaphase. Ces mécanismes de points de contrôle impliquent trois catégories de protéines (résumé Fig. 22) :

- les capteurs comme RPA et RCF qui signalent la présence d'anomalies et initient la cascade de signalisation.

- les transducteurs tels qu'ATM (Ataxia Telangectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangectasia Rad3-related), Chk1 et Chk2 (Checkpoint kinase 1 ou 2) qui permettent *via* leur activité kinase de phosphoryler les cibles du point de contrôle et d'amplifier le signal.

- les effecteurs comme Cdc25 et p53 qui une fois phosphorylés, régulent le cycle cellulaire et permettent le recrutement des protéines qui vont prendre en charge les problèmes.

Je ne vais m'intéresser ici qu'au point de contrôle de phase S dépendant d'ATR.

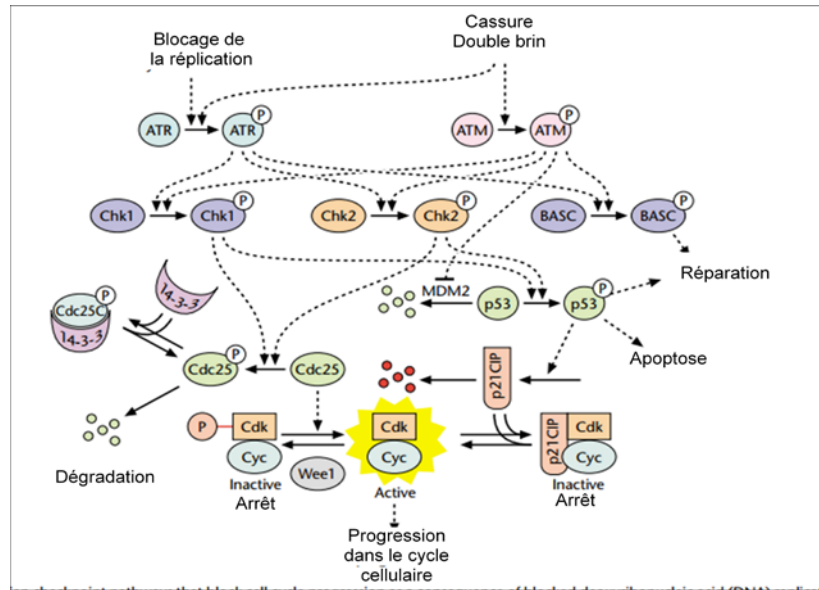


Figure 22 : Schéma simplifié des points de contrôle dépendant d'ATR et d'ATM.

D'après Sible *et al*, 2002.

(ii) ATR et Chk1 : signalisation des fourches de réplication bloquées

ATR est une protéine essentielle pour la viabilité des cellules humaines et murines puisque sa délétion est létale chez la souris (Brown and Baltimore, 2003). Cela est dû au fait qu'ATR ne prend pas qu'en charge les lésions de l'ADN, mais, est impliquée dans différents mécanismes. Elle joue un rôle dans la régulation de l'activation des origines de réplication, la réparation de l'ADN endommagé ainsi que dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées (Nyberg et al., 2002). La protéine clé qui permet le recrutement d'ATR est RPA qui se fixe sur l'ADN simple brin (Zou and Elledge, 2003). C'est notamment le découplage entre la polymérase répllicative et l'hélicase au niveau d'une fourche de réplication qui va provoquer l'accumulation d'ADN simple brin et son recouvrement par RPA (Byun et al., 2005). RPA recrute alors le complexe ATR-ATRIP (pour ATR-interacting protein). La protéine ATRIP est nécessaire à l'activité d'ATR puisqu'une diminution d'expression ou une inactivation entraîne une perte de fonction d'ATR (Cortez et al., 2001). Le recrutement de la protéine TOPBP1 (Topoisomerase-bindind protein 1) est aussi impliqué dans l'activation du complexe ATR-ATRIP (Kumagai et al., 2006). Ce complexe va alors phosphoryler ses cibles. La protéine Chk1 en fait partie. Elle est phosphorylée sur ses sérines 317 et 345. Pour cela, une autre protéine la recrute à proximité d'ATR-ATRIP : il s'agit de la Claspin. Une fois Chk1 activée, elle se détache de la chromatine pour aller phosphoryler ses cibles telles que les protéines Cdc25 impliquées dans la progression des cellules en mitose (Kumagai and Dunphy, 2000). D'autre part, Chk1 peut ralentir les fourches de réplication en cas de stress réplcatif, inhiber les origines qui normalement devaient être activées à proximité et enfin activer des origines dormantes (Ge and Blow, 2010; Unsal-Kaçmaz et al., 2007).

d) Mécanismes de tolérance aux lésions : généralités

La cellule est capable de prendre en charge les lésions ou les problèmes qui l'empêchent de progresser dans le cycle cellulaire. Il existe différents systèmes de réparation qui vont pouvoir intervenir en fonction de la lésion à prendre en charge mais aussi de l'endroit du cycle cellulaire où se trouve la cellule. On peut notamment citer le système de réparation par excision de base (BER) qui intervient plutôt lorsqu'il s'agit de prendre en charge les lésions dues au métabolisme cellulaire comme le stress oxydant. Une partie des lésions peuvent être prises en charge grâce à ces systèmes avant l'entrée en phase S de la cellule. Néanmoins, certaines lésions vont persister dans l'ADN et entravent la progression des polymérase répliquatives. Des mécanismes de tolérance aux lésions permettent à la cellule de compléter sa réplication en présence de lésions déformant l'ADN. La tolérance aux lésions met en jeu deux mécanismes : le contournement de lésions, appelé aussi Damage Avoidance Pathway (DAP), et la synthèse translésionnelle (TLS). Ces lésions qui persistent alors sur l'ADN pourront être prises en charge par la suite par des mécanismes de réparation.

Des études chez la levure *S. cerevisiae* ont montré que des modifications post-traductionnelles de l'homotrimère PCNA coordonnent les mécanismes de tolérance de lésions. PCNA peut être mono-ubiquitiné par le complexe Rad6-Rad18 et polyubiquitiné par le complexe Mms2-Ubc13/Rad5. La mono-ubiquitination de PCNA induit la voie de synthèse translésionnelle pour franchir la lésion alors que la polyubiquitination de PCNA induit le contournement de lésions par des mécanismes d'invasion de brin avec comme matrice les chromatides sœurs (Fig. 23) (Andersen et al., 2008; Hoege et al., 2002).

Chez l'Homme, il a été montré que la mono-ubiquitination sur la lysine 164 est la modification majoritaire de PCNA, facilement détectable après exposition de cellules en prolifération à des agents génotoxiques tels que les UV (Kannouche and Lehmann, 2004). Dès que l'ADN polymérase répliquative est bloquée par un dommage, le complexe Rad6/Rad18 mono-ubiquitine PCNA présent sur le site lésé, ce qui va favoriser le recrutement des polymérase translésionnelles sur l'ADN afin de franchir la lésion (Bienko et al., 2005; Kannouche et al., 2004).

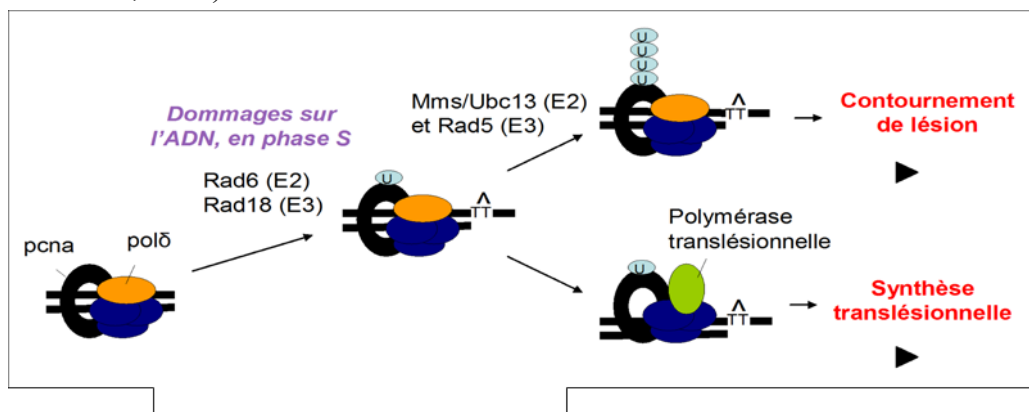


Figure 23 : Régulation des voies de tolérance chez *S. cerevisiae*.

Lorsque le réplisome rencontre un obstacle déformant l'ADN, PCNA peut être mono-ubiquitiné par le complexe Rad6/Rad18 et induire la synthèse translésionnelle en recrutant une polymérase translésionnelle. L'ubiquitination peut aussi se poursuivre *via* le complexe Mms/Ubc13 et Rad5 et conduire à la polyubiquitination de PCNA, qui favorise le contournement de lésion. D'après Agathe Bacquin.

e) La synthèse translésionnelle et les polymérases translésionnelles

La synthèse translésionnelle (TLS) est le processus majoritaire pour franchir des lésions au cours de la réplication de l'ADN dans les cellules humaines. Le modèle « d'échange de polymérases » suggère que la polymérase répllicative est transitoirement remplacée par une polymérase spécialisée, qui va franchir le dommage et permettre de continuer la synthèse d'ADN.

Dans les cellules de mammifères, les ADN polymérases translésionnelles sont divisées en deux grandes familles : Pol η (Pol η), Pol ι (Pol ι), Pol κ (Pol κ) et Rev1 pour la famille Y et, pour la famille B, Pol ζ (qui sera présentée de manière détaillée plus loin dans l'exposé). Le site actif des ces ADN polymérases de la famille Y est plus ouvert que celui des polymérases répliquatives (Ling et al., 2001) et leurs domaines catalytiques sont bien conservés de la bactérie à l'Homme (Fig. 24). Cette caractéristique permet aux polymérases TLS de répliquer plus facilement au travers d'une lésion modifiant la structure de la double hélice d'ADN, en revanche, elles sont moins fidèles car elles ne possèdent pas d'activité 3'-5' exonucléase, n'ont un contact que très limité avec la matrice et sont moins aptes à sélectionner le nucléotide qui va être incorporé [pour revue, (McCulloch and Kunkel, 2008)]. Les polymérases TLS introduisent un mauvais nucléotide toutes les 10 à 10 000 bases. Les polymérases spécialisées, qui sont conservées au cours de l'évolution, ont été bien caractérisées pour leur capacité à franchir différents types de lésions *in vitro*. Par contre, peu de données *in vivo* ont été rapportées. La plupart de ces polymérases spécialisées franchissant les lésions de l'ADN de manière mutagène, leur activité ainsi que leur recrutement sur l'ADN doivent être finement régulées. Cette régulation passe notamment par des protéines telles que PCNA, un cofacteur des ADN polymérases, qui peut subir des modifications post-traductionnelles afin de recruter différents partenaires protéiques impliqués dans la maintenance de l'intégrité génomique. On sait que la mono-ubiquitination de PCNA favorise le recrutement des ADN polymérases de la famille Y (Bienko et al., 2005; Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004) et défavorise l'interaction avec Pol δ (Watanabe et al., 2004).

Pour cela, les ADN polymérases de la famille Y possèdent des domaines leur permettant d'interagir avec

PCNA mono-ubiquitiné [pour revue, (Sale et al., 2012)]:

- le domaine PIP (PCNA Interacting Protein), identifié dans Pol η , Pol κ et Pol ι , permet l'interaction avec PCNA.
- le domaine UBZ (Ubiquitin Binding Zinc-finger), identifié dans Pol η et Pol κ , et le domaine UBM (Ubiquitin Binding Motif) identifié dans Pol ι et Rev1, permettent l'interaction avec l'ubiquitine.

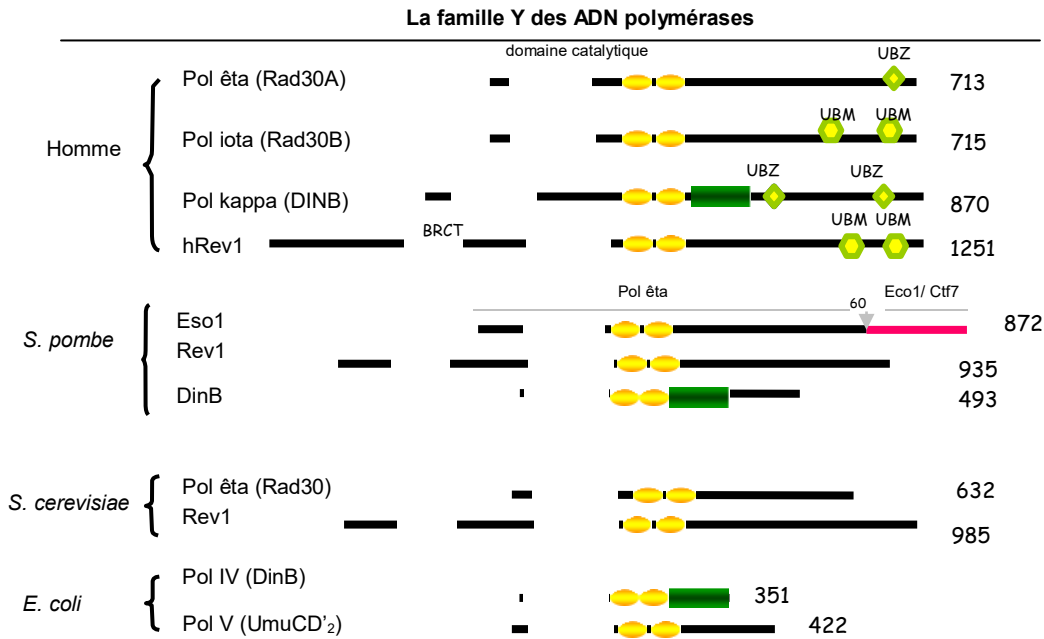


Figure 24 : Structure des domaines des ADN polymérases de la famille Y.

Le domaine catalytique est très conservé de la bactérie à l'Homme (représenté en marron). UBZ : ubiquitin binding zinc-finger ou UBM : ubiquitin binding motif, domaine d'interaction avec l'ubiquitine.

Deux modèles d'action des polymérases TLS ont été mis en évidence ; l'un qui a lieu à la fourche que l'on nomme le « switch » de polymérase et l'autre qui a lieu au niveau des brèches d'ADN, en arrière de la fourche, que l'on nomme le « gap filling ». Le modèle du « switch » de polymérase consiste en un échange entre la polymérase répllicative Pol δ/ϵ et une polymérase TLS afin de franchir la lésion (Fig. 25). Lorsque la fourche rencontre une lésion sur l'ADN, le complexe Rad6/Rad18 est recruté au niveau de l'ADN simple brin généré par l'arrêt de la réplication et mono-ubiquitine PCNA. Cette modification permet le recrutement d'une ou plusieurs polymérases TLS qui vont pouvoir franchir la lésion. Une fois la lésion franchie, la polymérase répllicative va de nouveau être chargée sur l'ADN pour continuer la réplication.

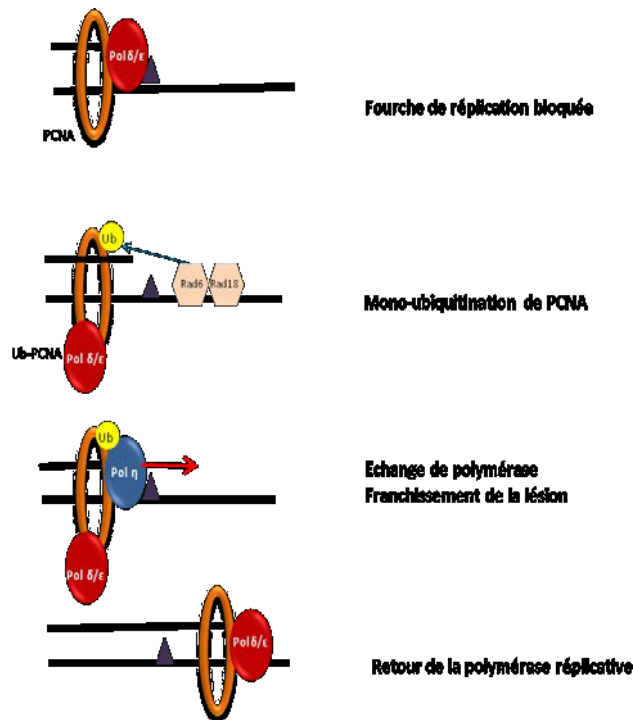


Figure 25 : Modèle du switch de polymérase lors de la synthèse translésionnelle.

Lorsque la fourche de réplication est bloquée par une lésion UV-induite, PCNA peut être mono-ubiquitiné par le complexe Rad6/Rad18. Cette modification permet l'échange de la polymérase réplcatrice (pol δ ou ϵ) avec la polymérase translésionnelle, pol η . Une fois la lésion franchie, la polymérase réplcatrice peut être de nouveau chargée sur l'ADN pour continuer la réplication.

1.2) Les obstacles naturels de la réplication

Outre les différentes lésions qui peuvent endommager l'ADN, il existe des régions du génome qui sont susceptibles de former des barrières pour la progression de la fourche de réplication. Ces barrières naturelles sont diverses et comprennent la collision entre la machine de transcription et la machine de réplication, les pontages ADN/protéines, les structures secondaires de l'ADN ainsi que les séquences répétées. Certaines régions du génome chez les eucaryotes sont plus difficiles à répliquer de par leur complexité en termes de séquence ou de structure comme les télomères, les centromères ou encore les sites fragiles communs.

a) Les collisions transcription/réplication

Les machineries de réplication et de transcription partageant la même matrice ADN, il est logique qu'elles finissent par entrer en collision l'une avec l'autre. Cette collision transcription/réplication a tout d'abord été mise en évidence chez *E.coli* où la réplication est ralentie à proximité d'une région en cours de transcription (Brewer, 1988; French, 1992). Des études effectuées chez *S. cerevisiae* ont mis en évidence des sites de pause de réplication dépendant de la transcription aux loci codant des ARN de transfert (ARNt) et ribosomaux.

(ARNr) (Deshpande and Newlon, 1996). Les études sur le stress réplicatif ont relancé l'intérêt pour l'étude des sites de pause de réplication dus à la transcription puisqu'on a pu identifier récemment que ces mêmes régions sont plus susceptibles de casser (Barlow et al., 2013). On parle de sites fragiles répliqués de manière précoce bien que l'on ne sache pas encore comment ces régions sont promptes à casser plus facilement. De manière très intéressante, il semblerait que ce ne soit ni l'élongation par l'ARN polymérase II, ni le complexe d'initiation de la réplication qui soit responsable de cette pause de la fourche de réplication mais plutôt le mécanisme d'export des ARN qui induirait un stress topologique (Bermejo et al., 2011).

b) Les structures secondaires de l'ADN

En plus de la structure canonique de l'ADN, qui consiste en une double hélice droite que l'on nomme ADN-B, il existe une multitude d'autres structures alternatives identifiées depuis les années 50 : les structures cruciformes, en épingle à cheveux, en triple hélice (ADN-H), en G-quadruplex (G4) ou encore en double hélice gauche (ADN-Z), la première structure à avoir été identifiée. Ces différentes structures sont basées sur la composition des répétitions et la symétrie de la séquence. Trois types de répétitions d'ADN ont été mis en évidence : les répétitions inversées, les répétitions en miroir et les répétitions directes (Tableau 1).

Type de répétition	Exemple de séquence	Structure formée
Répétitions inversées		Cruciformes ou épingle à cheveux
Répétitions en miroir		ADN-H
Répétitions directes	Dinucleotide repeat: $(AT)_n$ $n < 10$ nt: microsatellite $n > 10$ nt: minisatellite G-rich direct repeats: $GGG(N)_{1-7}GGG(N)_{1-7}GGG(N)_{1-7}GGG$	ADN-Z G-quadruplex

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des différentes structures d'ADN non-B.

D'après Sarkies *et al.*, 2010.

(i) Les structures en épingle à cheveux ou cruciformes

Ces structures peuvent se former en présence de répétitions inversées équidistantes du centre de symétrie et qui s'associent en respectant la structure Watson et Crick. L'association de deux séquences palindromiques forme une structure en épingle à cheveux avec comme boucle le centre de symétrie qui n'est pas associé à son brin complémentaire (Fig. 26D et E). Il semblerait que deux séquences palindromiques de 7 pb suffisent pour la formation de ces structures (Cai et al., 1998). La structure cruciforme, quant à elle, consiste en deux structures

en épingle à cheveux. La formation de ces structures requiert beaucoup d'énergie que l'on pense être apportée par le surenroulement négatif de l'ADN (Oussatcheva et al., 2004).

(ii) La structure ADN-Z

La structure ADN-Z consiste en une double hélice gauche avec un arrangement en zigzag (Fig. 26B). Elle est formée à partir de séquences répétées riches en purines et pyrimidines telles que (CG : CG) ou (CA : TG). Ces séquences sont très abondantes dans le génome humain, environ une toutes les 3 000 pb (Schroth and Hof, 1992). Beaucoup de séquences adoptant la structure ADN-Z ont été identifiées à des points de cassure dans des gènes importants de tumeurs humaines. Ceci suggère que cette structure peut induire de l'instabilité génétique, notamment en conduisant à des cassures double brin et à de larges délétions (Wang et al., 2006).

(iii) La structure en triple hélice ADN-H

La structure ADN-H peut se former au niveau de séquences répétées en miroir (MR, pour *miror sequence*) symétriques d'homopurine-homopyrimidines. Un des deux brins d'une des séquences en miroir se dissocie et se fixe dans le sillon majeur de l'ADN double brin du duplex restant afin de former une hélice à triple brin avec deux petits sillons supplémentaires (Voloshin et al., 1988). Les bases du troisième brin sont associées au duplex *via* des liaisons Hoogsteen [pour revue, (Frank-Kamenetskii and Mirkin, 1995)] (Fig. 26C).

(iv) La structure en G-quadruplex

Les G-quadruplex se forment dans des régions composées de longues répétitions directes (DR) de guanines. Ces structures sont formées par quatre plateaux de guanines empilés, stabilisés par des ions monovalents et reliés entre eux par des boucles latérales (Fig. 26F). Les G-quadruplex peuvent être formés par un, deux ou quatre brins et il existe une variété de conformations dépendant de la polarité des brins (parallèles ou anti-parallèles), de la séquence composant les boucles de connexion ainsi que de la disponibilité des cations pour les liaisons. Des analyses bioinformatiques ont mis en évidence que près de 43% des séquences promotrices dans le génome humain contiennent au moins un G-quadruplex et que les structures G4 les plus stables sont très souvent retrouvées à proximités du site de début des TSS (Huppert and Balasubramanian, 2007). Ceci suggère un rôle particulier de ces structures dans la régulation de la transcription. On trouve aussi des structures G4 au niveau des origines de réplication (OGRE).

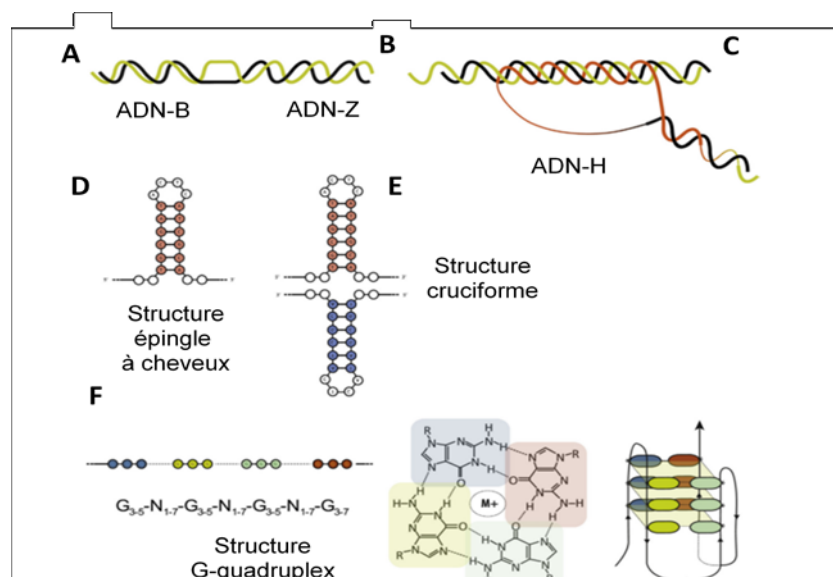


Figure 26 : Multiplicité des structures d'ADN non-B.

(A) Structure ADN-B classique (hélice droite) et (B) structure ADN-Z (hélice gauche). (C) Structure de l'ADN-H, ou triple hélice. (D) Structure en épingle à cheveux et (E) structure cruciforme. (F) Structure en G-quadruplex (structure primaire secondaire et tertiaire). De gauche à droite : motif G canonique, G-quartet et G-quadruplex. D'après Sarkies *et al.*, 2010.

c) Comment ces structures non-B peuvent-elles perturber la réplication ?

Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la formation de structures en épingle à cheveux, en triple hélice ou en G4 inhibe la progression de la fourche de réplication. *In vitro* et chez différents organismes, il a été montré que plusieurs ADN polymérases sont inhibées par des répétitions inversées (Bedinger *et al.*, 1989; Challberg and Englund, 1979; Weaver and DePamphilis, 1984), par des séquences MR (Baran *et al.*, 1991; Dayn *et al.*, 1992; Krasilnikov *et al.*, 1997) et des structures G4 (Usdin and Woodford, 1995; Weitzmann *et al.*, 1997; Woodford *et al.*, 1994). Ces différentes structures peuvent se former relativement sans contraintes lorsque l'ADN est sous forme simple brin, mais l'ADN étant sous forme double brin, il doit être assez rare de retrouver ces structures *in vivo*. Cependant, au cours de la réplication, une portion du brin retardé se retrouve sous forme simple brin de manière transitoire. On peut donc penser que ce contexte est favorable à la formation de structures secondaires qui pourraient interférer avec la progression de la fourche de réplication. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui montrent que, *in vivo*, les structures secondaires sont capables d'inhiber la réplication chez la bactérie, la levure et dans des cellules de mammifères [pour revue, (Mirkin and Mirkin, 2007)].

2) Les conséquences du stress réplicatif

2.1) Les conséquences génétiques d'un stress réplicatif : l'exemple des sites fragile communs

Il existe certains loci dans le génome humain qui sont particulièrement prompts à casser lorsque la réplication est perturbée (Richards, 2001). Ces régions, très conservées chez les eucaryotes, sont connues sous le nom de sites fragiles communs (SFCs) et illustrent parfaitement les conséquences au niveau génétique que peut avoir un stress réplicatif.

a) Qu'est-ce qu'un site fragile commun ?

Les sites fragiles sont des sites chromosomiques préférentiels d'instabilité génétique, susceptibles de casser lorsqu'on inhibe partiellement la réplication. Plus de 200 sites fragiles ont été identifiés dans les lymphocytes et sont classés en deux catégories :

-les sites fragiles rares qui représentent 5% des sites fragiles et sont transmis de manière héréditaire à la descendance (Kremer et al., 1991; Sutherland et al., 1998). Ils sont liés à des maladies dues à l'expansion d'éléments répétés tels que les di- ou trinuéclotides. Le syndrome de l'X fragile est dû à une expansion de trinuéclotides CGG en amont du gène *FRMI* empêchant ainsi l'expression de ce gène impliqué dans le contrôle de la traduction (Kremer et al., 1991).

-Les SFCs, représentant 95% des sites fragiles, sont retrouvés chez tous les individus et ne résultent pas d'expansion de nucléotides. Ces régions du génome deviennent instables dans des conditions de stress réplicatif telles qu'une inhibition partielle des ADN polymérases réplcatives (aphidicoline, APH) ou un déséquilibre du pool des nucléotides (hydroxyurée, HU). L'expression phénotypique de cette instabilité est visualisable sous forme de gaps ou de cassures lorsque l'on procède à l'étalement des métaphases des cellules traitées avec de faibles doses d'APH (Fig. 27). Le premier SFC à avoir été cloné est le site FRA3B situé sur le bras court du chromosome 3 (3p14.2) (Ohta et al., 1996; Wilke et al., 1994). L'instabilité des SFCs est fréquemment la cause des amplifications, délétions et réarrangements trouvés dans les tumeurs et participe ainsi au développement tumoral (Coquelle et al., 1997). Certains des SFCs étant associés à des gènes, les réarrangements chromosomiques peuvent aboutir à la perte d'expression de ceux-ci. On peut par exemple citer les SFCs FRA3B et FRA16D qui sont situés à proximité de deux gènes suppresseurs de tumeurs que sont respectivement FHIT et WOX. En plus d'être des sites privilégiés de cassures, les SFCs sont aussi des points chauds d'échange de chromatides sœurs et donc dépendants des mécanismes de recombinaison homologue (Glover and Stein, 1987).

b) La réplication des sites communs fragiles et le stress réplicatif

Les sites fragiles communs sont généralement associés à de grands gènes qui font entre 600 kb et 2 Mb (pour revue, (Smith et al., 2007)). Ces gènes sont environ 15% plus grands que la moyenne.

Les SFCs sont plutôt répliqués de manière tardive. Il a été montré que l'APH est à l'origine d'une réplication retardée du site FRA3B qui, à la fin de la phase G2, n'est pas entièrement répliqué (Palakodeti et al., 2009). Or, il est communément admis que les séquences codantes sont plutôt répliquées en début de phase S (comme présenté précédemment). Comment expliquer que ces régions associées pour la plupart à des gènes soient répliqués tardivement ? De récentes analyses de peignage moléculaire et de timing de réplication effectuées dans des lymphoblastes ont mis en évidence que le SFC FRA3B est pauvre en origines de réplication (Letessier et al., 2011). Lorsque les cellules sont traitées à l'APH, on observe une diminution dramatique de la vitesse des fourches de réplication ainsi qu'un défaut d'achèvement de la réplication. Les SFCs FRA6E (Palumbo et al., 2010) et FRA16D (Letessier et al., 2011) présentent les mêmes caractéristiques. Il se pourrait donc que le ralentissement des fourches de réplication soit plus délétère, dans des régions pauvres en origines lorsque les fourches doivent parcourir de longues distances, que dans des régions riches en origines où les distances inter-origines sont plus faibles. Néanmoins, d'un type cellulaire à un autre, il peut y avoir des expressions différentielles des sites fragiles communs et donc des différences quant aux nombre d'origines de réplication à proximité.

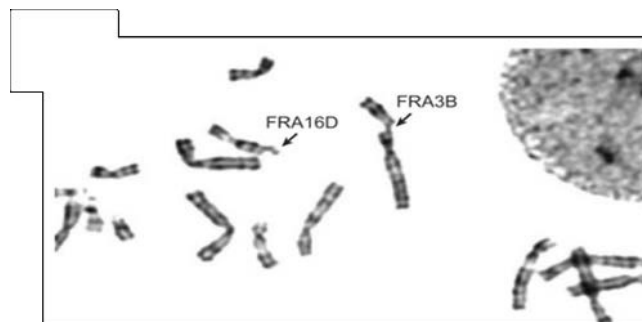


Figure 27 : Exemple de gaps et de cassures au niveau des sites fragiles communs sur un étalement métaphasique de cellule humaine.

D'après Durkin & Glover, 2007.

Il a aussi été mis en évidence que les SFCs sont constitués de nombreuses séquences répétées riches en AT (Mishmar et al., 1998; Ried et al., 2000; Shimizu et al., 2002) et que celles-ci sont capables de former des structures secondaires (Zhang and Freudenreich, 2007) inhibant la réplication. Cependant, une autre étude n'a pas pu montrer de corrélation entre les SFCs et la capacité à former des structures secondaires (Tsantoulis et al., 2008). L'une des questions qui se pose est de savoir si ces séquences riches en AT sont intrinsèquement promptes à casser. Encore une fois, différentes études donnent deux résultats contradictoires puisque, pour certains auteurs, les motifs AT donnent une certaine flexibilité à la région et expliquent sa facilité à casser. En revanche, lorsque l'on délète les régions flexibles riches en AT dans les

SFCs FRA16B et FRA3B, ces sites sont toujours prompts à casser (Letessier et al., 2011; Palumbo et al., 2010).

Enfin, des études récentes ont mis en évidence le rôle de la transcription dans la fragilité de certains sites. Les auteurs ont montré que la transcription de grands gènes de plus de 800 kb prenait plus d'un cycle et que, de ce fait, la machinerie de réplication rencontrait forcément la machinerie de réplication. D'ailleurs, il a été montré chez les eucaryotes que lorsqu'il y a un problème de maturation des ARNm et qu'il y a collision avec la machinerie de réplication, l'instabilité génétique augmente (pour revue, (Aguilera and García-Muse, 2013). Cependant, une étude RNA-seq sur les SFCs dans des cellules HCT116 n'a pas mis en évidence d'instabilité pour ces gènes de plus de 800 kb ce qui remettrait en cause l'hypothèse de la fragilité due à la collision entre les machineries de réplication et de transcription. On peut tout de même penser que la collision entre ces deux machineries peut accentuer l'instabilité aux SCFs.

Tout ceci suggère que les SFCs sont la résultante de plusieurs facteurs incluant le stress réplicatif, les structures secondaires et la rareté des origines de réplication dans ces régions du génome.

c) Maintenance et conséquences d'une réplication incomplète des SFCs

Le dogme selon lequel l'ADN est uniquement répliqué en phase S a complètement été remis en question depuis quelques années puisqu'il semblerait que la duplication à certains endroits du génome se poursuive en G2 et en tout début de mitose. C'est le cas pour les SFCs (Chan et al., 2009; Naim and Rosselli, 2009) dont la réplication se produit en phase G2 du cycle cellulaire. Néanmoins, lorsque la cellule entre en mitose, il peut subsister des régions qui n'ont pas été totalement répliquées. Ces intermédiaires de réplication sont visualisables sous la forme de ponts anaphasiques ultrafins (UFBs) reliant les deux chromatides sœurs. Les UFBs ont la particularité de ne pas être marqués au DAPI et ne contiennent pas d'histones. Ces UFBs ont été mis en évidence grâce à leur marquage par l'hélicase Bloom (BLM), de même que les ponts anaphasiques conventionnels, visualisables au DAPI (Chan et al., 2007). Trois types d'UFBs ont été mis en évidence, au niveau des centromères (C-UFB), des sites fragiles communs (FS-UFB) ou des télomères (T-UFB). Bien qu'on ne connaisse pas encore toutes les particularités de ces différents UFB, ils partagent néanmoins des caractéristiques communes comme le fait d'être des régions difficiles à répliquer et de correspondre à de l'ADN qui n'est pas totalement répliqué. Les cellules non stressées présentent peu de FS-UFBs mais ceux-ci peuvent être induits en traitant les cellules avec de faibles doses d'APH. D'autres protéines ont aussi été identifiées au niveau des UFBs comme les protéines de la voie Fanconi FANCD2 et FANCI, ainsi que l'ADN translocase PICH (Plk1-interacting checkpoint helicase) (Chan et al., 2007). Les protéines BLM ou FANCD2 jouent un rôle primordial dans la résolution de ces UFBs et le maintien de la stabilité génétique puisque leur mutation est associée à des maladies humaines graves que sont l'anémie de Fanconi et le syndrome de Bloom. La voie Fanconi semble avoir une affinité particulière pour les fourches bloquées *in vivo* (Gari et al., 2008), ce qui pourrait expliquer son implication dans la résolution des UFBs. De plus, il a été montré que la voie Fanconi est suractivée en réponse à

un traitement à l'APH et l'inhibition de cette voie augmente l'expression des SFCs, c'est-à-dire leur capacité à casser (Howlett et al., 2005). L'hélicase BLM est quant à elle impliquée dans la résolution des structures engendrées par la convergence de fourches de réplication. Une coopération entre BLM et FANCD2 au cours de la mitose a été évoquée dans différents articles (Chan et al., 2007; Naim and Rosselli, 2009). Lorsque la réplication est ralentie par de faibles doses d'APH et que les fourches sont bloquées, la voie Fanconi doit pouvoir stabiliser les structures partiellement répliquées pendant la fin de phase S/G2 et probablement durant la mitose. En absence de FANCD2, les UFBs peuvent casser, ce qui induit une expression très forte des SFCs. BLM doit jouer un rôle dans la décaténation de ces structures ADN composant les UFBs. Il a été proposé récemment que PICH puisse jouer un rôle dans la stabilisation des UFBs en décrochant les nucléosomes, ce qui servirait de signal pour la résolution des UFBs (Biebricher et al., 2013).

En prophase, la protéine FANCD2 va être recrutée au niveau de régions qui ne sont pas entièrement répliquées (under-replicated regions) en fin de G2. Des endonucléases comme ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation Group 1) et MUS81 vont pouvoir résoudre les intermédiaires tardifs de réplication et les structures d'ADN partiellement répliquées en créant des cassures en métaphase (Naim et al., 2013). La persistance d'intermédiaires de réplication entre les chromatide sœurs en anaphase va stimuler le recrutement de BLM et PICH, on parle alors d'UFB. Lorsqu'ERCC1 et MUS81 sont présentes, la ségrégation se passe correctement et il n'y a pas de formation d'UFB. Lorsqu'elles sont déplétées, il y a une augmentation du nombre et de la persistance des UFBs (Naim et al., 2013). Ces UFBs engendrent des cassures double brin à la fin de la mitose. Néanmoins, on ne sait pas si c'est le recrutement d'endonucléases qui vont pouvoir cliver l'UFB ou si c'est la séparation physique des chromatides sœurs qui va engendrer ces cassures. Il a été montré que les lésions issues de la cassure d'un UFB sont transmises aux cellules filles et séquestrées par la protéine 53BP1 (p53 Binding-Protein 1) sous forme de gros foyers appelés nuclear bodies en G1 (Lukas et al., 2011). Cette séquestration est nécessaire pour éviter que les extrémités libres des cassures double brin ne soient dégradées par des nucléases. Ces lésions seront alors prises en charge par des systèmes de réparation. Lorsque les UFBs cassent, il est aussi possible de perdre du matériel génétique sous forme de micronoyaux (Naim and Rosselli, 2009). Les principales étapes de la résolution des UFBs sont présentées Fig. 28.

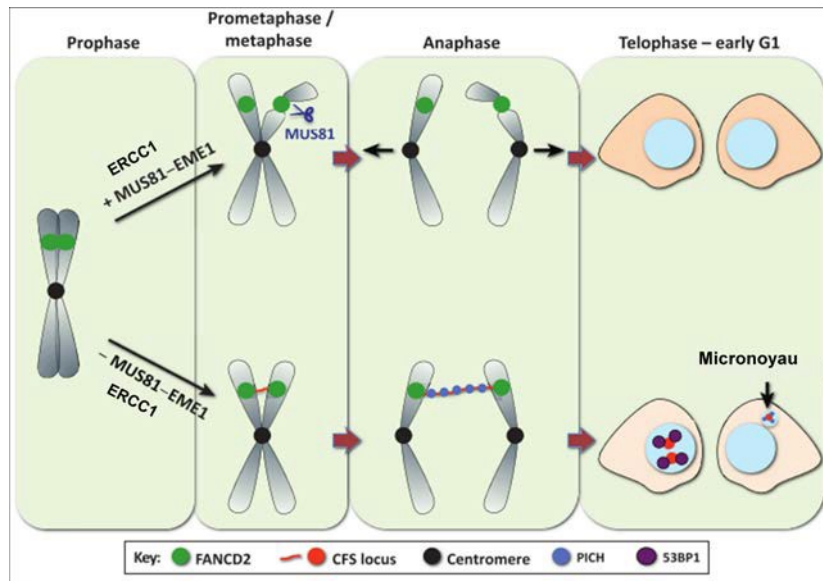


Figure 28 : Les domaines chromatinien enrichis en 53BP1 en G1 protègent les lésions ADN générées par une réplication incomplète au niveau des SFCs.

En présence de MUS81 et ERCC1 (panel du haut), les intermédiaires de réplication correspondant à de l'ADN non répliqué vont pouvoir être clivés. Il n'y a donc pas de formation d'UFB. Lorsque ces enzymes sont déplétées (panel du bas), des UFBs peuvent se former et vont être marqués par FANCD2 aux extrémités et par PICH le long de l'UFB. Après la mitose, les cassures résultant de la mauvaise ségrégation du génome vont être séquestrées par 53BP1. D'après Minocherhomji & Hickson, 2013.

2.1) Les conséquences épigénétiques d'un stress réplicatif : perturbation du recyclage des histones

Nous avons vu précédemment que la progression de la fourche de réplication consiste en une coordination parfaite de la machinerie de réplication et de la machinerie permettant le maintien de l'information épigénétique. Une perturbation de la progression de la fourche de réplication due à un stress réplicatif peut donc avoir un impact sur le recyclage des histones. En effet, lorsque la fourche de réplication est perturbée, les histones ne peuvent plus être incorporées et s'accumulent avec la protéine chaperon d'histone Asf1 (Groth et al., 2007; Singh et al., 2009). Cette étape est cruciale puisqu'il a été montré qu'un excès d'histones peut altérer la stabilité génétique chez *S. cerevisiae*. Un mécanisme de surveillance dépendant de Rad53 permet de réguler le niveau d'histones disponibles dans la cellule (Gunjan and Verreault, 2003).

Les histones néosynthétisées, notamment au cours de la réplication, sont importées dans le noyau. On pense que la marque des histones néosynthétisées, à savoir l'acétylation de l'histone H4 sur les lysines 5 et 12, est peut être impliquée dans l'import nucléaire ainsi que dans l'assemblage de la chromatine car ces marques sont très conservées au cours de l'évolution [pour revue, (Keck and Pemberton, 2013)]. On retrouve aussi les marques H3K14ac et H3K18ac. Le maintien d'un haut niveau d'acétylation des histones facilite la

réparation et le redémarrage des fourches (Barman et al., 2006). Bien entendu, ces marques doivent être enlevées une fois que les histones sont incorporées dans la chromatine afin de rétablir l'organisation de départ de celle-ci et d'autant plus lorsqu'il s'agit de domaines hétérochromatiniens (Jasencakova and Groth, 2010a).

Lorsque les histones néosynthétisées sont séquestrées par Asf1 en cas de stress réplcatif, la marque H3K9me va leur être apposée, ce qui signifie que les activités de réplcation du génome et le maintien de l'organisation chromatinienne ne sont plus coordonnés. La marque H3K9me peut être modifiée en H3K9me3, la marque de la chromatine fermée (Loyola et al., 2006, 2009), conduisant ainsi à une hétérochromatinisation inappropriée de la chromatine dans des régions qui normalement ne sont pas réprimées. Cela pourrait avoir de graves conséquences sur des régions transcriptionnellement actives, notamment sur l'expression de certains gènes. En outre, nous avons vu précédemment qu'un changement des marques épigénétiques peut sans doute avoir une influence sur le timing de réplcation. Les histones parentales, quant à elles, se retrouvent aussi séquestrées par Asf1 puisque, en cas de blocage de la fourche, on retrouve une variété d'histones modifiées en interaction avec la protéine chaperon d'histones (Jasencakova et al., 2010). Cette fois-ci, le fait de ne pas « replacer » les histones portant des marques spécifiques au bon endroit peut modifier l'organisation et la structure de la chromatine de manière locale.

Au cours de la réplcation, il est donc tout aussi important de dupliquer de manière fidèle l'ADN que de maintenir les marques épigénétiques qui lui sont associées.

3) Réplcation de l'ADN structuré

3.1) Rôle des hélicases dans la réplcation de l'ADN structuré

a) Généralités

Nous avons présenté précédemment certaines séquences d'ADN structuré comme les G-quadruplex. La formation de ces structures G-quadruplex a d'abord été mise en évidence *in vitro* et des expériences d'extension d'amorces ont montré leur capacité à bloquer la synthèse d'ADN (Woodford et al., 1994). Grâce à des outils bioinformatiques et quelques études *in vivo*, on sait qu'il existe environ 376 000 séquences d'ADN susceptibles de former des G-quadruplex et que ces structures sont retrouvées aux TSS, au niveau des gènes ribosomiaux, aux télomères et à des sites enrichis en cassures double-brin durant la mitose et la méiose (Huppert and Balasubramanian, 2005, 2007). L'utilisation de ligands spécifiques des G4 ainsi que d'anticorps a permis de visualiser ces structures qui sont extrêmement abondantes dans des cellules humaines en prolifération (Biffi et al., 2013; Henderson et al., 2014; Rodriguez and Miller, 2012).

Ces structures, lorsqu'elles ne sont pas déroulées, peuvent bloquer la progression des fourches de réplcation (Usdin and Woodford, 1995; Weitzmann et al., 1997; Woodford et al., 1994).

Plusieurs hélicases ont été identifiées comme étant impliquées dans la réplcation de l'ADN non-B et plus spécifiquement des G-quadruplex : FANCI, WRN (Werner syndrome protein) ou encore BLM. D'ailleurs, lorsque des cellules sont mutées pour ces hélicases, elles

présentent une forte instabilité génétique et épigénétique au niveau des sites G-quadruplex, suggérant une perturbation importante de la réplication.

b) L'hélicase FANCI

FANCI (d'abord nommée BRACH1 pour BRCA1 interacting C-terminal helicase) a d'abord été mise en évidence pour son interaction avec BRCA1 (Cantor et al., 2001). Tout comme cette dernière, une absence de FANCI prédispose au cancer du sein et des ovaires mais dans une moindre mesure. FANCI a été retrouvée mutée dans le groupe J de complémentation de l'anémie de Fanconi (Levitus et al., 2005; Levan et al., 2005; Litman et al., 2005). FANCI est une hélicase de la famille des clusters Fer-Soufre (Fe-S), qui comprend XPD, DDX11 et RTEL. Avec quatre cystéines conservées, le cluster (Fe-S) constitue le domaine core de l'hélicase.

La caractérisation biochimique de la protéine recombinante FANCI purifiée a permis de montrer qu'elle déroule l'ADN dans le sens 5' vers 3' d'une manière ATP-dépendante (Cantor et al., 2001). En plus de pouvoir dérouler des substrats ADN conventionnels, FANCI est capable de résoudre des structures alternatives dont les G4 (London et al., 2008; Wu et al., 2008). Les cellules FANCI mais pas FANCD2 sont sensibilisées par la telomestatine (TMS) qui est une drogue capable de stabiliser les structures G4 (Wu et al., 2008). Cette observation montre que le rôle de FANCI au niveau des structures G4 est indépendant de la voie Fanconi. De plus, des cellules humaines déficientes en FANCI présentent une accumulation de délétions aux sites prédits pour former des structures G4 (London et al., 2008). Parmi les hélicases de la famille des clusters (Fe-S), seule FANCI est capable de dérouler un substrat ectopique formant une structure G4. Une déficience en XPD ou DDX11 ne sensibilise pas des cellules traitées au TMS, ce qui confère à FANCI un rôle unique au sein de sa famille (Bharti et al., 2013). Une étude récente faite sur des extraits d'œufs de Xénope et des plasmides simple brin contenant une séquence capable de former une structure G4 a validé le rôle de FANCI dans la synthèse d'ADN au travers de ces structures secondaires (Bosch et al., 2014). Il serait intéressant de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans la réplication des télomères. En effet, l'activité hélicase de FANCI est normalement bloquée lorsqu'il s'agit de dérouler des complexes protéines-ADN comme au niveau des télomères où l'ADN interagit avec TRF1 et TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 et 2). Néanmoins, il a été montré que RPA peut, dans ce contexte, stimuler l'activité de FANCI (Sommers et al., 2014) et permettre la réplication dans des régions génomiques riches en obstacles. Dans des cellules de poulet (DT40) déficientes pour FANCI, la fourche de réplication est perturbée et conduit à une compaction accrue de la chromatine (Schwab et al., 2013). On a donc ici un exemple concret du lien entre stress réplcatif et modifications épigénétiques (déjà développé précédemment) confirmant le rôle crucial de FANCI dans le déroulement des structures secondaires au niveau des fourches de réplication.

c) Les hélicases WRN et BLM

Les hélicase WRN et BLM appartiennent à la famille des hélicases RecQ qui comprend trois autres membres que sont RECQL1, RECQL4 et RECQL5 chez les mammifères. Elles ont été nommées ainsi en référence à la protéine bactérienne RecF impliquée dans la recombinaison homologue. La plupart des membres de cette famille ont une activité hélicase capable de dérouler de l'ADN simple brin ou double brin dans le sens 3'-5', et ce, de manière ATP-dépendante (Karow et al., 1997; Shen et al., 1998). WRN a la particularité de posséder un domaine exonucléase pouvant agir de manière indépendante du domaine hélicase (Huang et al., 1998). Ces deux activités participant au processus de recombinaison homologue.

L'absence de ces hélicases est associée à des syndromes chez l'Homme :

- l'absence de BLM entraîne le syndrome de Bloom (SB) (Ellis et al., 1995), caractérisé par un retard de croissance, une sensibilité importante à la lumière du soleil, une immunodéficience accrue, une infertilité et une forte prédisposition au cancer [pour revue, (Manthei and Keck, 2013)]. Les cellules SB présentent une instabilité génétique élevée se traduisant par une fréquence élevée de cassures chromosomiques et un nombre important d'échanges entre chromatides sœurs (SCE). Lorsque l'on transfecte de manière stable des lymphoblastes déficients en BLM avec un plasmide codant pour cette protéine, on observe une diminution significative du nombre de SCE qui redevient comparable à celui de la lignée sauvage contrôle (Ellis et al., 1999). Il a aussi été montré que les cellules SB ont des fourches de réplication ralenties et qu'elles présentent une accumulation des intermédiaires de réplication (Lönn et al., 1990).

- l'absence de WRN entraîne le syndrome de Werner (Yu et al., 1996) qui se caractérise par un vieillissement prématuré des patients atteints, ainsi que différentes maladies liées à l'âge telles que l'ostéoporose, l'athérosclérose, des infarctus du myocarde, la cataracte mais aussi des cancers [pour revue, (Nehlin et al., 2000)]. Les cellules déficientes en WRN présentent une instabilité génomique importante ainsi qu'une fréquence de réarrangements chromosomiques accrue (pour revues, (Brabant et al., 2000; Cheok et al., 2005; Fukuchi et al., 1989)).

Il a été montré que BLM est capable de dérouler les structures G4 *in vitro*, ce qui nécessite qu'elle se fixe sur une petite séquence d'ADN simple brin ayant une extrémité 3'OH libre. Dans cette même étude, en procédant à des expériences d'efficacité de déroulement de l'ADN et de compétition avec différents substrats, les auteurs ont aussi mis en évidence le fait que les G4 sont les substrats préférentiels de BLM (Sun et al., 1998). De manière surprenante, il semblerait que la structure G4 en elle-même ait une influence sur l'activité hélicase de BLM qui serait alors capable ou non de dérouler l'ADN (Chatterjee et al., 2014). La séquence même et donc la conformation de la structure G4 constituerait une régulation additionnelle lors de la réplication de ces structures mais aussi dans la régulation de l'expression génique ou la réparation. En effet, j'ai évoqué précédemment que beaucoup de structures G4 prédites de manière bioinformatique sont retrouvées aux TSS des gènes. Ceci est en accord avec les résultats d'une étude qui a comparé les ARN messagers de cellules sauvages et de cellules déplétées en BLM. Les gènes qui ont été retrouvés dérégulés sont des gènes impliqués dans la

prolifération cellulaire, la survie ou les mécanismes d'oncogenèse et ont tous été prédits comme ayant une structure G4 au niveau de leurs TSS. Ceci montre l'importance d'une réplication correcte au travers de ces structures dans le maintien de l'information génétique mais aussi l'expression de certains gènes (Nguyen et al., 2014).

La protéine WRN est elle aussi capable de dérouler des structures G4 (Shen and Loeb, 2001). Des études ont montré que WRN est située au niveau de certains télomères durant la réplication non perturbée du génome, ce qui signifierait qu'elle joue un rôle important dans la réplication au travers d'obstacles naturels à la progression des fourches (Crabbe et al., 2004; Opresko et al., 2004). Cependant, des expériences d'immunoprécipitation ont montré que WRN n'est retrouvée associée qu'à 5% de l'ADN télomérique dans des cellules en réplication (Crabbe et al., 2004).

En outre, la protéine TRF2, nécessaire à la protection et la structuration des télomères, interagit avec les hélicases BLM et WRN et stimule leurs activités (Opresko et al., 2002).

Bien que ces deux hélicases semblent jouer le même rôle dans le déroulement des structures secondaires formées par des répétitions de G, le fait que l'absence de ces deux protéines résulte en des symptômes si différents implique qu'elles doivent avoir des fonctions distinctes qui ne peuvent être compensées l'une par l'autre.

2.2) Rôle émergent des ADN polymérases translésionnelles (TLS) dans la réplication de l'ADN structuré

a) Rev1 et la réplication des G-quadruplex

Rev1, qui fait partie de la famille Y des polymérases translésionnelles, possède une activité catalytique très particulière puisqu'elle est capable d'incorporer uniquement des cytidines (dC) *via* son activité désoxycytidyl- transférase en face d'une guanine ou d'un site abasique, (Haracska et al., 2002; Nelson et al., 1996a; Zhang et al., 2002). De manière très intéressante, Rev1 incorpore dC en utilisant comme matrice l'un de ses acides aminés, l'arginine 324 (Nair et al., 2005). Outre son activité enzymatique, Rev1 peut servir de plate-forme aux différentes ADN polymérases translésionnelles. Des analyses double-hybride ainsi que des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que Rev1 interagit avec Pol η , Pol ι , Pol κ ainsi qu'avec la sous-unité Rev7 de Pol ζ *via* son domaine PBM situé dans la partie C-terminale de la protéine (Guo et al., 2003; Ohashi et al., 2004; Tissier et al., 2004).

En plus de jouer un rôle dans la synthèse translésionnelle, elle serait impliquée dans la réplication des structures G4 (Sarkies et al., 2010). Dans cette étude, il a été montré que des cellules déplétées en Rev1 sont déficientes pour la réplication d'un plasmide contenant un motif G4 sur le brin continu mais pas sur le brin retardé. Rev1 joue aussi un rôle dans le maintien de l'information épigénétique puisque, toujours dans cette étude, et en utilisant le locus de la β -globine très bien caractérisé dans les cellules de poulet DT40, les auteurs ont mis en évidence une perte de la répression de ce locus en absence de Rev1. D'ailleurs, d'autres gènes ont été retrouvés dérégulés dans les cellules déficientes en Rev1 et près de 70%

de ceux-ci sont associés à au moins une structure G4 à 1500 pb en amont ou en aval du TSS. On peut penser que l'absence de Rev1 dans la réplication des structures G-quadruplex entraîne un stress réplcatif au niveau de la fourche de réplication et donc un problème de recyclage des histones. Dans un premier temps, Rev1 incorporerait des dC en face des dG pour dérouler la structure G-quadruplex puis permettrait le recrutement d'une TLS polymérase pour compléter la réplication localement (Fig. 29).

De manière intéressante, le domaine catalytique de Rev1 semble capable de dérouler les structures G4 indépendamment de son activité catalytique et ce, sans doute grâce à sa capacité à se fixer sur de l'ADN simple brin (Eddy et al., 2014). Enfin, Rev1 coopérerait avec les hélicases FANCI, BLM et WRN pour dérouler les structures G4 (Sarkies et al., 2012)

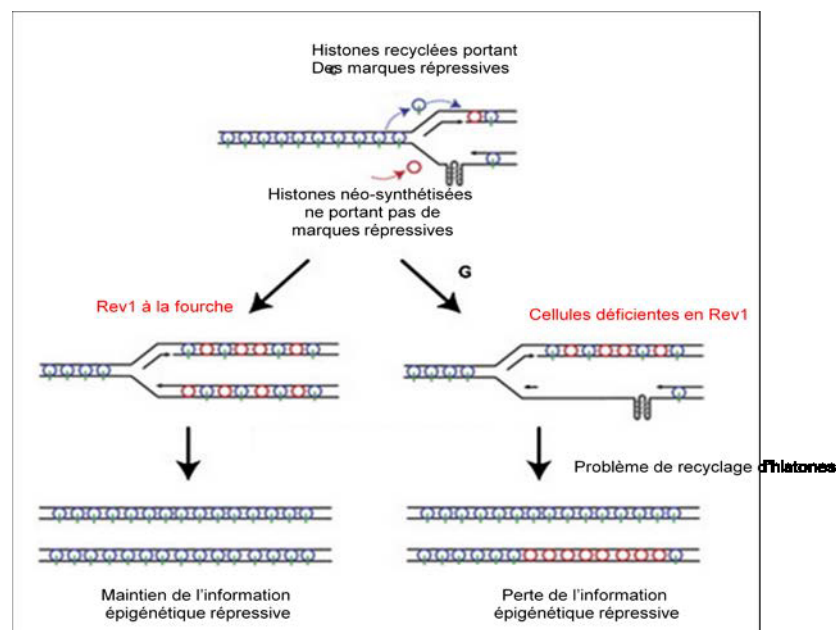


Figure 29 : Modèle pour expliquer la perte de l'information épigénétique sur les brins néosynthétisés en absence de Rev1.

Les histones parentales sont représentées en bleu et portent des marques répressives. Les histones néosynthétisées sont représentées en rouge. Lorsque Rev1 est présente, la structure G4 peut être déroulée et la progression de la fourche de réplication se poursuit sans encombre, permettant un recyclage des histones et le maintien de l'information épigénétique répressive. Lorsque Rev1 est absente, les structures G4 persistent sur l'ADN, entraînant le blocage local de la fourche de réplication et un mauvais recyclage des histones parentales. L'information épigénétique n'est plus correctement transmise et est perdue puisque des histones néosynthétisées ont été incorporées à la place des histones parentales. D'après Sarkies et al, 2010.

b) Polη et la réplication des sites fragiles communs

L'ADN polymérase η (Pol η) est sans doute la polymérase translésionnelle de la famille Y la mieux caractérisée car son absence est à l'origine du syndrome XP-V. Pol η est capable de franchir de manière fidèle les lésions majoritairement causées par les UV, à savoir les TT-CPD (Johnson et al., 1999; Masutani et al., 1999). Elle est aussi impliquée dans le processus

d'hypermutation somatique, important pour la diversification du répertoire des anticorps (Delbos et al., 2007; Zeng et al., 2001). Outre son rôle dans la TLS, cette polymérase est requise pour la prise en charge des structures G4 (sur laquelle je ne m'attarderai pas ici) et le maintien de la stabilité des sites fragiles communs. Le groupe de S. Hoffmann a mis en évidence que, dans des cellules déplétées en Pol η , on observe une augmentation de l'instabilité au niveau du site fragile commun FRA7H, et ce, avec ou sans stress réplicatif (Rey et al., 2009). Récemment, ce même groupe a étudié l'implication de Pol η dans ce processus au niveau de deux autres sites fragiles, FRA3B et FRA16D (Bergoglio et al., 2013). A l'aide d'un test de polymérisation *in vitro*, les auteurs ont tout d'abord montré que Pol δ a tendance à faire plus de pauses sur les séquences de ces deux SFCs que Pol η et que cette dernière a une efficacité plus grande sur ce genre de substrat. L'absence de cette TLS polymérase entraîne un délai de la réplication ainsi qu'une persistance de régions non répliquées en mitose et en G1. En effet, des expériences d'incorporation d'EdU pendant 45 min ont été réalisées dans des cellules déplétées en Pol η après un faible stress réplicatif induit par l'APH. De manière intéressante, des spots d'EdU sont observables dans des cellules en prométaphase et métaphase indiquant que la synthèse d'ADN se poursuit relativement tard jusqu'en phase G2 voire en début de mitose. L'analyse des mitoses montre que les spots d'incorporation d'EdU sont colocalisés avec des spots FANCD2, ce qui indique que ces régions ne sont pas répliquées correctement. Dans les cellules filles résultant de la mitose, on observe des cassures de ces régions sous la forme de 53BP1NBs.

Une autre polymérase TLS, Pol ζ , a également été impliquée dans la réplication des SFCs. Cependant, le phénotype des cellules déficientes en Pol ζ suggère qu'elle pourrait avoir un rôle plus large au cours de la réplication.

D) Pol ζ : une nouvelle ADN polymérase répllicative?

1) Présentation

1.1) Pol ζ chez *S. cerevisiae*

L'ADN polymérase zêta est constituée de deux sous-unités que sont Rev3, la sous-unité catalytique, et Rev7, la sous unité accessoire (Nelson et al., 1996b). La première identification de ces gènes associés à la mutagenèse UV-induite date des études effectuées chez *S. cerevisiae* par le laboratoire de C. Lawrence. Les auteurs ont montré que la perte des gènes *REV1*, *REV3* et *REV7* conférait un phénotype « reversionless » c'est-à-dire que les cellules ne présentaient pas de mutations UV-induites (Christensen, 1979; Lemontt, 1971). La protéine Rev3 présente une forte homologie de séquence au niveau de son site catalytique avec les ADN polymérases réplcatives, c'est pourquoi elle est classée partie de la famille B au même titre que Pol α , δ et ϵ (Morrison et al., 1989). Néanmoins, elle ne possède pas d'activité 3'-5' exonucléase et est moins fidèle que d'autres Pol réplcatives (fréquence de mutation de 10^{-4} à 10^{-5} pour Pol ζ

contre 10^{-5} à 10^{-7} pour les Pol réplicatives) (Fortune et al., 2005; McCulloch and Kunkel, 2008; Shcherbakova et al., 2003). En revanche, Pol ζ est plus fidèle que les polymérases de la famille Y puisque, par exemple, Pol ι incorpore un mauvais nucléotide avec une fréquence de 10^{-1} à 10^{-2} (Johnson et al., 2000; McCulloch and Kunkel, 2008; Zhong et al., 2006). *In vitro*, il a été montré que Pol ζ est capable d'ajouter des nucléotides à partir d'un mésappariement. Sur de l'ADN endommagé, le modèle évoqué implique qu'une autre polymérase TLS incorpore des nucléotides en face de la lésion et que Pol ζ prendrait le relais : on parle alors du modèle de synthèse translésionnelle en deux étapes (Haracska et al., 2001; Johnson et al., 2000; Nelson et al., 1996a). La protéine Rev1 a notamment été identifiée comme interagissant avec Rev3 par co-immunoprécipitation (Acharya et al., 2006a; Hirano and Sugimoto, 2006). PCNA serait aussi impliquée dans ce processus puisqu'elle est capable de stimuler l'activité de Pol ζ et interagit avec Rev1 (Garg et al., 2005). En outre, le modèle proposé pour la synthèse translésionnelle est un modèle faisant intervenir le complexe PCNA-Rev1- Rev3 et Rev7 (Fig. 30).

Chez *S. cerevisiae*, l'absence de Pol ζ n'affecte pas sa viabilité. Toutefois cette ADN polymérase translésionnelle est importante pour la survie lorsque les cellules sont soumises à divers agents génotoxiques (Morrison et al., 1989). Bien que chez la levure, Rev3 contribue de manière moins importante que Rad30 (Pol η) à la survie après irradiation UV (McDonald et al., 1997), Pol ζ est responsable de près de 96% des mutations UV-induites (Lemontt, 1971). Il semblerait que cela soit dû à l'absence d'activité exonucléase de Rev3. Pol ζ présente une signature mutationnelle par substitution de base bien particulière puisqu'elle incorpore de manière préférentielle des dCMP (désoxycytidine monophosphate) et des dGMP (désoxyguanosine monophosphate) (Zhong et al., 2006). Ce taux de substitution est variable et dépend fortement de la séquence ADN. En accord avec ces résultats, les transversions C-G vers G-C sont caractéristiques de la mutagenèse dépendante de Pol ζ *in vivo* (Pavlov et al., 2001; Sakamoto et al., 2007). Pol ζ est aussi capable de générer des mutations plus complexes de 6 à 10 nucléotides aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Harfe and Jinks-Robertson, 2000; Northam et al., 2010; Zhong et al., 2006). Ce mécanisme pourrait potentiellement impliquer un rôle de Pol ζ à la fois dans la création du mésappariement en face de la lésion et de l'extension à partir de celui-ci (Zhong et al., 2006). L'étude d'un mutant de Rev3, le mutant L979F, vient renforcer cette idée. Les polymérases de la famille B possèdent toutes une tyrosine interagissant avec le ribose du nucléotide qui va être incorporé. On trouve à proximité de cette tyrosine un résidu hydrophobique, une leucine pour Rev3 (L979), qui lorsqu'elle est mutée cause une augmentation de la mutagenèse spontanée de deux à trois fois ainsi qu'une augmentation plus importante encore des mutations UV-induites (Sakamoto et al., 2007; Stone et al., 2012). Le spectre des mutations associées à ce mutant comporte des séquences dinucléotidiques ainsi que de longues séquences de mutations complexes ce qui suggère fortement que Pol ζ est requise lors du mésappariement initial et qu'elle va initier l'extension à partir de celui-ci.

De manière très surprenante, l'inactivation de Rev3 induit aussi une diminution de près de moitié de la mutagenèse spontanée chez *S. cerevisiae* (Harfe and Jinks-Robertson, 2000; Quah et al., 1980; Roche et al., 1994). On pense que cette implication de Pol ζ dans la mutagenèse spontanée est en partie due au franchissement de dommages spontanés de l'ADN

comme des dommages oxydatifs (Sakamoto et al., 2007). On pense aussi que cette mutagenèse spontanée générée par Pol ζ serait dépendante de son recrutement au niveau de régions du génome où la réplication est perturbée, notamment lorsque les fourches de réplication rencontrent des barrières naturelles de type structures secondaires d'ADN non-B par exemple. Il est possible de déstabiliser le réplisome de manière artificielle en mutant les ADN polymérases réplcatives Pol δ et Pol ϵ dans leurs domaines exonucléasiques. De manière intéressante, une grande partie de la mutagenèse spontanée est associée à Pol ζ lorsque les ADN polymérases réplcatives ϵ et δ sont mutées dans leurs domaines exonucléasiques (Northam et al., 2006, 2010). On parle de mutagenèse induite par le réplisome (DRIM pour replisome-induced mutagenesis). Une étude a mis en évidence que des structures en épingle à cheveux pouvaient entraîner une augmentation de la mutagenèse dépendante de Pol ζ en situation de DRIM (Northam et al., 2014). En effet, les sites de pause au niveau des structures secondaires de la polymérase réplcative sont associés à une grande proportion de transversions GC-CG qui sont la principale signature mutationnelle de Pol ζ . Toujours dans cette idée de mutagenèse Pol ζ dépendante induite par une déstabilisation du réplisome, il a été montré que lorsque l'on déstabilise le complexe GINS ou que l'on empêche son interaction avec Pol ϵ , on augmente la mutagenèse spontanée dépendante de Pol ζ (Grabowska et al., 2014).

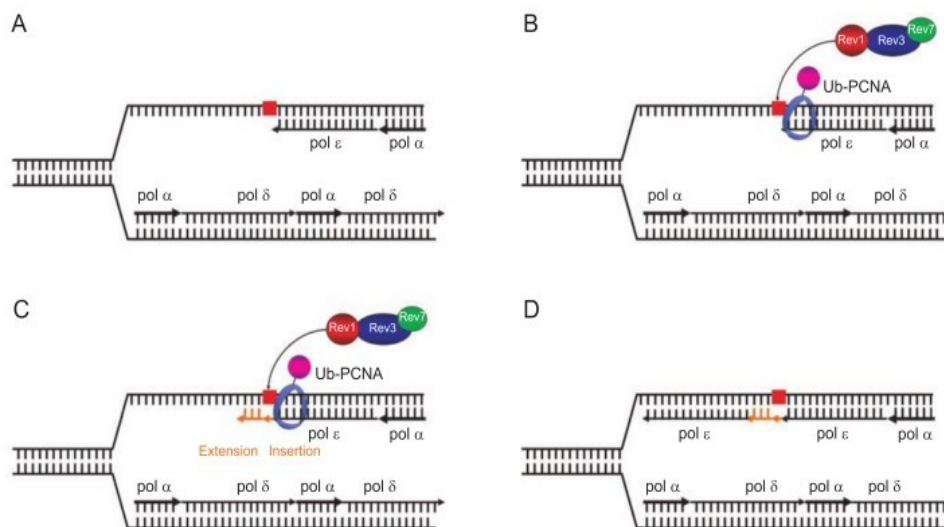


Figure 30 : Modèle de la synthèse translésionnelle opérée par le complexe Rev1-Rev3-Rev7.

(A) Une fourche de réplication est représentée avec le brin continu et le brin discontinu. Le carré rouge représente une lésion sur l'ADN. Lorsque la polymérase réplcative rencontre la lésion, elle est incapable de répliquer au travers ce qui entraîne un découplage entre l'hélicase et la polymérase. (B) Le complexe Rad6-Rad18 vient ubiquitiner PCNA sur la lysine 164 et permettre le recrutement du complexe Rev1-Rev3-Rev7. (C) Rev1 insère un dCMP en face de la lésion et le complexe Rev3-Rev7 assure l'extension. (D) Une fois la lésion passée, la polymérase réplcative reprend sa place sur l'ADN pour poursuivre la réplication. D'après Gan *et al*, 2008.

1.2) Polζ chez les eucaryotes supérieurs

a) Généralités sur *Rev3L*

Chez l'Homme, le gène *REV3L* est porté par le chromosome 6q21 et les analyses génomiques ont mis en évidence que ce gène était composé de 33 exons (Morelli et al., 1998). De manière intéressante, la présence de l'exon 3 dans l'ARNm change la position du codon start du démarrage de la transcription ce qui donne une protéine de 3053 a.a (Morelli et al., 1998) au lieu d'une protéine de 3130 a.a comme prédite à partir de la séquence (Gibbs et al., 1998). Chez la souris, le gène *Rev3L* est porté par le chromosome 10 à proximité du gène *c-myc* (Sloun et al., 2002). La taille attendue de Rev3L est de 353 kDa. La protéine Rev3L de mammifère fait environ deux fois la taille du Rev3 de levure (173 kDa). Cette différence de taille est exclusivement due à l'exon 13 qui code à lui seul pour 1388 a.a. (Fig. 31). Ces deux protéines partagent néanmoins des régions homologues : la région N-terminale (environ 36% d'homologie), la région d'interaction avec Rev7 (environ 29% d'homologie) et le domaine catalytique (environ 39% d'homologie). Un domaine appelé PCD (Positively charged domaine) a cependant été identifié dans tous les orthologues de Rev3 chez les vertébrés entre les a.a 970 et 1200 (Lee et al., 2014). Son rôle reste néanmoins encore inconnu. Les études sur la protéine Rev3L sont très difficiles puisqu'il n'existe aucun anticorps permettant de la visualiser *in cellulo* et qu'il est aussi très difficile d'exprimer la protéine entière. Une étude a montré que Rev3L est exprimée de manière ubiquitaire dans les tissus humains (Kawamura et al., 2001). Le laboratoire de W.Yang a cependant réussi à exprimer et visualiser une forme active de la protéine Rev3L délétée dans la région centrale non conservée chez la levure. Ils ont montré que lorsque l'on délète la région entre les a.a 527 et 1800, on augmente de 10 fois la quantité de protéine obtenue par rapport à la protéine entière (Lee et al., 2014). Cette forme n'est cependant que très peu active sur un substrat ADN-primer non endommagé. Pour avoir une activité comparable à celle de la protéine entière, il faut que la construction contienne le domaine PCD et que les a.a 2048 à 2217 soient délétés (Lee et al., 2014).

De par sa grande taille l'expression ectopique de Rev3L est difficile à étudier. Les études de partenaires ont été effectuées sur des fragments de la protéine. Il a été montré par co-immunoprécipitation de fragments exprimés de manière transitoire dans des cellules HeLa et par la technique du double hybride chez la levure que Rev3L interagit avec Rev7 *via* un domaine compris entre les acides-aminés 1888 et 1943 (Murakumo et al., 2001). Néanmoins, aucune étude n'a pu montrer la validité de ces interactions sur la protéine Rev3L entière.

Afin de mieux comprendre le rôle de Polζ, des études basées sur les conséquences d'une délétion du gène *Rev3L* ont été effectuées par différentes équipes.

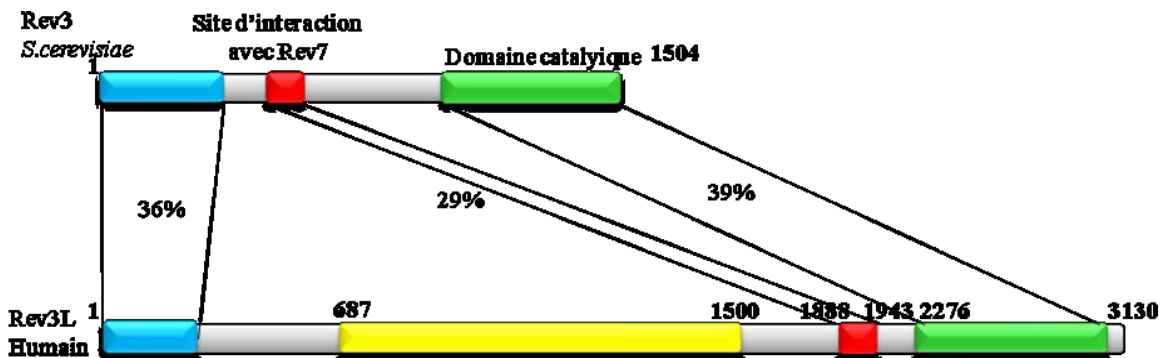


Figure 31 : Schémas des protéines Rev3 de levure et Rev3L humaine.

Les régions conservées de la levure à l'Homme sont le domaine N-terminal (bleu), le domaine d'interaction avec Rev7 (rouge) et le domaine catalytique C-terminal (vert). La région centrale de la protéine humaine n'est pas conservée chez la levure (jaune). Adapté de Gan *et al*, 2008.

b) Rev3L chez la souris et chez l'Homme

De nombreuses équipes ont mis en évidence que la déplétion du gène *Rev3L* entraînait une létalité embryonnaire entre les jours 8,5 et 12,5 post-coït (Bemark et al., 2000; Esposito et al., 2000; Wittschieben et al., 2000). Cette létalité embryonnaire est indépendante de TP53 et la viabilité des embryons *Rev3L*^{-/-} n'est pas restaurée lorsqu'un transgène *Rev3L* est exprimé ou lorsque l'on inactive *TP53* (O-Wang et al., 2002). La protéine Rev3L joue donc un rôle essentiel dans le développement embryonnaire car c'est la seule polymérase translésionnelle qui cause une létalité embryonnaire. L'une des hypothèses avancées pour expliquer cette létalité serait qu'au cours développement embryonnaire, les cellules prolifèrent très rapidement engendrant un stress oxydant important. Polζ pourrait être nécessaire pour la synthèse au travers des lésions d'ADN causées par ce stress. Pour mieux comprendre le rôle de Rev3L, le laboratoire de R. Wood (MD Anderson, USA) a étudié l'expression du gène *Rev3L* en intégrant au niveau génomique une cassette lacZ en aval du promoteur. Une expression a été mise en évidence dans les somites ainsi que dans l'ectoderme (cerveau), le mésoderme (muscles) et l'endoderme (poumons) (Wittschieben et al., 2000). L'expression de *Rev3L* constatée dans les tissus au cours de l'embryogenèse correspond au pattern d'expression vérifié par northern blot et RT-PCR chez des souris adultes et dans des tissus humains. Cela confirme l'importance de l'expression de Rev3L dans l'embryogenèse et dans la maintenance des tissus adultes (Kawamura et al., 2001; Van Sloun et al., 1999). Très récemment, une équipe a mis en évidence une diminution de l'expression de la protéine Rev3L chez trois patients atteints du syndrome de Möbius, un trouble neurologique caractérisé par une paralysie des nerfs faciaux et des anomalies congénitales (Tomas-Roca et al., 2015). Chez ces patients, des mutations sur un des deux allèles ont été identifiées dans la région du gène codant la partie N-terminale ainsi que dans la région non conservée chez la levure de Rev3. Elles entraînent des épissages alternatifs anormaux de l'ARNm codant Rev3L. On observe ainsi chez ces patients des transcrits anormaux ainsi qu'une diminution

globale de l'expression de *Rev3L*. Des études effectuées sur des souris hétérozygotes pour *Rev3L* ont mis en évidence une hypoplasie à savoir un développement insuffisant de certaines régions du cerveau, notamment par mort des précurseurs neuronaux, qui pourrait expliquer les anomalies neurologiques observées chez les patients. Ces résultats renforcent un peu plus le rôle de *Rev3L* dans l'embryogenèse et notamment ici, dans le développement du cerveau.

Malgré la létalité embryonnaire causée par l'absence de *Rev3L*, des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) inactivés pour *Rev3L* ont été obtenus par deux groupes en utilisant des techniques différentes. Les MEFs *Rev3L*^{-/-} primaires entrent en sénescence ou en apoptose et arrêtent de proliférer au bout de 3 à 4 divisions cellulaires (Lange et al., 2012). Après un doublement de la population, on observe des aberrations chromosomiques ainsi que des cassures double-brin dans 30 à 50% des cellules (Lange et al., 2012). L'inactivation du gène *TP53* est cependant suffisante pour rétablir la capacité de prolifération de cellules *Rev3L*^{-/-}. Ainsi, deux groupes indépendants ont générés des MEFs *Rev3L* nulles : le groupe de M. Bemark a inactivé le gène *TP53* (Zander and Bemark, 2004) et le groupe de R. Wood a immortalisé les cellules avec l'antigène T de SV40 (Lange et al., 2012; Wittschieben et al., 2006). Le groupe de M. Bemark a montré que les MEFs *Rev3L/TP53* nulles proliféraient de manière plus lente que des MEFs sauvages, qu'elles étaient hypersensibles au UVs et au cisplatine et qu'elles s'accumulaient en fin de S/G2 en réponse à des dommages à l'ADN (Zander and Bemark, 2004). Les MEFs obtenues par le groupe de R. Wood ne sont, quant à elles, que modérément sensibles à divers agents endommageant l'ADN (cisplatine, UVs, MMS...) mais présentent une instabilité génétique spontanée qui se caractérise par des aberrations chromosomiques et des translocations (Wittschieben et al., 2006).

Enfin, *Rev3L* semble impliquée dans les processus de tumorigenèse. Chez l'Homme, un rôle de suppresseur de tumeur de *Rev3L* a pu être mis en évidence puisqu'une réduction de l'expression de ce gène est associée à certains cas de cancer du côlon (Brondello et al., 2008). La perte de l'expression de *Rev3L* dans des cellules normales est un facteur de tumorigenèse, toutefois, une fois le processus oncogénique enclenché, cette perte d'expression est un facteur favorable à une bonne réponse à la chimiothérapie. Cela serait dû au fait que *Rev1* et *Polζ* sont impliquées dans la résolution des pontages inter-brins (ICL) causés par les agents pontants comme le cisplatine qui est très utilisé en chimiothérapie. Afin de mieux comprendre quel était l'impact de *Polζ* dans la tumorigenèse, des souris KO conditionnelles pour le gène *Rev3L* exprimant ou non la protéine *TP53* ont été obtenues par le laboratoire de R. Wood. De manière intéressante, l'absence de *Rev3L* est tolérée dans les cellules épithéliales mais pas dans les précurseurs hématopoïétiques (Wittschieben et al., 2009). Dans un contexte génétique *TP53*^{-/-}, les souris n'exprimant pas *Rev3L* développent des lymphomes thymiques. Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence que l'absence de *Rev3L* augmentait la fréquence de développement des tumeurs mammaires même chez les mâles. Tous ces résultats suggèrent que l'instabilité génétique causée par l'absence de *Rev3L* augmenterait le nombre de conversion néoplasique des cellules mammaires et lymphoblastiques.

2) Vers un nouveau rôle de Polζ dans la réplication de l'ADN non endommagé ?

Le laboratoire de W. Xiao a montré que Polζ est impliquée dans le maintien des SFCs (Bhat et al., 2013). En effet, la déplétion de la protéine Rev3L dans des cellules humaines à l'aide de siARN a permis de mettre en évidence une forte instabilité génétique accentuée après un traitement avec de faibles doses d'APH. Cette instabilité génétique se traduit par une augmentation des aberrations chromosomiques et des cassures, notamment au niveau de certains sites fragiles comme FRA7H et FRA3B. Tout ceci suggère un rôle de Polζ dans la réplication des sites fragiles comme la protéine Polη (Bergoglio et al., 2013; Rey et al., 2009). Néanmoins, contrairement aux autres polymérases TLS, seule une délétion de Polζ entraîne une létalité embryonnaire. Ce phénotype suggère qu'elle aurait un rôle plus complexe que celui connu dans la TLS.

Tout d'abord, l'étude menée par le laboratoire de K. Rajewsky a mis en évidence que les embryons *Rev3L*^{-/-} se développent de la même manière que des embryons androgénotes c'est-à-dire comme des embryons qui n'exprimeraient que les gènes soumis à empreinte parentale d'origine paternelle (Esposito et al., 2000). Ces embryons androgénotes sont capables d'un développement préimplantatoire normal jusqu'au stade blastocyste mais finissent par être avortés (McGrath and Solter, 1984). Ils présentent un développement normal des tissus extra-embryonnaires mais un développement anormal, voire quasi inexistant, des tissus formant le corps de l'embryon. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'un rôle de Polζ dans l'empreinte parentale sans pour autant développer d'avantage cette idée.

D'autre part, de récentes études ont permis d'identifier de nouveaux partenaires de Polζ. Il a été montré que la sous unité catalytique Rev3 de levure et humaine interagissent avec les deux sous-unités accessoires de Polδ que sont pol31 et pol32 chez la levure et p50 et p66 chez l'humain (Baranovskiy et al., 2012; Johnson et al., 2012; Lee et al., 2014; Makarova et al., 2012), en formant le complexe Polζ₄ (Fig. 32). Ces interactions se font *via* le domaine CTD de Rev3 (vu précédemment) et permettent d'augmenter la processivité de Polζ sur de l'ADN non endommagé (Lee et al., 2014). La plupart de ces études voit dans cette découverte une parfaite illustration du modèle de l'échange des polymérases où la polymérase TLS prend la place de la polymérase répliquative sur l'ADN pour répliquer au travers d'une lésion. Cela impliquerait donc uniquement un échange de la sous-unité catalytique entre Polδ et Polζ. De manière très intéressante, l'étude du laboratoire de S. Prakash souligne le fait qu'ils arrivaient à purifier le complexe sous forme très stable et en quantités stœchiométriques ce qui est en contradiction avec un état passager durant l'échange de polymérase (Johnson et al., 2012). De plus, ce modèle d'échange de polymérase ne permet d'expliquer que ce qui se passe sur le brin répliqué de manière continue par la polymérase Polε (Pursell et al., 2007). On peut néanmoins s'interroger sur le rôle de Rev7, la sous-unité accessoire de Polζ puisque, toujours dans cette étude dans le laboratoire de W.Xiao, les auteurs montrent que, durant la mitose, Rev3 est associée à l'ADN contrairement à Rev7 (Bhat et al., 2013). Il semblerait que Rev7 ait un rôle important dans la réplication de l'ADN endommagé mais pas dans le maintien des SFCs. Cela est en partie en contradiction avec les derniers résultats du laboratoire de R.Wood puisque cette étude montre que le complexe Rev3-Rev7 est nécessaire pour empêcher

l'apparition de cassures chromosomiques spontanées (Tomida et al., 2015). Néanmoins, une invalidation de *Rev7* est viable ce qui suggère que Rev3 aurait un rôle indépendant de Rev7 dans l'embryogenèse et dans la prolifération normale des cellules.

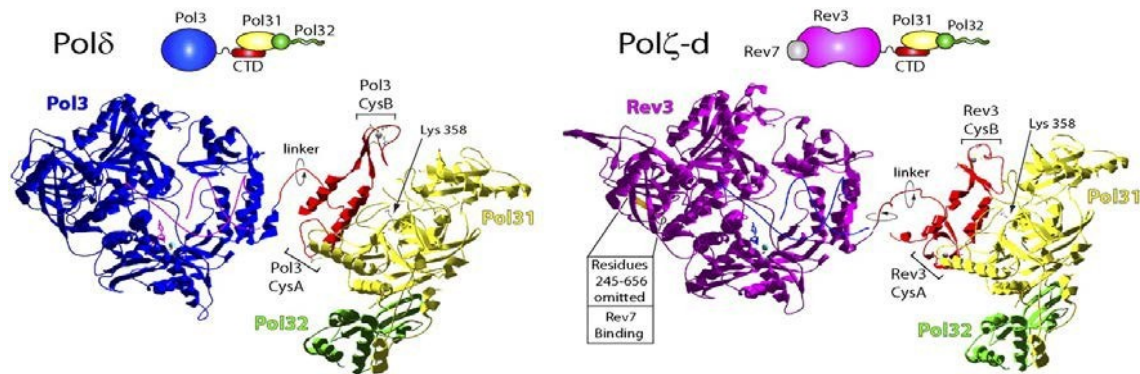


Figure 32 : Modèle des complexes Polδ et Polζ4 chez *S.cerevisiae*.

En haut, représentations schématiques des différentes sous unités de ces complexes. CTD : domaine C-terminal des sous-unités catalytiques de Pol3 et Rev3. En bas, cristallographies des domaines catalytiques de Pol3 et Rev3 (bleu) interagissant avec les sous unités Pol31(jaune) et Pol32 (vert) *via* le CTD comprenant les motifs CysA et CysB (rouge). D'après Johnson *et al*, 2012.

Projet de thèse

La réplication du génome est un processus qui vise à dupliquer le plus fidèlement possible l'information génétique et épigénétique de la cellule mère pour la transmettre aux deux cellules filles. Le maintien de l'information épigénétique est couplé à la machinerie de réplication mais l'équilibre est fragile et la perturbation de la progression de la fourche de réplication peut avoir des conséquences sur le recyclage des histones.

L'hétérochromatine qui contient de nombreuses marques épigénétiques est composée en grande partie de séquences répétées, et constitue un challenge pour la fourche de réplication. Cependant, les modalités de réplication de l'hétérochromatine ne sont pas totalement connues. L'un des aspects qui est encore discuté à propos de la réplication de l'hétérochromatine concerne la (les) polymérase(s) répliquative(s) qui est (sont) capable(s) de répliquer correctement ces régions particulières. Un concept émergent veut que les ADN polymérases translésionnelles puissent jouer un rôle dans la réplication de zones difficiles à répliquer du génome de manière ponctuelle, en plus de leur rôle canonique dans la tolérance aux lésions.

Ce travail de thèse avait donc pour but de caractériser le rôle de l'ADN polymérase spécialisée zeta (Pol ζ) au cours de la duplication du génome de cellules de mammifères, et plus particulièrement au niveau des régions hétérochromatiniennes.

Résumé de l'article 1

An unexpected role of DNA polymerase zeta in replication of mid-late replicating regions through a direct interaction with Heterochromatin protein 1

Sana Ahmed-Seghir¹, Jean Charles Cadoret², Caroline Pouvelle¹, Sabine S Lange³, Loélia Babin¹, Richard D Wood³ and Patricia L Kannouche^{1,*}

L'ADN polymérase zêta (Polζ) est un acteur majeur de la synthèse translésionnelle (TLS). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'inactivation du gène *Rev3* est viable et conduit à une diminution de la mutagenèse spontanée ou induite par des agents génotoxiques suggérant que Polζ est impliquée dans le franchissement mutagène des lésions endogènes ou induite. En revanche, l'inactivation du gène *Rev3L* chez la souris est embryonnaire létale alors que la plupart des autres ADN polymérases spécialisées ne sont pas vitales suggérant que Polζ a acquis des fonctions essentielles au cours de l'évolution qui restent inconnues à ce jour. Les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) *Rev3L*^{-/-} présentent une grande instabilité génétique spontanée associée à une forte augmentation de cassures et de translocations chromosomiques indiquant que Polζ est directement impliquée dans le maintien de la stabilité du génome.

Dans cet article, nous mettons en évidence que la progression en phase S des cellules *Rev3L*^{-/-} est fortement perturbée. De plus, nous constatons des changements du programme de réplication dans ces cellules, et plus particulièrement dans des régions de transition (TTR). Nous montrons aussi un enrichissement global en marques épigénétiques de type répressif (marques associées à l'hétérochromatine et méthylation de l'ADN) suggérant qu'en absence de *Rev3L*, un ralentissement de la progression de la fourche de réplication à des loci particuliers peut promouvoir une hétérochromatinisation. De manière intéressante, nous constatons une diminution de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement qui pourrait peut-être expliquer la létalité embryonnaire constatée en absence de *Rev3L*. Enfin, nous mettons en évidence une interaction directe entre la protéine d'organisation de l'hétérochromatine HP1α et *Rev3L* via un motif PxVxL. Nous postulons que Polζ pourrait assister les ADN polymérases répliquatives Polδ et Polε dans la réplication des domaines compactés de la chromatine en milieu et fin de phase S.

An unexpected role of DNA polymerase zeta in replication of mid-late replicating regions through a direct interaction with Heterochromatin protein 1

Sana Ahmed-Seghir¹, Jean Charles Cadoret², Caroline Pouvelle¹, Sabine S Lange³, Loélia Babin¹, Richard D Wood³ and Patricia L Kannouche^{1,*}

¹Université Paris-Sud, CNRS-UMR8200, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Gustave Roussy, Villejuif, France.

² Institut Jacques Monod, UMR7592, CNRS and University Paris-Diderot, 15 Rue Hélène Brion, Paris, Cedex 13 75205, France.

³Department of Epigenetics and Molecular Carcinogenesis, The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX 77030, USA

*Correspondence: Patricia L Kannouche, Université Paris-Sud, CNRS-UMR8200, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Gustave Roussy, Villejuif, France.

Email: patricia.kannouche@gustaveroussy.fr

Tel: +33 1 42 11 40 30; Fax: +33 1 42 11 50 08;

Key words: DNA replication, Heterochromatin, Replication timing, TLS polymerase, under-replicated region, late replicating region

Running title: DNA polymerase zeta is involved in replication of condensed regions

ABSTRACT

DNA polymerase zeta (Pol ζ) is a key player in Translesion DNA synthesis (TLS). Pol ζ is unique among TLS polymerases in mammalian cells, because inactivation of the gene encoding its catalytic subunit (*Rev3L*) leads to embryonic lethality in the mouse. However little is known about its biological functions under normal growth conditions.

Here we show that S phase progression is impaired in *Rev3L*^{-/-} MEFs with a delay in mid and late S phase. Genome-wide profiling of replication timing revealed that *Rev3L* inactivation induces changes in the temporal replication program, mainly in particular genomic regions in which the replication machinery propagates a slower velocity. We also highlighted a global enrichment of repressive histone modifications as well as hypermethylation of major satellites DNA repeats in *Rev3L*-deficient cells, suggesting that fork movements can slow down or stall in specific locations, and a delay in restarting forks could promote heterochromatin formation in *Rev3L*-depleted cells. As a direct or indirect consequence, we found that several genes involved in growth and development are down-regulated in *Rev3L*^{-/-} MEFs, which might potentially explain the embryonic lethality observed in *Rev3L* KO mice. Finally we discovered that HP1 α directly interacts and recruits Rev3L to pericentromeric heterochromatin. We therefore propose that Pol ζ has been co-opted by evolution to assist DNA polymerase δ and ϵ in duplicating condensed chromatin domains during mid and late S phase.

INTRODUCTION

Normal cellular division requires that the genome is faithfully replicated to ensure that unaltered genomic information is passed from one generation to the next. The duplication of the genome occurs in a spatially and temporally organized manner (Hand, 1978)(Hand R, Cell 1978). Indeed different DNA replication origins along each eukaryotic chromosome are activated in early, middle or late S phase. This temporal control of DNA replication is referred to as replication timing program and reflects the higher order organization of the genome (Rhind and Gilbert, 2013). Early-replicating domains correlate with open chromatin conformation, gene-rich regions which are actively transcribed while late-replicating domains correlate with constitutive heterochromatin, and consist of silenced genes as well as repetitive DNA sequences. Recent genome-wide studies determined that many early and late replication domains are separated by a several hundred–kilobase region, which are termed temporal transition region (TTR), where the DNA sequences are replicated progressively later in S phase as they become closer to late-replicating domains (Desprat et al., 2009; Farkash-Amar et al., 2008; Hiratani et al., 2008). Numerous reports have indicated that replication timing is associated with various factors, including *cis*-regulatory elements, transcriptional status, histone modifications, high order chromatin structure, and nuclear compartmentalization (Farkash-Amar et al., 2008; Gilbert, 2002; Hiratani et al., 2008, 2010). However the biological significance of this replication-timing program is currently unknown; but the existence of aberrant replication timing in many different genetic diseases suggests that it is a vital cellular process (Donley and Thayer, 2013).

It is well established that Polymerase delta (Pol δ) and epsilon (Pol ϵ) catalyze the high-fidelity duplication of the genome. However recent emerging concepts propose that translesion synthesis (TLS) DNA polymerases, known for their lesion-bypassing properties, could facilitate DNA synthesis when replicative DNA polymerases are not able to pass through replication stalling sites formed by structured DNA sequences [reviewed in (Boyer et al., 2013)]. Most of these studies were focused on Common Fragile Sites (CFS) and revealed

that DNA polymerase eta (Pol η) and zeta (Pol ζ) were required to maintain fragile site stability in human cells (Bergoglio et al., 2013; Bhat et al., 2013; Rey et al., 2009).

Pol ζ has been extensively characterized in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The core complex of yeast pol ζ is at least a heterodimer of the catalytic subunit Rev3 and the accessory subunit Rev7 which enhances the polymerase activity of Rev3. So far, the main function of Pol ζ is to catalyze efficient extension of a misinserted nucleotide opposite a DNA lesion (Lawrence, 2004). Structurally, Pol ζ is a B-family Polymerase, and the other three B-family Polymerases in eukaryotes - Pol α , Pol ϵ , and Pol δ - are collectively responsible for chromosomal DNA replication. Recently, it has been shown that Pol ζ can form a stable complex (called Pol ζ_4) by interacting with two Pol δ accessory subunits, p50 and p66 in human (p31 and p32 in yeast) (Baranovskiy et al., 2012; Johnson et al., 2012; Lee et al., 2014; Makarova et al., 2012). However, the role of this “replicative DNA polymerase-like” complex remains unclear.

Counterparts of the yeast *REV* genes have been identified in other eukaryotes. Mouse and human *Rev3L* (Rev3-like; 350 and 353 kDa, respectively) orthologs have a large extra segment which is not conserved in yeast *REV3*, and are thus about twice the size of the 173-kDa yeast Rev3. Despite the established participation of *Rev3L* in many cellular processes, little is known about the Rev3L protein itself since studies have been hampered by the inability to express this very large polypeptide or to detect the Rev3L protein in cells. Interestingly Pol ζ is unique among TLS polymerases in mammalian cells, because inactivation of the gene encoding its catalytic subunit (*Rev3L*) leads to embryonic lethality in the mouse [for review, see (Gan et al., 2008)]. This was not anticipated from studies of budding yeast, as *S.cerevisiae* containing a deletion of the homologous *REV3* gene is viable suggesting that Pol ζ has acquired an essential function during evolution. Mouse embryonic stem cells *Rev3L*^{-/-} are not viable (Bemark et al., 2000; Esposito et al., 2000; Wittschieben et al., 2000) and primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) obtained from conditional *Rev3L*

knockout show genome instability and growth defects without external damage on DNA (Lange et al., 2012; Wittschieben et al., 2006).

In this study we have investigated the biological functions of Polζ during S phase under normal growth conditions or after a mild replication stress. We show that S phase progression is impaired in *Rev3L*^{-/-} MEFs. Genome-wide profiling of replication timing revealed that a set of genomic regions located in TTRs changes replication timing in response to *Rev3L* inactivation suggesting an involvement of Polζ in the replication of TTRs. We also highlighted a global enrichment of repressive histone modifications as well as hypermethylation of major satellites DNA repeats in *Rev3L*-deficient cells. From this finding we assume that fork movements can slow down or stall, and a delay in restarting forks can promote heterochromatin formation in *Rev3L*-depleted cells. As a direct or indirect consequence, we found that several genes involved in growth and development, including *Hox* and imprinted genes are down-regulated in *Rev3L*^{-/-} MEFs, which might potentially explain the embryonic lethality observed in *Rev3L* KO mice. Finally we discovered that HP1α directly interacts and recruits Rev3L to pericentromeric heterochromatin. We therefore propose that Polζ has been co-opted by evolution to assist DNA polymerase δ and ε in duplicating condensed chromatin domains during mid and late S phase.

RESULTS

Spontaneous pericentromeric breaks/gaps occur in large fraction of *Rev3L*-defective cells

It has already been reported that cells from *Rev3L*^{-/-}; *p53*^{-/-} embryos exhibited striking chromosomal instability with increase in translocation frequency suggesting that Polζ was required to prevent multiple double strand breaks from occurring during S phase (Lange et al., 2012; Wittschieben et al., 2006). To gain molecular insight into Rev3L function on genome stability linked to DNA replication, we decided to re-examine chromosomal abnormalities in cells carrying a conditional *Rev3L* allele. *For that*, we used mouse

embryonic fibroblasts that are derived from mice harboring one allele with essential exons flanked by loxP sites, and either one inactivated allele of *Rev3L* (*Rev3L*^{-/lox}) or, one wild type allele (*Rev3L*^{+lox}). Upon introduction of an adenovirus expressing Cre, floxed copy of *Rev3L* was deleted thus generating *Rev3L*^{-Δ} cells. Cell lines were then SV40 Tag-immortalized (Lange et al., 2012). We then used *Rev3L*^{-Δ} and *Rev3L*^{+lox} MEFs in this study (named *Rev3L*^{-/-} and *Rev3L*^{+/+} MEFs respectively in the paper).

We examined the integrity of mitotic chromosomes from cultured *Rev3L*^{-/-} and *Rev3L*^{+/+} MEFs by analyzing metaphase chromosome spreads labelled with telomeric PNA probes and stained with DAPI. Metaphases were first counted for total chromosome numbers. Both cell lines were hypotetraploid (range, 64-76 and 71-82 for *Rev3L*^{-/-} and *Rev3L*^{+/+} cells respectively) which is a usual state of immortalized MEFs (**Fig 1.A-B**). Metaphases revealed significantly increased spontaneous chromosomal aberrations in *Rev3L*^{-/-} MEFs with 6.5 events per metaphase in *Rev3L* null cells vs ~1.5 in *Rev3L*^{+/+} cells (**Fig 1.C**). Intriguingly, 60% of *Rev3L*^{-/-} MEFs metaphases showed a missing of long arm of chromosome (**Fig 1.D-E**). This is consistent with the Wittschieben study which reported that the distribution of chromosome aberrations was not entirely random in *Rev3L*^{-/-}; *p53*^{-/-} cells since they observed that rearrangements preferentially occur within the chromosome long arm (Wittschieben et al., 2006). Moreover our analysis revealed a 3-fold increase of spontaneous chromosomal break/gaps in the absence of Rev3. Surprisingly, we showed that these chromatid breaks and gaps occurred in a large proportion (30%) in pericentromeric regions (**Fig 1.F-H**) suggesting that the lack of *Rev3L* can lead to intrinsic pericentromeric instability. Finally we found that inactivation of *Rev3L* induces micronuclei in more than 20% of cells (**Fig 1.I**) as already reported for *Rev3L*-defective cells compromised for p53 function (Wittschieben et al., 2006). This is consistent with the aneuploidy observed in these cells.

Completion of late DNA replication is impaired in *Rev3L*-deficient cells

There is growing evidence that spontaneous breaks/gaps observed on metaphase spreads arise from replication problems (also referred to as replication stress), particularly at genomic loci where progression of replication forks is slowed down or hampered by natural “replication barriers” including common fragile sites (CFSs), non-B structured DNA, repetitive sequences, telomeres, DNA-RNA hybrids or replication termination regions [reviewed in, (Branzei and Foiani, 2010)]. Recently, it has been shown that *Rev3L* depletion in human cells results in a significant increase of FANCD2-positive anaphase bridges associated to CFS expression suggesting that *Rev3L* was required for maintaining CFS stability (Bhat et al., 2013). Interestingly CFSs are large chromosomal regions which are replicated in late S/G2 phase, or even later when DNA replication is challenged by low dose of aphidicolin (APH), a DNA polymerase inhibitor (Le Beau et al., 1998; Debatisse et al., 2012; Widrow et al., 1998) raising the possibility that *Rev3L* could be involved in duplication of late replicating regions. This prompted us to evaluate the late completion of DNA replication at under-replicated regions in *Rev3L*-depleted cells. Replication intermediates in mitotic cells were identified by the formation of FANCD2 foci and the late DNA replication of these regions was examined by visualizing incorporation of the thymidine analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). MRC5 cells down regulating *Rev3L* as well as control cells were treated or not with low dose of aphidicolin (300 nM APH) for 24 h to induce a mild replication stress, then FANCD2 spots were monitored in mitotic cells. To visualize completion of DNA replication in mitotic cells, untreated or APH-treated cells were pulse-labeled with EdU for 45 min immediately before cell fixation, and EdU spots were counted only in mitotic cells. Few mitotic cells displayed one or two spontaneous EdU spots and FANCD2 foci, even in *Rev3L*-depleted cells (data not shown). By contrast upon mild replication stress, the number of both EdU- and FANCD2-positive mitotic cells considerably increased in control MRC5 cells since more than 50% of mitotic cells displayed more than 2 EdU spots (**Fig 2.A-B**). Strikingly, APH-treated cells depleted for *Rev3L* showed significantly less EdU and FANCD2 spots in

mitosis (less than 30% of cells showed more than 2 EdU spots) than control cells. These results suggest that Rev3L is intrinsically involved in the completion of late DNA replication. We assumed that in absence of Rev3L, replication intermediates cannot be correctly solved out leading to an accumulation of gaps/breaks during mitosis (**Fig 1.F-H**). This is consistent with Bhat's findings showing that Rev3L depleted cells accumulate in G2/M phase and is required for maintaining CFS stability (Bhat et al., 2013). However they revealed an increase of FANCD2-positive mitotic cells after depletion of Rev3L and replication stress while we found a decrease compared to control cells.

To validate the presence/persistence of under-replicated DNA in mitosis in *Rev3L*-deficient cells, we next quantified 53BP1 nuclear body (53BP1 NBs) formation in G1 daughter cells, hallmark of incomplete DNA replication during previous cell cycle generating anaphase bridge breakage in mitosis (Harrigan et al., 2011; Lukas et al., 2011). For that, we used *Rev3L*^{-/-} and *Rev3L*^{+/+} MEFs. Because we detected substantial spontaneous breaks/gaps in metaphase spreads, we quantified 53BP1 NBs in cyclin A-negative cells (related to G1 phase) in untreated MEFs (**Fig 2.C-D**). As expected in *Rev3L*^{+/+} cells, ~74% of cells were 53BP1 NBs- negative, 22% contained one or two NBs and less than 4% contained more than two 53BP1 NBs. Interestingly in *Rev3L*-deficient cells, only 40% of MEFs were 53BP1 NBs-negative, 33% contained one or two NBs and 27% contained more than two 53BP1 NBs. These results strongly suggest that in absence of Rev3L, completion of DNA replication is incomplete in numerous cells leading to anaphase bridge breakage then 53BP1 NBs in G1 daughter cells. Therefore, our data support the idea that Polζ is required for replicating genomic regions which are replicated late in S/G2 phase. We then reasoned that if we could artificially extend the G2 phase, replicative DNA polymerases would have more time to duplicate late-replicating regions in absence of *Rev3L*. Therefore we should observe less 53BP1 NBs in G1 daughter cells. To test this hypothesis, we used the selective CDK1 inhibitor RO-3306 which reversibly arrests proliferating cells at the G2/M-phase border (Vassilev, 2006). *Rev3L*^{-/-} MEFs were treated or not with 10μM RO-3306 for 20h to accumulate cells in G2, then released in fresh medium for 8h (**Fig 2.E**). By quantifying

53BP1 NBs in cyclin A-negative cells, we clearly observed a significant decrease of 53BP1 dots in treated cells (**Fig 2.F**). Indeed in RO-3306 treated cells, ~53% of cells were 53BP1 NBs- negative, 35% contained one or two NBs and only 12% contained more than two 53BP1 NBs in contrast to 39%, 29% and 31% respectively in untreated *Rev3L*-deficient cells. Altogether these data suggest that Polζ plays a major role in late DNA replication and its deficiency cannot be totally compensated by other DNA polymerases leading to under-replicated DNA in mitotic cells. Apart replication of CFSs, it is known that late replication is associated with constitutive heterochromatin which is mainly composed of long stretches of repetitive tandem DNA and exhibits a complex chromatin landscape, marked by high levels of DNA methylation, H3K9me3 and histone hypoacetylation (Hiratani et al., 2010). Because heterochromatin is packaged into a less accessible form, one can expect that replicative polymerases can be hampered by this replication barrier and Polζ have been co-opted to assist them.

S phase progression is impaired in *Rev3L*^{-/-} MEFs

We therefore decided to investigate the DNA replication program in absence of Rev3L. We first characterized the S-phase progression in *Rev3L*^{-/-} MEFs by FACS analysis and used *Rev3L*^{+/+} cells as control. Unchallenged *Rev3L*^{-/-} MEFs were pulse-labeled with the thymidine analog 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) for 15 min then released in fresh medium before harvesting at the indicated time points. As shown in **Fig 3.A**, cell cycle progression was delayed in *Rev3L*^{-/-} MEFs. Indeed we detected an accumulation of BrdU⁺ cells in late S/G2 phase 4 h and 6 h after BrdU pulse in *Rev3L*^{-/-} MEFs as compared to control cells. This was underscored by a depletion of BrdU⁺ cells in G1/early S at the same time period. In addition, we observed that BrdU⁺ cells in the G2 phase at T0h have re-entered 2h later into the G1 phase in control cells while MEFs took longer to re-enter into the G1 phase in absence of *Rev3L*. After quantification, about a 2h delay was estimated in the progression of the S phase in *Rev3L*^{-/-} MEFs (7-8 h for *Rev3L*^{+/+} MEFs vs 9-10 h for *Rev3L*^{-/-} MEFs). Interestingly,

similar results were obtained using Rev3L-depleted HeLa cells (**Fig. S1.A**). These data prompted us to investigate spatio-temporal replication patterns in *Rev3L* null MEFs.

S phase can be divided in different stages using immunofluorescence approach, each characterized by a specific thymidine analog pattern corresponding to early, middle or late S-phase (Dimitrova and Berezney, 2002; Fox et al., 1991; Guenatri et al., 2004). Therefore we analyzed the spatial organization of DNA replication in *Rev3L*^{-/-} MEFs. Cells were pulsed-labelled with IdU and the replication patterns typically observed in mouse cells were identified and quantified (Quivy et al., 2008). Representative replication patterns for each category are represented: early S-phase patterns with a high density of small foci distributed throughout the nucleus (stage I), early-mid S phase patterns with small foci throughout the nucleus excepted nucleolus (stage II), then mid-late S phase patterns with a typical ring-shaped labeling around pericentromeric heterochromatin domains (stage III), and finally late S-phase patterns with a few dots located mainly at the nuclear periphery (stage IV) (**Fig 3.B**). We found that in absence of *Rev3L*, the proportion of cells with an early replication spatial pattern (SI) decreased whereas the proportion of mid and late cells increased (**Fig 3.B, left panel**). Interestingly, we noticed a similar effect after depletion of *Rev3L* in human cells (**Fig 3.B, right panel**). These results may reflect a delay in replication timing of genomic regions which are replicated in mid and late S phase.

***Rev3L* inactivation causes a delay in replication timing, mainly in temporal transition regions.**

We then performed genome-wide profiling of replication timing in *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs. Since *Rev3L* inactivation can affect DNA replication we decided to examine the replication timing in cells having undergone few (p6) and many passages (p60). Cells were pulse-labeled with BrdU then *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs were sorted into early and late S-phase fractions by flow cytometry [see methods, (Fernandez-Vidal et al., 2014)]. Neo-

synthesized DNA of each fraction was then immunoprecipitated and labeled before hybridization on microarrays. The Agilent CGH algorithm determines the replication timing of genomic domains by analyzing the log ratio value of early fraction vs late fraction. When the log ratio of a domain is positive, the replication timing is early and when the log ratio is negative, the replication timing is late (Ryba et al., 2011). Genome-wide replication timing analysis identified a set of genomic regions that changed replication timing in response to *Rev3L* inactivation. Indeed, one striking effect of *Rev3L* deficiency was boundary shifts as exemplified in **Fig 4.A**, corresponding to a delay in particular regions between early and late domains called temporal transition regions (TTR) by Gilbert and colleagues (Hiratani et al., 2008). 157 genomic regions displayed this delay (Mid to Late) representing ~5% of the whole genome. Noteworthy we never detected advanced replication timing for these regions (Mid to Early). Observed changes in replication timing were reproducible between replicates. Indeed we did not notice significant variations on replication timing in *Rev3L*^{-/-} MEFs between p6 and p60 (**Fig 4.A, grey lines**) suggesting that the delay in TTR is an early event after *Rev3L* inactivation.

Analysis of the correlation between these genomic regions that changed replication timing and the coverage for GC and LINE-1 contents (**Fig 4.B**) as well as H3K27ac, H3K4me3, H3K27me3 marks (**Fig 4.C**) showed an intermediate molecular signature compared to early and late domains, strengthening our hypothesis that these regions correspond to TTR. These results reveal that *Rev3L* inactivation induces changes in the temporal replication program, especially in TTR which are replicated later than the control cells. It has been reported that TTR are associated with repressive marks, especially H3K9me3 in which the replication machinery propagates at a slower velocity (Farkash-Amar et al., 2012). Our data indicate that *Rev3L* deficiency exacerbates this slow down suggesting that *Rev3L* can be involved in the replication of these compacted genomic regions.

Numerous genes involved in growth and development are down-regulated in *Rev3*^{-/-} MEFs

Aspects of the relationship between transcription and replication timing have been well documented. Genome-wide analyses identified a strong correlation between early replication and high transcriptional potential (Farkash-Amar et al., 2008; Hiratani et al., 2008; MacAlpine et al., 2004). Moreover tissue-specific genes often replicate early in S phase when they are expressed but late when they are silent (Gilbert, 2002; Goren and Cedar, 2003; Norio, 2006). We reasoned that changes in replication timing observed in absence of Rev3L may have impacted on gene regulation. We therefore performed microarray-based transcriptome profiling from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs (**Fig 5**). Analysis of microarray data indicated a total of 394 genes with altered mRNA expression in *Rev3L*-deficient cells as compared to control cells, with 177 genes up-regulated and 217 genes that were significantly down-regulated by at least 3-fold. Surprisingly prominent among the repressed genes are *HoxB* gene cluster, including *HoxB2* to *HoxB9* as well as two *HoxA* genes (**Fig 5.A-B**).

Moreover *Rev3L* inactivation decreased the expression of approximately 14 genes from imprinted loci (corresponding to 6.5% of down-regulated genes, **Fig S2A**). These included paternally expressed genes *Dlk1*, *Snrpn*, *Peg3*, *Mest* and *Dcn* (**Fig S2A**, blue) and maternally expressed genes *H19*, *Meg3* and *Cdkn1c* (**Fig S2A**, pink). *WT1* is a well-characterized developmental gene that is mutated in Wilms' tumor as well as acute myeloid leukaemia and was identified as being imprinted (Kreidberg et al., 1993). Intriguingly we found that this gene was significantly down-regulated by at least 30-fold in *Rev3L*^{-/-} MEFs as compared to control cells. qRT-PCR from independent cultures of *Rev3L*^{-/-} and *Rev3L*^{+/+} MEFs confirmed the down-regulation of multiple *HoxB* and imprinted genes (**Fig 5.C and S2.B**). Moreover we found that genes displaying a down-regulation had significant enrichment for Gene Ontology terms related to organ and system development (**Fig 5.D**).

We next asked if genes showing altered mRNA expression in absence of *Rev3L* are located in genomic regions that displayed a replication timing delay. For this, we integrated both genome-wide profiling of replication timing and gene expression data. We found that 29

genes (corresponding to 7.36% of deregulated genes) were located in these temporal transition regions (**Table 1**). Interestingly all genes located in TTR showed a down-regulation. These observations are consistent with the fact that late replicating genes are often silenced. Altogether these data suggest that the absence of *Rev3L* can affect expression of genes involved in growth and development.

***Rev3L* deficiency causes epigenetic changes with an increase of repressive marks associated to a hypermethylation of major satellites**

In addition to gene expression various genomic features, including histone modification, DNA methylation, DNA repeat sequences, order chromatin structure and nuclear compartmentalization are linked to replication timing (Aladjem, 2007; Hiratani et al., 2008). Changes in replication timing as well as deregulation of gene expression in response to *Rev3L* inactivation prompted us to assess whether these modifications were associated to global level variations of histone marks. Total histones from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs were then screened by western blot with a panel of histone modification-specific antibodies. *Rev3L* depletion resulted in a striking up-regulation of histone H3 methylation (**Fig 6.A**), especially H3K27me3 (four-fold) and, to a lesser extent, H3K9me3 and H3K4me3 (more than two-fold) suggesting that *Rev3L* deficiency impacts on histone modification profiles. Interestingly the repressive histone marks, H3K27me3 and H3K9me3 (hallmarks for facultative and constitutive heterochromatin respectively) have been found enriched in TTR and in mid S-phase regions (Chandra et al., 2012; Farkash-Amar et al., 2012; Picard et al., 2014). Constitutive heterochromatin exhibits a complex chromatin landscape, marked by high levels of H3K9me3, DNA methylation and histone hypoacetylation. These modifications help define a highly condensed nature. The pericentromere is a heterochromatic domain that provides a structural scaffold for centromere formation and plays a crucial role in genome stability [reviewed in (Allshire and Karpen, 2008)]. In mouse cells pericentromeric heterochromatin consists of $\sim 10^5$ major satellite DNA repeats that are methylated (Vissel and

Choo, 1989). Since DNA and histone methylations are interrelated, and that we observed an up-regulation of H3K9me3 levels in Rev3L-deficient cells, we next investigated DNA methylation pattern at major satellites repeats. Genomic DNA was extracted from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs then digested with methylation-sensitive restriction enzymes MaeII, and DNA blots were hybridized with major satellite probes. Southern blots showed that in Rev3L-deficient cells, DNA repeat sequences were resistant to enzymatic digestion, probably due to an increase of methylation indicating that the absence of Rev3L causes an aberrant DNA methylation pattern at major satellites (**Fig 6.B**). Therefore, our data suggest that Rev3L might be required to duplicate these highly condensed genomic regions which are replicated in mid-late S phase (Guenatri et al., 2004). These results could also explain numerous pericentromeric breaks/gaps detected in *Rev3L*^{-/-} metaphase spreads (**Fig 1.F-H**).

Rev3L targets pericentromeric heterochromatin

To gain insight into the connection between Rev3L protein and the pericentromeric heterochromatin we decided to examine the Rev3L subcellular localization. In mouse cells, pericentromeric regions are easily identified by their intense DNA staining with the dye, DAPI. They are clearly discernible during interphase when major satellites from different chromosomes associate to form clusters (so called chromocenters), that co-localize with the heterochromatin protein 1 alpha (HP1 α), that is highly abundant in these regions (Maison et al., 2010). However, our study has been hampered by the inability to express this very large polypeptide (> 360kDa) or to detect the endogenous Rev3L protein in cells using commercial antibodies. We then generated a panel of eGFP-tagged Rev3L truncation proteins (**Fig 7.A, top panel**). Mouse fibroblasts were transfected with expression vectors then autofluorescence was processed 24 h later. Interestingly all the constructs were mainly detected into the nucleus and localized into chromocenters, visualized by dense DAPI staining (**Fig 7.A, bottom panel**). The smaller Rev3L construct (Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹) consisting of 268 residues was sufficient to target most, if not all the fusion protein into the nucleus,

suggesting that this polypeptide fragment contains a putative nuclear localization signal (NLS) and we assume that the amino-acid sequence [KSRKRRKMSKKLPP,(Nguyen Ba et al., 2009)] at position 960-973 is a good candidate. More important this small construct is also sufficient to target fusion protein into chromocenters. We then tested whether Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ was tightly bound to these structures by carrying out a pre-extraction with detergent before fixation and found that the staining was more intense in this condition (**Fig S3.A**). We then confirmed that Rev3L construct target pericentromeric heterochromatin by visualizing by immunofluorescence the co-localization of Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ with HP1 α and H3K9me3, the two hallmarks of pericentromeric heterochromatin (**Fig 7.B-C**). In mouse, the association of HP1 α at pericentromeric heterochromatin is severely compromised in cells lacking the H3 lys9 methyltransferases, *Suv39h1* and *Suv39h2*. We therefore investigated the Rev3 localization in such cells [*Suv39h* double null, dn; (Peters et al., 2001)]. Using co-immunostaining with HP1 α and Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ we observed that HP1 α was no longer enriched at pericentromeric heterochromatin in the *Suv39h* dn cells as previously reported (Maison et al., 2002). Likewise, Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ displayed a diffuse staining throughout the nucleus (**Fig 7. C**). Finally we observed that Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ staining was disrupted when cells were treated with trichostatin A (TSA), an histone deacetylase inhibitor which reversibly increases the acetylation level of histone H3K9 at pericentromeric regions (**Fig S3.B**). In fact Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ follows the HP1 α distribution which dissociates from heterochromatic domains in TSA-treated cells as previously reported (Taddei et al., 2001) and these changes reverse rapidly after drug removal. Collectively these results strongly suggest that HP1 α is required for targeting Rev3 to pericentromeric heterochromatin.

Rev3L localizes to pericentromeric heterochromatin through a direct interaction with HP1 α

Given that the Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ localization at pericentromeric regions is disrupted when that of HP1 α is impaired, we hypothesized of a possible interaction between Rev3L and HP1 α . As a partner of HP1 α , Rev3 should possess a conserved pentapeptide motif, PxVxL (Murzina et al., 1999; Thiru et al., 2004). We then searched this motif in the 268-amino-acid polypeptide (Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹), which is able to target fusion protein to pericentromeric heterochromatin. *In silico* analysis revealed two putative HP1-interactif motifs, PxVxL and PxVxl at positions 800-804 and 973-977 respectively (**Fig 8. A**). We first tested if these motifs were critical for Rev3 localization into chromocenters. To this aim, we used combinations of point mutations in the PxVxL or PxVxl motif (as indicated in **Fig 8. A**). Mouse fibroblasts were then transfected with GFP-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ wt, PVL mut, or PVI mut constructs to visualize their subcellular localization. Autofluorescence revealed that the localization of PVL mut was strongly impaired whereas GFP-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ wt as well as PVI mut showed a correct localization to pericentromeric heterochromatin, and co-localized with HP1 α (**Fig 8.B-C**). Since we found two alternative PxVxL motifs at the C-terminus of Rev3L, we assessed if they were also required for Rev3L localization into chromocenters. A Rev3 construct containing these two motifs (GFP-Rev3²⁷³²⁻³¹³⁰) was expressed in mouse cells (**Fig. S4.A**). Autofluorescence showed a diffuse staining in nucleus as well as in cytoplasm indicating that these motifs are unable to target Rev3L to pericentromeric regions. Taken together, these data indicate that the PxVxL motif at position 800-804 is important for Rev3L localization at pericentromeric heterochromatin. Moreover we found that this motif was very well-conserved among metazoans (**Fig. S4.B**).

To confirm a direct interaction between Rev3L and HP1 α , we performed GST pull-down assay by using purified GST-HP1 α recombinant protein and different HA-Rev3 constructs (Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ wt, PVL mut, or PVI mut) produced in reticulocyte lysates. While HA-Rev3 wt and PVI mut constructs bounded directly to GST-HP1, PVL mut did not (**Fig 8.D**). These results demonstrate that Rev3L is able to directly interact with HP1 α via its PxVxL motif at

position 800-804. We believe that this interaction is crucial for Rev3L functions during DNA replication, and reinforces our hypothesis that Rev3L can be involved in replication of highly condensed chromatin structures which are replicated in mid and late S-phase.

DISCUSSION

Unique among translesion synthesis DNA polymerases, Pol ζ is essential during embryogenesis and cell proliferation (refs). However its biological function under normal growth conditions remains unclear. The conditional KO of *Rev3L* provides a model to analyse Pol ζ functions *in cellulo*.

Here we demonstrate that S phase progression is impaired in *Rev3L*^{-/-} MEFs. Furthermore, genome-wide profiling of replication timing revealed a set of genomic regions that changed replication timing in response to *Rev3L* inactivation in particular regions between early and late domains called temporal transition regions (TTR), where the DNA sequences are replicated progressively later in S phase as they become closer to late-replicating domains (Desprat et al., 2009; Farkash-Amar et al., 2008; Hiratani et al., 2008). Thus our data suggest an involvement of Pol ζ in the replication of TTRs. It is unclear if the temporal transitions in TTRs are the result of sequential activation of a series of origins (Guilbaud et al., 2011) or of a single long replication fork (Guan et al., 2009; Hiratani et al., 2008). However it has been shown that the replication machinery propagates at a slower velocity in these regions (Desprat et al., 2009; Farkash-Amar et al., 2008). At least a part of TTRs has been shown to replicate predominantly as a single long unidirectional fork that initiates at an adjacent early origin in different human and mouse cell lines (Norio et al., 2005). It was hypothesized that one major consequence is an increase in the probability of replication fork stalling and DNA damage as have been suggested for fragile sites regions (Hiratani et al., 2008; Ozeri-Galai et al., 2014; Watanabe and Maekawa, 2010). TTRs are also enriched with repressive marks and are often localized in repressive compartments (nuclear envelope) which may contribute to origin silencing or to interference with and delay of the propagation

of replication forks (Farkash-Amar and Simon, 2009; Farkash-Amar et al., 2012). Thus the delay in TTRs detected in *Rev3L* null cells seems to result of exacerbated slow progression of the replication fork throughout these regions and/ or from stalling of the replication fork at specific locations in TTRs, possibly explaining the numerous aberrations found in *Rev3L*^{-/-} metaphases. Whether this has a direct effect on gene regulation has not been fully demonstrated.

However we have shown that inactivation of *Rev3L* affects gene expression. Indeed we found a total of 394 genes with altered mRNA expression in *Rev3L*-deficient cells, including 217 genes that were significantly down-regulated. Interestingly repressed genes had significant enrichment for Gene Ontology terms related to organ and system development such as multiple *Hox* and imprinted genes. Moreover we revealed that 29 genes were localized in TTRs. Importantly, although 45% of total genes were found up-regulated in our transcriptome, all genes located in TTRs showed a down-regulation, consistent with the fact that genes becoming late-replicated are silenced (Holmquist, 1987; Perry et al., 2004). Thus we assume that the absence of *Rev3L* can directly or indirectly affect expression of genes involved in growth and development and might potentially explain the embryonic lethality observed in *Rev3L* KO mice. In parallel with that, we found that *Rev3L* deficiency impacts on histone modification profiles with a striking up-regulation of H3K27me3, the hallmark of facultative heterochromatin and, to a lesser extent, H3K4me3 and H3K9me3. From these data we speculate that the increased levels of H3K27me3 might be linked to the down-regulated genes identified in our transcriptome analysis given that this repressive mark is placed by Polycomb-group protein complexes on developmentally regulated genes that need to be repressed (Schwartz and Pirrotta, 2007). Further experiments are needed to confirm this hypothesis.

During the process of DNA synthesis, compacted and open chromatin become partially disrupted and must then be properly reassembled following replication. Impediments to fork movement due to condensed chromatin state could pose a double threat to cell viability, first

by challenging the integrity of the DNA and second by interfering with chromatin maturation. From our data we can speculate that Pol ζ is required to replicate through compacted chromatin including facultative and constitutive heterochromatin. Indeed our study provides unprecedented insights on the subcellular localization of Rev3L since we uncovered that Rev3L targets pericentromeric heterochromatin through a direct interaction with HP1 α mediated by a PxVxL motif at position 800-804 in Rev3L sequence. Interestingly, this motif is embedded in the large non-conserved region in yeast suggesting that the new functions of Pol ζ described in this study have been acquired during evolution. We speculate that in mammalian cells depleted for Rev3L, fork movements can slow down or stall, and a delay in restarting forks can promote heterochromatin formation as proposed by Groth and colleagues (Jasencakova et al., 2010). This is consistent with the global increase of H3K9me3 as well as the aberrant DNA methylation pattern at major satellite repeats observed in *Rev3L null* cells. This could also explain frequent pericentromeric breaks/gaps detected in *Rev3L*^{-/-} metaphases.

Finally we demonstrated that Rev3L plays an important role in the completion of late replication since its deficiency cannot be totally compensated by other DNA polymerases thus leading to under-replicated DNA in mitotic cells then double strand breaks in G1 daughter cells. Therefore our data strongly support the idea that Pol ζ is important for duplicating genomic regions which are replicated very late as well. This is consistent with Bhat' findings showing that Rev3L is required for maintaining CFS stability (Bhat et al., 2013) given that CFS are large chromosomal regions that are replicated in late S/G2 phase (Le Beau et al., 1998; Hansen et al., 1993; Ozeri-Galai et al., 2014). It has also been reported that at least 1% of the total DNA is replicated within 90 min of mitosis revealing that DNA polymerases are still active just before cell division (Widrow et al., 1998). Of note, DNA sequences that replicate very late will have a shortened period of time for DNA repair before cell division, possibly leading to inefficient repair. However, since these late-replicating

regions are rather rich in repetitive DNA sequences, these events should have no adverse effect on normal cell function.

In conclusion, our results uncover important insights on the biological functions of Polζ in mammalian cells. We propose that Polζ has been co-opted by evolution to assist DNA polymerase δ and ε in duplicating condensed chromatin domains during mid and late S phase. These observations give rise to many new mechanistic questions on DNA replication dynamics as well as in the maintenance of genome stability given that Polζ is considered to as an error-prone DNA polymerase on undamaged DNA .

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

Immortalized mouse embryonic fibroblast (MEF) *Rev3L*^{-/-lox} and *Rev3L*^{+/-lox} (respectively *Rev3L* KO and WT MEF in the text) provided by S.Lange and R.D.Wood (described in ref) were cultivated in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% FCS under 5% CO₂. MRC5 SV-40 immortalized fibroblasts were cultivated in Minimal Eagle Medium (MEM ; Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin and L-glutamine under 5% CO₂. HeLa SV-40 immortalized fibroblasts were cultivated in D-MEM containing sodium pyruvate, penicillin/streptomycin and 10% FCS under 5% CO₂.

Antibodies and siRNA transfection

Antibodies used for western blotting and immunofluorescence were purchased from Abcam (FANCD2), Santa Cruz (Chk1, Chk1 S3/S4, total H3, Cyclin A), Bethyl (pS33-RPA 32),

Sigma (β -actin), Calbiochem (RPA32), Active Motif (H3K9me3, H3K27me3, total H4 and H3K20me3), and Millipore (HP1 α , 53BP1).

siRNA were purchased from Dharmacon: siRNA Rev3 (ON-TARGETplus Smart pool), non-targeting SiRNA (ON-TARGETplus non target pool). Cells were transfected with 10nM of siRNAs using Interferin (Polyplus) according to the manufacturer's instructions, and were treated 72h after transfection.

Cell lysates for phosphorylated proteins, acid histone extraction and Western blot

Phosphorylated proteins were obtain by lysis of cells in NETN buffer (150mM NaCl, 1mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.5, 0.5% NP40, antiproteases and antiphosphatases and incubated 30 min on ice then sonicated 15 sec at amplitude 30%. Histone extracts were obtain by lysis of cells in 10 volumes of CSK buffer (200mM NaCl, 300mM sucrose, 3mM MgCl₂, 10mM TrisHCl pH 7, 1mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 1mM PMSF, 10mM Na-Butyrate) during 5min at 37°C. After centrifugation during 20min, the pellet was incubated during 1h in cold room in 8 volumes of 0.4mM H₂SO₄ supplemented with Na-Butyrate and PMSF. After centrifugation, 6 volumes of Acetone were added to supernatant and incubated overnight in cold room. After centrifugation, the pellet was resuspended in distilled water and histone extracts were separated by electrophoresis in 8 to 15% SDS-PAGE gels and analyzed by western-blotting.

GST- pull-down assay

For GST pull-down, beads were washed with the wash buffer TBS: pull-down lysis buffer from life technology. GST or GST-HP1 α purified from *E.Coli* were immobilized on the beads and washed 5 times with the wash solution. Immobilized GST or GST-HP1 α were incubated with purified HA-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ WT and PVL obtained by in vitro transcription and translation (promega TnT system) for 1h at 4°C and washed 5 times with wash buffer. Bound proteins were eluted with 10mM glutathione and visualized by western blot analysis.

Immunofluorescence and delayed replication assay using EdU incorporation

Cells were seeded on glass coverslips. For IdU or EdU staining, cells incorporated base analogs during 10 min and coverslips were rinsed twice with cold PBS, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton-x100 in PBS. For detection of heterochromatin-associated proteins, cells were pre-extracted with Triton-X 100 0.2% during 5 min on ice with gentle agitation and fixed with 4% paraformaldehyde. For detection of 53BP1 foci, extraction with CSK100 buffer was performed (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2% Triton x-100, antiproteases (Complete EDTA free, Roche)) during 5 min on ice with gentle agitation. After one cold PBS wash and fixation with 4% paraformaldehyde, coverslips were washed with PBS. Immunodetection of proteins was performed with indicated primary antibodies 1h at RT. After washes, secondary antibodies coupled to Alexa Fluor were incubated during 30 min at RT. Coverslips were mounted in mounting medium (Dako) supplemented with Dapi (Sigma). Images were acquired using Axio Imager Z1 microscope (Zeiss).

Delayed replication was examined using an in situ 5-ethynyl-2'-deoxy- uridine (EdU) incorporation assay. After 48h of siRNA control or against Rev3, cells on glass coverslips were left untreated or treated with 0.3 μ M APH for 24 h and labeled with 10 μ M EdU for 45 min before fixation. Cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and then permeabilized in PBS/0.5% Triton X-100. EdU was detected by click reaction using the Click-iT EdU Imaging kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Immunodetection of FANCD2 was performed with indicated primary antibody 1h at RT. After washes, secondary antibody coupled to Alexa Fluor was incubated during 30 min at RT. Coverslips were mounted in mounting medium (Dako) supplemented with Dapi (Sigma). Images were acquired using Axio Imager Z1 microscope (Zeiss).

Flow cytometry

In order to study the cell cycle distribution, cells were treated with 10 μ M bromodeoxyuridine (BrdU) prior to harvest at different time points. Cells were collected, washed in PBS and fixed in 80% ice-cold ethanol overnight at -20°C. Total DNA was stained in 2.5 μ g propidium iodide (PI) and 50 μ g/ μ l RNase (Sigma) in PBS during 30 min at room temperature. Samples were analyzed on a C6 flow cytometer using the C6 Flow software (BD Accuri).

FISH analyses

Cells were treated with 0,15 μ g/ml colcemid (Gibco) for 4h at 37°C and were resuspended in hypotonic solution (0.05 M KCl) and incubated for 15min at 37°C. Cells were then fixed in a ethanol/acetic acid solution (3:1). Cell suspension was dropped on slides to obtain spread chromosomes. Metaphase slides were incubated with RNase A (100 μ g/ml IN 2X SCC) for 1h at 37°C and dehydrated in successive ethanol bath (70, 85 and 100%). Pre-heated PNA FISH telomere probes were applied on slides, denatured for 10 min at 85°C and hybridized during 2h in dark at room temperature. After 2 washes at 55°C for 10 min and one wash at room temperature, coverslips were mounted in mounting medium (Dako) supplemented with Dapi (Sigma). Images were acquired using Axio Imager Z1 microscope (Zeiss).

Neo-synthesized DNA preparation and microarrays

Neo-synthesized DNA preparation and analysis on microarrays were performed as previously described (Fernandez-Vidal et al., 2014).

Replication timing experiments and microarrays

Cells were incubated with 50 μ M of BrdU during 1h30 and collected, washed three times with DPBS 1X (Dilbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco Life technologies), and then fixed in ethanol 75%. Fixed cells were re-suspended in DPBS with RNase (0.5 mg/ml) and

then with propidium iodide (50 µg/ml) followed by an incubation in dark at room temperature during 30 min with a small agitation. Two fractions of 100,000 cells, S1 and S2 corresponding to Early and Late S-phase fractions respectively, were sorted by flow cytometry using INFLUX 500 (Cytocopia BD Biosciences). Whole DNA was extracted with a lysis buffer (50mM Tris pH=8, 10mM EDTA, 300mM NaCl, 0.5% SDS, and 0.2mg/ml of Proteinase K). Neo-synthesized DNA were immunoprecipitated with BrdU antibodies (Anti-BrdU Pure, BD Biosciences, # 347580) as previously described (Fernandez-vidal *et al.*, 2014). To control the quality of enrichment of early and late fractions in S1 and S2, qPCR was performed with BMP1 oligonucleotides (early control) and with Dppa2 oligonucleotides [late control; data not shown, (Hiratani *et al.*, 2008)]. Microarray hybridization requires a minimum of 1000 ng of DNA. To obtain sufficient specific immunoprecipitated DNA for this hybridization step, whole genome amplification was conducted (WGA, Sigma) on immunoprecipitated DNA. A post WGA qPCR was performed to confirm the maintaining of specific enrichment in both S1 and S2 fractions. Then early and late amplified neo-synthesized DNA 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 instructions on 4× 180K mouse microarrays (SurePrint G3 Mouse CGH Microarray Kit, 4x180K, AGILENT Technologies, reference genome: mm9). Microarrays were scanned with an Agilent High-Resolution C Scanner using a resolution of 3 µm and the autofocus option. Feature extraction was performed with the Feature Extraction 9.1 software (Agilent technologies). For each experiment, the raw data sets were automatically normalized by the Feature extraction software. Analysis was performed with the Agilent Genomic Workbench 5.0 software. The log₂-ratio timing profiles were smoothed using the Triangular Moving Average option of the Agilent Genomic Workbench 5.0 software with the linear algorithm and 500 kb windows.

Identification of replication domains and segments where replication timing profiles change.

To determine the replication domains in control cells and in *Rev3L*^{-/-} MEFs, the algorithms from CGH applications in the Agilent Genomic Workbench 5.0 software were exploited as previously described ((Fernandez-Vidal et al., 2014)). A comparison was conducted between early and late domains from both cell lines in order to determine segments where replication timing changes.

Intersection and coverage with H3K4Me1, H3K4Me3 and H3K27me3 marks

Data are loaded from the UCSC website. Peak coordinates of H3K27me3 come from the Broad Institute in the mm8 genome annotation (http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTrackUi?hgsid=199709818_uvGUfB28yATavzb9eAlxuHR5KGbQ&c=chr12&q=broadChromatinChIPSeq). The conversion of coordinates to mm9 genome annotation was performed with the Lift-over tool available in the GALAXY website (<https://usegalaxy.org/>). The peak coordinate of H3K4me1 and me3 are obtained from the Ludwig Institute for Cancer Research via the UCSC website (http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTrackUi?hgsid=208559602_SARngKJBy54VXgefrlgnd8rJaWFD&c=chr12&q=wgEncodeLicrHistone) in MEF mouse cell line and then used knowingly for intersection and coverage with the Intersection and Coverage tools installed on the GALAXY website. The statistical analysis are performed with the R package with the T-test

GC content

For the GC content, two steps were required: i) loading of the DNA sequence from interval files was performed with the Extract Genomic DNA tool with the mm9 genome annotation and ii) calculation of the GC content for each intervals by the GeeCee EMBOSS tool installed on the GALAXY website.

LINE-1 content

we obtained the line1 coordinates from the RepeatMasker track via the UCSC web site. Intersection and coverage were performed with the Intersection and Coverage tools installed on the GALAXY website.

Depository of microarray data.

The data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO), www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no.GSEXXXX, in progress).

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental data include four Supplemental Figures.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to T. Jenuwein (Max Planck Institute, Germany) for supplying *Suv39h dn* cells and Gustave Roussy Genomics Platform, especially Philippe Dessein for Bioinformatics analysis. We thank Charlene Garandau for technical assistance and members of the Kannouche lab for helpful discussions.

FUNDING

The P.L.K lab is supported by La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée). This work was supported by grants from Institut National du Cancer (INCa) PLBio-2010. P.L.K and J.C.C are supported by ANR N° ANR-14-CE10-0008-01. S.A.S received support from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the foundation Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

- Aladjem, M.I. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* 8, 588–600.
- Allshire, R.C., and Karpen, G.H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* 9, 923–937.
- Baranovskiy, A.G., Lada, A.G., Siebler, H.M., Zhang, Y., Pavlov, Y.I., and Tahirov, T.H. (2012). DNA polymerase δ and ζ switch by sharing accessory subunits of DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* 287, 17281–17287.
- Le Beau, M.M., Rassool, F. V., Neilly, M.E., Espinosa, R., Glover, T.W., Smith, D.I., and McKeithan, T.W. (1998). Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: Implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum. Mol. Genet.* 7, 755–761.
- Bemark, M., Khamlichi, A. a., Davies, S.L., and Neuberger, M.S. (2000). Disruption of mouse polymerase ζ (Rev3) leads to embryonic lethality and impairs blastocyst development in vitro. *Curr. Biol.* 10, 1213–1216.
- Bergoglio, V., Boyer, A.S., Walsh, E., Naim, V., Legube, G., Lee, M.Y.W.T., Rey, L., Rosselli, F., Cazaux, C., Eckert, K. a., et al. (2013). DNA synthesis by pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J. Cell Biol.* 201, 395–408.
- Bhat, A., Andersen, P.L., Qin, Z., and Xiao, W. (2013). Rev3, the catalytic subunit of Pol ζ , is required for maintaining fragile site stability in human cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 2328–2339.
- Boyer, A.S., Grgurevic, S., Cazaux, C., and Hoffmann, J.S. (2013). The human specialized DNA polymerases and non-B DNA: Vital relationships to preserve genome integrity. *J. Mol. Biol.* 425, 4767–4781.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 208–219.
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J.Y., Pope, B.D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S. a., Salama, R., Carroll, T., et al. (2012). Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. *Mol. Cell* 47, 203–214.
- Debatisse, M., Le Tallec, B., Letessier, A., Dutrillaux, B., and Brison, O. (2012). Common fragile sites: Mechanisms of instability revisited. *Trends Genet.* 28, 22–32.
- Desprat, R., Thierry-mieg, D., Lallier, N., Lajugie, J., Schildkraut, C., Thierry-mieg, J., and Bouhassira, E.E. (2009). Predictable dynamic program of timing of DNA replication in human cells Predictable dynamic program of timing of DNA replication in human cells. *Genome Res.* 2288–2299.
- Dimitrova, D.S., and Berezney, R. (2002). The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. *J. Cell Sci.* 115, 4037–4051.
- Donley, N., and Thayer, M.J. (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.
- Esposito, G., Godindagger, I., Klein, U., Yaspo, M.L., Cumano, a, and Rajewsky, K. (2000). Disruption of the Rev3l-encoded catalytic subunit of polymerase zeta in mice results in early embryonic lethality. *Curr. Biol.* 10, 1221–1224.
- Farkash-Amar, S., and Simon, I. (2009). Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosom. Res.* 18, 115–125.
- Farkash-Amar, S., Lipson, D., Polnen, A., Goren, A., Helmstetter, C., Yakhini, Z., and Simon, I. (2008). Global organization of replication time zones of the mouse genome. *Genome Res.* 18, 1562–1570.

- Farkash-Amar, S., David, Y., Poljnen, A., Hezroni, H., Eldar, Y.C., Meshorer, E., Yakhini, Z., and Simon, I. (2012). Systematic Determination of Replication Activity Type Highlights Interconnections between Replication, Chromatin Structure and Nuclear Localization. *PLoS One* 7.
- 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.
- Fox, M.H., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., Baumann, P.H., and Robert-Nicoud, M. (1991). Spatial and temporal distribution of DNA replication sites localized by immunofluorescence and confocal microscopy in mouse fibroblasts. *J. Cell Sci.* 99 (Pt 2), 247–253.
- Gan, G.N., Wittschieben, J.P., Wittschieben, B.Ø., and Wood, R.D. (2008). DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes. *Cell Res.* 18, 174–183.
- Gilbert, D.M. (2002). Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol* 14, 377–383.
- Goren, A., and Cedar, H. (2003). Replicating by the clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 25–32.
- Guan, Z., Hughes, C.M., Kosiyatrakul, S., Norio, P., Sen, R., Fiering, S., Allis, C.D., Bouhassira, E.E., and Schildkraut, C.L. (2009). Decreased replication origin activity in temporal transition regions. *J. Cell Biol.* 187, 623–635.
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., and Almouzni, G. (2004). Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J. Cell Biol.* 166, 493–505.
- Guilbaud, G., Rappailles, A., Baker, A., Chen, C.L., Arneodo, A., Goldar, A., d'Aubenton-Carafa, Y., Thermes, C., Audit, B., and Hyrien, O. (2011). Evidence for sequential and increasing activation of replication origins along replication timing gradients in the human genome. *PLoS Comput. Biol.* 7.
- Hand, R. (1978). Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell* 15, 317–325.
- Hansen, R.S., Canfield, T.K., Lamb, M.M., Gartler, S.M., and Laird, C.D. (1993). Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR1 gene. *Cell* 73, 1403–1409.
- Harrigan, J. a., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R., Fraser, P., and Jackson, S.P. (2011). Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J. Cell Biol.* 193, 97–108.
- Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Yokochi, T., Schwaiger, M., Chang, C.W., Lyou, Y., Townes, T.M., Schübeler, D., and Gilbert, D.M. (2008). Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol.* 6, 2220–2236.
- Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Rathjen, J., Kulik, M., Papp, B., Fussner, E., Bazett-Jones, D.P., Plath, K., Dalton, S., et al. (2010). Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis. *Genome Res.* 20, 155–169.
- Holmquist, G.P. (1987). Role of replication time in the control of tissue-specific gene expression. *Am. J. Hum. Genet.* 40, 151–173.
- Jasencakova, Z., Scharf, A.N.D., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G., and Groth, A. (2010). Replication Stress Interferes with Histone Recycling and Predeposition Marking of New Histones. *Mol. Cell* 37, 736–743.
- Johnson, R.E., Prakash, L., and Prakash, S. (2012). Pol31 and Pol32 subunits of yeast DNA polymerase are also essential subunits of DNA polymerase . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12455–12460.
- Kreidberg, J. a, Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679–691.
- Lange, S.S., Wittschieben, J.P., and Wood, R.D. (2012). DNA polymerase zeta is required for proliferation of normal mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 4473–4482.

- Lawrence, C.W. (2004). Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv. Protein Chem.* 69, 167–203.
- Lee, Y.-S., Gregory, M.T., and Yang, W. (2014). Human Pol ζ purified with accessory subunits is active in translesion DNA synthesis and complements Pol η in cisplatin bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2954–2959.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* 13, 1161–1169.
- MacAlpine, D.M., Macalpine, D.M., Rodriguez, H.K., Bell, S.P., and Bell, S.P. (2004). Coordination of replication and transcription along a. *Genes Dev.* 3094–3105.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H.F.M., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* 30, 329–334.
- Maison, C., Quivy, J.P., Probst, a. V., and Almouzni, G. (2010). Heterochromatin at mouse pericentromeres a model for de novo heterochromatin formation and duplication during replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 155–165.
- Makarova, A. V., Stodola, J.L., and Burgers, P.M. (2012). A four-subunit DNA polymerase ζ complex containing Pol δ accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 40, 11618–11626.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: Interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol. Cell* 4, 529–540.
- Nguyen Ba, A.N., Pogoutse, A., Provart, N., and Moses, A.M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10, 202.
- Norio, P. (2006). DNA replication : the unbearable. *Mol. Biol.* 7, 8–10.
- Norio, P., Kosiyatrakul, S., Yang, Q., Guan, Z., Brown, N.M., Thomas, S., Riblet, R., and Schildkraut, C.L. (2005). Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development. *Mol. Cell* 20, 575–587.
- Ozeri-Galai, E., Tur-Sinai, M., Bester, A.C., and Kerem, B. (2014). Interplay between genetic and epigenetic factors governs common fragile site instability in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 4495–4506.
- Perry, P., Sauer, S., Billon, N., Richardson, W.D., Spivakov, M., Warnes, G., Livesey, F.J., Merckenschlager, M., Fisher, A.G., and Azuara, V. (2004). A dynamic switch in the replication timing of key regulator genes in embryonic stem cells upon neural induction. *Cell Cycle* 3, 1645–1650.
- Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., WeiPolnshammer, 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.
- Picard, F., Cadoret, J.C., Audit, B., Arneodo, A., Alberti, A., Battail, C., Duret, L., and Prioleau, M.N. (2014). The Spatiotemporal Program of DNA Replication Is Associated with Specific Combinations of Chromatin Marks in Human Cells. *PLoS Genet.* 10.
- Quivy, J.-P., Gérard, A., Cook, A.J.L., Roche, D., and Almouzni, G. (2008). The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 972–979.
- Rey, L., Sidorova, J.M., Puget, N., Boudsocq, F., Biard, D.S.F., Monnat, R.J., Cazaux, C., and Hoffmann, J.-S. (2009). Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3344–3354.
- Rhind, N., and Gilbert, D. (2013). DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb. Perspect.*

Ryba, T., Battaglia, D., Pope, B.D., Hiratani, I., and Gilbert, D.M. (2011). Genome-scale analysis of replication timing: from bench to bioinformatics. *Nat. Protoc.* 6, 870–895.

Schwartz, Y.B., and Pirrotta, V. (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* 8, 9–22.

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.

Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H.R., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, P.R., Hirshberg, M., Verreault, A., Murzina, N. V., and Laue, E.D. (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.* 23, 489–499.

Vassilev, L.T. (2006). Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell Cycle* 5, 2555–2556.

Vissel, B., and Choo, K.H. (1989). Mouse major (gamma) satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays: implications for recombination between nonhomologous chromosomes. *Genomics* 5, 407–414.

Watanabe, Y., and Maekawa, M. (2010). Spatiotemporal regulation of DNA replication in the human genome and its association with genomic instability and disease. *Curr. Med. Chem.* 17, 222–233.

Widrow, R.J., Hansen, R.S., Kawame, H., Gartler, S.M., and Laird, C.D. (1998). Very late DNA replication in the human cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11246–11250.

Wittschieben, J., Shivji, M.K., Lalani, E., Jacobs, M. a, Marini, F., Gearhart, P.J., Rosewell, I., Stamp, G., and Wood, R.D. (2000). Disruption of the developmentally regulated Rev3l gene causes embryonic lethality. *Curr. Biol.* 10, 1217–1220.

Wittschieben, J.P., Reshmi, S.C., Gollin, S.M., and Wood, R.D. (2006). Loss of DNA polymerase zeta causes chromosomal instability in mammalian cells. *Cancer Res.* 66, 134–142.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Frequent pericentromeric DNA breaks/gaps in *Rev3L* null MEF

(A) Metaphase spreads from *Rev3L*^{-/-} MEFs. Chromosomes were stained with DAPI (blue) and telomeres with PNA FISH (red). Histograms show the quantitative analysis of **(B)** average chromosomes per metaphases and **(C)** average aberrations per metaphases in *Rev3L*^{+/+} versus *Rev3L*^{-/-} MEFs. **(D)** Representative images and **(E)** percentage of metaphases associated with long arms loss in *Rev3L*^{+/+} compared to *Rev3L*^{-/-} MEFs. **(F)** Percentage of metaphases with breaks/gaps in *Rev3L* WT versus *Rev3L*^{-/-} MEFs. **(G)** Representative images and **(H)** percentage of breaks/gaps in *Rev3L*^{-/-} MEFs divided in two categories: pericentromeric and non-pericentromeric breaks/gaps. **(I)** Spontaneous

micronucleus formation in *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs determined by DAPI staining. Error bars represent standard error for 3 independent experiments.

Figure 2. Completion of late DNA replication is impaired in *Rev3L*-deficient cells

(A) MRC5 cells were transfected with non-targeted siRNA (NT) or siRNA targeting Rev3 during 48h and cells were treated with aphidicholin 300 nM during 24h. Then, cells were pulse-labelled with EdU during 45min and fixed with 4% PAF. EdU (red) and FANCD2 (green) were detected by immunostaining and nuclei by DAPI staining (blue). **(B)** Quantification of EdU and FANCD2 spot distribution in 50 pro-metaphases and metaphases per experiment (3 independent experiments). The p-value was determined with the non-parametric Mann-Whitney test. ***, $P < 0.005$. Dark lines correspond to mean values. **(C)** *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs were fixed with 4% PAF. 53BP1 NBs (green) and cyclin A (red) were detected by immunostaining and nuclei by DAPI staining. **(D)** 53BP1 NBs were counted for 100 cyclin A negative cells (3 independent experiments). The p-value was determined with the non-parametric Mann-Whitney test. ***, $P < 0.005$. Dark lines correspond to mean values. **(E)** *Rev3L* null MEFs were treated or not with CDK1 inhibitor RO3306 at 10 μ M for 20h, resulting in an accumulation of cells in G2 and released for 8h. Cells were fixed with 4% PAF, then 53BP1 (green) and cyclin A (red) were detected by immunostaining. **(F)** 53BP1 NBs were counted for 100 cyclin A negative cells (3 independent experiences). The p-value was determined with the non-parametric Mann-Whitney test. **, $P < 0.05$. Dark lines correspond to mean values.

Figure 3. *Rev3L*^{-/-} MEFs display a delay in S phase progression

(A) *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs were seeded and pulse-labelled with BrdU prior to harvesting and analyzed by flow cytometry at different points in time. The analysis is focused

on S phase divided in 3 parts: G1/early S, middle S and late S/G2 BrdU+ cells. Histograms represent the percentage of cells in G1/early and late S/ G2 phase after the BrdU pulse. Error bars represent standard error for three independent experiments. **(B)** *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs were pulse-labelled with IdU during 10min, fixed and stained for IdU (red). S-phase substages from I to IV were evaluated by visual inspection of the cycling population. Histograms and pie charts show the relative proportion (percentage of total S) of each S-phase substages from I to IV. Error bars indicate standard error of the mean for two independent experiments (n=2). *, P<0.05 and ** P<0.005 by Student's *t*-test. **(C)** After 72h of transfection with non-target (NT) or Rev3 siRNA, MRC5 cells were pulse-labelled with EdU during 10 min, fixed and stained for EdU (red). As previously, S-phase substages were evaluated by visual inspection of the cycling population. Histograms and pie charts show the relative proportion (percentage of total S) of early, middle-late and late S-phase. Error bars indicate standard error of the mean for three independent experiments (n=3). *, P<0.05, ** P<0.005 and *** P< 0.0005 by Student's *t*-test.

Figure 4. *Rev3L* inactivation causes a delay in replication timing, mainly in temporal transition regions.

Characterization of the domains in which replication timing was changed following *Rev3L* depletion. **(A)** Cells were pulse-labelled with BrdU and were sorted by flow cytometry in two fractions, S1 and S2, corresponding to early and late S-phase fractions, respectively. Neo-synthesized DNA was immunoprecipitated with BrdU antibodies. Early and late neo-synthesized DNA were labeled with Cy3 and Cy5 ULS hybridized on microarrays. After analysis, replication-timing profiles can be obtained. Shown are the zoomed microarray profiles of the timing of replication on chromosome 1 (136.6-143.6 Mb), chromosome 5 (127.2-136.4 Mb) and chromosome 9 (44.8-54.1 Mb) from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs overlaid. Black lines represent *Rev3L*^{+/+} MEFs and grey lines represent *Rev3L*^{-/-} MEFs.

Genes are indicated in grey. **(B)** Analysis of GC and Line-1 content in early domains, late domains and changed regions. **(C)** Analysis of the active mark H3K27ac and facultative heterochromatin marks H3K4me3 and H3K27me3 content in early domains, late domains and changed regions.

Figure 5. Numerous genes involved in growth and development are down-regulated in *Rev3L*^{-/-} MEFs

(A) Expression heat maps of genes involved in growth and development from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs. Yellow represents the control data while blue represents down-regulation. **(B)** Volcano plot shows in red genes involved in development with high fold changes ≥ 2 . **(C)** Relative mRNA levels of four genes involved in development (*Hoxb 2*, *8*, *9* and *WT1*) in samples collected from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs were evaluated through qRT-PCR. The data were normalized to the amount of GAPDH mRNA. Error bars indicate standard error of the mean for three independent experiments (n=3). ***, $P < 0.0005$ and **, $P < 0.005$ by Student's *t*-test. **(D)** Top five biological process gene ontology (GO) terms of genes found deregulated in *Rev3L*^{-/-} MEFs transcriptome analysis.

Figure 6. *Rev3L* deficiency causes epigenetic changes with an increase of repressive marks associated to a hypermethylation of major satellites

(A) Histones were extracted performing an acid extraction on *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs. Samples were analyzed by western-blot to compare levels of histone acetylations (H4K12ac, H4K16ac, H4K5ac and H3K9K14ac) and histone methylations (H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3 and H4K20me3) between the two cell lines. An anti-pan H4 or H3 was used as loading control. Histograms show WT/KO fold change. **(B)** Southern blot analyse of genomic

DNA prepared from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs and restricted with the methylation-sensitive enzyme MaeII (5' –ACGT-3'). Blot was hybridized with probes specific to major satellites.

Figure 7. Rev3L targets pericentromeric heterochromatin

(A) Schematic representation of human wild-type catalytic subunit of Polζ, Rev3 and mutant constructs. Conserved domains between yeast and human Rev3 are the N-terminal domain (NTD, 1-333 aa) in blue, the Rev7 interacting domain in red (1888-1943 aa) and the catalytic domain in green (2276-3130 aa). A large region not found in yeast protein is almost exclusively encoded by exon 13. All the constructs lack the NTD domain and are fused to GFP. MEFs cells were transiently transfected with various GFP-Rev3 constructs and fixed with 4% formaldehyde. The distribution of GFP-Rev3 various constructs was detected by autofluorescence and nuclei were visualized using DAPI staining. **(B)** MEFs cells were transiently transfected with GFP-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ and fixed with 4% formaldehyde. The distribution of GFP-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ was detected by autofluorescence, chromocenters were visualized by H3K9me3 immunostaining and nuclei were visualized by DAPI staining. **(C)** WT MEFs and lacking Suv39h MEFs (*Suv39h* dn) cells were transiently transfected with GFP-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ construct and were fixed with 4% formaldehyde after 0.5% Triton X-100 extraction. The distribution of GFP-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ was detected by autofluorescence, H3K9me3 and HP1α immunodetections were processed using antibodies and nuclei were visualized by DAPI staining.

Figure 8. Rev3L localizes to pericentromeric heterochromatin through a direct interaction with HP1α

(A) Sequence alignment of proteins containing the PxVxL motif important for an interaction with HP1α with canonical residues shown in red. Schematic of Rev3FL and Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹

proteins and punctual mutations used for study are shown (PxVxL mutant: P800A, V802A, L804A and PxVxl mutant: P973A, V975A, L977A). **(B)** MEFs cells were transiently transfected with GFP-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ WT, PxVxL mut or PxVxl mut. Cells were fixed with 4% formaldehyde, the distribution of GFP-Rev3 constructs was detected by autofluorescence and nuclei were visualized by DAPI staining. **(C)** The graph shows the percentage of green cells in which GFP-Rev3 constructs localized in chromocenters. **(D)** GST and GST-HP1- α proteins were purified from bacteria. HA-Rev3⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ WT, PVL and PVI were obtained by transcription and translation in vitro. Purified proteins were used in a GST-pull down assay. After elution, samples were analyzed by western-blot using anti-HA and anti-GST antibodies.

Table 1. Loci displaying both delay in RT and gene misregulation in *Rev3L*^{-/-} MEFs

Domain	Chr	Size (bp)	Replication timing domain	Gene	Misregulation (fold change)
1	1	1 042 476	TTR	Pax3	-3.5
2	2	2 573 606	TTR	Plcb4	-3.0
3	6	6 628 128	TTR	Frmd4b	-3.1
4	8	671 566	TTR	Hand2	-7.6
5	8	641 165	TTR	Lpl	-3.4
6	10	567 222	TTR	Ptprb	-2.5
6	10	567 222	TTR	Tspan8	-7.1
7	11	920 184	TTR	Meis1	-5.7
8	12	548 987	TTR	Dlk1	-6.2
9	12	487 988	TTR	Foxg1	-20.4
10	12	691 317	TTR	L3h3pdh	-3.0
11	12	548 987	TTR	Meg3	-5.4
11	12	548 987	TTR	Mirg	-6.8
12	12	1 372 498	TTR	Mycn	-5.9
13	13	1 179 925	TTR	Sfrp4	-6.1
14	14	850 220	TTR	Scel	-3.9
15	14	671 779	TTR	Wnt5a	-4.5
16	15	1 054 278	TTR	Fbxl7	-8.5
17	15	1 145 389	TTR	Has2	-4.5
18	16	1 669 255	TTR	Cxadr	-3.4
19	17	808 766	TTR	Rftn1	-12.3
20	18	402 349	TTR	Gata6	-12.8
21	18	539 392	TTR	Pcdhb17	-2.9
21	18	539 392	TTR	Pcdhb20	-3.4
21	18	539 392	TTR	Pcdhb21	-5.6
21	18	539 392	TTR	Pcdhb22	-2.8
22	18	1 232 897	TTR	Ppp2r2b	-8.2
23	19	509 162	TTR	Aldh1a1	-11.3
23	19	509 162	TTR	Aldh1a7	-3.6

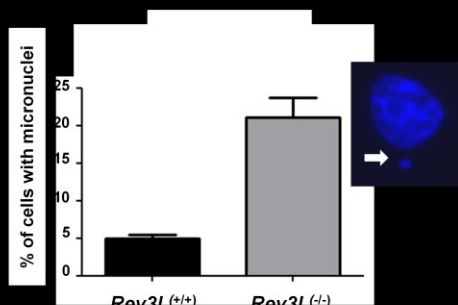
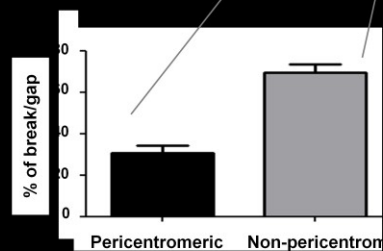
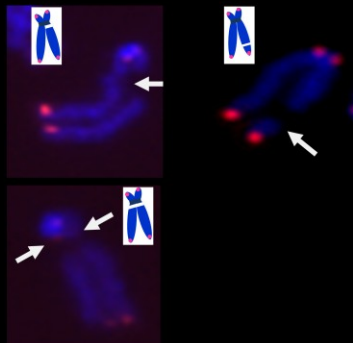
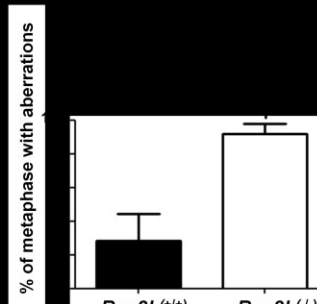
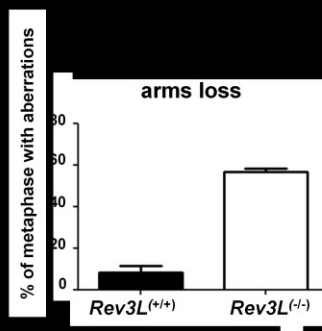
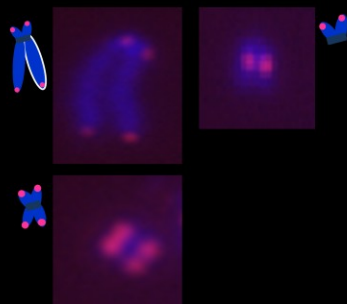
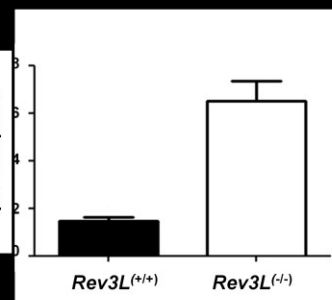
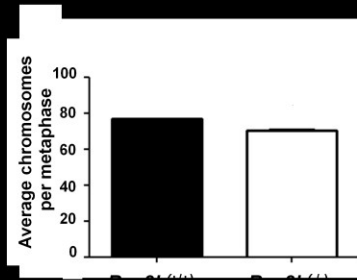
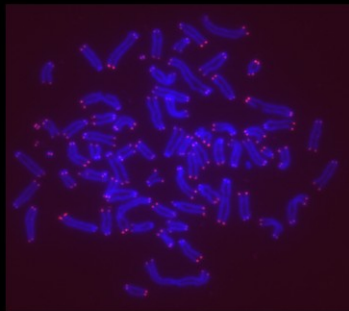
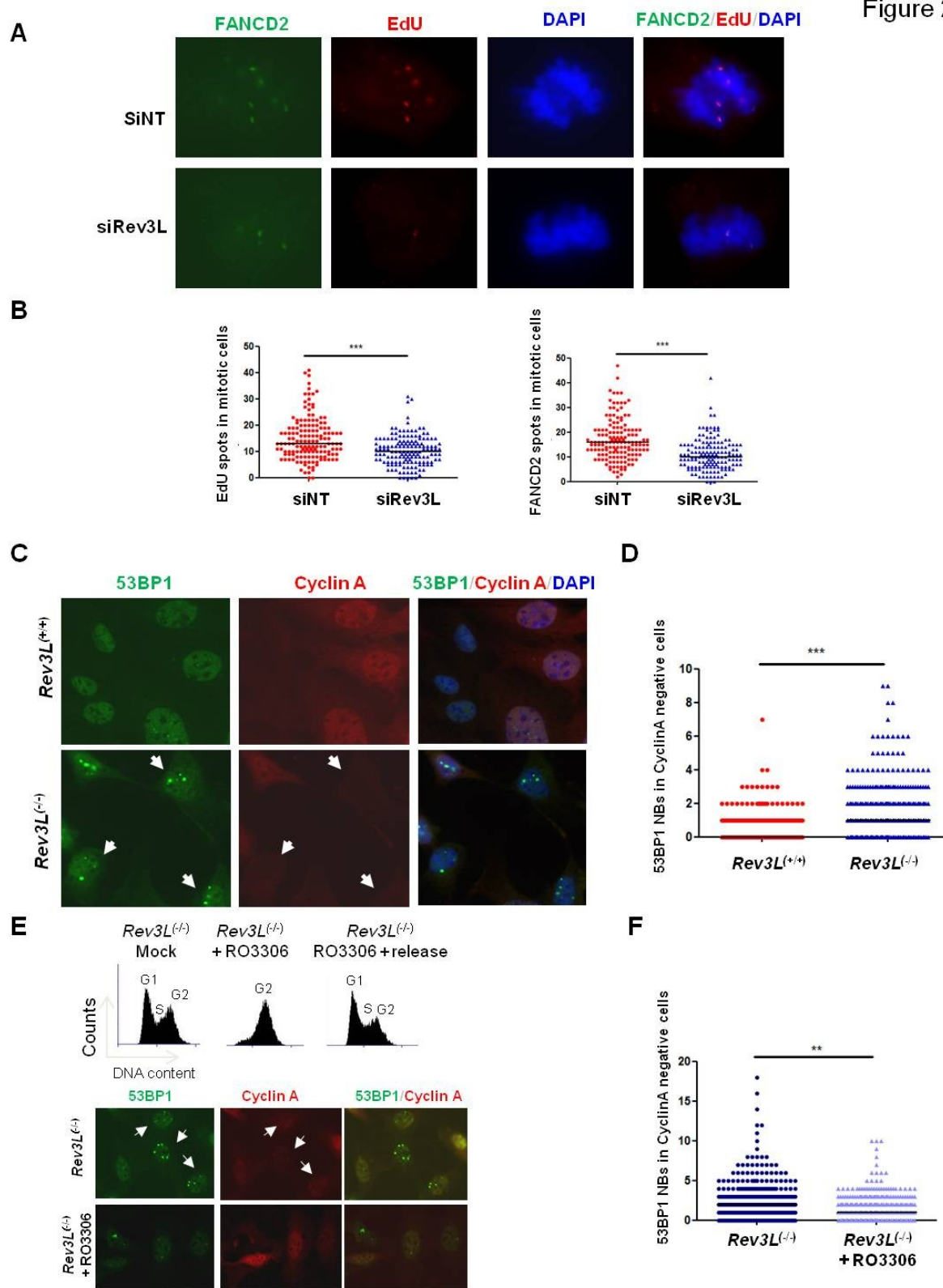


Figure 2



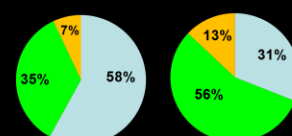
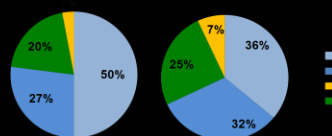
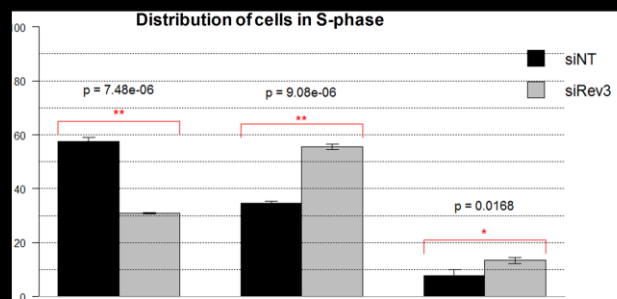
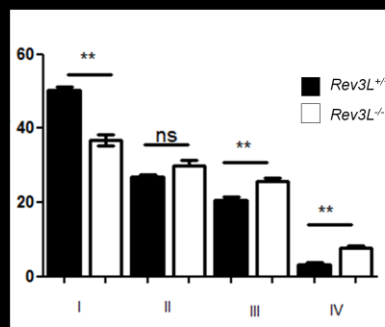
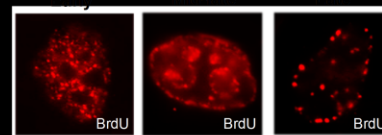
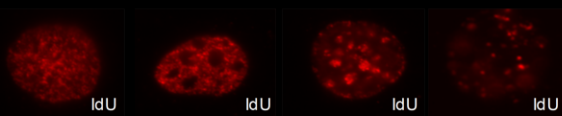
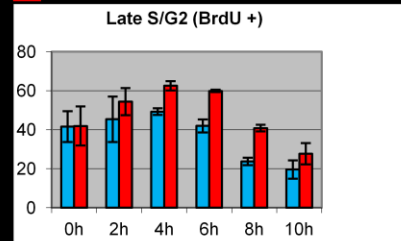
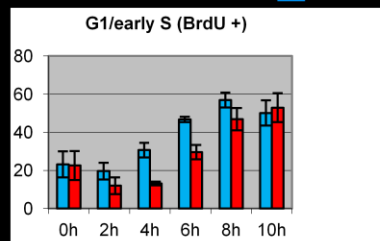
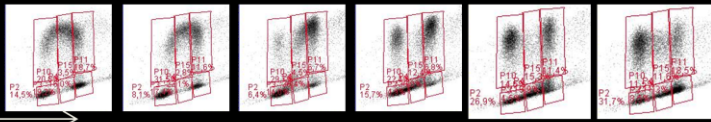
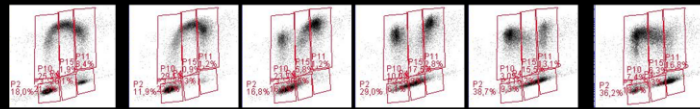
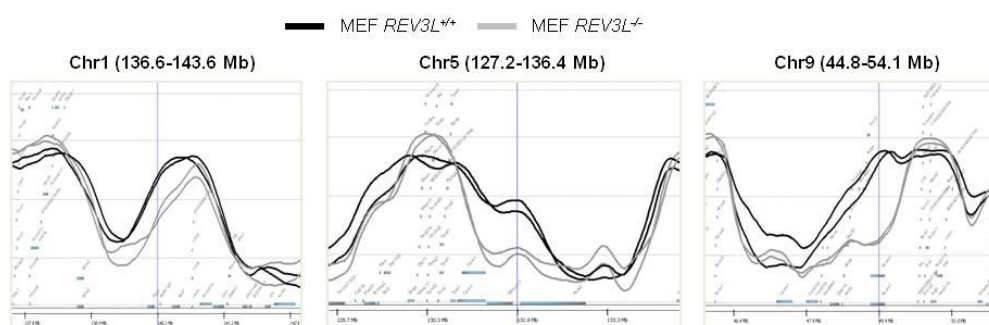
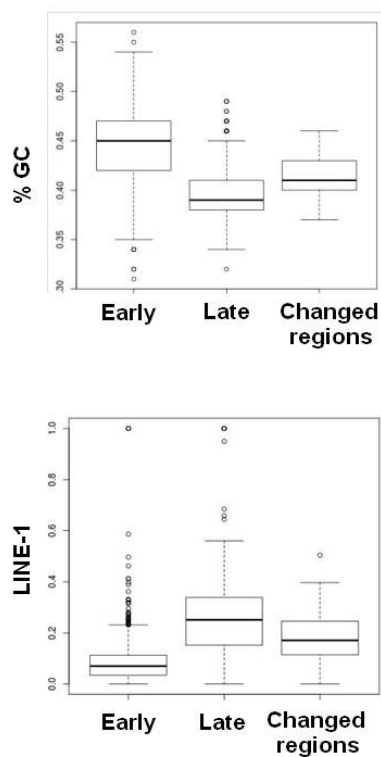


Figure 4

A



B



C

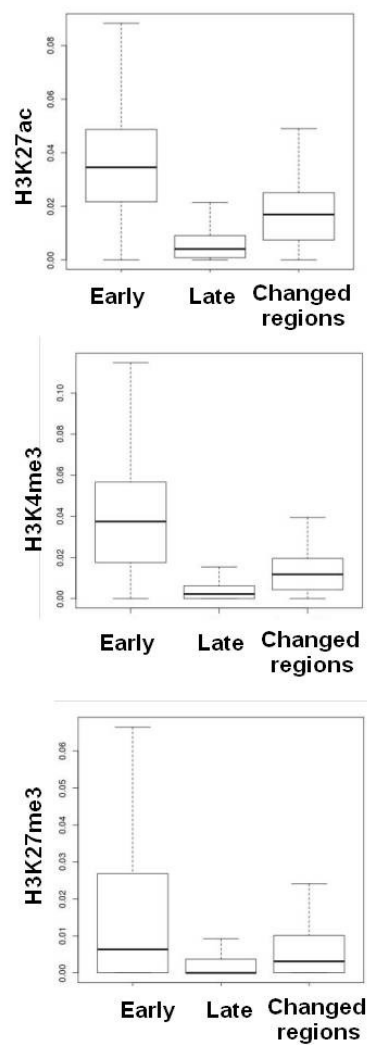


Figure 5

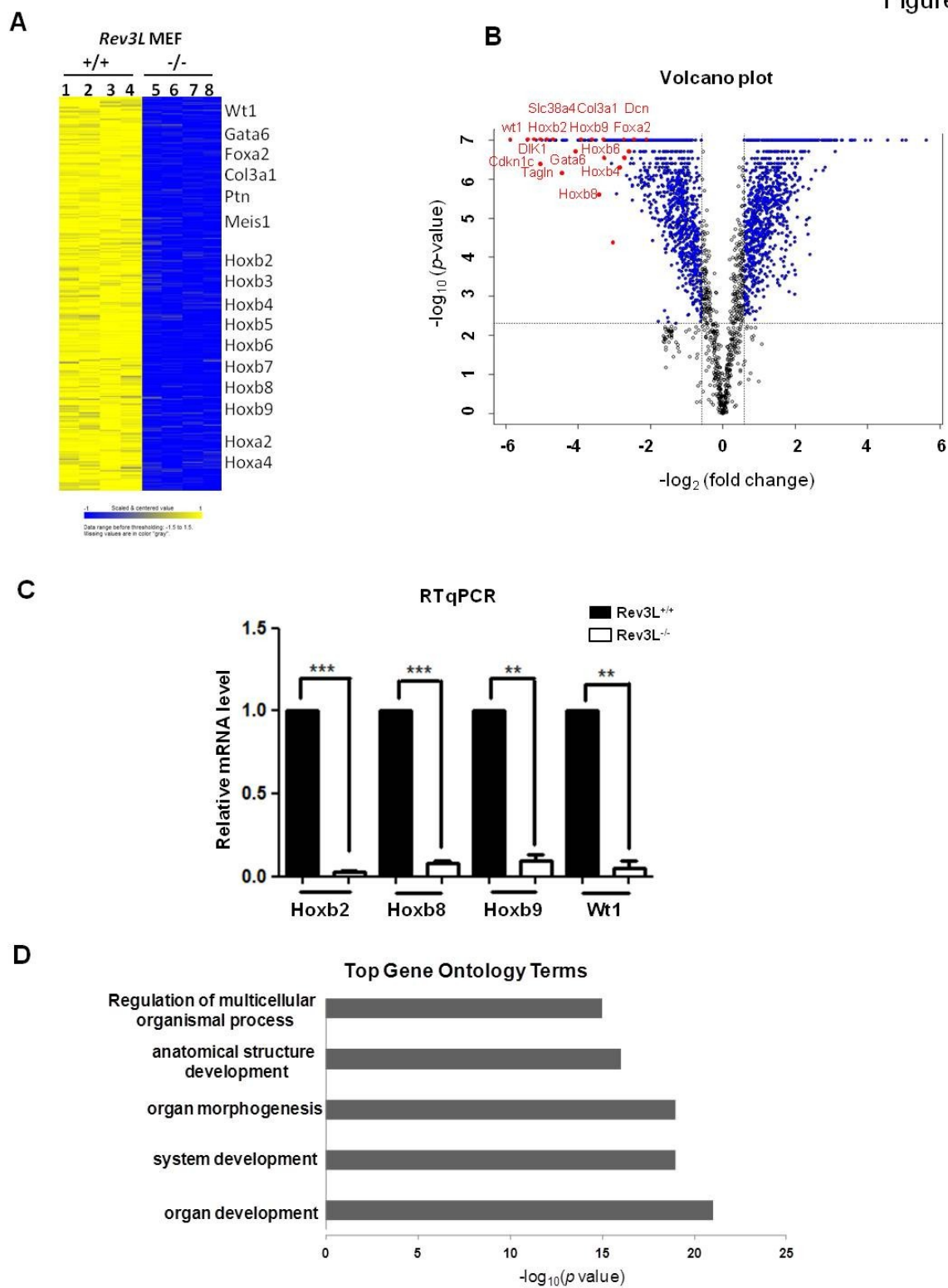
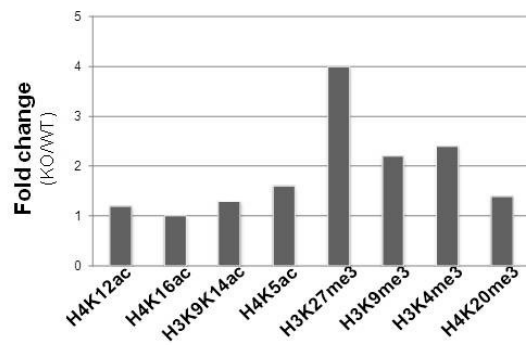
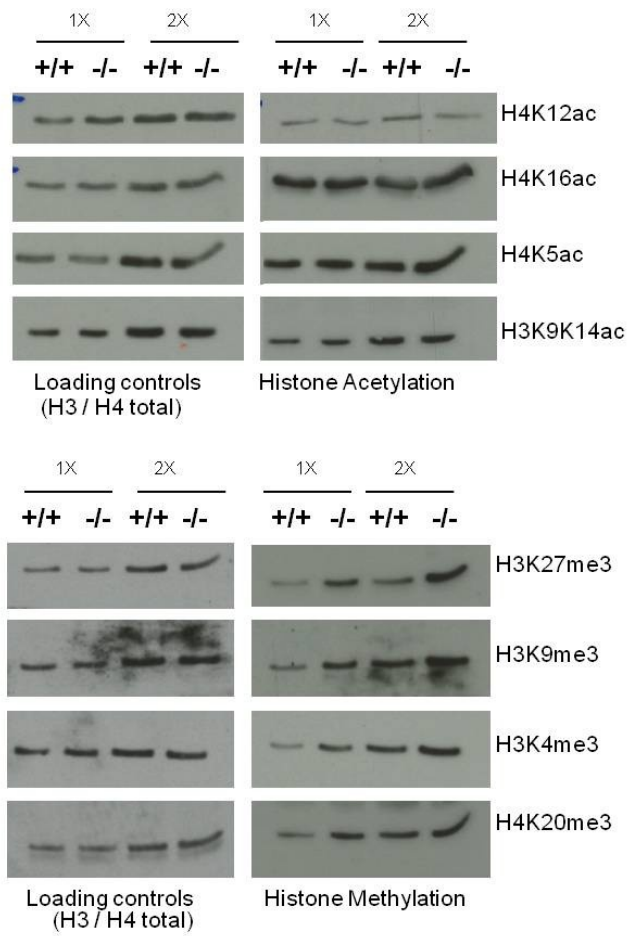


Figure 6

A



B

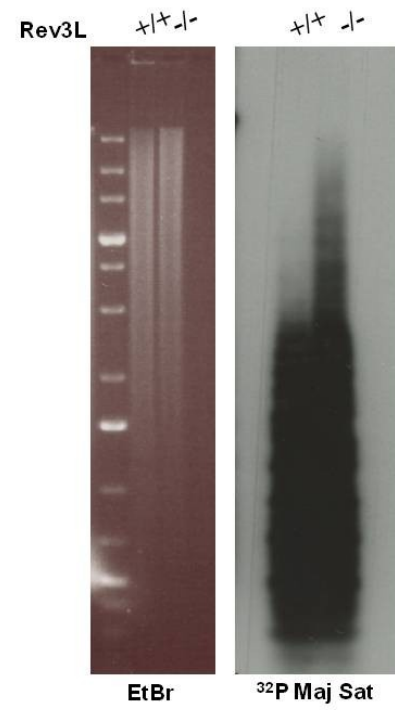
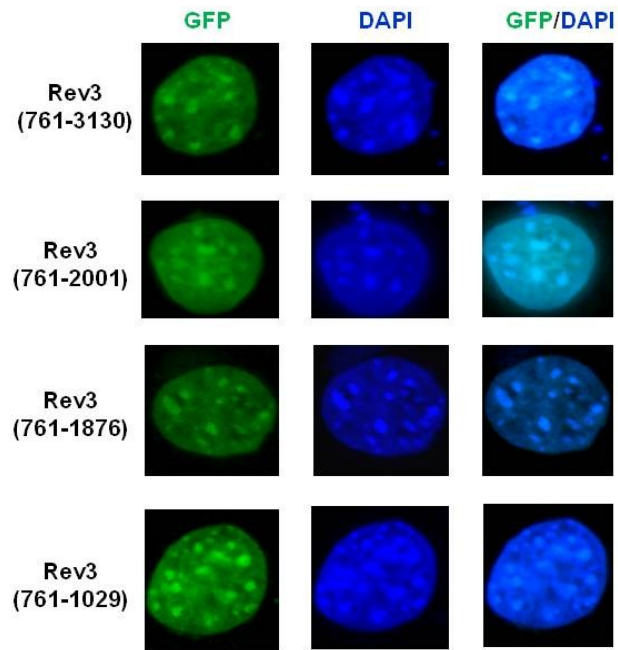
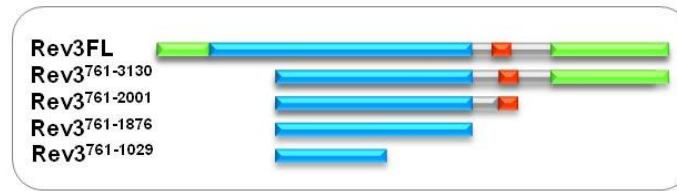
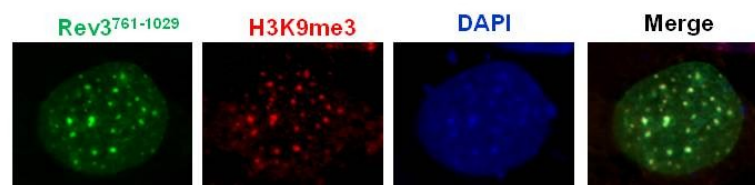


Figure 7

A



B



C

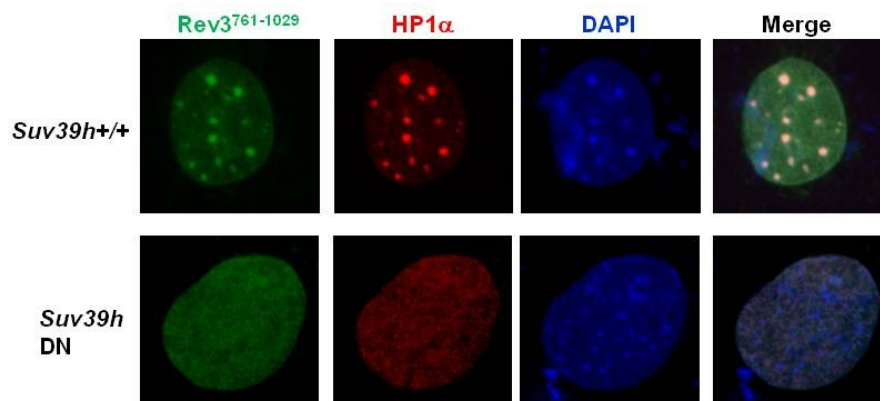
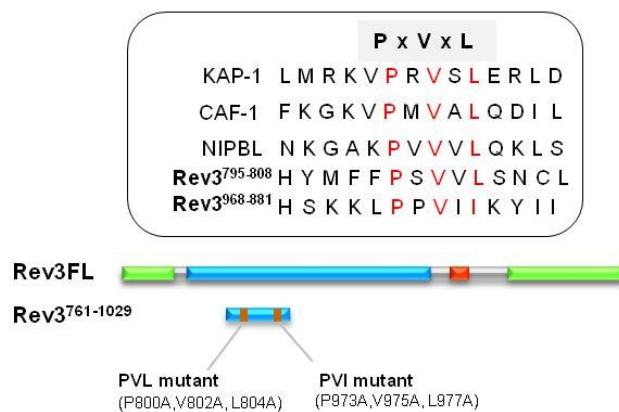
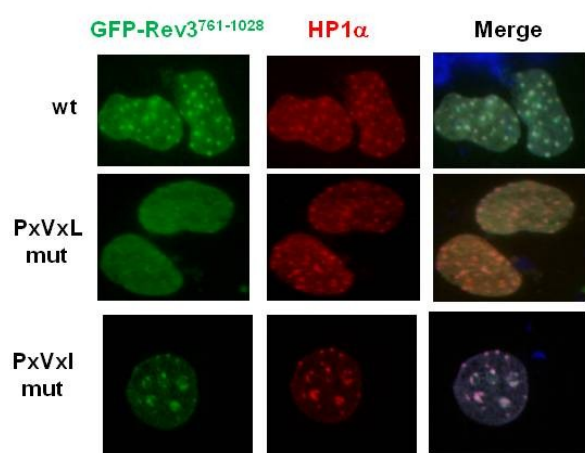


Figure 8

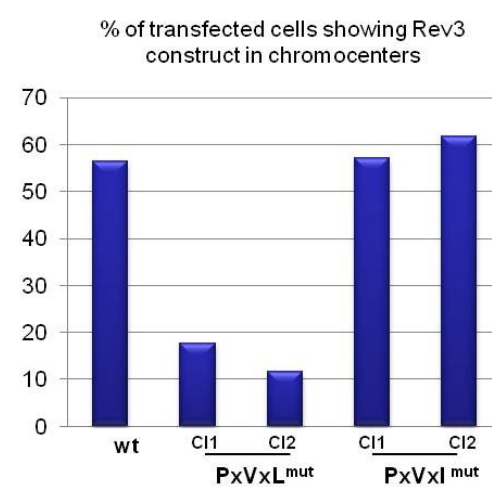
A



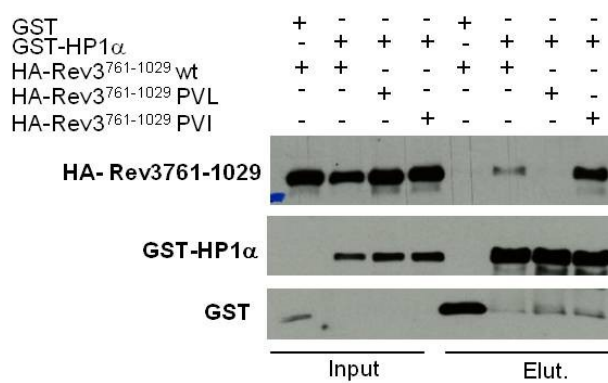
B



C



D



Supplemental Figure Legends

Figure S1. S-phase progression is impaired in human cells after down regulation of *Rev3L*

After 48h of transfection with NT or Rev3 siRNA, MRC5 cells were pulse-labelled with BrdU prior to harvest and analyzed by flow-cytometry at different points in time. The analysis is focused on S phase divided in 3 parts: G1/early S, middle S and late S/G2 BrdU+ cells. Histograms represent the percentage of cells in G1/early and late S/ G2 phase after the BrdU pulse. Error bars indicate standard error of the mean for three independent experiments (n=3). *, P<0,05 and ** P<0,005 by Student's *t*-test.

Figure S2. Several imprinted genes are down-regulated in *Rev3L*^{-/-} MEFs

(A) Expression heat maps of imprinted genes from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs. Yellow represents the control level while blue represents gene expression down-regulation. IGN: imprinted gene network. (B) Relative mRNA levels of genes involved in development (paternal expressed genes: *Dlk1* and *Slc18a4* and maternal expressed genes: *Dcn1* and *H19*) in samples collected from *Rev3L*^{+/+} and *Rev3L*^{-/-} MEFs were evaluated through qRT-PCR. The data were normalized to the amount of GAPDH mRNA. Error bars indicate standard error of the mean for three independent experiments (n=3). ***, P<0.0005 by Student's *t*-test. (C) Schematic representation of imprinted genes found down-regulated and their involvement in growth. Paternally expressed genes in blue promote growth whereas maternally expressed genes in pink inhibit it.

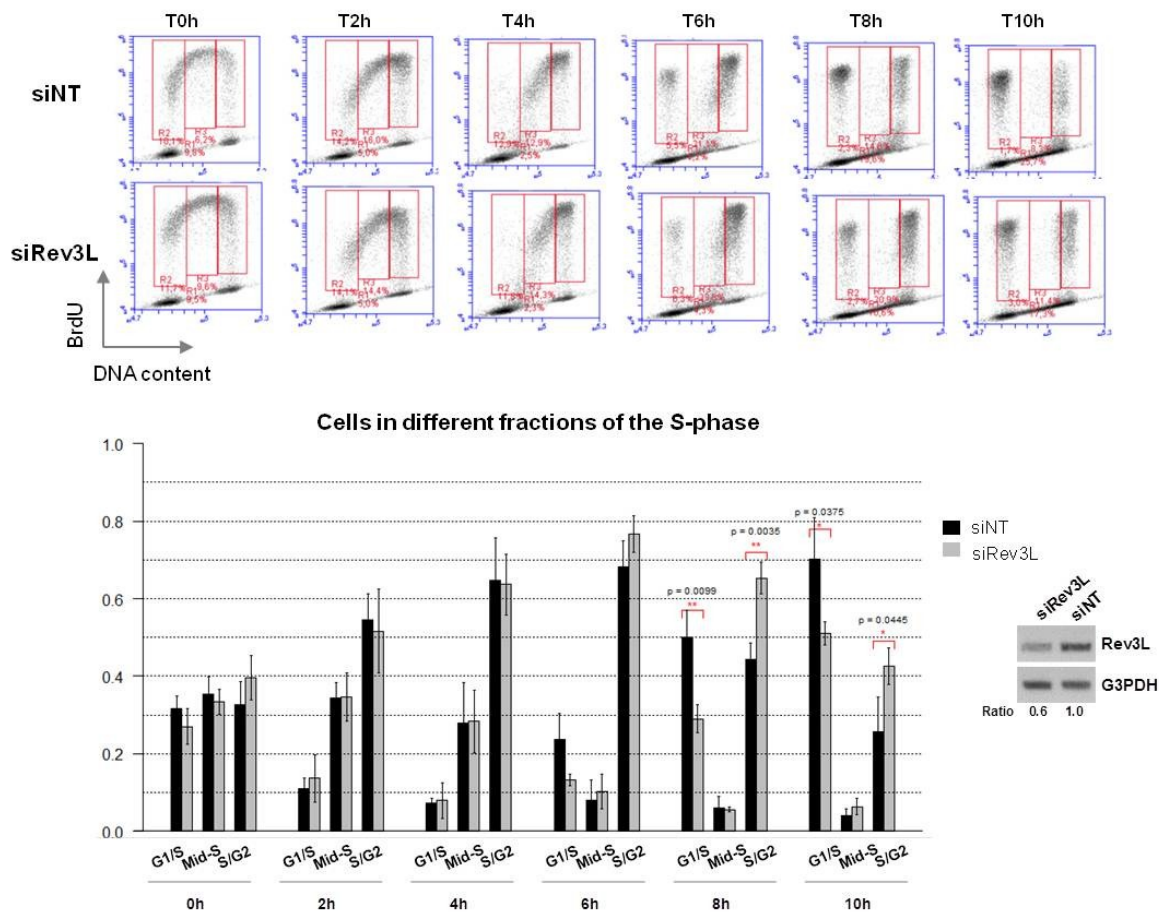
Figure S3. *Rev3L* construct is tightly bound into the chromocenters and become diffuse after TSA treatment

(A) MEFs cells were transiently transfected with GFP-*Rev3*⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ construct and were fixed with 4% formaldehyde directly or after a 0.5% Triton X-100 pre-extraction. The distribution of GFP-*Rev3*⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ was detected by autofluorescence and nuclei were visualized using DAPI staining. (B) MEFs cells were transiently transfected with GFP-*Rev3*⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ construct and treated or not during 24h with trichostatin A (TSA). Cells were released or not with new medium during 6 hours and fixed with 4% formaldehyde after 0.5% Triton X-100 pre-extraction. The distribution of GFP-*Rev3*⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ was detected by autofluorescence, HP1α was immunodetected using antibodies and nuclei were visualized using DAPI staining.

Figure S4. Putative PxVxL motifs in the C-terminus of *Rev3L* do not target to pericentromeric heterochromatin

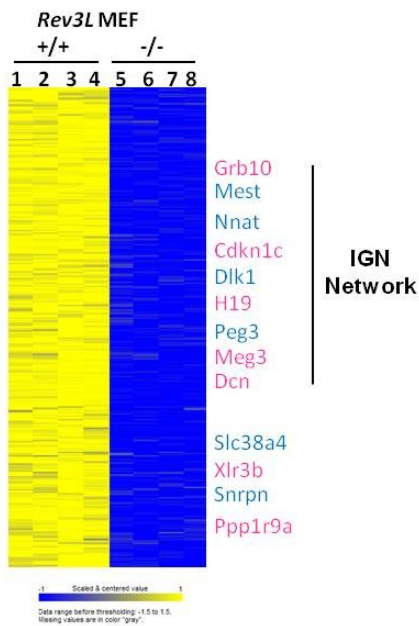
(A) Schematic of *Rev3FL* and *Rev3*²⁷³²⁻³¹³⁰ proteins. MEFs cells were transiently transfected with GFP- *Rev3*²⁷³²⁻³¹³⁰ or GFP- *Rev3*⁷⁶¹⁻¹⁰²⁹ constructs and fixed with 4% formaldehyde. The distribution of GFP-*Rev3* constructs was detected by autofluorescence and nuclei with DAPI staining. (B) Sequence alignment of *Rev3* among different species containing the PxVxL motif with canonical residues shown in red.

Suppl. Figure 1

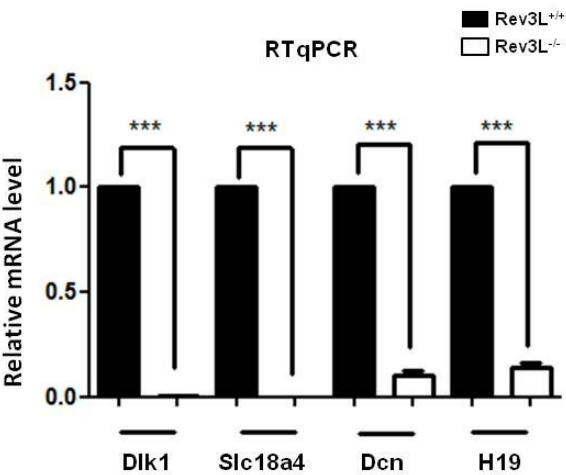


Suppl. Figure 2

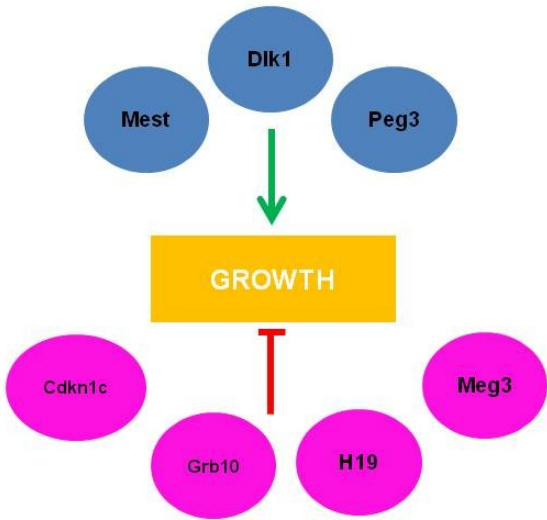
A



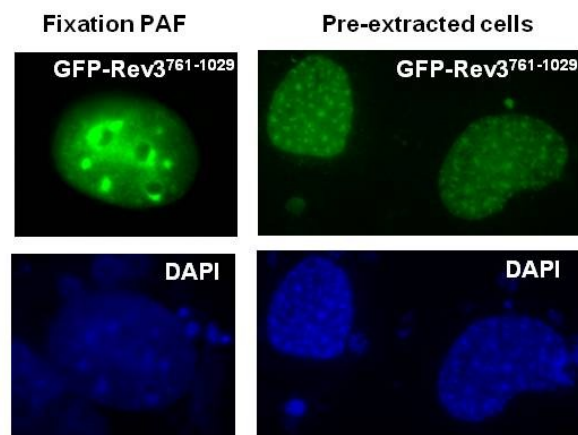
B



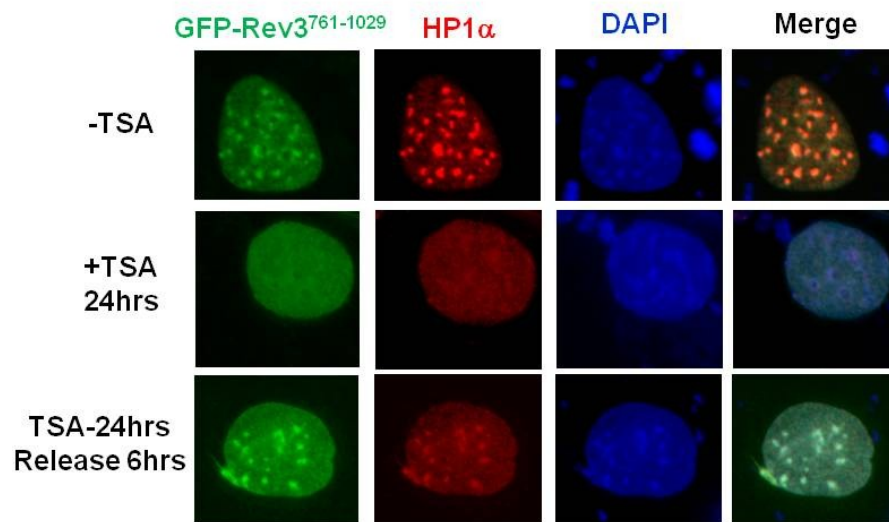
C



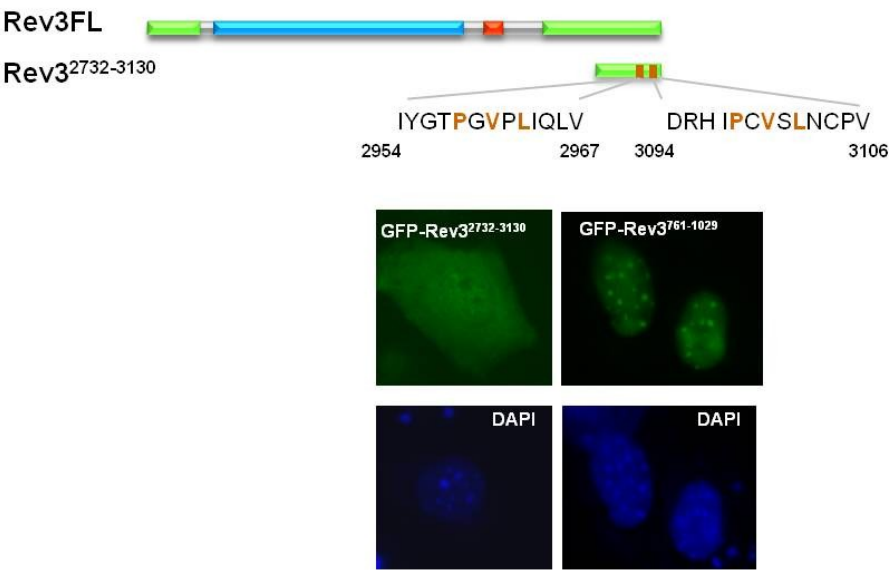
A



B



A



B

REV3L, <i>H.sapiens</i>	775	RYEEFQEHKTEKPSLSQQA AHYMFF PSV LSNCLTRPQKLSPVTYKLQPG	824
REV3L, <i>C.lupus</i>	696	RYEEFQEHKTEKPSLSQQA AHYMFF PSV LSNCLSRPQKLSPVTYKLQPS	745
REV3L, <i>B.taurus</i>	775	RYEEFQEHKTEKPSLSQQA AHYMFF PSV LSNCLSRPQKLSPVTYKLQPG	824
REV3l, <i>M.musculus</i>	774	RYEEFQEHKMEKPSLSQQA AHYMFF PSV LSNCLTRPQKLSPVTYKLQSG	823
REV3l, <i>R.norvegicus</i>	774	RYEEFQEHKMERPSLSQQA AHYMFF PSV LSNCLTRPQKLSPVTYKLQPG	823
REV3L, <i>G.gallus</i>	764	RYEEFQEHKA EKPSLSQQA AHYMFF PSV LSNCLSRPQKLAPVTYKLQQG	813
REV3L, <i>X.laevis</i>	767	RSEELQQHATDMTSGNQATHYKFF PSV LSNCLNRPQKLAPVTYKVQQC	816

Discussion et perspectives

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai pu mettre en évidence un nouveau rôle de l'ADN polymérase zeta dans la réplication de l'ADN non endommagé dans les cellules de mammifères et plus spécifiquement au niveau des régions génomiques qui se répliquent dans la seconde moitié de la phase S (mid-late S phase), riches en séquences d'ADN répétées et pauvres en gènes transcrits. Dans cette partie, je me propose d'approfondir les résultats obtenus au cours de ma thèse et de discuter ceux-ci par rapport à ce qui est actuellement connu dans la littérature.

1) Réplication de l'ADN en absence de Pol ζ

a) Conséquences sur la stabilité génétique et épigénétique

(i) Instabilité génétique

Il était connu que l'absence de Rev3L conduit à une augmentation de l'instabilité génétique qui se traduit par des aberrations chromosomiques et des translocations (Lange et al., 2012; Wittschieben et al., 2006; Zander and Bemark, 2004). Nous avons mis en évidence que ces cassures/gaps n'étaient pas localisés de manière aléatoire dans le génome mais qu'une fraction non négligeable (30%) était située à proximité des régions péricentromériques. Il serait important de préciser leurs localisations par rapport aux centromères, notamment en utilisant des sondes d'ADN spécifiques des répétitions satellites majeures et mineures. À quoi correspondent ces cassures/gaps proches des régions péricentromériques? Nous savons que, de part leurs séquences et leurs degrés de compaction, les régions centromériques et péricentromériques sont des « régions difficiles à répliquer ». En absence de tout traitement, elles sont promptes à la formation d'UFBs (Ultra-fine DNA bridges) spécifiques appelés C-UFBs (centromère-UFBs), résultant d'intermédiaires de réplication ou d'ADN entièrement répliqué qui vont être enchevêtrés. Ces C-UFBs sont en grande majorité pris en charge au cours de l'anaphase par la topoisomérase II α (TOPOII α) qui va « désenchevêtrer » les brins d'ADN, ce qui fait que ces structures ne sont pas préjudiciables pour la cellule. Il se peut que ces cassures/gaps observés dans les cellules déficientes en Rev3L soient générés à partir de C-UFBs résultant d'une réplication incomplète des régions proches des centromères. Lorsqu'elles sont en trop grand nombre, elles ne sont peut être pas toutes prises en charge et certaines vont alors casser en anaphase. Des cassures à proximité des centromères ne sont pas anodines puisqu'elles peuvent être source de pertes chromosomiques si elles ne sont pas réparées correctement (Deng et al., 2012; Simi et al., 1998). En effet, une cassure au niveau des régions péricentromériques peut priver l'un des bras du chromosome des séquences centromériques nécessaire à l'attachement aux kinétochores lors de la ségrégation des chromosomes. Dans les cellules *Rev3L*^{-/-}, nous avons pu constater des pertes de bras chromosomiques dans près de 50% des métaphases présentant des aberrations.

Des études effectuées dans des cellules humaines cancéreuses déplétées pour Rev3L ont montré que, spontanément, plus de cassures et de gaps sont observés et ce nombre augmente lorsque l'on traite les cellules avec de faibles doses d'APH (Bhat et al., 2013). Les auteurs montrent que ces cassures/gaps sont situés préférentiellement au niveau de SFCs (e.g. FRA7H, FRA3B) après traitement APH. Ils ont aussi mis en évidence une augmentation des intermédiaires de réplication non-résolus au niveau de ces sites fragiles par un marquage FANCD2, connu pour se fixer au point d'attachement des FS-UFBs (fragile site-UFBs) aux chromosomes. Afin de mieux comprendre l'implication de Rev3L dans la réplication des SFCs, nous avons effectué une déplétion de Rev3L dans des fibroblastes humains. Nous n'avons constaté aucune différence du nombre de foyers FANCD2 en absence de traitement lorsque l'expression de Rev3L a été réduite par ARN interférent. En revanche, après traitement avec une faible dose d'APH, on note une diminution significative du nombre de foyers FANCD2 dans les cellules transfectées avec des ARN interférents dirigés contre Rev3L par rapport aux cellules contrôles. Nos résultats sont en contradiction avec ceux du groupe de Xiao puisqu'ils constatent une augmentation de ces foyers FANCD2. L'explication la plus simple est que ces différents résultats soient inhérents aux lignées cellulaires utilisées. En effet, pour le groupe de Xiao, les expériences ont été faites sur des cellules HCT116 (lignée de cancer colorectal, déficiente pour le MMR car le promoteur de MLH1 est hyperméthylé, très mutagénique) alors que nous avons utilisé des MRC5-sv, fibroblastes humains transformés par SV40. De plus, il n'est pas impossible que le recrutement et/ou maintien de FANCD2 au niveau des régions en cours de duplication en G2/M soit dépendant d'une réplication active. En effet, jusqu'à récemment nous pensions que la duplication complète du génome s'effectuait uniquement en phase S. Or des études ont rapporté que des régions d'ADN non répliquées (under replicated regions) or des séquences d'ADN entrelacées (intertwined DNA sequences) étaient présentes en mitose, à l'origine des ponts anaphasiques ultrafins au moment de la ségrégation des chromosomes [pour revue, (Liu et al., 2014)]. De manière inattendue, une synthèse d'ADN détectée sous la forme de spots d'EdU (analogue de nucléotides) en mitose a été rapportée après un stress réplicatif (Bergoglio et al., 2013; Naim et al., 2013) suggérant qu'un ralentissement de la duplication du génome (avec de faibles doses d'APH) va conduire à un achèvement de la réplication en mitose. Cela concerne les régions génomiques qui se répliquent tardivement comme l'hétérochromatine et les SFCs. Nous avons donc examiné si l'absence de Rev3 pouvait impacter sur cette réplication tardive suite à un stress réplicatif. De façon très intéressante, nous avons observé une diminution significative du nombre de spots EdU dans les MEFs *Rev3L*^{-/-} par rapport aux MEFs *Rev3L*^{+/+}. Ces résultats corrélerent avec la diminution du nombre foyers FANCD2 et renforce notre hypothèse selon laquelle Polζ est impliquée dans la réplication des régions génomiques qui se dupliquent tardivement suite à un stress réplicatif. En l'absence de Rev3, la duplication du génome reste inachevée dans certaines régions, expliquant ainsi le nombre important de cassures/gaps, notamment dans les régions péricentromériques.

Par ailleurs, nous avons constaté un grand nombre de cassures double brin (CDBs) en G1 qui sont séquestrées dans les 53BP1 NBs dans les MEFs *Rev3L*^{-/-}, et ce en absence de traitement à l'APH. Si l'on prolonge de manière artificielle la phase G2 du cycle précédent à l'aide d'un inhibiteur de CDK1, le nombre de 53BP1 NBs diminue de manière significative. Ceci suggère

qu'une augmentation de la phase G2 laisserait plus de temps aux ADN polymérases répliquatives de dupliquer les régions compactées en absence de Pol ζ , limitant ainsi le nombre de régions non répliquées au moment de la mitose et donc le nombre de CDBs en G1.

(ii) Instabilité épigénétique

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, l'information épigénétique doit elle aussi être maintenue afin d'être transmise correctement à la génération suivante. Des modifications de l'information épigénétique peuvent avoir des répercussions sur l'organisation chromatinienne de certaines régions, l'expression de certains gènes, mais aussi le programme de réplication de la cellule (Hiratani et al., 2008). Nous avons pu constater que l'absence de Rev3L dans les MEFs entraîne une modification du niveau global des marques d'histone avec une augmentation des marques associées à l'hétérochromatine constitutive et facultative, H3K9me3 et H3K27me3 respectivement. Une interprétation possible de ces observations est que ces modifications épigénétiques ont lieu localement, au niveau des régions qui sont répliquées par Pol ζ . En absence de Rev3, les fourches de réplication vont progresser lentement, voire s'arrêter et ceci pourrait entraîner des problèmes de recyclage des histones. Il a été montré qu'une perturbation de la progression de la fourche de réplication due à un stress répliquatif peut avoir un impact sur le recyclage des histones. Si le stress répliquatif persiste et que les histones sont séquestrées longtemps par la protéine chaperon d'histone Asf1, des marques additionnelles peuvent leur être apposées et changer la structure de la chromatine localement une fois les histones déposées sur la chromatine (Groth et al., 2007; Jasencakova and Groth, 2010b; Singh et al., 2009). Un mécanisme d'hétérochromatinisation a déjà été décrit lorsque le recyclage des histones est perturbé (Loyola et al., 2006, 2009).

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec des anticorps dirigés contre les marques H3K9me3 et H3K27me3 puis séquençage à haut débit (ChIP-seq) sont en cours au laboratoire afin d'identifier les régions génomiques qui ont subies des altérations de ces marques en absence de Rev3L. On regardera notamment s'il y a un enrichissement au niveau des gènes *Hox* ou des gènes soumis à empreinte parentale pour l'hétérochromatine facultative vu que ces gènes ont été identifiés comme réprimés dans les cellules *Rev3L*^{-/-}, et au niveau des séquences répétées comme les LINEs pour l'hétérochromatine constitutive.

Nous avons aussi constaté une augmentation de la méthylation de l'ADN au niveau des régions contenant les satellites majeurs. Cette hyperméthylation peut être due soit à une augmentation de la méthylation des CpGs dans ces séquences, soit à une diffusion de la méthylation de l'ADN au-delà des régions péri-centromériques. Pour tester ces hypothèses, nous pourrions effectuer un séquençage à haut débit après immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP).

Ces modifications du paysage chromatinien sont très probablement associées aux modifications du programme de réplication comme cela a été suggéré dans la revue de Gödor et Ohlsson (Göndör and Ohlsson, 2009).

b) Conséquences sur le programme de réplication de l'ADN

Une analyse par FACS a permis de montrer que la durée de la phase S est allongée d'environ 2 heures dans les cellules *Rev3L*^{-/-} par rapport aux cellules sauvages. Cependant cette technique donne peu d'informations sur les causes de ce retard. En visualisant les profils réplcatifs des cellules par immunofluorescence, nous avons constaté que la distribution des cellules en phase S (précoce, milieu ou fin) était différente dans les cellules *Rev3L*^{-/-} avec une fraction plus importante de cellules en milieu/fin de phase S. Ce résultat a été confirmé dans des cellules humaines déplétées en Rev3. Ces observations suggéraient que la réplication des régions génomiques répliquées en milieu et fin de phase S étaient ralenties/retardées. Une analyse du timing de réplication des MEFs *Rev3L*^{-/-} et *Rev3L*^{+/+} a permis de confirmer cette hypothèse. De part les marques d'histones associées à ces régions génomiques qui présentent un changement du timing de réplication ainsi que leur contenu en GC et en LINE, on en a déduit que ces régions correspondent à des régions de transition (TTR, Temporal Transition Region). Ces segments génomiques de plusieurs centaines de kilobases séparent les domaines réplcatifs précoces des domaines tardifs. Ils sont largement distribués dans le génome de mammifères (approx. 13% du génome murin) et diffèrent selon le type cellulaire (Farkash-Amar., 2012). On soupçonne qu'ils possèdent de nouvelles fonctions dans la régulation de la réplication et de l'organisation du génome (Desprat et al., 2009; Guan et al., 2009; Hiratani et al., 2008). Il semble que ces TTR possèdent peu d'origines de réplication et qu'ils sont donc passivement répliqués par une fourche uni-directionnelle qui s'initie au niveau du domaine réplcatif précoce adjacent. Cette fourche voyage de longue distance dans la zone de transition jusqu'à ce qu'elle atteigne la fourche de réplication qui s'est initiée dans le domaine réplcatif tardif adjacent (Farkash-Amar and Simon, 2009; Farkash-Amar et al., 2008; Hiratani et al., 2008). Cette particularité des TTR peut avoir pour conséquence une forte probabilité de décrochage du réplisome pouvant créer ainsi des dommages à l'ADN, voire de l'instabilité génétique (Watanabe and Maekawa, 2010). Nous pensons donc que Pol ζ pourrait jouer un rôle important dans ces régions génomiques en assistant les ADN polymérases réplcatives à répliquer, surtout qu'il a été montré que les TTR sont particulièrement enrichies en marque d'hétérochromatine facultative et constitutive, H3K27me3 et H3K9me3 (Chandra et al., 2012; Picard et al., 2014), ce qui conduit à une compaction de la chromatine, générant ainsi des difficultés supplémentaires pour les ADN polymérases réplcatives à répliquer au travers de ces régions génomiques. Il pourrait donc exister un lien direct entre le retard de timing de réplication au niveau des TTR et l'augmentation de la marque d'histone H3K27me3 en absence de Rev3L. Il est important de noter que le laboratoire d'O. Hyrien a publié des résultats différents sur les TTRs et suggéré que ces régions génomiques étaient pourvues d'origine de réplication s'activant progressivement selon le « modèle domino » (Guilbaud et al., 2011).

Une analyse transcriptomique différentielle a montré que dans les cellules inactivées pour *Rev3l*, 394 gènes étaient dérégulés (177 gènes sur-exprimés et 217 gènes sous-exprimés, *pValue* < 0.05). En croisant nos données de timing de réplication et de transcriptome, nous avons mis en évidence qu'il existait des gènes présentant à la fois un retard de réplication (mid to late) et une dérégulation génique. Il est intéressant de constater que ces 29 gènes

communs présentent tous une diminution et non une augmentation de la transcription (soit 7.36% des gènes dérégulés), ce qui est cohérent avec un retard du timing de réplication.

2) Impact de l'absence de Rev3L sur les gènes impliqués dans le développement embryonnaire

Comme il a été mentionné dans l'introduction, l'inactivation du gène *Rev3L* chez la souris conduit à une létalité embryonnaire (Bemark et al., 2000; Esposito et al., 2000; Wittschieben et al., 2000). L'hypothèse avancée pour expliquer cette létalité est que Polζ est nécessaire au franchissement des lésions dues à un stress oxydatif qui résulterait de la prolifération très importante des cellules au cours de l'embryogenèse. Or, d'autres polymérases translésionnelles sont capables de franchir les lésions oxydatives comme Polη (Kuraoka et al., 2001). Nous pensons donc que Polζ a acquis d'autres fonctions essentielles au cours de l'évolution puisqu'elle est la seule ADN polymérase translésionnelle à causer une létalité embryonnaire lorsqu'elle est inactivée. Les résultats que je présente dans ce manuscrit nous renseignent sur ces nouvelles fonctions. Nous avons mis en évidence que parmi les gènes réprimés en absence de Rev3L, une fraction importante est impliquée dans le développement embryonnaire. De manière intéressante, le groupe de K. Rajewsky a montré que les embryons *Rev3L*^{-/-} se développent de la même manière que des embryons androgénotes, à savoir comme des embryons qui n'expriment que les gènes soumis à empreinte parentale d'origine paternelle (Esposito et al., 2000; McGrath and Solter, 1984). On sait que lorsque les deux allèles d'un gène soumis à empreinte parentale ne sont pas ou peu exprimés, cela conduit à une létalité embryonnaire [pour revue, (Barlow and Bartolomeil, 2014)] . Or, nous avons mis en évidence dans les MEF *Rev3L*^{-/-} une réduction de l'expression de 14 gènes soumis à empreinte parentale (maternels et paternels), ce qui correspond à 6.5% des gènes sous-exprimés en absence de Rev3L. Nous avons aussi montré une diminution de l'expression de plusieurs gènes du cluster *Hoxb* qui causent, quant à eux, une létalité post-natale lorsqu'ils sont inactivés (Barrow and Capecchi, 1996; Davenne et al., 1999). On peut donc se demander si ce n'est pas la diminution de l'expression de tous ces gènes nécessaires au développement qui serait à l'origine de cette létalité embryonnaire constatée en absence de Rev3L. Nous avons observé par différentes techniques que la dynamique de réplication était perturbée et que le niveau global de certaines marques d'histones était altéré en absence de Rev3L. On peut supposer que les marques d'histones au niveau des promoteurs des gènes *Hoxb* et des gènes soumis à empreinte parentale soient modifiées (augmentation des marques répressives). Comme nous l'avons mentionné plus haut, nous envisageons des expériences de ChIP-qPCR en utilisant des anticorps dirigés contre les marques H3K27me3, H3K9me3 ou encore H3K4me3 afin de déterminer si l'absence de Rev3L induit des modifications expliquant ainsi cette diminution d'expression. Néanmoins, il ne faut pas oublier que nos études ont été réalisées à partir de fibroblastes embryonnaires de souris. On ne peut donc pas exclure que nos résultats ne soient pas totalement représentatifs de ce qu'il se passe chez l'embryon au cours du développement. Des expériences d'analyses transcriptomiques par RNA-seq à partir

d'ARNm extraits d'embryons *Rev3L*^{+/+} et *Rev3L*^{-/-} de 10.5 dpc sont en cours au laboratoire pour vérifier nos résultats.

3) Recrutement de Rev3L sur l'hétérochromatine péricentromérique : Rôle possible ?

Nous avons montré que Rev3L s'associait à la protéine HP1 α (Heterochromatin protein 1 alpha) *in vitro* et *in vivo* via le motif d'interaction PxVxL. HP1 α joue un rôle essentiel dans l'organisation et le maintien de l'hétérochromatine notamment au niveau des régions péricentromériques chez la souris, dans la ségrégation des chromosomes et dans la stabilité génétique [pour revue (Maison and Almouzni, 2004)] Le motif PxVxL est présent chez plusieurs protéines interagissant avec HP1 comme la sous – unité p150 du complexe CAF-1 (Chromatin assembly factor 1), KAP1 (KRAB-associated protein 1), SENP7 (Nielsen et al., 1999; Quivy et al., 2004; Romeo et al., 2015; Ryan et al., 1999). Cette séquence polypeptidique a été identifiée entre les acides-aminés 796 et 808 de la protéine Rev3L humaine. Il est intéressant de constater que ce motif est contenu dans une région d'environ 1350 acides aminés, non conservée chez la levure. Dans une étude récente, cette région a été décrite comme étant en grande partie désorganisée et comprenant un domaine chargé positivement (Positively Charged Domain, PCD) allant des acides-aminés 950 à 1200, conservée chez les vertébrés (Lee et al., 2014). Ainsi, la protéine Rev3L a acquis ce large domaine qui possède certainement des fonctions inconnues à ce jour qui pourraient lui conférer son rôle essentiel chez les vertébrés supérieurs. Mon travail de thèse a déjà permis d'identifier le motif PxVxL.

On peut alors se demander pourquoi Rev3L interagit avec HP1 α . L'hypothèse la plus probable serait que cette interaction permettrait de recruter Pol ζ au niveau des régions hétérochromatiniennes. Un modèle de réplication de l'hétérochromatine constitutive a été proposé par l'équipe de G. Almouzni impliquant deux pools de protéines HP1 α et γ (Quivy et al., 2004). La réplication de l'hétérochromatine péricentromérique se ferait sous forme de halo autour des chromocentres au niveau desquels la chromatine matrice va « migrer » ainsi qu'un pool spécifique de protéines HP1 permettant le recrutement de facteurs importants pour le maintien des marques épigénétiques comme CAF-1. Une fois répliquée, la chromatine va de nouveau « migrer » vers l'intérieur du chromocentre en interaction avec des molécules d'HP1. Nous pensons que HP1 pourrait recruter Pol ζ au niveau de ces régions péricentromériques, *via* une interaction directe médiée par le domaine PxVxL de Rev3L pour assister les ADN polymérases répliquatives à répliquer ces régions très compactées contenant de nombreuses séquences d'ADN répétées. Comme il l'a été observé pour la protéine CAF-1, il serait important de déterminer si un pool de Rev3L résistant à la RNaseI est localisé en périphérie des chromocentres, c'est-à-dire là où la réplication de l'hétérochromatine péricentromérique a lieu (Quivy et al., 2004). Il faut noter que la plupart de nos expériences ont été réalisées uniquement avec des fragments peptidiques de Rev3L. Rev3L est une protéine de haut poids moléculaire : 365 kDa. Nous (et d'autres laboratoires) n'avons jamais réussi à exprimer de

façon transitoire la protéine entière. De même, nous n'avons pas réussi à produire des anticorps anti-Rev3L capable de détecter la protéine endogène par western blot ou immunofluorescence. Il serait cependant très intéressant de vérifier la localisation sub-cellulaire de la protéine Rev3L.

Il a été montré que les régions péricentromériques se répliquent en milieu et fin de phase S , (Guenatri et al., 2004; Maison et al., 2010). Ces observations sont en adéquation avec nos résultats de retard de timing de réplication en absence de Rev3L.

On peut également se demander comment Polζ est recrutée au niveau de l'hétérochromatine facultative. Contrairement au dogme selon lequel l'hétérochromatine constitutive est associée à la marque H3K9me3 et à l'hétérochromatine facultative à la marque H3K27me3, une étude récente a mis en évidence la coexistence de ces marques afin de maintenir HP1α à la chromatine (Boros et al., 2014b). On peut penser que la présence d'HP1α au niveau de l'hétérochromatine facultative suffit au recrutement de Polζ au cours de la réplication de ces régions riches en marques d'histone répressives. En ce qui concerne les télomères constitués de séquences hautement répétées riches en guanine [(TTAGGG)_n, 10 kb à la naissance], on peut émettre l'hypothèse que Polζ pourrait participer à la réplication de ces régions. Des données d'interactome ont montré que Rev3L interagit avec TRF2 (Telomeric Binding Factor 2), une protéine du complexe Shelterin nécessaire au maintien des télomères (Giannone et al., 2010).

4) Polζ : un « driver » de l'évolution des génomes?

Nous savons que chez *S. cerevisiae*, Polζ est responsable de près de 96% des mutations UV-induites et à plus de la moitié de la mutagenèse spontanée (Lawrence, 2004; Lemontt, 1971). L'hypothèse est qu'elle serait importante pour le franchissement des lésions endogènes (Harfe and Jinks-Robertson, 2000; Quah et al., 1980; Roche et al., 1994). Cette mutagenèse spontanée serait en partie associée au franchissement de structures en épingle à cheveux en association avec Rev1 puisqu'une signature mutationnelle particulière de Polζ (transversion GC→CG) a été mise en évidence *in vitro* (Northam et al., 2014). Etant donné que nos résultats suggèrent un rôle de Polζ dans la réplication de régions chromatiniennes compactées, on peut penser que Polζ peut introduire des mutations dans ces régions au cours de la réplication.

De récentes études croisant des données de programme de réplication et de mutagenèse dans des cellules humaines ont mis en évidence que les mutations ne sont pas distribuées de manière aléatoire dans le génome mais qu'elles sont préférentiellement accumulées dans les régions répliquées tardivement au cours du cycle cellulaire, que ce soit dans les régions de transitions (TTR) ou les régions répliquées en fin de phase S (Koren et al., 2012; Stamatoyannopoulos et al., 2009). Les mutations mises en évidence sont principalement des transversions, six fois plus nombreuses dans les régions répliquées tardivement (Koren *et al*, 2012). Ce gradient de mutations a été observé aussi bien au cours de l'évolution des espèces que du cancer suggérant un mécanisme d'action commun (Donley and Thayer, 2013).

Il est bien établi maintenant, surtout dans les cellules murines, que la plupart des régions riches en gènes actifs pour la transcription sont répliquées précocement, alors que les gènes silencieux, les régions intergéniques et les séquences répétées sont répliquées tardivement (Schwaiger and Schübeler, 2006). La plupart des gènes silencieux ont tendance à être tissu-spécifique et seront exprimés (et deviendront précoces) que dans les tissus où ils fonctionnent (Farkash-Amar et al., 2008; Goren and Cedar, 2003). Il est intéressant de constater que de nombreux gènes tissu-spécifiques (e.g. récepteurs impliqués dans la détection de modifications de l'environnement, de la réponse immunitaire) sont beaucoup plus divergents entre espèces que les gènes impliqués dans les fonctions cellulaires essentielles comme le métabolisme et la transcription (Chuang and Li, 2004; Zhang and Li, 2004). Il a donc été suggéré que le timing de réplication pourrait être un moyen d'optimiser le taux de mutation intrinsèque tel que les gènes de ménage, répliqués précocement soient moins soumis aux mutations alors que les gènes tissu-spécifiques, qui sont généralement sous une pression accrue pour adapter la cellule à son environnement (e. g. adhérence cellulaire, fonction immunitaire, récepteurs olfactifs), soient plus facilement soumis à la mutagenèse (Donley and Thayer, 2013). Nous pensons que le rôle crucial de Polζ dans la réplication des TTR et des régions tardives puisse avoir un impact important sur ce gradient de mutations étant donné ses propriétés « mutagéniques ». Par conséquent, cette ADN polymérase pourrait être considérée comme un « driver » de l'évolution des génomes et de l'adaptation des espèces à leur environnement. Il est surprenant de constater qu'une autre polymérase spécialisée, appelée Polθ ait été également présentée très récemment comme un facteur clé de l'évolution des génomes, mais pour d'autres raisons qui concernent son rôle particulier à réparer des cassures double brin (van Schendel et al., 2015). Cette hypothèse permet de comprendre pourquoi une ADN polymérase « error-prone » a pu acquérir des fonctions essentielles au cours de l'évolution. Par ailleurs, comme les régions répliquées tardivement sont composées de nombreux transposons et séquences virales, une augmentation du nombre de mutations par Polζ est un moyen de les inactiver rapidement et d'éviter ainsi qu'elles ne se propagent dans le génome, ce qui peut conduire à une instabilité génétique. Au laboratoire nous allons vérifier si Polζ est responsable du gradient de mutations en comparant la mutagenèse dans les MEFs *Rev3L*^{-/-} et *Rev3L*^{+/+}. Pour cela, nous séquencerons l'ADN de régions génomiques répliquées tardivement et déterminerons s'il y a une diminution de la mutagenèse en absence de Rev3L et ce, après un certain nombre de passages.

La caractérisation de ce nouveau rôle de Polζ dans la réplication de régions particulières du génome soulève certaines questions, à savoir quel complexe protéique pourrait être impliqué. Le rôle canonique de Polζ dans le franchissement des lésions a bien été décrit dans la littérature et implique l'ADN polymérase Rev1 (Acharya et al., 2006b; Hirano and Sugimoto, 2006). Toutefois, il semblerait que le complexe Rev1-Polζ soit aussi impliqué dans la réplication de structures d'ADN non-B (Northam et al., 2014). On ne peut donc pas exclure un rôle de Rev1 dans la duplication plus globale de régions difficiles à répliquer. C'est tout de même le complexe Polζ₄ (Rev3L et Rev7 en interaction avec les sous-unités accessoires de Polδ, p50 et p66) qui reste le complexe privilégié pour la réplication de l'hétérochromatine. Ce complexe a pu être purifié de manière pré-assemblé ce qui ne correspondrait pas avec un

état transitoire requis pour la TLS (Johnson et al., 2012). Le complexe Pol ζ_4 est cinq à dix fois plus processif et possède une activité polymérasique 30 fois plus grande que Pol ζ sur de l'ADN non endommagé, ce qui permettrait de répliquer de longues séquences d'ADN (Lee et al., 2014). Très récemment, il a d'ailleurs été rapporté que Pol ζ était capable de synthétiser plusieurs centaines de nucléotides après le franchissement d'une lésion chez la levure *S. cerevisiae* (Kochenova et al., 2015)

J'aimerais conclure ce manuscrit par un schéma/modèle qui récapitule mes résultats sur les conséquences d'une absence de Pol ζ chez les vertébrés supérieurs. De plus, je propose un modèle de réplication des régions hétérochromatiniennes impliquant Pol ζ . Et pour finir un schéma intégrera l'organisation chromatinienne, le timing de réplication et le paysage mutationnel.

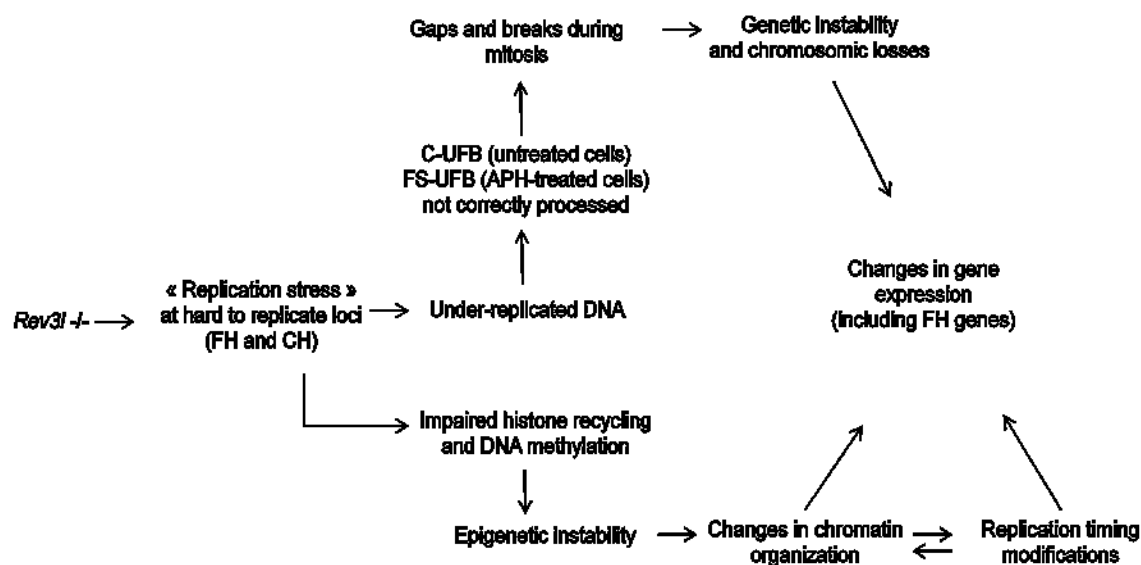


Figure 33 : Modèle des conséquences d'une absence de Rev3L chez les vertébrés supérieurs

Une absence de Rev3L conduit à des difficultés de réplication de l'hétérochromatine facultative (FH) et constitutive (CH). D'une part, ces problèmes de réplifications vont causer une instabilité génétique. Certaines régions comme les régions centromériques et péricentromériques en absence de dommage et les sites fragiles communs après de faibles doses d'APH ne seront pas entièrement répliqués. Ils peuvent alors former des ponts d'anaphase ultrafins (C-UFB pour UFB centromériques et FS-UFB pour UFB au niveau des sites fragiles) qui, s'ils ne sont pas correctement pris en charge, vont engendrer des cassures et des gaps après mitose et sans doute des pertes chromosomiques. D'autre part, l'absence de Rev3L va causer une instabilité épigénétique causée selon nous par des problèmes de recyclages des histones et du maintien de la méthylation de l'ADN dans les régions où la réplication est perturbée. Des changements à l'échelle locale des marques épigénétiques peut entraîner des modifications du programme de réplication. C'est cette instabilité génétique et épigénétique qui peut être à l'origine de changements de l'expression de certains gènes, notamment des gènes présents au niveau des zones de transitions à savoir, des gènes du développement et tissus-spécifiques.

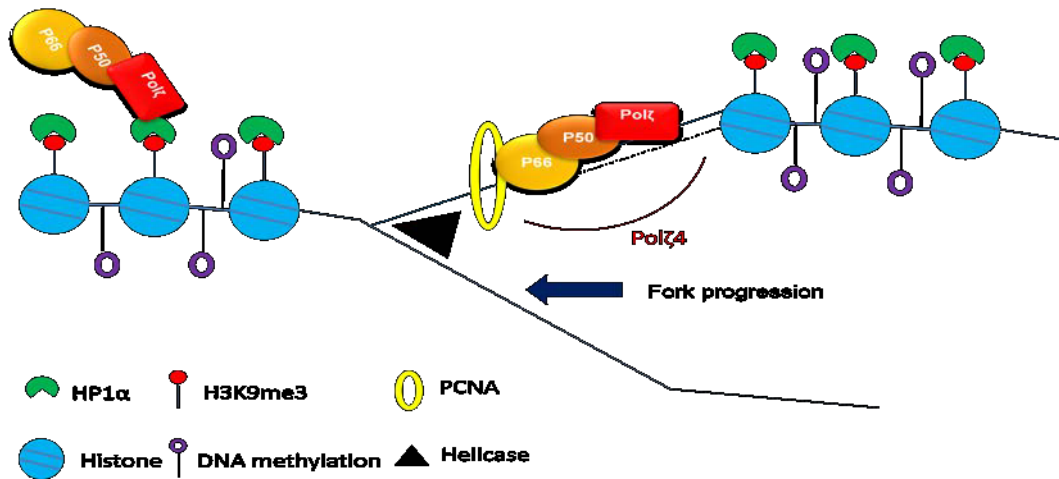


Figure 34 : Recrutement de Polζ₄ au niveau des régions hétérochromatiniennes.

Le complexe Polζ₄ (Rev3-Rev7-p50 et p66) serait recruté au niveau des régions hétérochromatiniennes *via* l'interaction entre HP1α et le motif PxVxL de Rev3L. Polζ₄ participerait ainsi à la réplication de ces régions connues pour être fortement compactées et organisées.

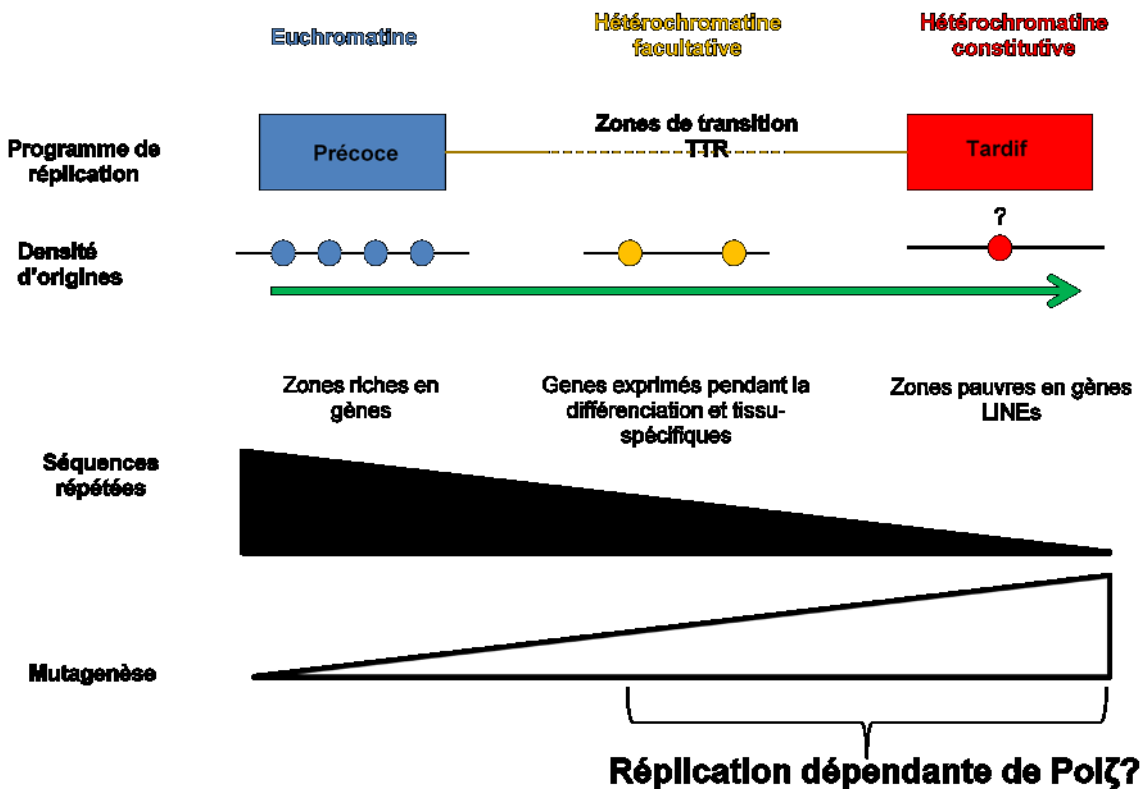


Figure 35 : Polζ un driver de l'évolution des génomes ?

Bibliographie

- Acharya, N., Johnson, R.E., Prakash, S., and Prakash, L. (2006a). Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9555–9563.
- Acharya, N., Johnson, R.E., Prakash, S., and Prakash, L. (2006b). Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9555–9563.
- Adolph, K.W., Cheng, S.M., and Laemmli, U.K. (1977). Role of Nonhistone Proteins Chromosome Structure in Metaphase. *Cell* 12, 605–616.
- Aguilera, A., and García-Muse, T. (2013). Causes of genome instability. *Annu. Rev. Genet.* 47, 1–32.
- Akam, M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101, 1–22.
- Alexandrov, K., Rojas, M., and Rolando, C. (2006). DNA damage by benzo(a)pyrene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing rosemary extract, which lowers free radicals. *Cancer Res.* 66, 11938–11945.
- Alexandrow, M.G., and Hamlin, J.L. (2004). Cdc6 chromatin affinity is unaffected by serine-54 phosphorylation, S-phase progression, and overexpression of cyclin A. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1614–1627.
- Alver, R.C., Chadha, G.S., and Blow, J.J. (2014). The contribution of dormant origins to genome stability: From cell biology to human genetics. *DNA Repair (Amst.)* 19, 182–189.
- Andersen, P.L., Xu, F., and Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* 18, 162–173.
- Arana, M.E., Seki, M., Wood, R.D., Rogozin, I.B., and Kunkel, T. a. (2008). Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. *Nucleic Acids Res.* 36, 3847–3856.
- Arias, E.E., and Walter, J.C. (2005). Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 19, 114–126.
- Arias, E.E., and Walter, J.C. (2006). PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat. Cell Biol.* 8, 84–90.
- Baker, A., Audit, B., Chen, C.L., Moindrot, B., Leleu, A., Guilbaud, G., Rappailles, A., Vaillant, C., Goldar, A., Mongelard, F., et al. (2012). Replication fork polarity gradients revealed by megabase-sized U-shaped replication timing domains in human cell lines. *PLoS Comput. Biol.* 8.
- Balestrini, A., Cosentino, C., Errico, A., Garner, E., and Costanzo, V. (2010). GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication. *Nat. Cell Biol.* 12, 484–491.
- 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.
- Baran, N., Lapidot, A., and Manor, H. (1991). Formation of DNA triplexes accounts for arrests of DNA synthesis at d (TC) n and d (GA) n tracts. *Proc. Natl. ...* 88, 507–511.
- Baranovskiy, A.G., Lada, A.G., Siebler, H.M., Zhang, Y., Pavlov, Y.I., and Tahirov, T.H. (2012). DNA polymerase δ and ζ switch by sharing accessory subunits of DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* 287, 17281–17287.

- Barlow, D.P. (2011). Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 379–403.
- Barlow, D.P., and Bartolomeil, M.S. (2014). Genomic Imprinting in Mammals Genomic Imprinting I Overview Genomic Imprinting.
- Barlow, J., Faryabi, R.B., Callen, E., Wong, N., Malhowski, A., Chen, H.T., Gutierrez-cruz, G., Sun, H., Mckinnon, P., Casellas, R., et al. (2013). A novel class of early replicating fragile sites that contribute to genome instability in B cell lymphomas. *Cell* *152*, 620–632.
- Barman, H.K., Takami, Y., Ono, T., Nishijima, H., Sanematsu, F., Shibahara, K.I., and Nakayama, T. (2006). Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 1547–1557.
- Barrow, J.R., and Capecchi, M.R. (1996). Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development* *122*, 3817–3828.
- Becker, P.B., and Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 247–273.
- Bedinger, P., Munn, M., and Alberts, B.M. (1989). Sequence-specific pausing during in vitro DNA replication on double-stranded DNA templates. *J. Biol. Chem.* *264*, 16880–16886.
- Beisel, C., and Paro, R. (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 123–135.
- Bell, S.P., and Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* *357*, 128–134.
- Bemark, M., Khamlichi, A. a., Davies, S.L., and Neuberger, M.S. (2000). Disruption of mouse polymerase ζ (Rev3) leads to embryonic lethality and impairs blastocyst development in vitro. *Curr. Biol.* *10*, 1213–1216.
- Bender, W., Spierer, P., and Hogness, D.S. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* *168*, 17–33.
- Bergoglio, V., Boyer, A.S., Walsh, E., Naim, V., Legube, G., Lee, M.Y.W.T., Rey, L., Rosselli, F., Cazaux, C., Eckert, K. a., et al. (2013). DNA synthesis by pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J. Cell Biol.* *201*, 395–408.
- Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gómez-González, B., et al. (2011). The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* *146*, 233–246.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., Gingeras, T.R., et al. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* *120*, 169–181.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* *125*, 315–326.
- Besaratinia, A., Yoon, J.-I., Schroeder, C., Bradforth, S.E., Cockburn, M., and Pfeifer, G.P. (2011). Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB J.* *25*, 3079–3091.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2395–2402.

Bétous, R., Rey, L., Wang, G., Pillaire, M., Selves, J., Biard, D.S.F., Shin-ya, K., and Vasquez, K.M. (2009). NIH Public Access. *48*, 369–378.

Bharti, S.K., Sommers, J. a., George, F., Kuper, J., Hamon, F., Shin-Ya, K., Teulade-Fichou, M.P., Kisker, C., and Brosh, R.M. (2013). Specialization among iron-sulfur cluster helicases to resolve G-quadruplex DNA structures that threaten genomic stability. *J. Biol. Chem.* *288*, 28217–28229.

Bhat, A., Andersen, P.L., Qin, Z., and Xiao, W. (2013). Rev3, the catalytic subunit of Pol ζ , is required for maintaining fragile site stability in human cells. *Nucleic Acids Res.* *41*, 2328–2339.

Biebricher, A., Hirano, S., Enzlin, J., Wiechens, N., Streicher, W., Huttner, D., Wang, L.H.C., Nigg, E., Owen-Hughes, T., Liu, Y., et al. (2013). PICH: A DNA Translocase Specially Adapted for Processing Anaphase Bridge DNA. *Mol. Cell* *51*, 691–701.

Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, a. R., et al. (2005). Ubiquitin-binding domains in translesion synthesis polymerases. *403*.

Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., and Balasubramanian, S. (2013). Quantitative Visualization of DNA G-quadruplex Structures in Human Cells. *Nat. Chem.* *5*, 182–186.

Bjerling, P., and Ekwall, K. (2002). Centromere domain organization and histone modifications. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* *35*, 499–507.

Bloom, K.S. (2014). Centromeric Heterochromatin: The Primordial Segregation Machine. *Annu. Rev. Genet.* *48*, 457–484.

Bodor, D.L., Mata, J.F., Sergeev, M., David, A.F., Salimian, K.J., Panchenko, T., Cleveland, D.W., Black, B.E., Shah, J. V., and Jansen, L.E.T. (2014). The quantitative architecture of centromeric chromatin. *Elife* *2014*, 1–26.

Boros, J., Arnoult, N., Stroobant, V., Collet, J.-F., and Decottignies, A. (2014a). Polycomb Repressive Complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain Heterochromatin Protein 1 α at chromatin. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 3662–3674.

Boros, J., Arnoult, N., Stroobant, V., Collet, J.-F., and Decottignies, A. (2014b). Polycomb Repressive Complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain Heterochromatin Protein 1 α at chromatin. *Mol. Cell. Biol.*

Bosch, P.C., Segura-bayona, S., Koole, W., Heteren, J.T. Van, Dewar, J.M., Tijsterman, M., and Knipscheer, P. (2014). FANCI promotes DNA synthesis through G-quadruplex structures. *33*, 2521–2534.

Boyer, L. a, Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. a, Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., et al. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* *441*, 349–353.

Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J. a, and Bickmore, W. a (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 211–219.

Brabant, A.J. Van, Stan, R., and Ellis, N. a (2000). Dna H Elicases , G Enomic I Nstability , and. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* *1*, 406–459.

Bramhill, D., and Kornberg, a (1988). Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* *52*, 743–755.

Brewer, B.J. (1988). When polymerases collide: replication and the transcriptional organization of the *E. coli* chromosome. *Cell* *53*, 679–686.

- Brondello, J.-M., Pillaire, M.J., Rodriguez, C., Gourraud, P., Selves, J., Cazaux, C., and Piette, J. (2008). Novel evidences for a tumor suppressor role of Rev3, the catalytic subunit of Pol zeta. *Oncogene* 27, 6093–6101.
- Brown, S.W. (1966). Heterochromatin. *Chromosoma* 417–425.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* 17, 615–628.
- Brown, S.W., and Chandra, H.S. (1973). Inactivation system of the mammalian X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 195–199.
- Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H., and Arndt-jovin, D.J. (1998). The Distribution of Polycomb-Group Proteins During Cell Division and Development in. *Cell* 141, 469–481.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K. a. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19, 1040–1052.
- 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. U. S. A.* 105, 15837–15842.
- Cai, J., Zhu, K.J., and Yang, S.L. (1998). Seven-Base-Pair Inverted Repeats in DNA Form Stable Hairpins in Vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Polymer (Guildf)*. 39, 4409–4415.
- Campos, E.I., and Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. *Annu. Rev. Genet.* 43, 559–599.
- Cantor, S.B., Bell, D.W., Ganesan, S., Kass, E.M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D.C.R., Sgroi, D.C., Lane, W.S., Haber, D. a., et al. (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105, 149–160.
- De Capoa, A., Menendez, F., Poggesi, I., Giancotti, P., Grappelli, C., Marotta, M.R., Di Leandro, M., Reynaud, C., and Niveleau, A. (1996). Cytological evidence for 5-azacytidine-induced demethylation of the heterochromatic regions of human chromosomes. *Chromosom. Res.* 4, 271–276.
- Carone, D.M., and Lawrence, J.B. (2013). Heterochromatin instability in cancer: From the Barr body to satellites and the nuclear periphery. *Semin. Cancer Biol.* 23, 99–108.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Vigneron, A., Stanojcic, S., Ganier, O., Peiffer, I., Rivals, E., Puy, A., Laurent-Chabalier, S., Desprat, R., et al. (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res.* 21, 1438–1449.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Puy, A., Rialle, S., Kaplan, N., Segal, E., and Méchali, M. (2012). New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle* 11, 658–667.
- Challberg, M.D., and Englund, P.T. (1979). The effect of template secondary structure of vaccinia DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 254, 7820–7826.
- Chan, K.L., Palmai-Pallag, T., Ying, S., and Hickson, I.D. (2009). Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* 11, 753–760.
- Chan, K.-L., North, P.S., and Hickson, I.D. (2007). BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* 26, 3397–3409.
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J.Y., Pope, B.D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S. a., Salama, R., Carroll, T., et al. (2012). Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. *Mol. Cell* 47, 203–214.

Chatterjee, S., Zagelbaum, J., Savitsky, P., Sturzenegger, A., Huttner, D., Janscak, P., Hickson, I.D., Gileadi, O., and Rothenberg, E. (2014). Mechanistic insight into the interaction of BLM helicase with intra-strand G-quadruplex structures. *Nat. Commun.* 5, 5556.

Chattopadhyay sharbani, and Bielinsky, A.K. (2007). Human Mcm10 regulates the catalytic subunit of DNA polymerase α and prevents DNA damage during replication. *Mol. Biol. Cell* 18, 2991–3001.

Chen, S., and Bell, S.P. (2011). CDK prevents Mcm2-7 helicase loading by inhibiting Cdt1 interaction with Orc6. *Genes Dev.* 25, 363–372.

Cheok, C.F., Bachrati, C.Z., Chan, K.L., Ralf, C., Wu, L., and Hickson, I.D. (2005). Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1456–1459.

Choo, K.H., Vissel, B., Nagy, a., Earle, E., and Kalitsis, P. (1991). A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res.* 19, 1979.

Chowdhury, a, Liu, G., Kemp, M., Chen, X., Katrangi, N., Myers, S., Ghosh, M., Yao, J., Gao, Y., Bubulya, P., et al. (2010). The DNA unwinding element binding protein DUE-B interacts with Cdc45 in preinitiation complex formation. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1495–1507.

Christensen, R.B. (1979). Ultraviolet-induced reversion. 397–408.

Christopher, F.J.H., and Shore, D. (1992). A RAP 1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. 801–814.

Chuang, J.H., and Li, H. (2004). Functional bias and spatial organization of genes in mutational hot and cold regions in the human genome. *PLoS Biol.* 2, 253–263.

Chuang, L.S.-H., Ian, H.-I., Koh, T.-W., Ng, H.-H., Xu, G., and Li, B.F.. (1997). Human DNA-(Cytosine-5) Methyltransferase-PCNA Complex as a Target for p21W. *Science* (80-.). 277, 1996–2000.

Cook, J.G., Chasse, D. a D., and Nevins, J.R. (2004). The Regulated Association of Cdt1 with Minichromosome Maintenance Proteins and Cdc6 in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 9625–9633.

Coquelle, a, Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G., and Debatisse, M. (1997). Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 89, 215–225.

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.

Corneo, G., Ginelli, E., Soave, C., and Bernardi, G. (1968a). Isolation and characterization of mouse and guinea pig satellite deoxyribonucleic acids. *Biochemistry* 7, 4373–4379.

Corneo, G., Ginelli, E., and Polli, E. (1968b). Isolation of the complementary strands of a human satellite DNA. *J. Mol. Biol.* 33, 331–335.

Corneo, G., Ginelli, E., and Polli, E. (1970). Repeated sequences in human DNA. *J. Mol. Biol.* 48, 319–327.

Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713–1716.

Cosgrove, A.J., Nieduszynski, C. a., and Donaldson, A.D. (2002). Ku complex controls the replication time of DNA in telomere regions. *Genes Dev.* 16, 2485–2490.

Crabbe, L., Verdun, R.E., Haggblom, C.I., and Karlseder, J. (2004). Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 306, 1951–1953.

Dai, J., Chuang, R.-Y., and Kelly, T.J. (2005). DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 337–342.

Das, S.P., Borrmann, T., Liu, V.W.T., Yang, S.C., Bechhoefer, J., and Rhind, N. (2015). Replication Timing is Regulated by the Number of MCMs Loaded at Origins. *Genome Res.*

Davenne, M., Maconochie, M.K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., and Rijli, F.M. (1999). *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* 22, 677–691.

Davidovich, C., Zheng, L., Goodrich, K.J., and Cech, T.R. (2013). Promiscuous RNA binding by Polycomb repressive complex 2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1250–1257.

Dayn, a, Samadashwily, G.M., and Mirkin, S.M. (1992). Intramolecular DNA triplexes: unusual sequence requirements and influence on DNA polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11406–11410.

Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2007). DNA polymerase η is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J. Exp. Med.* 204, 17–23.

Delgado, S., Gomez, M., Bird, a, and Antequera, F. (1998). Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J.* 17, 2426–2435.

Deng, W., Tsao, S.W., Guan, X.Y., and Cheung, A.L.M. (2012). Pericentromeric Regions Are Refractory To Prompt Repair after Replication Stress-Induced Breakage in HPV16 E6E7-Expressing Epithelial Cells. *PLoS One* 7.

DePamphilis, M.L. (2005). Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex. *Cell Cycle* 4, 70–79.

Deshpande, a M., and Newlon, C.S. (1996). DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* 272, 1030–1033.

Desprat, R., Thierry-mieg, D., Lailler, N., Lajugie, J., Schildkraut, C., Thierry-mieg, J., and Bouhassira, E.E. (2009). Predictable dynamic program of timing of DNA replication in human cells Predictable dynamic program of timing of DNA replication in human cells. *Genome Res.* 2288–2299.

Devault, A., Vallen, E. a., Yuan, T., Green, S., Bensimon, A., and Schwob, E. (2002). Identification of Tah1/Sid2 as the ortholog of the replication licensing factor Cdt1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12, 689–694.

Dewar, J.M., Budzowska, M., and Walter, J.C. (2015). The mechanism of DNA replication termination in vertebrates.

Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 327, 26–47.

Dombroski, B. a, Mathias, S.L., Nanthakumar, E., Scott, a F., and Kazazian, H.H. (1991). Isolation of an active human transposable element. *Science* 254, 1805–1808.

Donley, N., and Thayer, M.J. (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.

- Downs, J. a, Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001–1004.
- Duboule, D., and Dollé, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8, 1497–1505.
- Duncker, B.P., Chesnokov, I.N., and McConkey, B.J. (2009). The origin recognition complex protein family. *Genome Biol.* 10, 214.
- Duzdevich, D., Warner, M.D., Ticau, S., Ivica, N.A., Bell, S.P., and Greene, E.C. (2015). The Dynamics of Eukaryotic Replication Initiation: Origin Specificity, Licensing, and Firing at the Single-Molecule Level. *Mol. Cell* 58, 483–494.
- Ebrahimi, H., Robertson, E.D., Taddei, A., Gasser, S.M., Donaldson, A.D., and Hiraga, S. (2010). Early initiation of a replication origin tethered at the nuclear periphery. *J. Cell Sci.* 123, 1015–1019.
- Eddy, S., Ketkar, A., Zafar, M.K., Maddukuri, L., Choi, J.-Y., and Eoff, R.L. (2014). Human Rev1 polymerase disrupts G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* 42, 3272–3285.
- Eivazova, E.R., Gavrilov, A., Pirozhkova, I., Petrov, A., Iarovaia, O. V., Razin, S. V., Lipinski, M., and Vassetzky, Y.S. (2009). Interaction in vivo between the Two Matrix Attachment Regions Flanking a Single Chromatin Loop. *J. Mol. Biol.* 386, 929–937.
- Elgin, S.C.R., and Reuter, G. (2013). Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Ellis, N. a, Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M., and German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83, 655–666.
- Ellis, N. a, Proytcheva, M., Sanz, M.M., Ye, T.Z., and German, J. (1999). Transfection of BLM into cultured bloom syndrome cells reduces the sister-chromatid exchange rate toward normal. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1368–1374.
- Esposito, G., Godindagger, I., Klein, U., Yaspo, M.L., Cumano, a, and Rajewsky, K. (2000). Disruption of the Rev3l-encoded catalytic subunit of polymerase zeta in mice results in early embryonic lethality. *Curr. Biol.* 10, 1221–1224.
- Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Minardi, S., Katou, Y., Kanoh, Y., Shirahige, K., Azvolinsky, A., Zakian, V. a., and Foiani, M. (2010). Replication Termination at Eukaryotic Chromosomes Is Mediated by Top2 and Occurs at Genomic Loci Containing Pausing Elements. *Mol. Cell* 39, 595–605.
- Farkash-Amar, S., and Simon, I. (2009). Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosom. Res.* 18, 115–125.
- Farkash-Amar, S., Lipson, D., Polßen, A., Goren, A., Helmstetter, C., Yakhini, Z., and Simon, I. (2008). Global organization of replication time zones of the mouse genome. *Genome Res.* 18, 1562–1570.
- Faust, C., Schumacher, a, Holdener, B., and Magnuson, T. (1995). The *eed* mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development* 121, 273–285.
- Ferguson, B.M., Brewer, B.J., Reynolds, a E., and Fangman, W.L. (1991). A yeast origin of replication is activated late in S phase. *Cell* 65, 507–515.
- 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.

- Ferraiuolo, M. a., Rousseau, M., Miyamoto, C., Shenker, S., Wang, X.Q.D., Nadler, M., Blanchette, M., and Dostie, J. (2010). The three-dimensional architecture of Hox cluster silencing. *Nucleic Acids Res.* *38*, 7472–7484.
- Finlan, L.E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J.R., and Bickmore, W. a. (2008). Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet.* *4*.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D’Errico, M., Simonelli, V., and Dogliotti, E. (2003). 8-Oxoguanine DNA damage: At the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* *531*, 127–139.
- Fortune, J.M., Pavlov, Y.I., Welch, C.M., Johansson, E., Burgers, P.M.J., and Kunkel, T. a. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* DNA Polymerase δ : High fidelity for base substitutions but lower fidelity for single- and multi-base deletions. *J. Biol. Chem.* *280*, 29980–29987.
- Francastel, C., Schübeler, D., Martin, D.I., and Groudine, M. (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 137–143.
- Frank-Kamenetskii, M.D., and Mirkin, S.M. (1995). Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 65–95.
- French, S. (1992). Consequences of replication fork movement through transcription units in vivo. *Science* *258*, 1362–1365.
- Fukuchi, K., Martin, G.M., and Monnat, R.J. (1989). Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5893–5897.
- Fuller, R.S., Funnell, B.E., and Kornberg, a (1984). The dnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (oriC) and other DNA sites. *Cell* *38*, 889–900.
- Fuss, J., and Linn, S. (2002). Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J. Biol. Chem.* *277*, 8658–8666.
- Garg, P., Stith, C.M., Majka, J., and Burgers, P.M.J. (2005). Proliferating cell nuclear antigen promotes translesion synthesis by DNA polymerase zeta. *J. Biol. Chem.* *280*, 23446–23450.
- Gari, K., Décaillot, C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and Constantinou, A. (2008). The Fanconi Anemia Protein FANCM Can Promote Branch Migration of Holliday Junctions and Replication Forks. *Mol. Cell* *29*, 141–148.
- Gavin Kimberley, Masumi, H., and Bruce, S. (1995). Conserved Initiator Proteins in Eukaryotes. *Science* (80-.). 0–4.
- 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.
- Giannone, R.J., McDonald, H.W., Hurst, G.B., Shen, R.F., Wang, Y., and Liu, Y. (2010). The protein network surrounding the human telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and POT1. *PLoS One* *5*, 34–39.
- Gibbs, P.E., McGregor, W.G., Maher, V.M., Nisson, P., and Lawrence, C.W. (1998). A human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* REV3 gene, which encodes the catalytic subunit of DNA polymerase zeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6876–6880.
- Gilson, E., and Géli, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 825–838.
- Glover, T.W., and Stein, C.K. (1987). Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. *Am. J. Hum. Genet.* *41*, 882–890.

- Gomes, X. V., and Burgers, P.M.J. (2001). ATP utilization by yeast replication factor C: I. ATP-mediated interaction with DNA and with proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 276, 34768–34775.
- Göndör, A., and Ohlsson, R. (2009). Replication timing and epigenetic reprogramming of gene expression: a two-way relationship? *Nat. Rev. Genet.* 10, 269–276.
- González Besteiro, M. a., and Gottifredi, V. (2015). The fork and the kinase: A DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 763, 168–180.
- Goren, A., and Cedar, H. (2003). Replicating by the clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 25–32.
- Grabowska, E., Wronska, U., Denkiewicz, M., Jaszczur, M., Respondek, A., Alabrudzinska, M., Suski, C., Makiela-Dzubska, K., Jonczyk, P., and Fijalkowska, I.J. (2014). Proper functioning of the GINS complex is important for the fidelity of DNA replication in yeast. *Mol. Microbiol.* 92, 659–680.
- Graham, a, Papalopulu, N., and Krumlauf, R. (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57, 367–378.
- Gregan, J., Lindner, K., Brimage, L., Franklin, R., Namdar, M., Hart, E.A., Aves, S.J., and Kearsey, S.E. (2003). Fission Yeast Cdc23/Mcm10 Functions after Pre- replicative Complex Formation To Promote Cdc45 Chromatin Binding. *Mol. Biol. Cell* 14, 3876–3887.
- Grewal, S.I.S., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8, 35–46.
- Grewal, S.I.S., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798–802.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair. *Cell* 128, 721–733.
- Gruss, C., Wu, J., Koller, T., and Sogo, J.M. (1993). Disruption of the nucleosomes at the replication fork. *EMBO J.* 12, 4533–4545.
- Guan, Z., Hughes, C.M., Kosiyatrakul, S., Norio, P., Sen, R., Fiering, S., Allis, C.D., Bouhassira, E.E., and Schildkraut, C.L. (2009). Decreased replication origin activity in temporal transition regions. *J. Cell Biol.* 187, 623–635.
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., and Almouzni, G. (2004). Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J. Cell Biol.* 166, 493–505.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L. a., Jaenisch, R., and Young, R. a. (2007). A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell* 130, 77–88.
- Guilbaud, G., Rappailles, A., Baker, A., Chen, C.L., Arneodo, A., Goldar, A., d'Aubenton-Carafa, Y., Thermes, C., Audit, B., and Hyrien, O. (2011). Evidence for sequential and increasing activation of replication origins along replication timing gradients in the human genome. *PLoS Comput. Biol.* 7.
- Gunjan, A., and Verreault, A. (2003). A Rad53 Kinase-Dependent Surveillance Mechanism that Regulates Histone Protein Levels in *S. cerevisiae*. *Cell* 115, 537–549.
- Guo, C., Fischhaber, P.L., Luk-Paszyc, M.J., Masuda, Y., Zhou, J., Kamiya, K., Kisker, C., and Friedberg, E.C. (2003). Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *EMBO J.* 22, 6621–6630.
- Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A.Y., Eck, S., Wörz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J.P., Mäyser, A., et al. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesion recruitment to heterochromatin. *Genes Dev.* 27, 859–872.

- Hansen, R.S., Thomas, S., Sandstrom, R., Canfield, T.K., Thurman, R.E., Weaver, M., Dorschner, M.O., Gartler, S.M., and Stamatooyannopoulos, J. a (2010). Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 139–144.
- Haracska, L., Unk, I., Johnson, R.E., Johansson, E., Burgers, P.M., Prakash, S., and Prakash, L. (2001). Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev.* *15*, 945–954.
- Haracska, L., Prakash, S., and Prakash, L. (2002). Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* *277*, 15546–15551.
- Harding, K., Wedeen, C., McGinnis, W., and Levine, M. (1985). Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science* *229*, 1236–1242.
- Harfe, B.D., and Jinks-Robertson, S. (2000). DNA polymerase ζ introduces multiple mutations when bypassing spontaneous DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* *6*, 1491–1499.
- Heichinger, C., Penkett, C.J., Bähler, J., and Nurse, P. (2006). Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* *25*, 5171–5179.
- Henderson, A., Wu, Y., Huang, Y.C., Chavez, E. a., Platt, J., Johnson, F.B., Brosh, R.M., Sen, D., and Lansdorp, P.M. (2014). Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *42*, 860–869.
- Heun, P., Laroche, T., Raghuraman, M.K., and Gasser, S.M. (2001). The positioning and dynamics of origins of replication in the budding yeast nucleus. *J. Cell Biol.* *152*, 385–400.
- Hewish, D.R., and Burgoyne, L. a (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *52*, 504–510.
- Hirano, Y., and Sugimoto, K. (2006). ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase ζ -Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Curr. Biol.* *16*, 586–590.
- Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Yokochi, T., Schwaiger, M., Chang, C.W., Lyou, Y., Townes, T.M., Schübeler, D., and Gilbert, D.M. (2008). Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol.* *6*, 2220–2236.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* *419*, 135–141.
- Hogg, M., Sauer-Eriksson, a. E., and Johansson, E. (2012). Promiscuous DNA synthesis by human DNA polymerase θ . *Nucleic Acids Res.* *40*, 2611–2622.
- Hori, Y., Shirahige, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. (1996). Characterization of a novel CDC gene (ORC1) partly homologous to CDC6 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *7*, 409–418.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Durkin, S.G., D'Andrea, A.D., and Glover, T.W. (2005). The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 693–701.
- Huang, S., Li, B., Gray, M.D., Oshima, J., Mian, I.S., and Campisi, J. (1998). The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nat. Genet.* *20*, 114–116.
- Huang, S., Zhou, H., Katzmann, D., Hochstrasser, M., Atanasova, E., and Zhang, Z. (2005). Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13410–13415.
- Huang, S., Zhou, H., Tarara, J., and Zhang, Z. (2007). A novel role for histone chaperones CAF-1 and Rtt106p in heterochromatin silencing. *EMBO J.* *26*, 2274–2283.

- Hübner, M.R., Eckersley-Maslin, M. a, and Spector, D.L. (2013). Chromatin organization and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 89–95.
- Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 33, 2908–2916.
- Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2007). G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 35, 406–413.
- Hurley, I., Hale, M.E., and Prince, V.E. (2005). Duplication events and the evolution of segmental identity. *Evol. Dev.* 7, 556–567.
- Hyrien, O., Marheineke, K., and Goldar, A. (2003). Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem. *BioEssays* 25, 116–125.
- Iftode, C., and Borowiec, J. a (1998). Unwinding of origin-specific structures by human replication protein A occurs in a two-step process. *Nucleic Acids Res.* 26, 5636–5643.
- Izumi, M., Yanagi, K., Mizuno, T., Yokoi, M., Kawasaki, Y., Moon, K.Y., Hurwitz, J., Yatagai, F., and Hanaoka, F. (2000). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G(2) phase. *Nucleic Acids Res.* 28, 4769–4777.
- Jasencakova, Z., and Groth, A. (2010a). Restoring chromatin after replication: How new and old histone marks come together. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 231–237.
- Jasencakova, Z., and Groth, A. (2010b). Replication stress, a source of epigenetic aberrations in cancer? *BioEssays* 32, 847–855.
- Jasencakova, Z., Scharf, A.N.D., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G., and Groth, A. (2010). Replication Stress Interferes with Histone Recycling and Predeposition Marking of New Histones. *Mol. Cell* 37, 736–743.
- Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R.C., Workman, J.L., Conaway, J.W., and Kusch, T. (2005). In and out: Histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30, 680–687.
- Johansson, E., and Dixon, N. (2013). Replicative DNA polymerases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3–6.
- Johnson, R.E., Kondratieck, C.M., Prakash, S., and Prakash, L. (1999). hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* 285, 263–265.
- Johnson, R.E., Washington, M.T., Haracska, L., Prakash, S., and Prakash, L. (2000). Eukaryotic polymerases ι and ζ act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* 406, 1015–1019.
- Johnson, R.E., Prakash, L., and Prakash, S. (2012). Pol31 and Pol32 subunits of yeast DNA polymerase δ are also essential subunits of DNA polymerase ϵ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12455–12460.
- Johnson, R.E., Klassen, R., Prakash, L., and Prakash, S. (2015). A Major Role of DNA Polymerase δ in Replication of Both the Leading and Lagging DNA Strands. *Mol. Cell* 59, 163–175.
- Juan, A.H., and Ruddle, F.H. (2003). Enhancer timing of Hox gene expression: deletion of the endogenous Hoxc8 early enhancer. *Development* 130, 4823–4834.
- Julienne, H., Zoufir, A., Audit, B., and Arneodo, A. (2013). Human Genome Replication Proceeds through Four Chromatin States. *PLoS Comput. Biol.* 9.

- Kaneko, S., Bonasio, R., Saldaña-Meyer, R., Yoshida, T., Son, J., Nishino, K., Umezawa, A., and Reinberg, D. (2014). Interactions between JARID2 and Noncoding RNAs Regulate PRC2 Recruitment to Chromatin. *Mol. Cell* 53, 290–300.
- Kannouche, P.L., and Lehmann, A.R. (2004). Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* 3, 1011–1013.
- Kannouche, P.L., Wing, J., and Lehmann, A.R. (2004). Interaction of Human DNA Polymerase η with Monoubiquitinated PCNA. *Mol. Cell* 14, 491–500.
- Karnani Neerja, Christopher M. Taylor, Ankit Malhotra, and A.D. (2009). Genomic Study of Replication Initiation in Human Chromosomes Reveals the Influence of Transcription Regulation and Chromatin Structure on Origin Selection. *Mol. Biol. Cell* 21, 4042–4056.
- Karow, J., Chakraverty, Hickson, R., and I, D. (1997). The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. 30611–30614.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* 81, 1105–1114.
- Kawamura, K., O-Wang, J., Bahar, R., Koshikawa, N., Shishikura, T., Nakagawara, A., Sakiyama, S., Kajiwar, K., Kimura, M., and Tagawa, M. (2001). The error-prone DNA polymerase zeta catalytic subunit (Rev3) gene is ubiquitously expressed in normal and malignant human tissues. *Int. J. Oncol.* 18, 97–103.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S.I., and Sugino, A. (2000). Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* 5, 975–989.
- Keck, K., and Pemberton, L.. (2013). Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly. *Biochim. Biophys. Acta -* 1819, 277–289.
- Kenna, M., Amaya, E., and Bloom, K. (1988). Selective Excision of the Centromere Chromatin Complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 107, 9–15.
- Khochbin, S. (2001). Histone H1 diversity: Bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271, 1–12.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., and Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36, 5678–5694.
- Kit, S. (1961). Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J. Mol. Biol.* 3, 711–716.
- Klemm, R.D., and Bell, S.P. (2001). ATP bound to the origin recognition complex is important for preRC formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8361–8367.
- Klinge, S., Núñez-Ramírez, R., Llorca, O., and Pellegrini, L. (2009). 3D architecture of DNA Pol alpha reveals the functional core of multi-subunit replicative polymerases. *EMBO J.* 28, 1978–1987.
- Kmita, M., and Duboule, D. (2003). Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 301, 331–333.
- Kochenova, O. V., Dae, D.L., Mertz, T.M., and Shcherbakova, P. V. (2015). DNA Polymerase ζ -Dependent Lesion Bypass in *Saccharomyces cerevisiae* Is Accompanied by Error-Prone Copying of Long Stretches of Adjacent DNA. *PLOS Genet.* 11, e1005110.

- Kondo, T., and Duboule, D. (1999). Breaking colinearity in the mouse HoxD complex. *Cell* 97, 407–417.
- Koren, A., Polak, P., Nemesh, J., Michaelson, J.J., Sebat, J., Sunyaev, S.R., and McCarroll, S. a. (2012). Differential relationship of DNA replication timing to different forms of human mutation and variation. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 1033–1040.
- Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285–294.
- Krasilnikov, A.S., Panyutin, I.G., Samadashwily, G.M., Cox, R., Lazurkin, Y.S., and Mirkin, S.M. (1997). Mechanisms of triplex-caused polymerization arrest. *Nucleic Acids Res.* 25, 1339–1346.
- Kremer, E.J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S.T., Schlessinger, D., Sutherland, G.R., and Richards, R.I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* 252, 1711–1714.
- Krishna, T.S., Kong, X.P., Gary, S., Burgers, P.M., and Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79, 1233–1243.
- Kubota, Y., Mimura, S., Nishimoto, S.I., Masuda, T., Nojima, H., and Takisawa, H. (1997). Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in *Xenopus* eggs. *EMBO J.* 16, 3320–3331.
- Kumagai, a, and Dunphy, W.G. (2000). Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* 6, 839–849.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124, 943–955.
- Kunkel, T. a. (2011). Balancing eukaryotic replication asymmetry with replication fidelity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 620–626.
- Kuraoka, I., Robins, P., Masutani, C., Hanaoka, F., Gasparutto, D., Cadet, J., Wood, R.D., and Lindahl, T. (2001). Oxygen free radical damage to DNA. Translesion synthesis by human DNA polymerase eta and resistance to exonuclease action at cyclopurine deoxynucleoside residues. *J. Biol. Chem.* 276, 49283–49288.
- Labib, K. (2010). Howdo Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev.* 24, 1208–1219.
- 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.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lange, S.S., Wittschieben, J.P., and Wood, R.D. (2012). DNA polymerase zeta is required for proliferation of normal mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 4473–4482.
- Larivée, M., LeBel, C., and Wellinger, R.J. (2004). The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev.* 18, 1391–1396.
- Lawrence, C.W. (2004). Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv. Protein Chem.* 69, 167–203.
- Lee, C., Liachko, I., Bouten, R., Kelman, Z., and Tye, B.K. (2010). Alternative mechanisms for coordinating polymerase alpha and MCM helicase. *Mol. Cell. Biol.* 30, 423–435.

Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L. a., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K.I., et al. (2006). Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 125, 301–313.

Lee, Y.-S., Gregory, M.T., and Yang, W. (2014). Human Pol ζ purified with accessory subunits is active in translesion DNA synthesis and complements Pol η in cisplatin bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2954–2959.

Lehmann, a R., Kirk-Bell, S., Arlett, C.F., Paterson, M.C., Lohman, P.H., de Weerd-Kastelein, E. a, and Bootsma, D. (1975). Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 219–223.

Lehnertz, B., Ueda, Y., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, A.H.F.. (2003). Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Curr. Biol.* 13, 1317–1323.

Lemontt, J.F. (1971). Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. *Genetics* 68, 21–33.

Letessier, A., Millot, G. a, Koundrioukoff, S., Lachagès, A.-M., Vogt, N., Hansen, R.S., Malfoy, B., Brison, O., and Debatisse, M. (2011). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 470, 120–123.

Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M. a, Pals, G., et al. (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat. Genet.* 37, 934–935.

Levran, O., Attwooll, C., Henry, R.T., Milton, K.L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S.D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., et al. (2005). The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat. Genet.* 37, 931–933.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.

Lewis, R., and Kaufman, T.C. (1980). GENETIC ANALYSIS OF THE ANTENNAPEDIA GENE COMPLEX (ANT-C) AND ADJACENT CHROMOSOMAL REGIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*. I. POLYTENE CHROMOSOME SEGMENTS 84B-D. *Genetics* 95, 367–381.

Li, C.-J., and DePamphilis, M.L. (2002). Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol. Cell. Biol.* 22, 105–116.

Li, C., Vassilev, A., and Depamphilis, M.L. (2004). Role for Cdk1 (Cdc2)/ Cyclin A in Preventing the Mammalian Origin Recognition Complex ' s Largest Subunit (Orc1) from Binding to Chromatin during Mitosis Role for Cdk1 (Cdc2)/ Cyclin A in Preventing the Mammalian Origin Recognition Complex ' s Large. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5875–5888.

Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362–365.

Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P., and Wu, X. (2003). The SCFSkp2 ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J. Biol. Chem.* 278, 30854–30858.

Ling, H., Boudsocq, F., Woodgate, R., and Yang, W. (2001). Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: A mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell* 107, 91–102.

Litman, R., Peng, M., Jin, Z., Zhang, F., Zhang, J., Powell, S., Andreassen, P.R., and Cantor, S.B. (2005). BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCI. *Cancer Cell* 8, 255–265.

- 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, Y., Nielsen, C.F., Yao, Q., and Hickson, I.D. (2014). The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 26, 1–5.
- London, T.B.C., Barber, L.J., Mosedale, G., Kelly, G.P., Balasubramanian, S., Hickson, I.D., Boulton, S.J., and Hiom, K. (2008). FANCD1 is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts. *J. Biol. Chem.* 283, 36132–36139.
- Lönn, U., Lönn, S., Nylen, U., Lå, U., Lå, S., Vvinblad, G., and German, J. (1990). An Abnormal Profile of DNA Replication Intermediates in Bloom ' s Syndrome An Abnormal Profile of DNA Replication Intermediates in Bloom ' s Syndrome1. *Cancer Res.* 51, 3141–3145.
- López-Flores, I., and Garrido-Ramos, M. a. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn.* 7, 1–28.
- Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. *Mol. Cell* 24, 309–316.
- 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.
- Luger, K., Mäder, a W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J., et al. (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 243–253.
- LYON, M.F. (1962). Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 14, 135–148.
- Macas, J., Neumann, P., Novák, P., and Jiang, J. (2010). Global sequence characterization of rice centromeric satellite based on oligomer frequency analysis in large-scale sequencing data. *Bioinformatics* 26, 2101–2108.
- Maga, G., Frouin, I., Spadari, S., and Hübscher, U. (2001). Replication Protein A as a “Fidelity Clamp” for DNA Polymerase α . *J. Biol. Chem.* 276, 18235–18242.
- Mager, J., Montgomery, N.D., de Villena, F.P.-M., and Magnuson, T. (2003). Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nat. Genet.* 33, 502–507.
- Maine, G.T., Sinha, P., and Tye, B.W. (1984). Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* 106, 365–385.
- Maison, C., and Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 296–304.
- Maison, C., Quivy, J.P., Probst, a. V., and Almouzni, G. (2010). Heterochromatin at mouse pericentromeres a model for de novo heterochromatin formation and duplication during replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 155–165.
- Majka, J., Chung, B.Y., and Burgers, P.M.J. (2004). Requirement for ATP by the DNA damage checkpoint clamp loader. *J. Biol. Chem.* 279, 20921–20926.

- Makarova, A. V., Stodola, J.L., and Burgers, P.M. (2012). A four-subunit DNA polymerase ζ complex containing Pol δ accessory subunits is essential for PCNA-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* *40*, 11618–11626.
- Mallo, M., and Alonso, C.R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development* *140*, 3951–3963.
- Manthei, K. a., and Keck, J.L. (2013). The BLM dissolvasome in DNA replication and repair. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 4067–4084.
- Mareddy, S., Reddy, J., Babu, S., and Balan, P. (2013). Xeroderma pigmentosum: Man deprived of his right to light. *Sci. World J.* *2013*.
- Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G., and Labib, K. (2014). Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science* (80-.).
- Marshall, O.J., Chueh, A.C., Wong, L.H., and Choo, K.H.A. (2008). Neocentromeres: New Insights into Centromere Structure, Disease Development, and Karyotype Evolution. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 261–282.
- Martens, J.H. a, O’Sullivan, R.J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P., and Jenuwein, T. (2005). The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* *24*, 800–812.
- Masumoto, H., Nakano, M., and Ohzeki, J.I. (2004). The role of CENP-B and ??-satellite DNA: De novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. *Chromosom. Res.* *12*, 543–556.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, a, Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* *399*, 700–704.
- McCulloch, S.D., and Kunkel, T.A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Nature* *261*, 148–161.
- McDonald, J.P., Levine, A.S., and Woodgate, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics* *147*, 1557–1568.
- McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* *93*, 1043–1053.
- McGrath, J., and Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* *37*, 179–183.
- McMillan, T.J., Leatherman, E., Ridley, a, Shorrocks, J., Tobi, S.E., and Whiteside, J.R. (2008). Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. *J. Pharm. Pharmacol.* *60*, 969–976.
- Meaburn, K.J., and Misteli, T. (2007). Cell biology: chromosome territories. *Nature* *445*.
- Méchal, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 728–738.
- Méndez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.-Y., Hidaka, M., Tansey, W.P., and Stillman, B. (2002). Human Origin Recognition Complex Large Subunit Is Degraded by Ubiquitin-Mediated Proteolysis after Initiation of DNA Replication. *Mol. Cell* *9*, 481–491.

- Merchant, a M., Kawasaki, Y., Chen, Y., Lei, M., and Tye, B.K. (1997). A lesion in the DNA replication initiation factor Mcm10 induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 3261–3271.
- Metz, C.. (1938). Chromosome behavior, inheritance and sex determination in *Sciara*. *Am. Nat.* *72*, 485–520.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., and Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 7049–7053.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* *448*, 553–560.
- Mirkin, E. V, and Mirkin, S.M. (2007). Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *71*, 13–35.
- Mishmar, D., Rahat, a, Scherer, S.W., Nyakatura, G., Hinzmann, B., Kohwi, Y., Mandel-Gutfroind, Y., Lee, J.R., Drescher, B., Sas, D.E., et al. (1998). Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of a simian virus 40 integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8141–8146.
- Moindrot, B., Audit, B., Klous, P., Baker, A., Thermes, C., De Laat, W., Bouvet, P., Mongelard, F., and Arneodo, A. (2012). 3D chromatin conformation correlates with replication timing and is conserved in resting cells. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9470–9481.
- Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* *129*, 665–679.
- Morelli, C., Mungall, a J., Negrini, M., Barbanti-Brodano, G., and Croce, C.M. (1998). Alternative splicing, genomic structure, and fine chromosome localization of REV3L. *Cytogenet. Cell Genet.* *83*, 18–20.
- Morey, C., Da Silva, N.R., Perry, P., and Bickmore, W. a (2007). Nuclear reorganisation and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to Hox gene activation. *Development* *134*, 909–919.
- Morrison, a, Bell, J.B., Kunkel, T. a, and Sugino, a (1991). Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3'----5' exonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 9473–9477.
- Morrison, a., Christensen, R.B., Alley, J., Beck, a. K., Bernstein, E.G., Lemontt, J.F., and Lawrence, C.W. (1989). REV3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J. Bacteriol.* *171*, 5659–5667.
- Mulvihill, D.J., and Wang, Y.H. (2004). Two breakpoint clusters at fragile site FRA3B form phased nucleosomes. *Genome Res.* *14*, 1350–1357.
- Murakumo, Y., Ogura, Y., Ishii, H., Numata, S.I., Ichihara, M., Croce, C.M., Fishel, R., and Takahashi, M. (2001). Interactions in the Error-prone Postreplication Repair Proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J. Biol. Chem.* *276*, 35644–35651.
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y.S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ??, and GINS in budding yeast. *Genes Dev.* *24*, 602–612.
- Muzi-Falconi, M., Giannattasio, M., Foiani, M., and Plevani, P. (2003). The DNA polymerase alpha-primase complex: multiple functions and interactions. *ScientificWorldJournal.* *3*, 21–33.
- Nagano, T., Mitchell, J.A., Sanz, L.A., and Pauler, F.M. (2008). The Air Noncoding RNA Epigenetically Silences Transcription by Targeting G9a to Chromatin. *Science* (80-.). *322*, 1717–1720.

- Naim, V., and Rosselli, F. (2009). The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat. Cell Biol.* *11*, 761–768.
- Naim, V., Wilhelm, T., Debatisse, M., and Rosselli, F. (2013). ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1008–1015.
- Nair, D.T., Johnson, R.E., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A.K. (2005). Rev1 employs a novel mechanism of DNA synthesis using a protein template. *Science* *309*, 2219–2222.
- Nakaseko, Y., Goshima, G., Morishita, J., and Yanagida, M. (2001). M phase-specific kinetochore proteins in fission yeast: Microtubule-associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase. *Curr. Biol.* *11*, 537–549.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* *292*, 110–113.
- Neerja Karnani,* Christopher M. Taylor,*† Ankit Malhotra, and A.D. (2010). Genomic Study of Replication Initiation in Human Chromosomes Reveals the Influence of Transcription Regulation and Chromatin Structure on Origin Selection. *Mol. Biol. Cell* *21*, 4042–4056.
- Nehlin, J.O., Skovgaard, G.L., and Bohr, V. a (2000). The Werner syndrome. A model for the study of human aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *908*, 167–179.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W., and Hinkle, D.C. (1996a). Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature* *382*, 729–731.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W., and Hinkle, D.C. (1996b). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science* *272*, 1646–1649.
- Netz, D.J. a, Stith, C.M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Heide, M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M.J., Pierik, A.J., et al. (2012). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster f. *8*, 125–132.
- Neylon, C., Neylon, C., Kralicek, A. V, Kralicek, A. V, Hill, T.M., Hill, T.M., Dixon, N.E., and Dixon, N.E. (2005). Replication Termination in. *Society* *69*, 501–526.
- Nguyen, G.H., Tang, W., Robles, A.I., Beyer, R.P., Gray, L.T., Welsh, J. a, Schetter, A.J., Kumamoto, K., Wang, X.W., Hickson, I.D., et al. (2014). Regulation of gene expression by the BLM helicase correlates with the presence of G-quadruplex DNA motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *1*, 1–6.
- Nick McElhinny, S. a., Gordenin, D. a., Stith, C.M., Burgers, P.M.J., and Kunkel, T. a. (2008). Division of Labor at the Eukaryotic Replication Fork. *Mol. Cell* *30*, 137–144.
- Nielsen, A.L., Ortiz, J. a., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P., and Losson, R. (1999). Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* *18*, 6385–6395.
- Noordermeer, D., Leleu, M., Splinter, E., Rougemont, J., De Laat, W., and Duboule, D. (2011). The Dynamic Architecture of Hox Gene Clusters. *Science* (80-.). *334*, 222–225.
- Northam, M.R., Garg, P., Baitin, D.M., Burgers, P.M.J., and Shcherbakova, P. V (2006). A novel function of DNA polymerase zeta regulated by PCNA. *EMBO J.* *25*, 4316–4325.
- Northam, M.R., Robinson, H. a., Kochenova, O. V., and Shcherbakova, P. V. (2010). Participation of DNA polymerase ζ in replication of undamaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *184*, 27–42.

- Northam, M.R., Moore, E. a., Mertz, T.M., Binz, S.K., Stith, C.M., Stepchenkova, E.I., Wendt, K.L., Burgers, P.M.J., and Shcherbakova, P. V. (2014). DNA polymerases ζ and Rev1 mediate error-prone bypass of non-B DNA structures. *Nucleic Acids Res.* 42, 290–306.
- Nyberg, K. a, Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T. a (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617–656.
- Ohashi, E., Murakumo, Y., Kanjo, N., Akagi, J.I., Masutani, C., Hanaoka, F., and Ohmori, H. (2004). Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases. *Genes to Cells* 9, 523–531.
- Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M.G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., Mccue, P., Druck, T., et al. (1996). The FHIT Gene , Spanning the Chromosome 3p14 . 2 Fragile Site and Renal Carcinoma – Associated t (3 ; 8) Breakpoint , Is Abnormal in Digestive Tract Cancers. 84, 587–597.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D. a., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Olins, a L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330–332.
- Opresko, P.L., Von Kobbe, C., Laine, J.P., Harrigan, J., Hickson, I.D., and Bohr, V. a. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J. Biol. Chem.* 277, 41110–41119.
- Opresko, P.L., Otterlei, M., Graakjær, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kølvrå, S., May, A., Seidman, M.M., and Bohr, V. a. (2004). The werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell* 14, 763–774.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281–300.
- Oussatcheva, E. a., Pavlicek, J., Sankey, O.F., Sinden, R.R., Lyubchenko, Y.L., and Potaman, V.N. (2004). Influence of global DNA topology on cruciform formation in supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 338, 735–743.
- O-Wang, J., Kajiura, K., Kawamura, K., Kimura, M., Miyagishima, H., Koseki, H., and Tagawa, M. (2002). An essential role for REV3 in mammalian cell survival: Absence of REV3 induces p53-independent embryonic death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1132–1137.
- Palakodeti, A., Lucas, I., Jiang, Y., Young, D.J., Fernald, A. a., Karrison, T., and Le Beau, M.M. (2009). Impaired replication dynamics at the FRA3B common fragile site. *Hum. Mol. Genet.* 19, 99–110.
- Palumbo, E., Matricardi, L., Tosoni, E., Bensimon, A., and Russo, A. (2010). Replication dynamics at common fragile site FRA6E. *Chromosoma* 119, 575–587.
- Parada, L. a, McQueen, P.G., and Misteli, T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol.* 5, R44.
- Paulson, J.F., and Laemmli, U.K. (1977). Chromosomes of Histone-Depleted Metaphase. *Cell* 12, 817–828.
- Pavlov, Y.I., Shcherbakova, P. V., and Kunkel, T. a. (2001). In vivo consequences of putative active site mutations in yeast DNA polymerases α , ϵ , δ and ζ . *Genetics* 159, 47–64.
- Pchelintsev, N., McBryan, T., Rai, T., VanTuyn, J., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Adams, P. (2013). Placing the HIRA Histone Chaperone Complex in the Chromatin Landscape. *Cell Rep.* 3, 1012–1019.
- Pelizon, C., Madine, M. a., Romanowski, P., and Laskey, R. a. (2000). Unphosphorylatable mutants of Cdc6 disrupt its nuclear export but still support DNA replication once per cell cycle. *Genes Dev.* 14, 2526–2533.

- Perera, F., Tang, D., Whyatt, R., and Lederman, S.A. (2005). DNA Damage from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Measured by Benzo [a] pyrene-DNA Adducts in Mothers and Newborns from Northern Manhattan , The World Trade DNA Damage from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Measured by Benzo [a] pyrene-DNA Adducts in Mo. *14*.
- Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., WeiPolqshammer, 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.
- Petersen, B.O., Lukas, J., Sørensen, C.S., Bartek, J., and Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* *18*, 396–410.
- Picard, F., Cadoret, J.C., Audit, B., Arneodo, A., Alberti, A., Battail, C., Duret, L., and Prioleau, M.N. (2014). The Spatiotemporal Program of DNA Replication Is Associated with Specific Combinations of Chromatin Marks in Human Cells. *PLoS Genet.* *10*.
- Pinto, I., and Winston, F. (2000). Histone H2A is required for normal centromere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *19*, 1598–1612.
- Polizzi, C., and Clarke, L. (1991). The chromatin structure of centromeres from fission yeast: Differentiation of the central core that correlates with function. *J. Cell Biol.* *112*, 191–201.
- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* *28*, 1057–1068.
- Prosser, J., Frommer, M., Paul, C., and Vincent, P.C. (1986). Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J. Mol. Biol.* *187*, 145–155.
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundstrom, E.-B., Johansson, E., and Kunkel, T. a. (2007). Yeast DNA Polymerase Participates in Leading-Strand DNA Replication. *Science* (80-.). *317*, 127–130.
- Quah, S.K., Von Borstel, R.C., and Hastings, P.J. (1980). The origin of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *96*, 819–839.
- Quivy, J.-P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G. (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J.* *23*, 3516–3526.
- Rae, P.M.M., and Franke, W.W. (1972). The interphase distribution of satellite DNA-containing heterochromatin in mouse nuclei. *Chromosoma* *39*, 443–456.
- Rando, O.J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: Revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 148–155.
- Remus, D., and Diffley, J.F. (2009). Eukaryotic DNA replication control: Lock and load, then fire. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 771–777.
- Rey, L., Sidorova, J.M., Puget, N., Boudsocq, F., Biard, D.S.F., Monnat, R.J., Cazaux, C., and Hoffmann, J.-S. (2009). Human DNA polymerase ϵ is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3344–3354.
- Richards, R.I. (2001). Fragile and unstable chromosomes in cancer: Causes and consequences. *Trends Genet.* *17*, 339–345.

- Ricke, R.M., and Bielinsky, A.K. (2004). Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- δ . *Mol. Cell* 16, 173–185.
- Ried, K., Finniss, M., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Dayan, S., Nancarrow, J.K., Woollatt, E., Kremmidiotis, G., Gardner, a, Venter, D., et al. (2000). Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1651–1663.
- Roche, H., Gietz, R.D., and Kunz, B. a. (1994). Specificity of the yeast rev3 δ antimutator and REV3 dependency of the mutator resulting from a defect (rad1 δ) in nucleotide excision repair. *Genetics* 137, 637–646.
- Rodriguez, R., and Miller, K. (2012). Small molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nat. Chem.* ... 8, 301–310.
- Rolef Ben-Shahar, T., Castillo, A.G., Osborne, M.J., Borden, K.L.B., Kornblatt, J., and Verreault, A. (2009). Two fundamentally distinct PCNA interaction peptides contribute to chromatin assembly factor 1 function. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6353–6365.
- Romeo, K., Louault, Y., Cantaloube, S., Loiodice, I., Almouzni, G., and Quivy, J.-P. (2015). The SENP7 SUMO-Protease Presents a Module of Two HP1 Interaction Motifs that Locks HP1 Protein at Pericentric Heterochromatin. *Cell Rep.* 10, 771–782.
- Rumbaugh, J. a., Murante, R.S., Shi, S., and Bambara, R. a. (1997). Creation and removal of embedded ribonucleotides in chromosomal DNA during mammalian okazaki fragment processing. *J. Biol. Chem.* 272, 22591–22599.
- Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Singh, P.B., Friedman, J.R., Fredericks, W.J., and Rauscher, F.J. (1999). KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Krüppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4366–4378.
- Ryba, T., Hiratani, I., Lu, J., Itoh, M., Kulik, M., Zhang, J., Schulz, T.C., Robins, A.J., Dalton, S., and Gilbert, D.M. (2010). Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res.* 20, 761–770.
- Rytkönen, A.K., Vaara, M., Nethanel, T., Kaufmann, G., Sormunen, R., Läärä, E., Nasheuer, H.P., Rahmeh, A., Lee, M.Y.W.T., Syväoja, J.E., et al. (2006). Distinctive activities of DNA polymerases during human DNA replication. *FEBS J.* 273, 2984–3001.
- Sacco, E., Hasan, M.M., Alberghina, L., and Vanoni, M. (2012). Comparative analysis of the molecular mechanisms controlling the initiation of chromosomal DNA replication in yeast and in mammalian cells. *Biotechnol. Adv.* 30, 73–98.
- Saha, P., Chen, J., Thome, K.C., Lawlis, S.J., Hou, Z.H., Hendricks, M., Parvin, J.D., and Dutta, a (1998). Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2758–2767.
- Sakamoto, A.N., Stone, J.E., Kissling, G.E., McCulloch, S.D., Pavlov, Y.I., and Kunkel, T. a. (2007). Mutator alleles of yeast DNA polymerase ζ . *DNA Repair (Amst).* 6, 1829–1838.
- Sale, J.E., Lehmann, A.R., and Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat. Publ. Gr.* 13, 141–152.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A., Sheriff, J., Bernstein, B., Emre, T., Scheiber, S., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407–411.

- Sarkies, P., Reams, C., Simpson, L.J., and Sale, J.E. (2010). Epigenetic Instability due to Defective Replication of Structured DNA. *Mol. Cell* 40, 703–713.
- Sarkies, P., Murat, P., Phillips, L.G., Patel, K.J., Balasubramanian, S., and Sale, J.E. (2012). FANCI coordinates two pathways that maintain epigenetic stability at G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* 40, 1485–1498.
- Sawyer, S.L., Cheng, I.H., Chai, W., and Tye, B.K. (2004). Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 340, 195–202.
- Scheffer, M.P., Eltsov, M., and Frangakis, a. S. (2011). Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16992–16997.
- Van Schendel, R., Roerink, S.F., Portegijs, V., van den Heuvel, S., and Tijsterman, M. (2015). Polymerase Θ is a key driver of genome evolution and of CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis. *Nat. Commun.* 6, 7394.
- Schoeftner, S., and Blasco, M. a (2009). A “higher order” of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J.* 28, 2323–2336.
- Schorderet, P., and Duboule, D. (2011). Structural and functional differences in the long non-coding RNA hotair in mouse and human. *PLoS Genet.* 7, 1–10.
- 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.
- Schroth, G.P., and Hof, P.S. (1992). Mapping Z-DNA in the Human Genome. 267, 11846–11855.
- Schübeler, D., Scalzo, D., Kooperberg, C., van Steensel, B., Delrow, J., and Groudine, M. (2002). Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat. Genet.* 32, 438–442.
- Schwab, R. a., Nieminuszczy, J., Shin-ya, K., and Niedzwiedz, W. (2013). FANCI couples replication past natural fork barriers with maintenance of chromatin structure. *J. Cell Biol.* 201, 33–48.
- Schwaiger, M., and Schübeler, D. (2006). A question of timing: Emerging links between transcription and replication. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 177–183.
- Seki, M., Marini, F., and Wood, R.D. (2003). POLQ (Pol ??), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 6117–6126.
- Seki, M., Gearhart, P.J., and Wood, R.D. (2005). DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Rep.* 6, 1143–1148.
- Semple, J.W., Da-Silva, L.F., Jarvis, E.J., Ah-Kee, J., Al-Attar, H., Kummer, L., Heikkila, J.J., Pasero, P., and Duncker, B.P. (2006). An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. *EMBO J.* 25, 5150–5158.
- Senga, T., Sivaprasad, U., Zhu, W., Jong, J.P., Arias, E.E., Walter, J.C., and Dutta, A. (2006). PCNA is a cofactor for CDT1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 281, 6246–6252.
- Shcherbakova, P. V., Pavlov, Y.I., Chilkova, O., Rogozin, I.B., Johansson, E., and Kunkel, T. a. (2003). Unique Error Signature of the Four-subunit Yeast DNA Polymerase ϵ . *J. Biol. Chem.* 278, 43770–43780.
- Shen, J.C., and Loeb, L. a. (2001). Unwinding the molecular basis of the Werner syndrome. *Mech. Ageing Dev.* 122, 921–944.

- Shen, J.C., Gray, M.D., Oshima, J., and Loeb, L. a. (1998). Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: Directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A. *Nucleic Acids Res.* 26, 2879–2885.
- Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 96, 575–585.
- Shimizu, Y., Ikeda, S., Fujimori, M., Kodama, S., Nakahara, M., Okajima, M., and Asahara, T. (2002). Molecular characterization of FRAXB and comparative common fragile site instability in cancer cells. *Genes Chromosom. Cancer* 33, 82–92.
- Siddiqui, K., On, K.F., and Diffley, J.F.X. (2013). Regulating DNA replication in Eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Simi, S., Simili, M., Bonatti, S., Campagna, M., and Abbondandolo, a. (1998). Fragile sites at the centromere of Chinese hamster chromosomes: A possible mechanism of chromosome loss. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 397, 239–246.
- Singer, M.S., Kahana, A., Wolf, A.J., Meisinger, L.L., Peterson, S.E., Goggin, C., Mahowald, M., and Gottschling, D.E. (1998). Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 613–632.
- Singh, R.K., Kabbaj, M.-H.M., Paik, J., and Gunjan, A. (2009). Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. *Nat. Cell Biol.* 11, 925–933.
- Sloun, P.P.H. Van, Varlet, I., Sonneveld, E., Boei, J.W. a, Romeijn, R.J., Eeken, J.C.J., De, N., Boei, J.J.W. a, and Wind, N. De (2002). Involvement of Mouse Rev3 in Tolerance of Endogenous and Exogenous DNA Damage Involvement of Mouse Rev3 in Tolerance of Endogenous and Exogenous DNA Damage. 22, 2159–2169.
- Van Sloun, P.P., Romeijn, R.J., and Eeken, J.C. (1999). Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of the mouseRev3l gene, encoding the catalytic subunit of polymerase zeta. *Mutat. Res.* 433, 109–116.
- Smit, a. F. a (1996). The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 743–748.
- Smith, D.I., McAvoy, S., Zhu, Y., and Perez, D.S. (2007). Large common fragile site genes and cancer. *Semin. Cancer Biol.* 17, 31–41.
- Sommers, J. a., Banerjee, T., Hinds, T., Wan, B., Wold, M.S., Lei, M., and Brosh, R.M. (2014). Novel function of the fanconi anemia group J or RECQ1 helicase to disrupt protein-DNA complexes in a replication protein A-stimulated manner. *J. Biol. Chem.* 289, 19928–19941.
- Soshnikova, N., and Duboule, D. (2009). Epigenetic temporal control of mouse Hox genes in vivo. *Science* 324, 1320–1323.
- Soudet, J., Jolivet, P., and Teixeira, M.T. (2014). Elucidation of the DNA end-replication problem in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 53, 954–964.
- Stamatoyannopoulos, J. a, Adzhubei, I., Thurman, R.E., Kryukov, G. V, Mirkin, S.M., and Sunyaev, S.R. (2009). Human mutation rate associated with DNA replication timing. *Nat. Genet.* 41, 393–395.
- Stevenson, J.B., and Gottschling, D.E. (1999). Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev.* 13, 146–151.

- Stiborová, M., Moserová, M., Černá, V., Indra, R., Dračinský, M., Šulc, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H., et al. (2014). Cytochrome b5 and epoxide hydrolase contribute to benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH:P450 oxidoreductase conditions. *Toxicology* 318, 1–12.
- Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 1428–1435.
- Stone, J., Lujan, S.A., and Kunkel, T.A. (2012). DNA Polymerase ζ Generates Clustered Mutations During Bypass of Endogenous DNA Lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 229–235.
- Sugimoto, N., Kitabayashi, I., Osano, S., Tatsumi, Y., Yugawa, T., Narusawa-Saito, M., Matsukage, A., Kiyono, T., and Fujita, M. (2008). Identification of Novel Human Cdt1-binding Proteins by a Proteomics Approach: Proteolytic Regulation by APC/CCd. *Mol. Biol. Cell* 19, 1007–1021.
- Sun, H., Karow, J.K., Hickson, I.D., and Maizels, N. (1998). The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.* 273, 27587–27592.
- Sutherland, G.R., Baker, E., and Richards, R.I. (1998). Fragile sites still breaking. *Trends Genet.* 14, 501–506.
- 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.
- Takeda, D.Y., Parvin, J.D., and Dutta, A. (2005). Degradation of Cdt1 during S phase is Skp2-independent and is required for efficient progression of mammalian cells through S phase. *J. Biol. Chem.* 280, 23416–23423.
- Tanaka, S., and Araki, H. (2013). Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–14.
- Tanaka, S., and Diffley, J.F.X. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat. Cell Biol.* 4, 198–207.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 328–332.
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2003). The ORC1 cycle in human cells: I. Cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J. Biol. Chem.* 278, 41528–41534.
- Thoma Koller, T., Klug, A., F. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403–427.
- Thu, Y.M., and Bielinsky, A.K. (2013). Enigmatic roles of Mcm10 in DNA replication. *Trends Biochem. Sci.* 38, 184–194.
- Ticau, S., Friedman, L.J., Ivica, N.A., Gelles, J., and Bell, S.P. (2015). Single-Molecule Studies of Origin Licensing Reveal Mechanisms Ensuring Bidirectional Helicase Loading. *Cell* 161, 513–525.
- Tissier, A., Kannouche, P., Reck, M.P., Lehmann, A.R., Fuchs, R.P.P., and Cordonnier, A. (2004). Co-localization in replication foci and interaction of human Y-family members, DNA polymerase pol η and REV1 protein. *DNA Repair (Amst)*. 3, 1503–1514.
- Tomas-Roca, L., Tsaalbi-Shtylik, A., Jansen, J.G., Singh, M.K., Epstein, J. a., Altunoglu, U., Verzijl, H., Soria, L., van Beusekom, E., Roscioli, T., et al. (2015). De novo mutations in PLXND1 and REV3L cause Möbius syndrome. *Nat. Commun.* 6, 7199.

- Tomida, J., Takata, K. -i., Lange, S.S., Schibler, a. C., Yousefzadeh, M.J., Bhetawal, S., Dent, S.Y.R., and Wood, R.D. (2015). REV7 is essential for DNA damage tolerance via two REV3L binding sites in mammalian DNA polymerase . *Nucleic Acids Res.* *43*, 1000–1011.
- Torras-Llort, M., Moreno-Moreno, O., and Azorín, F. (2009). Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J.* *28*, 2337–2348.
- Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Mol. Cell* *28*, 1–13.
- Tsantoulis, P.K., Kotsinas, a, Sfrikakis, P.P., Evangelou, K., Sideridou, M., Levy, B., Mo, L., Kittas, C., Wu, X.-R., Papavassiliou, a G., et al. (2008). Oncogene-induced replication stress preferentially targets common fragile sites in preneoplastic lesions. A genome-wide study. *Oncogene* *27*, 3256–3264.
- Tsao, C.-C., Geisen, C., and Abraham, R.T. (2004). Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling. *EMBO J.* *23*, 4660–4669.
- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* *402*, 555–560.
- Unsal-Kaçmaz, K., Chastain, P.D., Qu, P.-P., Minoo, P., Cordeiro-Stone, M., Sancar, A., and Kaufmann, W.K. (2007). The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3131–3142.
- Usdin, K., and Woodford, K.J. (1995). CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* *23*, 4202–4209.
- Vaara, M., Itkonen, H., Hillukkala, T., Liu, Z., Nasheuer, H.P., Schaarschmidt, D., Pospiech, H., and Syväoja, J.E. (2012). Segregation of replicative DNA polymerases during S phase: DNA polymerase ϵ , but not DNA polymerases α/δ , are associated with lamins throughout S phase in human cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 33327–33338.
- Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: New pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* *14*, 1430–1438.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* *87*, 95–104.
- Voloshin, O.N., Mirkin, S.M., Lyamichev, V.I., Belotserkovskii, B.P., and Frank-Kamenskii, M.D. (1988). Chemical probing of homurine-homopyrimidine mirror repeats in supercoiled DNA. *Nature* *336*, 403–405.
- Wade, P. a., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1997). Histone acetylation: Chromatin in action. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 128–132.
- Walsh, E., Wang, X., Lee, M.Y., and Eckert, K. a. (2013). Mechanism of replicative DNA polymerase delta pausing and a potential role for DNA polymerase kappa in common fragile site replication. *J. Mol. Biol.* *425*, 232–243.
- Wan, L. Ben, and Bartolomei, M.S. (2008). Chapter 7 Regulation of Imprinting in Clusters: Noncoding RNAs Versus Insulators. *Adv. Genet.* *61*, 207–223.
- Wang, B., Feng, L., Hu, Y., Huang, S.H., Reynolds, C.P., Wu, L., and Jong, a Y. (1999). The essential role of *Saccharomyces cerevisiae* CDC6 nucleotide-binding site in cell growth, DNA-synthesis, and Orc1 association. *J. Biol. Chem.* *274*, 8291–8298.
- Wang, G., Christensen, L. a, and Vasquez, K.M. (2006). Z-DNA-forming sequences generate large-scale deletions in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2677–2682.

- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* *431*, 862–868.
- Wang, J., Mager, J., Schnedier, E., and Magnuson, T. (2002). The mouse PcG gene *eed* is required for Hox gene repression and extraembryonic development. *Mamm. Genome* *13*, 493–503.
- Warren, E.M., Huang, H., Fanning, E., Chazin, W.J., and Eichman, B.F. (2009). Physical interactions between Mcm10, DNA, and DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* *284*, 24662–24672.
- Watanabe, Y., and Maekawa, M. (2010). Spatiotemporal regulation of DNA replication in the human genome and its association with genomic instability and disease. *Curr. Med. Chem.* *17*, 222–233.
- Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H., and Yamaizumi, M. (2004). Rad18 guides pol ϵ to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J.* *23*, 3886–3896.
- Watt, F., and Molloy, P.L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* *2*, 1136–1143.
- Weaver, D.T., and DePamphilis, M.L. (1984). The role of palindromic and non-palindromic sequences in arresting DNA synthesis in vitro and in vivo. *J. Mol. Biol.* *180*, 961–986.
- Weitzmann, M.N., Woodford, K.J., and Usdin, K. (1997). DNA secondary structures and the evolution of hypervariable tandem arrays. *J. Biol. Chem.* *272*, 9517–9523.
- Wilke, C.M., Guo, S.-W., Hall, B.K., Boldog, F., Gemmill, R.M., and Glover, T.W. (1994). Multicolor FISH mapping of YAC clones in 3p14 and identification of a YAC spanning both FRA3B and the t(3;8) associated with hereditary renal cell carcinoma.
- Wittschieben, J., Shivji, M.K., Lalani, E., Jacobs, M. a, Marini, F., Gearhart, P.J., Rosewell, I., Stamp, G., and Wood, R.D. (2000). Disruption of the developmentally regulated Rev3l gene causes embryonic lethality. *Curr. Biol.* *10*, 1217–1220.
- Wittschieben, J.P., Reshmi, S.C., Gollin, S.M., and Wood, R.D. (2006). Loss of DNA polymerase zeta causes chromosomal instability in mammalian cells. *Cancer Res.* *66*, 134–142.
- Wittschieben, J.P., Patil, V., Glushets, V., Robinson, L.J., Kusewitt, D.F., and Wood, R.D. (2009). Loss of DNA polymerase zeta enhances spontaneous tumorigenesis. *27*, 417–428.
- 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.
- Wohlschlegel, J. a., Dhar, S.K., Prokhorova, T. a., Dutta, A., and Walter, J.C. (2002). Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol. Cell* *9*, 233–240.
- Wolffe, a P., and Pruss, D. (1996). Hanging on to histones. *Chromatin. Curr. Biol.* *6*, 234–237.
- Woodcock, C.L. (1994). Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length. *J. Cell Biol.* *125*, 11–19.
- Woodcock, C.L., and Dimitrov, S. (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 130–135.
- Woodfine, K., Fiegler, H., Beare, D.M., Collins, J.E., McCann, O.T., Young, B.D., Debernardi, S., Mott, R., Dunham, I., and Carter, N.P. (2004). Replication timing of the human genome. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 191–202.

- Woodfine, K., Beare, D.M., Ichimura, K., Debernardi, S., Mungall, A.J., Fiegler, H., Collins, V.P., Carter, N.P., and Dunham, I. (2005). Replication timing of human chromosome 6. *Cell Cycle* 4, 172–176.
- Woodford, K.J., Howell, R.M., and Usdin, K. (1994). A novel K⁺-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 269, 27029–27035.
- 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.
- Wu, Y., Shin-ya, K., and Brosh, R.M. (2008). FANCDJ helicase defective in Fanconi anemia and breast cancer unwinds G-quadruplex DNA to defend genomic stability. *Mol. Cell Biol.* 28, 4116–4128.
- Yaffe, E., Farkash-Amar, S., Polnen, A., Yakhini, Z., Tanay, A., and Simon, I. (2010). Comparative analysis of DNA replication timing reveals conserved large-scale chromosomal architecture. *PLoS Genet.* 6, 1–12.
- Yamane, K., Mizuguchi, T., Cui, B., Zofall, M., Noma, K.I., and Grewal, S.I.S. (2011). Asf1/HIRA facilitate global histone deacetylation and associate with HP1 to promote nucleosome occupancy at heterochromatic loci. *Mol. Cell* 41, 56–66.
- 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.
- Young, N.L., DiMaggio, P. a., and Garcia, B. a. (2010). The significance, development and progress of high-throughput combinatorial histone code analysis. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3983–4000.
- Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., et al. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272, 258–262.
- Zander, L., and Bemark, M. (2004). Immortalized mouse cell lines that lack a functional Rev3 gene are hypersensitive to UV irradiation and cisplatin treatment. *DNA Repair (Amst.)* 3, 743–752.
- Zeng, X., Winter, D.B., Kasmer, C., Kraemer, K.H., Lehmann, a R., and Gearhart, P.J. (2001). DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat. Immunol.* 2, 537–541.
- Zhang, H., and Freudenreich, C.H. (2007). An AT-Rich Sequence in Human Common Fragile Site FRA16D Causes Fork Stalling and Chromosome Breakage in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* 27, 367–379.
- Zhang, L., and Li, W.H. (2004). Mammalian Housekeeping Genes Evolve More Slowly than Tissue-Specific Genes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 236–239.
- Zhang, Y., Wu, X., Rechkoblit, O., Geacintov, N.E., Taylor, J.-S., and Wang, Z. (2002). Response of human REV1 to different DNA damage: preferential dCMP insertion opposite the lesion. *Nucleic Acids Res.* 30, 1630–1638.
- Zhong, X., Garg, P., Stith, C.M., McElhinny, S. a N., Kissling, G.E., Burgers, P.M.J., and Kunkel, T. a. (2006). The fidelity of DNA synthesis by yeast DNA polymerase zeta alone and with accessory proteins. *Nucleic Acids Res.* 34, 4731–4742.
- Zhu, Q., Pao, G., and Verma, I.M. (2011). BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature* 477, 179–184.
- Zorn, C., Cremer, C., Cremer, T., and Zimmer, J. (1979). Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. *Exp. Cell Res.* 124.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–1548.

PARTIE II

Etude des modalités de régulation de la polymérase spécialisée *êta* *via*
son domaine C-terminal

Avant-propos

Au cours de ma thèse, j'ai pu travailler sur une autre ADN polymérase translésionnelle, la polymérase η (Pol η). Pour cela, nous avons étudié spécifiquement un mutant de la protéine identifié chez un patient atteint de Xeroderma Pigmentosum de type variant (XP-V). La protéine mutante, appelée Pol η^{721} car possédant 721 acides-aminés au lieu de 713, présentait un temps de demi-vie anormalement court. Ceci nous a poussé à nous intéresser au mécanisme de dégradation de Pol η^{721} et, de manière plus générale, nous permettre de mieux comprendre le(s) système(s) de régulation par la protéolyse de la protéine Pol η . Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans DNA Repair qui vous est présenté plus loin.

A) Le xeroderma pigmentosum de type variant (XP-V)

La présence de l'ADN polymérase η (Pol η) dans la cellule est particulièrement importante dans le maintien de la stabilité génétique. Une mutation dans le gène codant pour cette polymérase provoque un syndrome appelé xeroderma pigmentosum variant (XP-V), une forme variante du syndrome xeroderma pigmentosum (XP).

2) Physiopathologie

C'est en 1970 que fut décrit par Ernest G. Jung le groupe xeroderma pigmentosum variant (XP-V), un sous-groupe de patients représentant 20% des cas XP. Cette maladie autosomale récessive se caractérise par une sensibilité accrue aux UV et une prédisposition au cancer de la peau mais qui se manifeste plus tard que pour les patients XP, c'est-à-dire plutôt vers l'âge de 20 ans. Il fallut attendre 1999 pour que le gène *POLH* impliqué dans le syndrome XP-V et codant Pol η soit mis en évidence par des méthodes de biochimie (Masutani et al., 1999a). Chez les patients XP-V, différentes mutations dans le gène *POLH* ont été mises en évidence.

2) Mutations fréquentes de Pol η et les cellules XP-V

De nombreuses mutations telles que des substitutions, des insertions ou des délétions de bases dans le gène codant Pol η menant à des protéines tronquées ont été décrites chez des patients XP-V. Une nouvelle mutation non-sens allongeant la protéine de 8 acides-aminés a été mise en évidence chez un patient XP-V. C'est d'ailleurs l'étude de ce mutant qui fait l'objet du premier article présenté.

Les cellules XP-V présentent des défauts de réplication ainsi qu'une mutagenèse accrue après irradiations aux UV (Lehmann et al., 1975; Sary et al., 2003). Il semblerait que cela soit dû au fait que d'autres polymérases translésionnelles (TLS) prennent le relais en absence de Pol η et soient plus mutagènes lors du passage au travers de la lésion TT-CPD (Ziv et al., 2009).

B) L'ADN polymérase spécialisée η (Pol η)

1) Fonction

Pol η , une protéine de 78 kDa, est codée par le gène *POLH* porté par le chromosome 6 et plus spécifiquement sur le brin court, au locus 21. Ce gène comprend 11 exons donnant un ARN messager (ARNm) de 2432 pb ayant une phase ouverte de lecture de 2139 pb. Ce gène est conservé chez tous les eucaryotes (de la levure à l'homme). Cette polymérase est spécialisée dans le franchissement fidèle de la plus abondante lésion induite par les rayons UV (les TT-

CPD) en incorporant deux adénines en face de la lésion (Johnson et al., 1999; Masutani et al., 1999b).

2) Structure et localisation cellulaire de Polη

Polη est une protéine de 713 acides aminés constituée de deux grands domaines : le domaine catalytique résidant dans les 512 premiers acides aminés est composé de 5 motifs (I, II, III, IV, et V) conservés pour la plupart chez les polymérases de la famille Y, ainsi que le domaine C-terminal regroupant différents motifs (Fig.33). Il a été démontré que les 70 derniers acides aminés de Polη contiennent un signal de localisation nucléaire (NLS) dit « bipartite » (entre les acides aminés 682 et 696) indispensable pour la localisation nucléaire de polη (Kannouche et al., 2001a). Ce fragment peptidique contient également un motif d'interaction à PCNA (PIP, PCNA Interacting Protein) entre les acides aminés 702 et 708 (Haracska et al., 2001) ainsi qu'un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBZ, Ubiquitin-Binding Zinc Finger) entre les acides aminés 632 et 659. Un domaine PIP putatif a été mis en évidence en aval du site catalytique. Il a été montré que Polη pouvait être modifiée de manière post-traductionnelle :

- mono-ubiquitinée sur différentes lysines : trois lysines présentes dans le NLS (K682, K686, K694) et ainsi que la lysine K709 (Bienko et al., 2010)

- phosphorylée sur la sérine 587 et la thréonine 617 (Chen et al., 2008)

L'étude détaillée de tous les motifs situés dans la région C-terminale de la protéine ont permis de comprendre qu'ils étaient requis pour une relocalisation efficace de polη dans les foyers intranucléaires (Bienko et al., 2005).

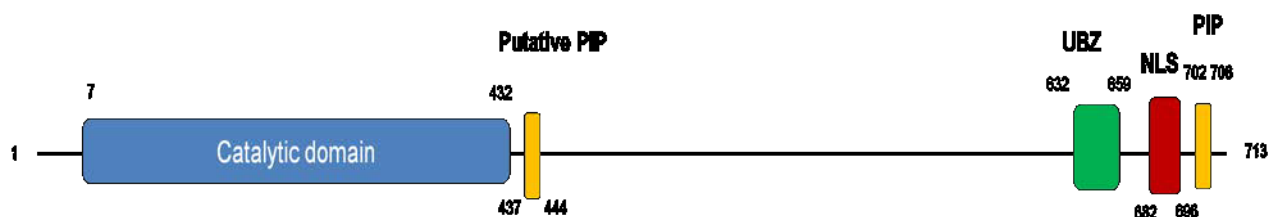


Figure 36: Représentation schématique de Polη

Les 400 premiers acides-aminoés en N-terminal contiennent le domaine catalytique conservé chez les polymérases de la famille Y ainsi qu'un motif putatif PIP d'interaction avec PCNA. La partie C-terminale de la protéine contient les domaines de régulation incluant un signal de localisation nucléaire (NLS), et deux motifs permettant d'interagir avec PCNA mono-ubiquitiné, le domaine UBZ (Ubiquitine-Binding Zn finger) et le domaine PIP.

3) Pol η est localisée au niveau des lésions de l'ADN non réparées au cours de la réplication

Il a été montré que Pol η est associée à la machinerie de réplication (Kannouche et al., 2001b). Cependant, il semble que pol η ne soit pas impliquée dans le processus de réplication normale puisque les cellules XP-V, déficientes pour Pol η répliquent leur ADN avec la même efficacité que des cellules normales. D'autre part, il a été montré que pol η était localisée exclusivement au niveau des zones lésées après irradiations aux UV (Fig. 34). Ces données supportent l'idée que les foyers intranucléaires de Pol η observés dans plus de 80% des cellules irradiées aux UVC, sont localisés au niveau des fourches de réplication bloquées par des lésions de l'ADN.

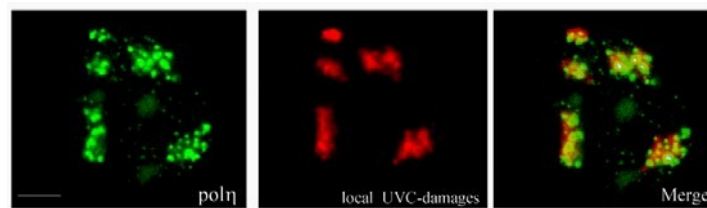


Figure 37 : Localisation de la protéine pol η dans une cellule irradiée localement.

Un double marquage a été réalisé en utilisant d'une part des anticorps anti-pol η (marquage vert), d'autre part des anticorps anti-dimères de pyrimidines (CPD) pour localiser les dommages (marquage rouge). Les deux marquages colocalisent.

C) Régulations de Pol η : rôles et modalités

On sait que Pol η est une ADN polymérase mutagène lorsqu'elle est recrutée sur de l'ADN non endommagé. Son accès à la chromatine ainsi que son devenir une fois le franchissement de la lésion effectué doivent être finement régulés.

1) La régulation de Pol η : accès à la chromatine

a) Mono-ubiquitination de Pol η et accès à la chromatine

Il a été montré que Pol η peut-être mono-ubiquitinée sur différentes lysines, notamment des lysines du NLS (K682, K686, K694) et ainsi que la lysine K709 (Bienko et al., 2010). Seule une de ces lysines peut-être ubiquitinée à la fois pour cause d'encombrement stérique. Néanmoins, la mutation de la lysine K686 n'abolit pas entièrement la mono-ubiquitination, il faut pour cela muter les 3 autres lysines. Les auteurs ont pu montrer que cette mono-ubiquitination de Pol η était abolie après irradiation aux UV. Enfin, lorsque l'on transfecte Pol η constitutivement ubiquitinée (chimère Pol η -Ubiquitine en C-terminal) dans des cellules déficientes en Pol η (XPV), il y a une déficience en synthèse ADN après UV. De plus, ce mutant est incapable de compléter des cellules XPV dans leur phénotype hypersensible après UV. Le modèle avancé est que l'ubiquitination de Pol η au niveau du NLS permettrait une interaction avec son propre domaine UBZ (Fig. 35). Ainsi, la protéine adopterait une

conformation fermée ne permettant pas l'interaction avec PCNA mono-ubiquitiné. Cela empêcherait donc son recrutement à la chromatine en absence de dommage. Cette mono-ubiquitination de Pol η serait dépendante de l'ubiquitine-ligase Pirh2 (Jung et al., 2011).

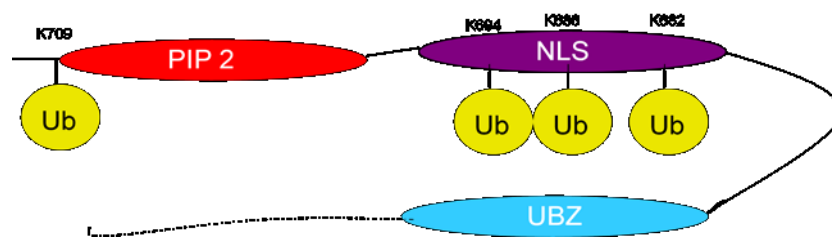


Figure 38 : Représentation schématique du domaine de régulation en C-terminal de Pol η et des lysines ubiquitinables.

Quatre lysines peuvent être ubiquitinées dans la partie C-terminale de Pol η : K682, K686 et K694 qui se trouvent dans le NLS et la lysine K709 en aval du domaine PIP. Lorsque l'une de ces lysines est ubiquitinée, ce motif va pouvoir interagir avec le domaine UBZ de Pol η . Adapté de Bienko et al, 2010.

b) Interaction avec PCNA mono-ubiquitiné

Chez l'Homme, il a été montré que la mono-ubiquitination sur la lysine 164 est la modification majoritaire de PCNA facilement détectable après exposition de cellules en prolifération à des agents génotoxiques tels que les UV (Kannouche and Lehmann, 2004). Dès que l'ADN polymérase répliquative est bloquée par un dommage, le complexe Rad6/Rad18 mono-ubiquitine PCNA présent sur le site lésé, ce qui va favoriser le recrutement des polymérases translésionnelles sur l'ADN afin de franchir la lésion (Bienko et al., 2005; Kannouche et al., 2004). En effet, Pol η est capable d'interagir spécifique avec PCNA mono-ubiquitiné (Kannouche and Lehmann, 2004), et ce, via ces motifs PIP et UBZ (Bienko et al., 2005). Récemment, des expériences effectuées au laboratoire ont mis en évidence que les motifs PIP et UBZ n'étaient pas important pour le recrutement mais plutôt pour le maintien de Pol η aux endroits où la fourche de répllication est bloquée (Despras et al., 2012). Il a été montré que des cellules exprimant de manière stable les mutants de l'un des deux motifs ne présentent qu'une sensibilité faible aux UVC.

c) Rad18 et Hsp90 guident Pol η au fourches bloquées après UV

L'ubiquitine ligase Rad18, en plus de jouer un rôle dans le recrutement des polymérases TLS en mono-ubiquitinant PCNA, est capable de guider Pol η au niveau des fourches bloquées (Watanabe et al., 2004). Pour cela, Rad18 est capable d'interagir directement avec la partie C-terminale de Pol η . De manière intéressante, cette interaction entre Rad18 et Pol η nécessite la phosphorylation de Rad18 par la protéine kinase Cdc7 (Day et al., 2010). Une équipe a mis en évidence que la protéine DVC1/ Spartan était non seulement capable d'interagir avec PCNA ubiquitiné via un motif PIP et un motif UBZ mais qu'elle était importante pour le recrutement de Rad18 à la chromatine (Centore et al., 2012). DVC1/ Spartan semble donc indirectement

impliquée dans le recrutement de Pol η aux lésions. Néanmoins, nous verrons plus loin que d'autres équipes ont mis en évidence un rôle autre de DVC1/Spartan dans l'extraction de Pol η de la chromatine après franchissement de la lésion.

La protéine chaperon HSP90 est une protéine abondante et conservée au cours de l'évolution. Elle a pour rôle de réguler la conformation de certaines protéines. Il a été mis en évidence que Pol η pouvait interagir avec Hsp90 et que cette interaction permettait non seulement la formation des foyers Pol η au niveau des fourches bloquées après UV mais aussi de stabiliser l'interaction entre Pol η et PCNA mono-ubiquitiné (Sekimoto et al., 2010).

2) La régulation de Pol η après le franchissement de la lésion

a) Dissociation passive de Pol η en aval de la lésion

Des études de structure de Pol η ont mis en évidence qu'elle perdait son affinité pour sa matrice 3pb en aval de la lésion (Biertümpfel et al., 2010). Le modèle proposé est donc une dissociation passive de Pol η une fois que la lésion a été franchie. Ce modèle favoriserait le recrutement de l'ADN polymérase répliquative en aval de la lésion.

b) Dissociation active de Pol η via DVC1/ Spartan

Récemment, il a été mis en évidence par deux équipes différentes que DVC1/ Spartan était importante dans l'éviction de Pol η à la fourche, une fois la lésion passée, pour éviter des mécanismes mutagènes (Davis et al., 2012; Mosbech et al., 2012). De manière surprenante, dans ces deux études, Rad18 n'est pas nécessaire au recrutement de DVC1/ Spartan aux sites de dommages de l'ADN mais ce recrutement nécessite la forme PCNA mono-ubiquitinée. DVC1/ Spartan permet le recrutement de la ségrégase p97 qui va faciliter la dissociation de Pol η et PCNA mono-ubiquitiné au niveau de la fourche bloquée. Cette dissociation se ferait grâce à l'activité ATPase de p97. Néanmoins, les auteurs n'ont pas réussi à déterminer si Pol η n'était pas dégradée plutôt que dissociée de la chromatine en aval de la lésion. En effet, il existe chez *C. elegans* ce type de mécanisme d'action/ dégradation où l'orthologue de Pol η est dégradé une fois qu'il a franchi la lésion sur l'ADN.

c) Mécanisme d'action/ dégradation de Pol η (POLH-1 chez *C. elegans*)

Chez *C. elegans*, un mécanisme d'action/ dégradation de l'orthologue de Pol η a été mis en évidence. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'absence de GEI-17, une SUMO-E3 ligase, conduit à la dégradation de POLH-1 suite à des faibles doses d'agents endommageant l'ADN (Kim and Michael, 2008). Ils ont montré que GEI-17 est capable de SUMOyler les lysines 85 et 260 de POLH-1 et ce, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Cette SUMOylation permettrait de protéger POLH-1 d'une éventuelle dégradation avant qu'elle puisse jouer son rôle dans le franchissement des lésions. La dégradation via le complexe CRL4-Cdt2, ayant

une activité ubiquitine-ligase, intervient donc après le franchissement de la lésion puisque lorsque POLH-1 est SUMOylée, elle ne peut pas être dégradée. C'est la poly-ubiquitination de POLH-1 qui va permettre la prise en charge de la protéine par le protéasome (Fig.4). Ce mécanisme d'action dégradation n'a cependant pas pu être mis en évidence chez l'Homme malgré le fait que tous les acteurs importants y aient été identifiés. La plupart des cibles du complexe CRL4-Cdt2 possèdent un motif PIP particulier appelé PIP degron (Havens and Walter, 2009). Or, POLH-1 possède ce PIP degron mais pas la protéine humaine. De plus, des travaux en cours dans notre laboratoire laissent suggérer que Pol η serait SUMOylée dans les cellules humaines mais que cette forme aurait un rôle différent de celui identifié chez *C. elegans* (Despras et al, manuscript in preparation).

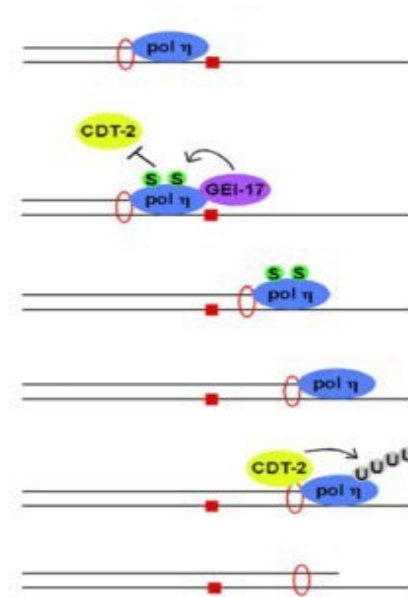


Figure 39 : Modèle d'action/ dégradation de POLH-1 chez *C. elegans*.

La SUMO-ligase GEI-17 peut SUMOyler POLH-1 pour prévenir sa dégradation dépendante du protéasome médiée par l'ubiquitine-ligase CRL4-Cdt2 et ce, dans le but de permettre le franchissement de la lésion. D'après Kim et al, 2008.

d) Ubiquitination et dégradation de Pol η dans les cellules humaines en réponse aux UV

Les ubiquitine-ligases Pirh2 et MDM2 ont été identifiées dans les cellules humaines comme étant capables d'ubiquitiner Pol η . Pirh2, comme il a été dit précédemment, n'est capable que de mono-ubiquitiner Pol η et nous ne connaissons pas encore les modalités d'implication de cette protéine dans la dégradation de la Pol η (Jung et al., 2010, 2011). La protéine MDM2 (Murine Double Minute), est une ubiquitine ligase, notamment impliquée dans la dégradation de p53. Il a été montré qu'elle pouvait poly-ubiquitiner Pol η *in vivo* et *in vitro* via un contact direct entre les deux protéines (Jung et al., 2012). Cette dégradation est dépendante du protéasome et serait provoquée par irradiation aux UV ou d'autres stress réplcatifs. Néanmoins, les auteurs n'ont pas réussi à déterminer dans quelle mesure les deux ubiquitine-ligases pouvaient participer ensemble à la régulation de Pol η .

D) Résumé de l'article 1

Aberrant C-terminal Domain of Polymerase η Targets the Functional Enzyme to the Proteosomal Degradation Pathway

Sana Ahmed-Seghir, Caroline Pouvelle, Emmanuelle Despras, Agnès Cordonnier, Alain Sarasin, Patricia L. Kannouche.

Au laboratoire, nous avons identifié un nouveau mutant de Pol η issu de cellules de patient (cellules AS872) qui présentait un phénotype XP-V.

Nous avons observé par western-blot que la protéine était présente dans ces cellules AS872 à un très faible niveau. Le séquençage des régions exoniques du gène *POLH* a révélé la présence de deux mutations dans la région codante :

- une mutation faux- sens dans le domaine NLS de pol η (T692A)
- une mutation faux-sens qui entraîne la substitution du codon stop en un tryptophane allongeant ainsi la protéine de 8 acides aminés en C-terminal (X714W), nous avons donc appelé ce mutant **Pol η ⁷²¹**

Nous avons caractérisé moléculairement et cellulièrement ce nouveau mutant de Pol η anormalement long. Pol η ⁷²¹ est capable de franchir des lésions CPD *in vivo*. Nous avons aussi montré que ce mutant est recruté sur la chromatine après irradiations aux UV, interagit avec PCNA mono-ubiquitiné et relocalise au niveau des lésions de l'ADN lorsque l'on stabilise la protéine en utilisant un inhibiteur de protéasome, le MG132. Des lignées XP-V surexprimant la protéine Pol η ⁷²¹ ne présentent qu'une sensibilité moyenne aux UVC contrairement à des lignées non complémentées. Nous nous sommes donc intéressés à la dégradation excessive de cette protéine qui semblait être la cause du phénotype XP-V chez le patient, puisque l'activité de Pol η ⁷²¹ n'était pas affectée. Nous avons mis en évidence que le mutant Pol η ⁷²¹ est dégradé par le protéasome et ce, de manière dépendant de sa poly- ubiquitination. Néanmoins, les ubiquitine-ligases CRL4-Cdt2 et Pirh2, connues pour ubiquitiner Pol η avant dégradation, ne semblent pas être impliquées dans la poly-ubiquitination de ce mutant. Nous avons montré que les huit acides-aminés additionnels de Pol η ⁷²¹ n'agissaient pas comme un motif degron mais qu'ils induisaient plutôt un changement de conformation de la protéine, exposant ainsi toute la partie C-terminale de Pol η ⁷²¹ à (aux) ubiquitine –ligase(s) susceptible(s) d'ubiquitiner les lysines du NLS ainsi que la lysine K709.



Aberrant C-terminal domain of polymerase η targets the functional enzyme to the proteosomal degradation pathway

Sana Ahmed-Seghir^a, Caroline Pouvelle^a, Emmanuelle Despras^a, Agnès Cordonnier^b,
Alain Sarasin^a, Patricia L. Kannouche^{a,*}

^a Université Paris-Sud, CNRS-UMR8200, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Gustave Roussy, Villejuif, France

^b CNRS-FRE3211, IREBS, BP 10413, F-67412 Illkirch-Cedex, France

article info

Article history:

Received 11 November 2014

Received in revised form 14 February 2015

Accepted 16 February 2015

Available online 26 February 2015

Keywords:

Translesion synthesis

XP-V

Xeroderma pigmentosum variant

Bortezomib

MG132

Ubiquitin/proteasome system

Ultraviolet

abstract

Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) is a rare genetic disease, characterized by sunlight sensitivity and predisposition to cutaneous malignancies. XP-V is caused by a deficiency in DNA polymerase eta (Pol η) that plays a pivotal role in translesion synthesis by bypassing UV-induced pyrimidine dimers. Previously we identified a new Pol η variant containing two missense mutations, one mutation within the bipartite NLS (T692A) and a second mutation on the stop codon (X714W) leading to a longer protein with an extra 8 amino acids (721 instead of 713 AA). First biochemical analysis revealed that this Pol η missense variant was barely detectable by western blot. As this mutant is extremely unstable and is nearly undetectable, a definitive measure of its functional deficit in cells has not been explored. Here we report the molecular and cellular characterization of this missense variant. In cell free extracts, the extra 8 amino acids in the C-terminal of Pol η ⁷²¹ only slightly reduce the bypass efficiency through CPD lesions. In vivo, Pol η ⁷²¹ accumulates in replication factories and interacts with mUb-PCNA albeit at lower level than Pol η ^{wt}. XP-V cells overexpressing Pol η ⁷²¹ were only slightly UV-sensitive. Altogether, our data strongly suggest that Pol η ⁷²¹ is functional and that the patient displays a XP-V phenotype because the mutant protein is excessively unstable. We then investigated the molecular mechanisms involved in this excessive proteolysis. We showed that Pol η ⁷²¹ is degraded by the proteasome in an ubiquitin-dependent manner and that this proteolysis is independent of the E3 ligases, CRL4^{cdt2} and Pirh2, reported to promote Pol η degradation. We then demonstrated that the extra 8 amino acids of Pol η ⁷²¹ do not act as a degron but rather induce a conformational change of the Pol η C-terminus exposing its bipartite NLS as well as a sequence close to its UBZ to the ubiquitin/proteasome system. Interestingly we showed that the clinically approved proteasome inhibitor, Bortezomib restores the levels of Pol η ⁷²¹ suggesting that this might be a therapeutic approach to preventing tumor development in certain XP-V patients harboring missense mutations.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Most types of DNA damage block replication fork progression during DNA synthesis because replicative DNA polymerases are unable to accommodate altered DNA bases in their active sites. To overcome such blocks, eukaryotic cells employ a specialized set of DNA polymerases that carry out translesion synthesis (TLS) past DNA lesions [8]. These polymerases, mostly belonging to the Y family, have a more open conformation and can accommodate different damaged bases in their active sites [37]. While these catalytic sites are conserved between different family members and

are typically contained within the N-terminal 432 amino acids, the 250 C-terminal amino acids are poorly conserved. This C-terminal region is mainly involved in the cellular localization and regulation of these TLS polymerases [18,19,25,34]. The best characterized of these Y-family polymerases is DNA polymerase (Pol η), which participates in genome stability through its capacity to accurately bypass the most abundant photoproduct, the TT-CPD [13,24]. Mutations in the human POLH gene encoding Pol η are responsible for the cancer-prone xeroderma pigmentosum variant (XP-V), a human recessive disorder characterized by a high sensitivity to solar light and a dramatic predisposition to cutaneous tumors. XP-V cells present a replication defect and an elevated mutagenesis upon UV exposure [23,32].

Because Pol η is error-prone on undamaged DNA, it has to be tightly regulated in cells (for review [28]). A critical step in the

* Corresponding author. Tel.: +33 1 42 11 40 30; fax: +33 1 42 11 50 08.

E-mail address: patricia.kannouche@gustaveroussy.fr (P.L. Kannouche).

regulation of TLS is the post-translational modification of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), the replicative sliding clamp that plays an essential role in DNA replication [11]. Upon UV irradiation, PCNA is monoubiquitinated on its Lys-164. This event is considered to facilitate the TLS process since Pol η preferentially interacts with monoubiquitinated PCNA through its ubiquitin-binding domain (UBZ) as well as its PCNA interacting peptide (PIP)-box [2,20,36].

Recent works showed that the activity of Pol η can also be regulated by its monoubiquitination [3]. It was hypothesized that, Pol η is mono-ubiquitinated on one of the four C-terminal lysines at the end of the protein to inhibit its interaction with PCNA in undamaged cells [3]. Other studies highlight different mechanisms to promote the degradation of Pol η . In *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), the GEI-17 SUMO E3 ligase protects PolH protein from degradation mediated by CRL4^{Cdt2} pathway [21]. It has been reported that in human cells, the RING-H2 type E3 ligase (Pirh2) promotes Pol η degradation in an ubiquitin-independent manner [16]. In addition, the Murine double minute-2 (MDM2) can also serve as an E3 ligase for Pol η polyubiquitination and proteosomal degradation in response to ultraviolet irradiation [17].

The vast majority of XP-V patients harbor POLH mutations giving rise to a truncated protein. However, some XP-V patients have missense mutations producing full-length Pol η proteins that are generally undetectable by western blot [26]. We recently identified a new Pol η variant containing two missense mutations, one mutation within the bipartite NLS (T692A) and a second mutation on the physiological stop codon (X714W) leading to a longer protein with an extra 8 amino acids (721 instead of 713 AA [26]). As the Pol η missense variant is extremely unstable and is nearly undetectable, a definitive measure of its functional deficit in cells has not been explored.

In the current work, we report the characterization of the Pol η variant, Pol η ⁷²¹ at the molecular and cellular level. We found that Pol η ⁷²¹ is functional in vitro and in vivo and that the patient displays a XP-V phenotype because the mutant protein is excessively unstable. We also demonstrated that the extra 8 amino acids of Pol η ⁷²¹ do not act as a degron but rather induce a conformational change of the Pol η C-terminus exposing its bipartite NLS as well as a sequence close to its UBZ to the ubiquitin/proteasome system. Interestingly we showed that a clinically approved proteasome inhibitor, Bortezomib fully restores the levels of Pol η ⁷²¹ suggesting that this might be a therapeutic approach to preventing tumor development in certain XP-V patients harboring missense mutations.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

Normal and XP-V primary diploid fibroblasts (405VI and XP872VI respectively), SV-40 immortalized fibroblasts XP-V (named XP30RO) and SV-40 immortalized human fibroblasts MRC5 were cultivated in Minimal Eagle Medium (MEM; Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin under 5% CO₂. HEK293FT cells (Invitrogen) were cultivated in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) containing sodium pyruvate, penicillin/streptomycin and 10% FCS under 5% CO₂. Cycloheximide and MG132 purchased from Sigma were used at 25 μ g/ml and 10 μ M respectively. Bortezomib was purchased from Calbiochem and used as indicated. Global and local UV-C irradiations were performed as previously described [18].

2.2. Constructions and transfections

All constructs for mutant analysis were generated using standard molecular biology techniques and were verified directly

by DNA sequencing. The parent plasmid for expression of Pol η ⁷²¹ and its various mutant derivatives was pCDNA-POLH [32], which contains a full-length POLH cDNA under the control of the CMV promoter. Point mutants were generated by PCR-based methods using a QuikChange® site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Details on all constructs are available upon request.

Transient transfection was performed using Exgen500 (Fermentas) according to the manufacturer's protocol, and cells were analyzed 24–48 h later. For stable transfection, XP30RO fibroblasts were transfected using FuGENE 6 (Roche) and stable Pol η ⁷²¹ transfectants were isolated and further propagated in medium containing 100 μ g/ml zeocin (InvivoGen). Stable XP30RO cell lines expressing wild-type Pol η (Pol η ^{wt}) or Pol η ^{D652A} have been previously described ([7,32], respectively).

siRNA were purchased from Eurogentec: siRNA PCNA [GCC-GAGAUUCAGCCAUAAU], and Dharmacon: non-targeting siRNA [ON-TARGETplus non target pool], siRNA Cdt2 [ON-TARGETplus SMART pool] and siRNA Pirh2 [CCAACAGACUUGUGAAGAA]. Cells were transfected with 10 nM of siRNAs using INTERFERin reagent (Polyplus) according to the manufacturer's instruction, and analyzed 72 h later.

2.3. Antibodies

Antibodies used for western blotting and immunofluorescence were purchased from Abcam (Pol η ab17725, Cdt2, GAPDH, GFP), Santa Cruz (Chk1, Pol H-300, Lamin A/C, PCNA, Nbs1.), Bethyl (pS33-RPA 32, Cdt1, Pol η), Sigma ((β -actin), BD biosciences ((β -catenin), Calbiochem (RPA32), Cell signaling (Ps345-Chk1), and Novus biological (Ps343-NBS1).

2.4. Cell lysates and western blot

For analysis of phosphorylated proteins, cells were scrapped directly in NETN buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.5, 0.5% NP-40, antiproteases, antiphosphatases (PhosSTOP, Roche)) and incubated 30 min on ice. Extracts were sonicated 15 s at amplitude 30%. Whole cell extracts were prepared in lysis buffer (20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 7.5, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail and 50 U/ml benzonase, Novagen). Proteins were separated by electrophoresis in 8–10% SDS-PAGE gels and analyzed by western-blotting.

2.5. Immunoprecipitation, His pull-down and cell fractionation

Immunoprecipitations of PCNA were performed as previously described [20]. For His pull-down, HEK 293FT cells were lysed in denaturing conditions (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M urea, 20 mM imidazole, pH 8), centrifuged and supernatant was incubated with Ni-NTA-agarose (Qiagen) during 45 min at RT before washes and a denaturation by heating.

To obtain chromatin-bound proteins cell fractionation was performed as already described [7]. Nuclear/cytosolic fractionation was performed using 1 volume of isotonic buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 mM sucrose and 0.05% NP40). After incubation, extracts were centrifuged. The supernatant (cytoplasmic fraction) was then transferred in a new tube and kept at –80 °C and nuclei were resuspended in 3 volumes of Nuclear protein extraction buffer (20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA and 25% glycerol) during 30 min at 4 °C then sonicated. After centrifugation, the nuclear soluble fraction was heat-denatured.

2.6. Proliferation assay

Cells were plated at 1.5×10^5 per well of a six-well plate 24 h before UVC exposure. Seventy-two hours after irradiation and incubation in medium supplemented or not with 0.38 mM caffeine (Sigma), cells were counted with trypan blue using Neubauer haemocytometer.

2.7. Immunofluorescence

Cells were seeded on glass coverslips 24 h before UVC irradiation. For total Pol η immunostaining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton-X100 in PBS. For detection of replication foci, soluble proteins were extracted in CSK100 (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2% Triton X100, antiproteases (Complete EDTA free, Roche)) for 5 min on ice under gentle agitation. Cells were washed in ice-cold PBS and fixed in 4% formaldehyde. Coverslips were immersed in methanol at -20°C for 10 s (only for PCNA immunodetection). After washes in PBS, coverslips were blocked in IF buffer (3% BSA, 0.5% Tween 20 in PBS) for 30 min. Antibodies were diluted in IF buffer. Primary antibodies (1/500 rabbit anti-Pol η Abcam ab17725, 1/500 PCNA PC10 Santa Cruz) were incubated for 1 h at room temperature. Secondary antibodies (1/1000 anti-rabbit Alexa Fluor 488, 1/1000 anti-mouse Alexa Fluor 594) were incubated for 30 min at room temperature. Coverslips were mounted in mounting medium (Dako) supplemented with DAPI (Sigma). Images were acquired on an Axio Imager Z1 microscope using the Axio Vision software (Zeiss). Immunodetection of Pol η and PCNA after local UV-irradiation was performed as previously described [18].

3. Results

3.1. Aberrant C-terminal region of Pol1 directs the protein to the degradation in the nucleus

We previously reported the identification of a XP-V patient (called XP872VI) harboring two missense mutations at the homozygous state that are not located in the catalytic domain of the DNA polymerase: one missense mutation in the bipartite NLS (T692A) and a second missense mutation on the physiological stop codon (X714W) leading to a longer protein with another stop codon eight amino-acids downstream (721 instead of 713 AA, Fig. 1A). First biochemical analysis revealed that this mutant was barely detectable by western blot suggesting that this protein is unstable [26]. Consistent with this hypothesis we found similar levels of POLH mRNA in XP872VI and 405VI cells (data not shown).

In order to better understand the cause of this instability, we tested whether this Pol η missense variant was able to be stabilized by the proteasome inhibitor MG132. Primary fibroblasts from the XP872VI patient were analyzed by western-blotting and compared to primary 405VI cells expressing normal level of Pol η . As expected, no detectable band was observed in XP872VI cells whereas in wild-type cells, a band was detected at around 80 kDa (Fig. 1B). After incubation of XP-V cells with MG132 for 3 h a very faint band was observed suggesting that, in XP872VI cells the Pol η variant is excessively degraded by the proteasome.

To better understand the mechanism responsible for this proteolysis, we generated a POLH cDNA harboring the missense mutation on the stop codon leading to a longer protein with an extra 8 amino acids (that will be called Pol η^{721} in the rest of the paper). We then stably expressed this mutant in XP30RO fibroblasts, a SV40-transformed XP-V cell line which does not express Pol η because of a point mutation in the POLH gene causing a premature

stop codon [35]. As control, we used the previously described XP30RO cell line stably expressing Pol η^{WT} [32]. We confirmed that XP30RO-Pol η^{721} cell line recapitulates the stability of Pol η observed in XP872VI cells with a very weak level of the protein in untreated cells and its stabilization 3 h after MG132 treatment (Fig. 1C). It is noteworthy that in primary XP872VI cells, inhibition of the proteasome hardly restores Pol η variant levels (Fig. 1A) while we observed a nice Pol η^{721} recovery in the SV40-transformed XP-V fibroblasts after MG132 treatment (Fig. 1C). We assume that this difference is mainly due to the fact that in primary cells POLH gene expression is under the control of its own promoter which is quite weak while in XP30RO-Pol η^{721} cells, POLH cDNA expression is under the control of the CMV promoter known to be very strong. Therefore in the clone the production of Pol η^{721} protein is very high and this can be observed as soon as the proteasome is inhibited.

The C-terminal part of Pol η contains an UBZ, NLS and PIP motifs and this region is mainly involved in the cellular localization and regulation of the protein. We reasoned that the extra-C-terminal sequence (8 amino acids) of Pol η^{721} could affect the cellular distribution of the protein leading to its degradation. We thus examined the distribution of Pol η^{721} after cell fractionation. We showed that after treatment with MG132, Pol η^{721} is mainly found in the nuclear fraction as observed for Pol η^{WT} (Fig. 1D). This was confirmed by immunofluorescence experiments after transient transfection of plasmids expressing Pol η^{WT} , Pol η^{T692A} or Pol η^{721} in XP30RO cells and treatment with MG132. We clearly observed a nuclear localization for all Pol η variants (Fig. S1). These results also indicate that the missense mutation within the NLS (T692A) does not affect Pol η localization.

To determine the sub-nuclear localization of Pol η^{721} , we performed another type of cell fractionation. XP30RO-Pol η^{721} cells were first treated or not with MG132 for 1 h then cells were lysed in total lysis buffer (WCE) or in CSK buffer to remove soluble proteins and the resulting pellet mainly contained chromatin fraction (CF). Western blotting analysis revealed that the majority of Pol η^{721} is retrieved in chromatin fraction (Fig. 1E) suggesting that the extra-C-terminal part of Pol η^{721} does not abolish the capability of the protein to bind chromatin.

3.2. Pol1⁷²¹ is a functional enzyme which can complement XP-V cells when it is overexpressed

As Pol η^{721} is extremely unstable and is nearly undetectable, a definitive measure of its functional deficit in cells has not been explored. Indeed, we do not know whether the XP872VI patient displays a XP-V phenotype because the mutant protein is functional but excessively unstable or if it is not functional and the residual protein cannot bypass UV-induced DNA damage. Therefore we examined if Pol η^{721} was proficient for the lesion bypass in vitro and in vivo. We first assessed the ability of Pol η^{721} to bypass CPD lesion in vitro by using XP-V cell extracts complemented with different Pol η proteins produced in reticulocyte lysates (Fig. S2A). We analyzed the bypass efficiencies of Pol η^{WT} , Pol η^{721} and Pol η^{DEAD} , a catalytically inactive form of Pol η (as a negative control). We observed that the Pol η^{WT} and Pol η^{721} were able to bypass CPD. However, at similar protein levels, Pol η^{721} showed a lesser efficiency for bypassing CPD lesions than Pol η^{WT} (59% vs 75%) suggesting that the extra 8 amino acids of Pol η^{721} slightly impact on the folding of the C-terminal of Pol η required for an efficient CPD bypass in human cell free extracts [29].

Next, we analyzed the nuclear localization of Pol η^{721} in UV-irradiated cells. As shown in Fig. 2A, 1 h after MG132 treatment, Pol η^{721} is able to accumulate in replication factories where it co-localizes with PCNA in UV-irradiated cells as observed for Pol η^{WT} . This was confirmed after local UV-irradiation (Fig. S2B).

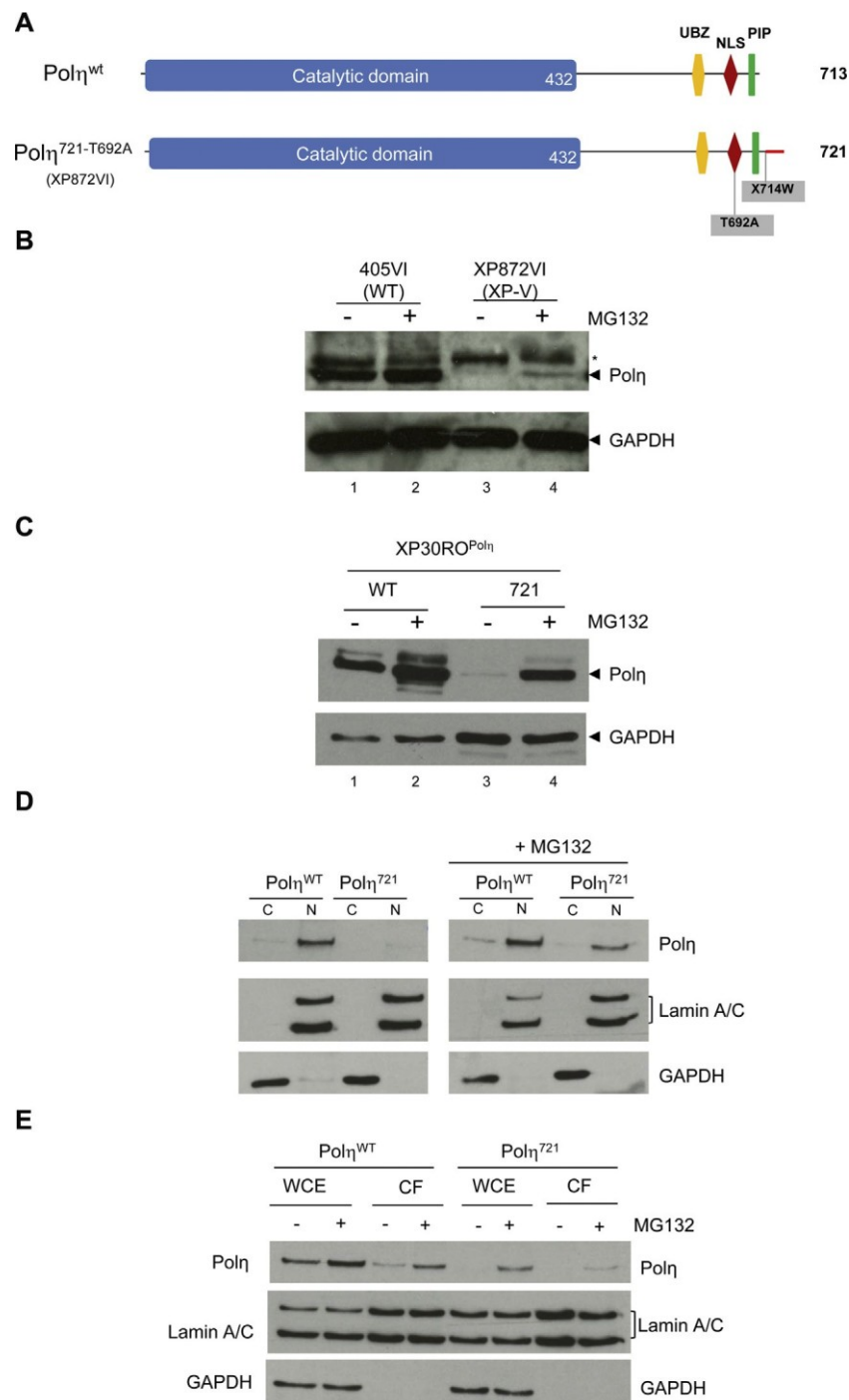
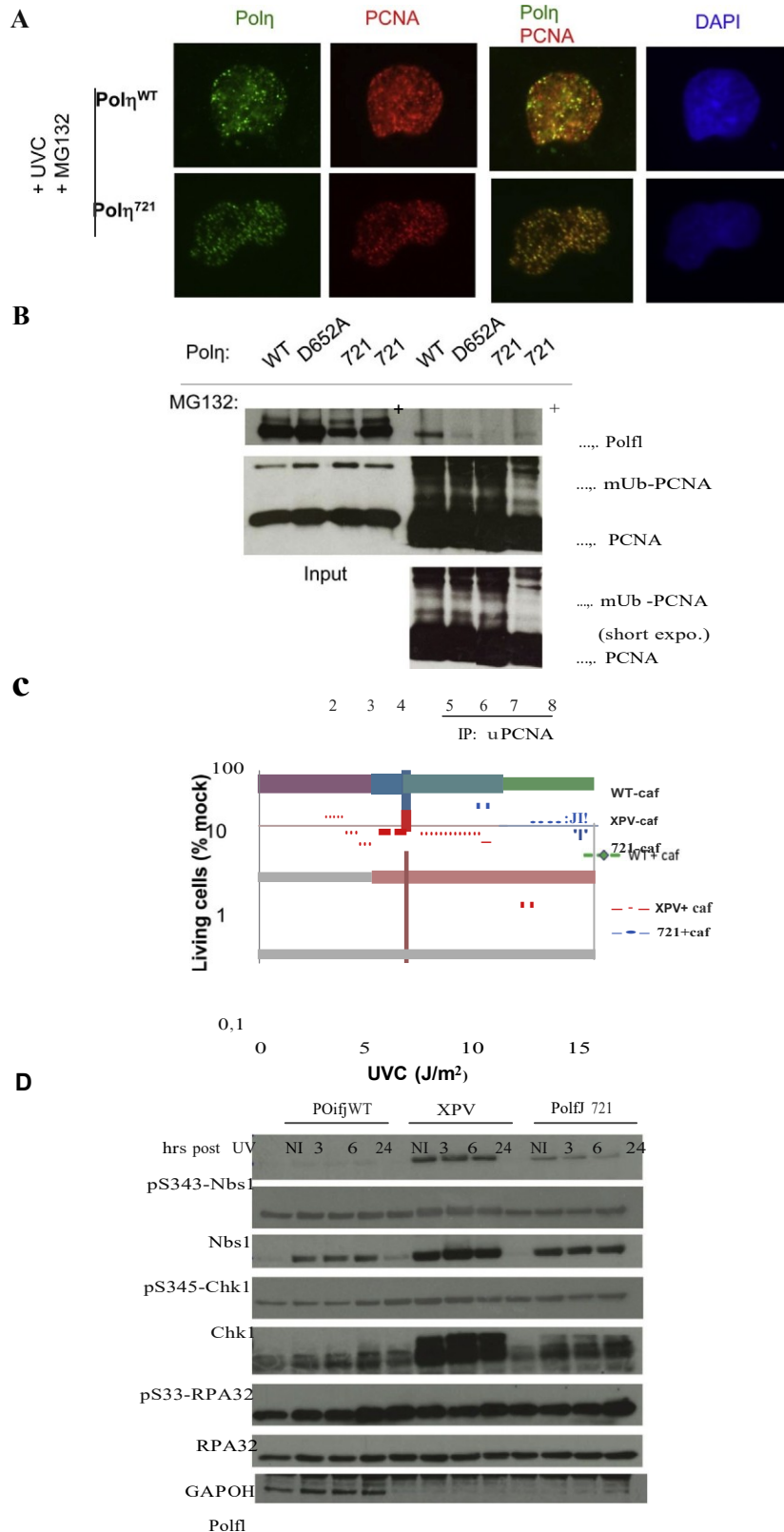


Fig. 1. Aberrant C-terminal region of Pol η directs the protein to the degradation in the nucleus. (A) Schematic representation of human wild-type Pol η and the mutations described in the XP-V patient (XP872VI). The different domains of the Pol η are depicted: The active polymerase domain corresponds to the first 432 AA. The C-terminal part contains the regulation domains including the bipartite nuclear localization signal (NLS), an ubiquitin-binding Zn finger (UBZ), and a PCNA Interacting Peptide motif (PIP-box) [2,18]. In XP872VI patient, two missense mutations were found in the regulatory domain of the protein: one in the NLS (T692A) and another one on the endogenous stop codon leading a longer protein with extra 8 amino acids. (B) Detection of Pol η level in XP872VI (XP-V) and 405VI (WT) primary fibroblasts with or without addition of 10 μ M MG132 for 3 h. (C) XP30RO cells stably expressing Pol η^{WT} or POLH cDNA harboring the missense mutation on the stop codon leading to a longer protein with an extra 8 amino acids (called Pol η^{721}) were treated or not with MG132 for 3 h. Protein levels of Pol η^{WT} and Pol η^{721} were analyzed by western blot using anti-Pol η antibody. GAPDH was used as loading control. (D) XP30RO cells stably expressing Pol η^{WT} or Pol η^{721} were treated or not for 1 h with MG132. Nuclear/cytoplasmic fractionation was then performed. Cytoplasmic (C) and nuclear (N) extracts were analyzed by western blotting with antibodies against Pol η , Lamin A/C and GAPDH. (E) XP30RO cells stably expressing Pol η^{WT} or Pol η^{721} were treated or not for 1 h with MG132. Whole cell extract (WCE) and chromatin fraction (CF) were collected and analyzed by western-blotting using antibodies against Pol η , Lamin A/C and GAPDH.

Then we tested if the extra C-terminal region of Pol η^{721} could affect its binding with mono-ubiquitinated PCNA (mUb-PCNA). To address this, cell extracts from UV-irradiated XP30RO-Pol η^{721} cells were immunoprecipitated using anti-PCNA antibodies as

previously described [20]. Again, to get a chance to observe an interaction, we treated the XP30RO-Pol η^{721} cells with MG132 for 1 h before harvesting. We also used two other cell lines as control: the XP30RO-Pol η^{WT} and the XP30RO-Pol η^{D652A} cells which express



2. PolI⁷²¹ is a functional enzyme which can complement XP-V cells when it is overexpressed. (A) XP30RO cells stably expressing PolI^{WT} or PolI⁷²¹ were irradiated at 20 J/m² then incubated for 6 h before treating with 10 μ M MG132 for 1 h. Cells were then fixed with 4% formaldehyde containing 0.2% Triton X100 and immunodetection of PolI and PCNA were processed using anti-PolI and anti-PCNA antibodies. Nuclei were visualized by DAPI. (B) XP30RO cells stably expressing PolI^{WT}, PolI⁷²¹ or PolI^{D652A} were irradiated at 20 J/m² then incubated for 4 h before treating or not with 10 μ M MG132 for 1 h. Cells were then lysed and immunoprecipitation was performed using anti-PCNA antibody. Immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting using anti-PCNA and anti-polI antibodies. (C) XP30RO cells (XP-V), and XP30RO cells stably expressing PolI^{WT} or PolI⁷²¹ were irradiated at the indicated doses and grown for 3 days with or without 0.38 mM caffeine. Cells were counted with trypan blue using a Coulter hemocytometer. Surviving fraction was expressed as a percentage of mock-irradiated cells. (D) XP30RO cells (XP-V), and XP30RO cells stably expressing PolI^{WT} or PolI⁷²¹ were irradiated at 7 J/m² and lysed at the indicated time points. Phosphorylation levels of ATR targets, Chk1 (Ser 345), Nbs1 (Ser 343) and RPA32 (Ser 33), were analyzed by western-blotting.

Pol η containing a point mutation in its UBZ domain and known to be impaired in localization to PCNA foci [7]. Western blot analysis showed that the Pol η^{721} is able to interact with mUb-PCNA albeit at lower level than Pol η^{WT} (Fig. 2B). It has to be noted that in this experiment, we needed to treat cells with a proteasome inhibitor to stabilize Pol η^{721} . However it is known that this treatment also reduces the PCNA monoubiquitination levels [27] even during the immunoprecipitation process. This can be observed when we compare the levels of monoUb PCNA after IP in cell extracts treated or not with MG132 (Fig. 2B, lanes 7 and 8). Since we did not recover much monoUb PCNA, we did not expect to detect a reasonable amount of Pol η^{721} in co-IP (lane 8). However we cannot rule out that the extra 8 amino acids of Pol η^{721} directly impact on the interaction between mono-Ub PCNA and Pol η .

Next, we asked if Pol η^{721} can complement XP-V cells given that only a residual amount of the protein is maintained in untreated XP30RO-Pol η^{721} cells. One of the characteristics of XP-V cells is their ability to be sensitized to UV with low concentrations of

caffeine [1]. Hence, we compared the proliferation of cells irradiated at various UV doses and incubated in the presence or not of 0.38 mM caffeine. This concentration increased the sensitivity of XP-V cells but had no effect on XP-V cells complemented by Pol η^{WT} [6,7]. As shown in Fig. 2C, XP-V cells expressing Pol η^{721} were only slightly sensitive to UV and cells showed a barely sensitization by caffeine strongly suggesting that the extra 8 amino acids in C-terminal of the protein do not impair the ability of Pol η^{721} to bypass UV-induced lesions *in vivo* even when the protein is present at a very low level. These results are in agreement with the restoration of normal cell cycle profiles 24 h after UV-irradiation in this cell line (Fig. S2C).

To confirm these results, we monitored the ATR checkpoint activation in UV-irradiated XP30RO-Pol η^{712} cell line. Indeed, replication fork stalling at UV-induced DNA damage activates a checkpoint regulated by the ATR kinase that allows S-phase slow down and stabilization of replication forks (for review, see [4]). We have previously shown that persistent inhibition of DNA synthesis

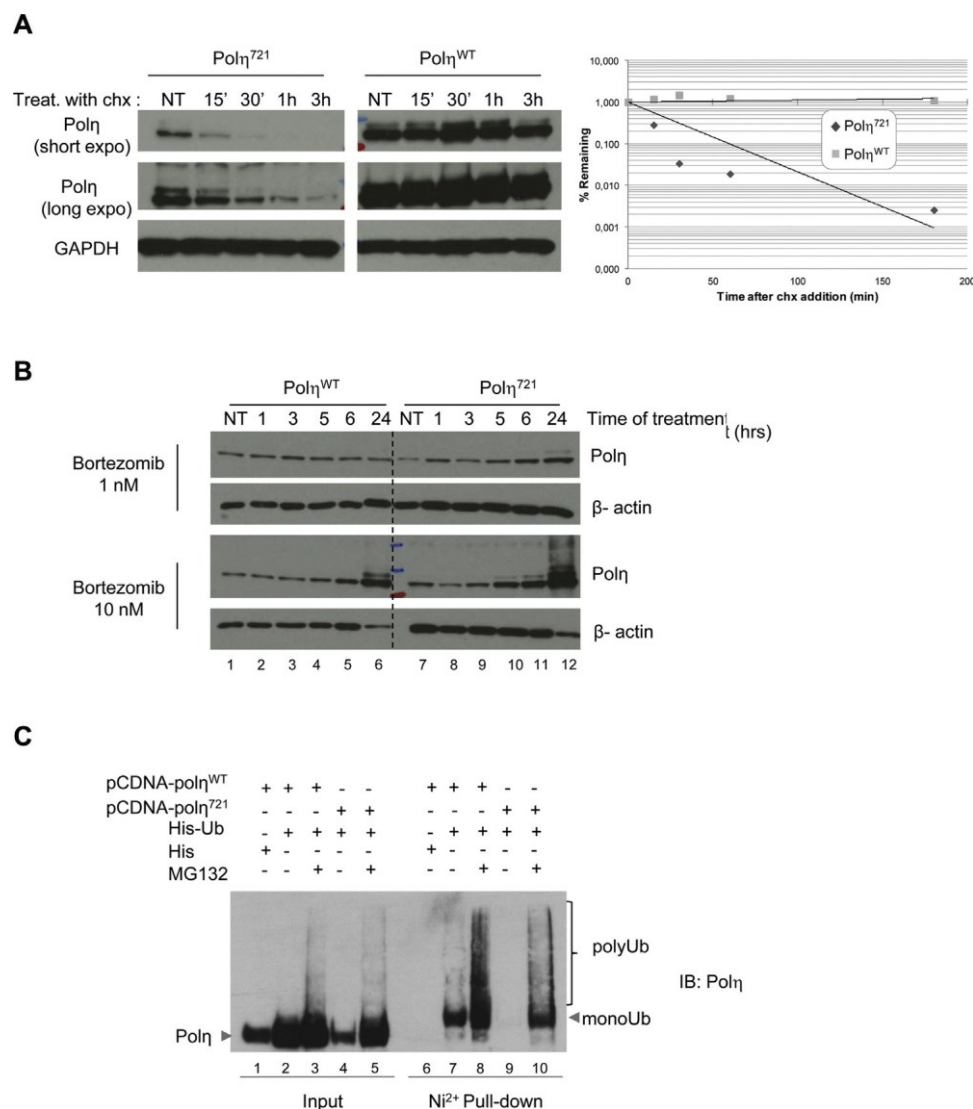


Fig. 3. The excessive proteolysis of Pol η^{721} is mediated by the ubiquitin/proteasome system. (A) XP30RO cells stably expressing Pol η^{WT} or Pol η^{721} were first treated with MG132 for 3 h to stabilize proteins then incubated with 25 μ g/ml cycloheximide (chx) for the indicated times. Cell extracts were then analyzed by western blotting using antibodies against Pol η and GAPDH (loading control). The signals were quantified using the Image J software. The left panel shows the blot and the right panel shows a graphical representation of the level of remaining Pol η at different time points as the percentage of initial Pol η level. (B) XP30RO cells stably expressing Pol η^{WT} or Pol η^{721} were treated with 1 nM or 10 nM of Bortezomib. Cells were then lysed at the indicated times and cell extracts were analyzed by western blotting using antibodies against Pol η and β -actin (loading control). (C) HEK293FT cells were co-transfected with plasmids expressing His-tagged ubiquitin and Pol η^{WT} or Pol η^{721} . His-ubiquitinated proteins were Ni $^{2+}$ pulled-down in denaturing conditions and His-Ub Pol η proteins were immunodetected by western blotting using antibody against Pol η .

in UV-irradiated cells deficient in Pol η was associated with a stronger and persistent activation of ATR checkpoint [6]. We analyzed the phosphorylation status of various ATR targets. These included Checkpoint Kinase 1 (Chk1), Nijmegen Breakage Syndrome 1 (Nbs1) and the 32-kDa subunit of Replication Protein A (RPA32). After 7 J/m², these proteins are more strongly phosphorylated in XP-V cells than in XP-V cells complemented with Pol η^{WT} and phosphorylation levels remained high 24 h after UV exposure in the absence of Pol η (Fig. 2D). In XP30RO-Pol η^{721} cells, amounts of phosphorylated Chk1, Nbs1 and RPA32 were at intermediate levels after UV irradiation suggesting that in these cells UV-induced lesions can be bypassed but less efficiently than in XP30RO-Pol η^{WT} cells. This could explain why we found a slight sensitization by caffeine, known to inhibit ATR checkpoint pathway.

Altogether, our data strongly suggest that Pol η^{721} is functional *in vitro* and *in vivo* and that the XP872VI patient displays a XP-V phenotype because the mutant protein is excessively unstable.

3.3. The excessive proteolysis of Pol1 721 is mediated by the ubiquitin–proteasome system

We then concentrated our efforts to determine the cause of Pol η^{721} instability. We already showed that Pol η^{721} degradation was mediated by the proteasome (Fig. 1). We then measured the half-life of Pol η^{721} protein by treating cells with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (chx) and Pol η levels were monitored at time intervals of up to 3 h. Pol η^{WT} was stable for at least 3 h whereas Pol η^{721} was found to have a half-life of ~15 min (Fig. 3A). As shown on the graph, after 1 h of chx, there was ten times less Pol η^{721} than Pol η^{WT} (Fig. 3A, right panel). Interestingly, we also found that the clinically approved proteasome inhibitor, Bortezomib, strongly reduces the turnover of Pol η^{721} even after a dose as low as 1 nM (Fig. 3B). We also tested if this proteasome inhibitor was able to stabilize the Pol η missense variant in primary XP872VI fibroblasts by treating XP-V and 405VI cells with 10 and 100 nM Bortezomib for 3 h. As observed after MG132 treatment, Bortezomib slightly restores the variant Pol η protein levels (Fig. S3).

It has been shown that Pol η degradation can be targeted by different mechanisms in human cells. Indeed the E3 ligase Pirh2 promotes Pol η degradation in an ubiquitin-independent manner [16] while MDM2 can also serve as an E3 ligase for Pol η polyubiquitination and proteosomal degradation in response to ultraviolet irradiation [17]. We observed that incubation of cells with 10 nM Bortezomib leads to the accumulation of slower migrating forms of Pol η^{721} (Fig. 3B, lane 12) which seem to be poly-ubiquitin chains strongly suggesting that Pol η^{721} is poly-ubiquitinated before degradation. To confirm this, we carried out a Ni²⁺ pull-down in 293FT cells over-expressing the Pol η mutant and His-ubiquitin (His-Ub) and showed that Pol η^{721} as Pol η^{WT} is efficiently poly-ubiquitinated after MG132 treatment (Fig. 3C, lane 10). Collectively, these results demonstrate that Pol η^{721} is degraded by the proteasome in a ubiquitin-dependent manner.

3.4. The bipartite NLS is partially responsible of the excessive Pol1⁷²¹ proteolysis

We then attempted to identify the amino acid sequence in the C-terminal part of Pol η mutant critical for this aberrant proteolysis. We first asked if the last 80 amino-acids of Pol η^{721} (spanning the NLS and PIP motifs of the wild type sequence + the extra 8 amino-acids) are capable of destabilizing a completely unrelated protein. To do that, we constructed a chimeric polypeptide in which the last 80 amino acids of Pol η^{721} (or the last 70 amino-acids of the wild-type Pol η^{WT}) were fused to the C-terminal end of the eGFP reporter (denoted GFP-Pol η 80 and GFP-Pol η 70, respectively) and monitored the stability of the fusion proteins. As shown in Fig. 4B,

GFP-Pol η 80 exhibited a strong instability as compared to GFP-Pol η 70 (1 h vs 3 h). As illustrated on the graph, after 3 h of chx, there was seven times less GFP-Pol η 80 than GFP-Pol η 70. We then reasoned that the extra 8 amino-acids might act as a degron. To test this notion, we examined the stability of fusion proteins containing point mutations in the extra C-terminal part of Pol η^{721} (Fig. S3). All the mutants did not show any increase of protein stability unless cells were treated with MG132. Even mutations on the 8 amino acids (eGFP-Pol η 80 8A) cannot stabilize the fusion protein (Fig. 4C and Fig. S4). These results indicate that the extra C-terminal part of Pol η^{721} does not function as a degron. From these data we assumed that the extra 8 amino-acids have changed the conformation of the C-terminal part of Pol η exposing the protein to the ubiquitin/proteasome system.

To gain insight into the specific residues in Pol η^{721} that are important for its proteolysis, we constructed a series of truncated Pol η mutants fused to GFP reporter and analyzed their stability in cells (Fig. 4D). One construct contains the last 40 amino-acids spanning the NLS, PIP and the extra C-terminus of Pol η^{721} (GFP-Pol η 40), another one contains the PIP and the extra C-terminus (GFP-Pol η 20), or only the extra C-terminus (GFP-Pol η extra C-term). Cells expressing GFP constructs were treated or not with MG132 for 3 h and fusion protein levels were analyzed by western blot. As shown in Fig. 4E, GFP-Pol η extra C-term was as stable as the GFP alone confirming that this motif does not act as a degron. Interestingly we found that GFP-Pol η 20 lacking the bipartite NLS was less destabilized than GFP-Pol η 40 suggesting that the Pol η NLS can participate in the proteolysis of Pol η^{721} . Alternatively it is possible that in the absence of NLS, the fusion protein is not driven into the nucleus limiting its degradation. To rule out this possibility, we examined the half life of each construct as well as that of a new construct in which we replaced the bipartite NLS by a NLS peptide which derives from the SV40 Large T antigen (GFP-NLS AgT Pol η 40). Cells expressing GFP constructs were treated with chx till 7 h and fusion protein amounts were analyzed at different time points by western blot (Fig. 4F, left panel). As expected the half life of GFP-Pol η 40 was much shorter than that of GFP alone. Indeed GFP was stable for at least 7 h whereas GFP-Pol η 40 was found to have a half-life <2 h (Fig. 4F, right panel). Importantly, by replacing the bipartite NLS by T-Ag NLS peptide, we increased the stability of the chimeric protein with a half life similar to that of GFP-Pol η 20 lacking the bipartite NLS (about 3 h, Fig. 4F, right panel). These results suggested that the bipartite NLS of Pol η is directly or indirectly involved in the degradation of Pol η^{721} .

3.5. The four mono-ubiquitination sites of Pol1 are partially involved in the proteolysis of Pol1⁷²¹

Previous works reported that in physiological condition, a fraction of Pol η is mono-ubiquitinated in human cells and that mono-ubiquitination of Pol η occurs C-terminal to its UBZ domain at one of the four lysine residues available in this region (Fig. 5A). The hypothesis is that the attachment of Ub to the C-terminus of Pol η , by introducing an intramolecular interaction with the UBZ motif, prevents this domain from being engaged in other interactions and also sterically masks the region, hiding it from PCNA [3]. Interestingly, three out of four mono-ubiquitination sites are in the NLS sequence (e.g. K682, K686, K694). Because we found that the bipartite NLS was implicated in the proteolysis of Pol η^{721} , we asked if these lysine residues were required for its excessive destabilization. To this aim, we generated four different mutants of Pol η^{721} which contain one, two, three or four K to R substitutions (Fig. 5A). XP-V cells expressing these constructs were or not treated with MG132 and protein levels were analyzed by western blotting. We observed that the more Pol η^{721} contains K/R substitutions, the more the protein was stable without addition of proteasome inhibitor (Fig. 5B).

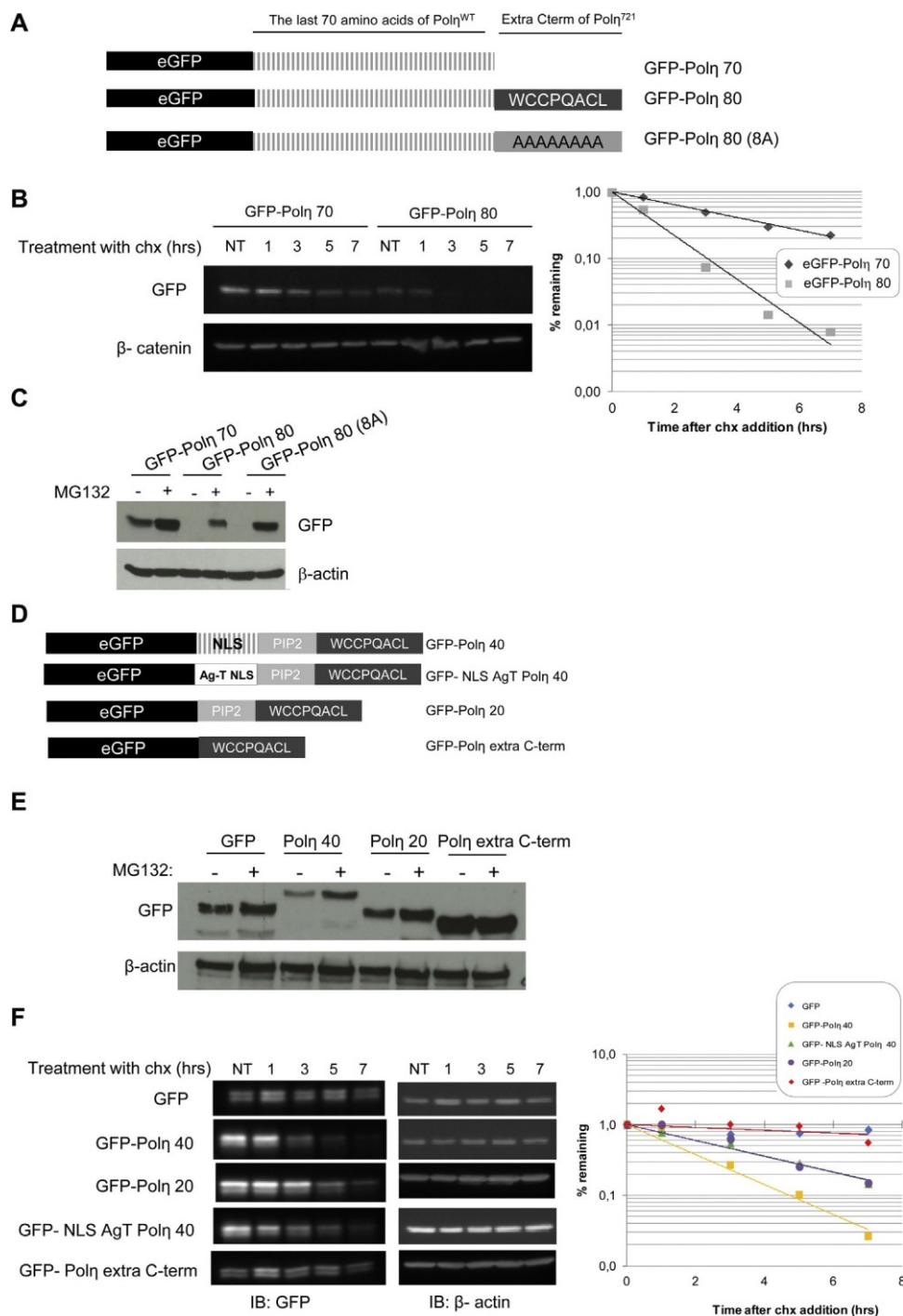


Fig. 4. The bipartite NLS is partially responsible of the excessive Pol η^{721} proteolysis. (A) Scheme of various GFP fusion proteins containing the last 70 amino-acids of Pol η^{WT} (GFP-Pol η 70), or the last 80 amino-acids of Pol η^{721} (GFP-Pol η 80) containing point mutations in the extra C-terminus (GFP-Pol η 80 8A). (B) MRC5 cells transiently expressing GFP-Pol η 70 or GFP-Pol η 80 were first treated with MG132 for 3 h to stabilize proteins then incubated with 25 μ g/ml cycloheximide (chx) for the indicated times. Cell extracts were then analyzed by western blotting using antibodies against GFP and (3-actin (loading control)). The signals were quantified using the Image J software. The left panel shows the blot and the right panel shows a graphical representation of the level of remaining GFP fusions at different time points as the percentage of initial GFP fusions level. (C) MRC5 cells were transfected with various GFP fusion proteins and treated or not with MG132 for 3 h. Cells were then lysed and extracts were analyzed by western blotting using antibodies against GFP and (3-actin (loading control)). (D) Schematic representation of various GFP fusion proteins containing different domains of Pol η (details in the text). (E) MRC5 cells were transfected with various GFP fusion proteins and treated or not with MG132 for 3 h. Cells were then lysed and extracts were analyzed by western blotting using antibodies against GFP and (3-actin (loading control)). (F) MRC5 cells transiently expressing GFP, GFP-Pol η 40, GFP-NLS AgT Pol η 40, GFP-Pol η 20 and GFP-Pol η extra C-term were analyzed as described in (B).

These data are consistent with the involvement of the bipartite NLS in the proteolysis of Pol η^{721} .

It was reported that when all four lysines were mutated to arginines (Pol η 4K/R), no ubiquitinated species of Pol η were detectable in whole cell extracts [3]. We confirmed this observation

with two independent clones (Fig. 5C, lanes 3 and 4). In contrast, the mutant Pol η^{721} 4K/R remained mono-ubiquitinated (Fig. 5C, lane 5) reinforcing the hypothesis that the extra 8 amino acids sequence modifies the conformation of the C-terminus of Pol η^{721} allowing the ubiquitination of other lysines in close proximity of (or in) the

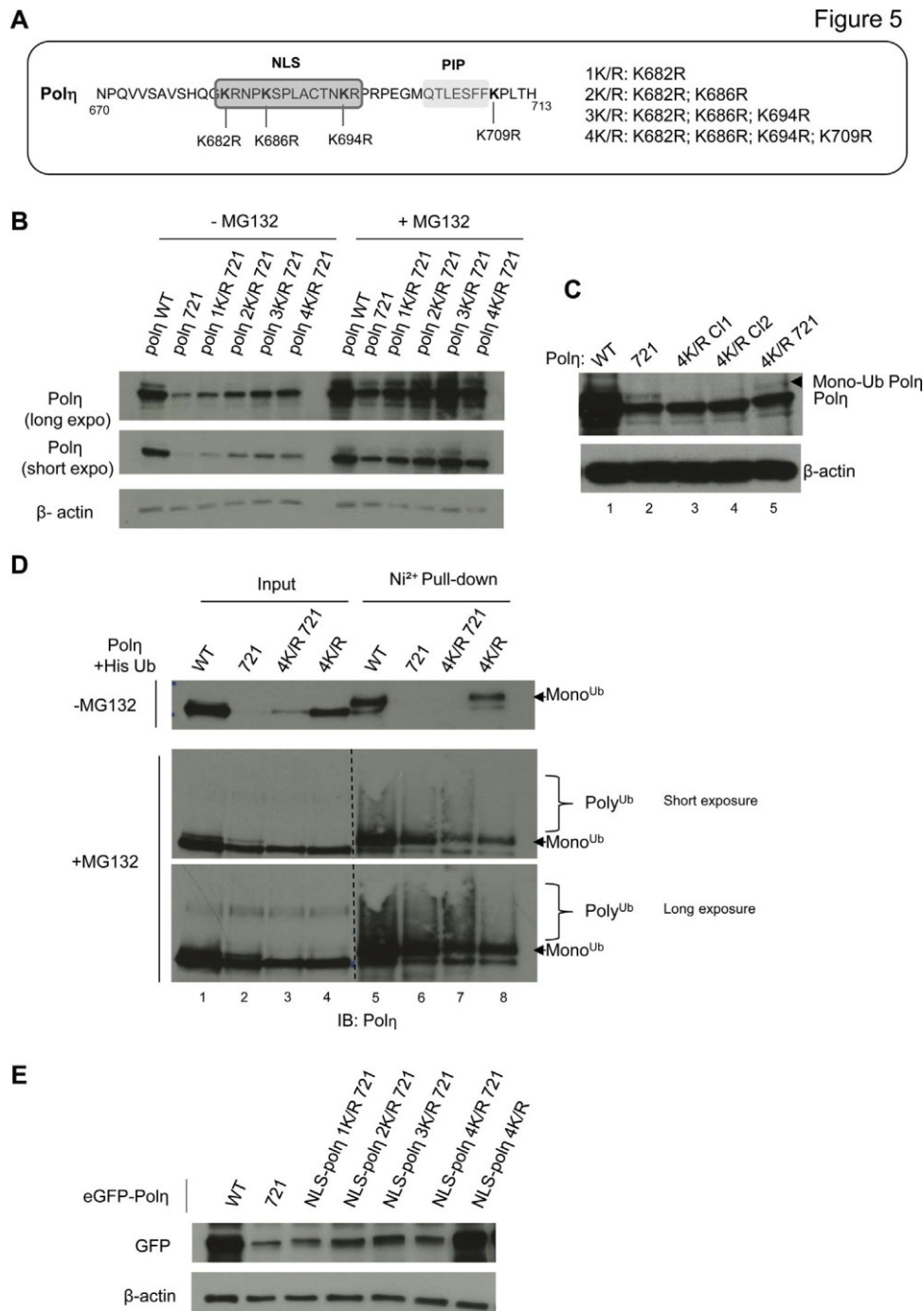


Fig. 5. The four mono-ubiquitination sites of Pol η are partially involved in the proteolysis of Pol η ^{T21}. (A) Schematic representation of the C-terminus of Pol η with the NLS, the PIP box and the mono-ubiquitinated lysines mutated in arginines. (B, C) XP3RO cells were transiently transfected with various Pol η constructs and treated or not for 3 h with MG132. Cells were then lysed and samples were analyzed by western-blotting using antibodies against Pol η and (3-actin (loading control)). (D) HEK293T cells were co-transfected with His-tagged ubiquitin and various Pol η constructs then treated or not with MG132 for 3 h. His-ubiquitinated proteins were Ni²⁺ + pulled-down in denaturing conditions and His-Ub Pol η proteins were immunodetected by western-blotting using antibody against Pol η . (E) XP3RO cells were transiently transfected with various GFP fusion proteins and treated or not for 3 h with MG132. Cells were then lysed and protein levels were monitoring using immunoblotting against GFP and (3-actin (loading control)).

UBZ domain. We then checked if this Pol η ^{T21} 4K/R mutant was also degraded in a ubiquitin-dependent manner. To address this, we performed a Ni²⁺ pull-down from cells over-expressing different Pol η mutants as well as His-Ub and analyzed the ubiquitinated species of Pol η by western blot. Unexpectedly we observed mono-ubiquitinated forms of Pol η ^{WT} 4K/R after pull down (Fig. 5D, lane 8). Western blot analysis also revealed that in contrast to Pol η ^{WT}

4K/R, Pol η ^{T21} 4K/R was efficiently poly-ubiquitinated after MG132 treatment (Fig. 5D, lane 7 vs lane 8). These data suggest that excessive proteolysis of Pol η ^{T21} involves additional lysines located in the C-terminal part of the protein which are targeted for proteosomal degradation.

Because three out of four lysines were within the NLS, we reasoned that the partial stabilization of the K/R mutants could result

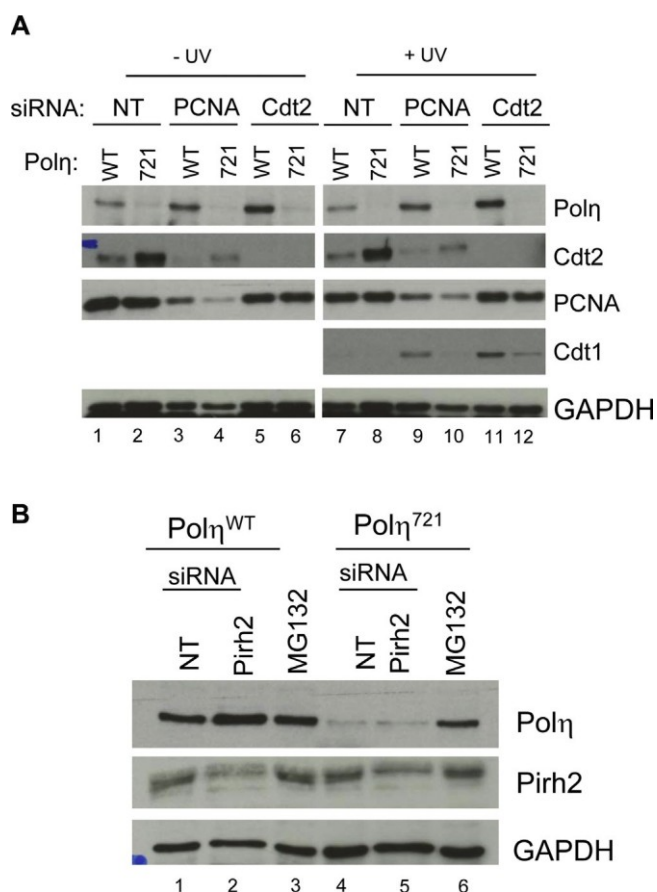


Fig. 6. The E3 ligases CRL4^{Cdt2} and Pirh2 are not involved in the excessive degradation Polh⁷²¹. (A) XP30RO cells stably expressing Polh^{WT} or Polh⁷²¹ were transfected with non-targeted siRNAs (NT) or siRNAs targeting PCNA or CRL4^{Cdt2}. Seventy-two hours later, cells were irradiated or not at 20 J/m². Levels of Polh, CRL4^{Cdt2}, PCNA, Cdt1 and GAPDH (loading control) were monitored with specific antibodies. (B) XP30RO cells stably expressing Polh^{WT} or Polh⁷²¹ were transfected with non-targeted siRNAs (NT) or siRNAs targeting Pirh2 for 72 h later or treated with MG132 for 3 h prior to harvest. Proteins were analyzed by western-blotting using antibodies against Polh, Pirh2 and GAPDH (loading control).

from an incorrect nuclear localization leading to an inefficient proteolysis. We then decided to introduce an exogenous SV40 large T-Ag NLS at the N-terminus of the Polh in fusion with the GFP. As shown in Fig. 5E, these mutants remained stabilized even when they localized into the nucleus.

Altogether, these results suggest that the extra 8 amino-acids of Polh⁷²¹ induce a conformational change of the C-terminal region of Polh exposing the bipartite NLS of Polh as well as a sequence close to the UBZ to the ubiquitin/proteasome system.

3.6. The E3 ligases CRL4^{Cdt2} and Pirh2 are not involved in the proteolysis of Polh⁷²¹

In *C. elegans*, the GEI-17 SUMO E3 ligase protects PolH protein from degradation mediated by CRL4^{Cdt2} pathway [21]. In human cells the four lysines located in the C-terminus of Polh were found to be mono-ubiquitinated by Pirh2 to inhibit the ability of Polh to interact with PCNA [15].

In an attempt to identify the E3 ligase involved in the proteolysis of Polh⁷²¹ we first analyzed the levels of the TLS polymerase after down-regulation of CRL4^{Cdt2}. We also monitored the protein levels of cdt1 as positive control since it is known that knock-down of PCNA or CRL4^{Cdt2} increased the stability of Cdt1, especially after UV irradiation [10]. As shown in Fig. 6A (lanes 6 and 12), efficient down-regulation of the E3 ligase CRL4^{Cdt2} does not stabilize Polh⁷²¹

while it stabilizes cdt1 (Fig. 6A, lanes 11 and 12). We then explored the impact of down-regulation of the E3 ligase Pirh2 on Polh⁷²¹ stability. While we detected an increase of Polh^{WT} levels after Pirh2 depletion (Fig. 6B, lane 2) we did not observe any Polh⁷²¹ stabilization (Fig. 6B, lane 5). Altogether these results revealed that CRL4^{Cdt2} and Pirh2 are not involved in the proteolysis of Polh⁷²¹.

4. Discussion

We recently reported the case of a XP-V patient (XP872VI) with “mild symptoms” harboring two missense mutations at the homozygous state: one mutation on the bipartite NLS (T692A) and a second mutation on the stop codon (X714W) leading to a longer protein with an extra 8 amino acids (Fig. 1A). The Polh missense variant was barely detectable by western blot suggesting that it is extremely unstable [26]. Several studies reported that missense mutations affect the stability of Polh regardless of the location of the mutation in the protein structure [12,26,33]. As these Polh missense variants are extremely unstable and nearly undetectable, a definitive measure of their functional deficit in cells has not been fully explored. Indeed, it is unknown if the patients exhibit a XP-V phenotype because the mutant protein is functional but excessively unstable or if the protein is not functional and the residual amount is unable to bypass UV-induced DNA damage. This question has to be solved if we want to propose a therapeutic approach to treating tumors (or preventing cancer progression) in XP-V patients harboring missense mutations in POLH gene.

In the present study we have characterized the Polh missense variant, Polh⁷²¹ at the cellular and molecular level by generating a POLH cDNA harboring the missense mutation on the stop codon leading to a longer protein with an extra 8 amino acids and by stably expressing this variant in XP-V fibroblasts. We first found that Polh⁷²¹ is excessively degraded by 20S proteasome in a ubiquitin-dependent manner. Blocking degradation through chemical inhibition of the proteasome restored levels and function to Polh⁷²¹. Indeed, we found that stabilized Polh⁷²¹ localizes in the replication factories after UV-irradiation and interacts with mUb-PCNA albeit at lower level than Polh^{WT}.

Moreover, XP-V cells overexpressing Polh⁷²¹ show only a slight sensitivity to UV compared to XP-V cells. Finally, in our in vitro assay, Polh⁷²¹ is able to bypass CPD lesions albeit less efficiently than Polh^{WT}. From these results we concluded that Polh⁷²¹ is functional and that the XP872VI patient displays a XP-V phenotype because the mutant protein is excessively degraded. This is consistent with the fact that the patient has only “mild symptoms”.

Interestingly we showed that the clinically approved proteasome inhibitor Bortezomib restores the levels of Polh⁷²¹ suggesting that this may be a viable therapeutic approach to preventing tumor development in certain XP-V patients. However general inhibition of proteasome activity could be very toxic, particularly in the long-term treatment. It is noteworthy that 20S proteasome inhibitors (Bortezomib, Carfilzomib...) are already used for treating multiple myeloma (for review [9,31]). Indeed, Bortezomib is currently used in combination with an alkylating agent Melphalan which induces alkylation of guanine and adenine as well as inter-strand DNA crosslinks. However resistances to Melphalan have been observed in multiple myeloma cells [9]. Given that Polh is able to bypass alkylated DNA lesions [14] and that Bortezomib stabilizes the TLS polymerase, the combination of the two drugs might explain development of drug resistance.

By performing a comprehensive analysis of the amino acid sequence in the C-terminal part of Polh⁷²¹ critical for its excessive proteolysis, we found that the extra 8 amino acids do not act as a degron but rather might induce a conformational change of the C-terminal of Polh exposing the protein to the ubiquitin/proteasome

system. Previous works reported that a fraction of human Pol η is mono-ubiquitinated at one of the four lysine residues located in the C-terminal part of the protein (K682, K686, K694, and K709) to inhibit its interaction with PCNA [3,15]. Three out of the four ubiquitination sites are present in the bipartite NLS of Pol η . We found that these lysines were implicated in the degradation of Pol η ⁷²¹ since mutations to arginines increase the level of Pol η variant. However, it did not reach the Pol η ^{wt} level indicating that proteolysis of Pol η ⁷²¹ involves additional lysine residues, apart the four mono-ubiquitinated sites already identified. Consistent with this hypothesis, we observed that in contrast to Pol η ^{wt} 4K/R, the mutant Pol η ⁷²¹ 4K/R is still poly-ubiquitinated then degraded by the 20S proteasome.

So far three E3 ligases (e.g. CRL4^{cdt2}, Pirh2 and mdm2) have been involved in the ubiquitination and/or degradation of Pol η [16,17,21]. In this study we report that the degradation of Pol η ⁷²¹ is independent of CRL4^{cdt2} and Pirh2. Since Mdm2 has been involved in the ubiquitination and degradation of Pol η after UV irradiation, it is unlikely that this E3 ligase is involved in the proteolysis of the Pol η ⁷²¹ observed in unstressed cells [17]. Therefore it is tempting to assume that another E3 ligase is implicated in this degradation. Interestingly, it has been reported that the chaperone HSP90 recognizes Pol η as a client and facilitates its accumulation at fork stalling sites through regulation of its stability/solubility [30]. Hsp90 promotes proper folding of newly synthesized proteins into mature forms, and regulates stability, and protein interactions of mature clients. If the native state is unattainable, misfolded proteins are targeted for degradation via the ubiquitin-proteasome system. The specificity of this proteolysis is generally provided by E3 ubiquitin ligases [22]. One of the best characterized proteins that links molecular chaperones with protein degradation is the E3 ubiquitin ligase CHIP (C-terminus of Hsc70 Interacting Protein) which is a U-box E3 enzyme belonging to a new category of E3 enzyme responsible for quality control of cellular proteins [5]. Therefore, we believe that the chaperone associated ubiquitin ligase, CHIP is an attractive candidate for degrading Pol η ⁷²¹. This hypothesis is currently under investigation.

Funding

The P.L.K. lab is supported by La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée). This work was supported by grants from Institut National du Cancer (INCa) PLBio-2010 and PLBio-2012. S.A.S. received support from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Foundation Association pour la Recherche sur le Cancer. E.D. received fellowship from INCa PLBio-2010.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful to JE Cleaver (UCSF, CA) for supplying XP30RO cells and Robert Fuchs (CRCM, France) for providing single-stranded plasmids containing a CPD lesion (pUC-CPD.ss). We thank Florian Dupuy for technical assistance and members of the Kannouche lab as well as Said Aoufouchi for helpful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.02.017>.

References

- [1] C.F. Arlett, S.A. Harcourt, B.C. Broughton, The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation, *Mutat. Res.* 33 (1975) 341–346.
- [2] M. Bienko, C.M. Green, N. Crosetto, F. Rudolf, G. Zapart, B. Coull, P. Kannouche, G. Wider, M. Peter, A.R. Lehmann, K. Hofmann, I. Dikic, Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis, *Science* 310 (2005) 1821–1824.
- [3] M. Bienko, C.M. Green, S. Sabbioneda, N. Crosetto, I. Matic, R.G. Hibbert, T. Begovic, A. Niimi, M. Mann, A.R. Lehmann, I. Dikic, Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination, *Mol. Cell* 37 (2010) 396–407.
- [4] K.A. Cimprich, D. Cortez, ATR: an essential regulator of genome integrity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 616–627.
- [5] P. Connell, C.A. Ballinger, J. Jiang, Y. Wu, L.J. Thompson, J. Hohfeld, C. Patterson, The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 93–96.
- [6] E. Despras, F. Daboussi, O. Hyrien, K. Marheineke, P.L. Kannouche, ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells, *Hum. Mol. Genet.* 19 (2010) 1690–1701.
- [7] E. Despras, N. Delrieu, C. Garandeau, S. Ahmed-Seghir, P.L. Kannouche, Regulation of the specialized DNA polymerase eta: revisiting the biological relevance of its PCNA- and ubiquitin-binding motifs, *Environ. Mol. Mutagen.* 53 (2012) 752–765.
- [8] E.C. Friedberg, A.R. Lehmann, R.P. Fuchs, Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol. Cell* 18 (2005) 499–505.
- [9] C. Gourzones-Dmitriev, A. Kassambara, S. Sahota, T. Reme, J. Moreaux, P. Bourquard, D. Hese, P. Pasero, A. Constantinou, B. Klein, DNA repair pathways in human multiple myeloma: role in oncogenesis and potential targets for treatment, *Cell Cycle* 12 (2013) 2760–2773.
- [10] C.G. Havens, J.C. Walter, Mechanism of CRL4(Cdt2), a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase, *Genes Dev.* 25 (2011) 1568–1582.
- [11] C. Hoege, B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis, S. Jentsch, RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature* 419 (2002) 135–141.
- [12] T. Itoh, S. Linn, R. Kamide, H. Tokushige, N. Katori, Y. Hosaka, M. Yamaizumi, Xeroderma pigmentosum variant heterozygotes show reduced levels of recovery of replicative DNA synthesis in the presence of caffeine after ultraviolet irradiation, *J. Invest. Dermatol.* 115 (2000) 981–985.
- [13] R.E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, Efficient bypass of a thymine–thymine dimer by yeast DNA polymerase, *Poleta, Science* 283 (1999) 1001–1004.
- [14] R.E. Johnson, S.L. Yu, S. Prakash, L. Prakash, A role for yeast and human translesion synthesis DNA polymerases in promoting replication through 3-methyl adenine, *Mol. Cell Biol.* 27 (2007) 7198–7205.
- [15] Y.S. Jung, A. Hakem, R. Hakem, X. Chen, Pirh2 E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates DNA polymerase eta to suppress translesion DNA synthesis, *Mol. Cell Biol.* 31 (2011) 3997–4006.
- [16] Y.S. Jung, G. Liu, X. Chen, Pirh2 E3 ubiquitin ligase targets DNA polymerase eta for 20S proteasomal degradation, *Mol. Cell Biol.* 30 (2010) 1041–1048.
- [17] Y.S. Jung, Y. Qian, X. Chen, DNA polymerase eta is targeted by Mdm2 for polyubiquitination and proteasomal degradation in response to ultraviolet irradiation, *DNA Repair (Amst.)* 11 (2012) 177–184.
- [18] P. Kannouche, B.C. Broughton, M. Volker, F. Hanaoka, L.H. Mullenders, A.R. Lehmann, Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells, *Genes Dev.* 15 (2001) 158–172.
- [19] P. Kannouche, A.R. Fernandez de Henestrosa, B. Coull, A.E. Vidal, C. Gray, D. Zicha, R. Woodgate, A.R. Lehmann, Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells, *EMBO J.* 22 (2003) 1223–1233.
- [20] P.L. Kannouche, J. Wing, A.R. Lehmann, Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage, *Mol. Cell* 14 (2004) 491–500.
- [21] S.H. Kim, W.M. Michael, Regulated proteolysis of DNA polymerase eta during the DNA-damage response in *C. elegans*, *Mol. Cell* 32 (2008) 757–766.
- [22] F. Kriegenburg, L. Ellgaard, R. Hartmann-Petersen, Molecular chaperones in targeting misfolded proteins for ubiquitin-dependent degradation, *FEBS J.* 279 (2012) 532–542.
- [23] A. Lehmann, S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, M.C. Paterson, P.H.M. Lohman, E.A. de Weerd-Kastelein, D. Bootsma, Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (1975) 219–223.
- [24] C. Masutani, M. Araki, A. Yamada, R. Kusumoto, T. Nogimori, T. Maekawa, S. Iwai, F. Hanaoka, Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity, *EMBO J.* 18 (1999) 3491–3501.
- [25] T. Ogi, P. Kannouche, A.R. Lehmann, Localisation of human Y-family DNA polymerase kappa: relationship to PCNA foci, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 129–136.
- [26] K. Opletalova, A. Bourillon, W. Yang, C. Pouvelle, J. Armer, E. Despras, M. Ludovic, C. Mateus, C. Robert, P. Kannouche, N. Soufir, A. Sarasin, Correlation of phenotype/genotype in a cohort of 23 xeroderma pigmentosum-variant

- patients reveals 12 new disease-causing POLH mutations, *Hum. Mutat.* 35 (2014) 117–128.
- [27] B.S. Plosky, A.E. Vidal, A.R. Fernandez de Henestrosa, M.P. McLenigan, J.P. McDonald, S. Mead, R. Woodgate, Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ι and η via interactions with ubiquitin, *EMBO J.* 25 (2006) 2847–2855.
- [28] J.E. Sale, Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a012708.
- [29] V. Schmutz, R. Janel-Bintz, J. Wagner, D. Biard, N. Shiomi, R.P. Fuchs, A.M. Cordonnier, Role of the ubiquitin-binding domain of Poleta in Rad18-independent translesion DNA synthesis in human cell extracts, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 6456–6465.
- [30] T. Sekimoto, T. Oda, F.M. Pozo, Y. Murakumo, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Yamashita, The molecular chaperone Hsp90 regulates accumulation of DNA polymerase η at replication stalling sites in UV-irradiated cells, *Mol. Cell* 37 (2010) 79–89.
- [31] M. Shen, S. Schmitt, D. Buac, Q.P. Dou, Targeting the ubiquitin–proteasome system for cancer therapy, *Expert Opin. Ther. Targets* 17 (2013) 1091–1108.
- [32] A. Sary, P. Kannouche, A.R. Lehmann, A. Sarasin, Role of DNA polymerase η in the UV mutation spectrum in human cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18767–18775.
- [33] M. Tanioka, T. Masaki, R. Ono, T. Nagano, E. Otoshi-Honda, Y. Matsumura, M. Takigawa, H. Inui, Y. Miyachi, S. Moriwaki, C. Nishigori, Molecular analysis of DNA polymerase η gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1745–1751.
- [34] A. Tissier, P. Kannouche, M.P. Reck, A.R. Lehmann, R.P. Fuchs, A. Cordonnier, Co-localization in replication foci and interaction of human η -family members, DNA polymerase pol η and REV1 protein, *DNA Repair (Amst.)* 3 (2004) 1503–1514.
- [35] J.P. Volpe, J.E. Cleaver, Xeroderma pigmentosum variant cells are resistant to immortalization, *Mutat. Res.* 337 (1995) 111–117.
- [36] K. Watanabe, S. Tateishi, M. Kawasuji, T. Tsurimoto, H. Inoue, M. Yamaizumi, Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination, *EMBO J.* 23 (2004) 3886–3896.
- [37] W. Yang, R. Woodgate, What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 15591–15598.

E) Résumé de l'article 2

Regulation of the specialized DNA Polymerase Eta: revisiting the biological relevance of its PCNA- and ubiquitin-binding motifs

Emmanuelle Despras, Noémie Délrieu, Charlène Garandeau, [Sana Ahmed-Seghir](#), Patricia L. Kannouche.

L'importance des domaines de régulation présents dans la partie C-terminale de Pol η est vivement discutée dans la littérature car des études menées dans différents laboratoires ont donné des résultats contradictoires, notamment sur l'importance des domaines PIP et UBZ dans la réponse aux UV. Dans cet article 2, nous avons voulu ré-examiner quelle était la contribution de ces domaines PIP et UBZ de Pol η en réponse aux UVC en utilisant différents mutants de la protéine non tagués. Pour cela des lignées exprimant ces protéines mutantes de Pol η invalidées pour les domaines PIP ou UBZ ou les deux en même temps ont été construites. Nous avons montré que l'invalidation des deux domaines en même temps confère aux cellules un phénotype XP-V. En effet, nous avons constaté une forte sensibilité aux UVC qui est accrue en présence de faibles doses de caféine, une inhibition prolongée de la synthèse ADN et une activation persistante du point de contrôle intra-S dépendant d'ATR. En revanche, lorsqu'on invalide qu'un seul des deux domaines à la fois, les cellules sont très peu sensibles aux UVC ce qui suggère que ces mutants sont actifs *in cellulo*. Par des expériences d'immunofluorescence, nous avons constaté que les mutants PIP ou UBZ sont capables d'être recrutés au niveau des lésions après UVC mais à un plus faible niveau que la protéine sauvage. Ces résultats suggèrent que les domaines PIP et UBZ ne sont pas nécessaires au recrutement de Pol η mais plutôt à sa rétention au niveau des fourches de réplication bloquées.

Research Article

Regulation of the Specialized DNA Polymerase Eta: Revisiting the Biological Relevance of Its PCNA- and Ubiquitin-Binding Motifs

Emmanuelle Despras,* Noémie Delrieu, Charline Garandeau, Sana Ahmed-Seghir, and Patricia L. Kannouche*

Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8200 Laboratoire Stabilité Génétique et Oncogénèse, Université Paris-Sud, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

During translesion synthesis (TLS), low-fidelity polymerases of the Y-family polymerases bypass DNA damages that block the progression of conventional processive DNA polymerases, thereby allowing the completion of DNA replication. Among the TLS polymerases, DNA polymerase eta (polh) performs nucleotide incorporation past ultraviolet (UV) photoproducts and is deficient in cancer-prone xeroderma pigmentosum variant (XPV) syndrome. Upon UV irradiation, the DNA sliding clamp PCNA is monoubiquitylated on its conserved Lys-164. This event is considered to facilitate the TLS process in vivo since polh preferentially interacts with monoubiquitylated PCNA through its ubiquitin-binding domain (UBZ) as well as its PCNA interacting peptide (PIP)-box. However, recent observations questioned this model. Therefore, in this study, we re-examined the relative contribution of the regulatory UBZ and PIP domains of polh in response to UVC. We show

that simultaneous invalidation of both motifs confers sensitivity to UVC, sensitization by low concentrations of caffeine, prolonged inhibition of DNA synthesis and persistent S phase checkpoint activation, all characteristic features of XPV cells. While each domain is essential for efficient accumulation of polh in replication factories, mutational inactivation of UBZ or PIP motif only confers a slight sensitivity to UVC indicating that, although informative, polh focus analysis is not a reliable tool to assess the polh's ability to function in TLS in vivo. Taken together, these data indicate that PIP and UBZ motifs are not required for recruitment but for retention of polh at sites of stalled replication forks. We propose that this is a way to ensure that a sufficient amount of the protein is available for its bypass function. *Environ. Mol. Mutagen.* 53:752–765, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: UV; replication; translesion synthesis; xeroderma pigmentosum variant; polymerase eta

INTRODUCTION

During replication of human genome, thousands of replication origins are activated in a spatially and temporally regulated manner to allow the complete duplication of the genetic material within a few hours. The presence of DNA damage during this period of time is particularly deleterious as it can lead to introduction of mutations, chromosomal rearrangements or cell death. As a matter of fact, it is now accepted that the genetic instability generated by replicative stress plays a major role during tumorigenesis process [Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al. 2005]. The ultraviolet (UV) component of solar light is the prominent etiological factor responsible for the onset of skin cancers. UV mainly causes the formation of two types of DNA lesions, the cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and the pyrimidine 6,4 pyrimidone photoproduct (6,4-PP), both deforming the DNA double helix. These

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Agence Nationale de la Recherche; Grant Number N8 ANR-09-PIRI-001; Grant sponsor: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; Grant sponsor: Institut National du Cancer (INCa PLBio-2010).

*Correspondence to: Patricia Kannouche, Laboratoire Stabilité Génétique et Oncogénèse, CNRS UMR8200, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France; E-mail: patricia.kannouche@igr.fr and Emmanuelle Despras, Laboratoire Stabilité Génétique et Oncogénèse, CNRS UMR8200, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France. E-mail: emmanuelle.despras@igr.fr

Received 25 May 2012; provisionally accepted 22 August 2012; and in final form 23 August 2012

DOI 10.1002/em.21741

Published online 17 October 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

damages can be repaired by the nucleotide excision repair (NER) pathway. However, if they persist during S phase, they can block the progression of DNA replicative polymerases whose catalytic sites are too restrictive to accommodate the distortion. To cope with this problem, cells evolved various mechanisms of DNA damage tolerance, such as translesion DNA synthesis process (TLS), that allow completion of replication without removal of the lesions [for review, see Chang and Cimprich 2009].

During TLS, replicative polymerases are transiently replaced by specialized low-fidelity DNA polymerases able to replicate across the lesion thanks to a larger catalytic site. Five of these DNA polymerases, called TLS polymerases, are involved in replication of UVC-induced lesions in human cells: polh, poli, polj, Rev1 (Y family) and polf (B family) [Sale et al., 2012]. Each of these polymerases exhibits specific efficiency and accuracy towards various DNA lesions but are highly unfaithful on undamaged DNA templates [for review, see Kannouche and Stry, 2003]. Polh participates in genome stability through its capacity to accurately bypass the most abundant photoproduct, the TT-CPD [Masutani et al., 2000; Yoon et al., 2009]. Mutations in the gene coding for polh are responsible for the cancer-prone xeroderma pigmentosum variant (XPV), a human recessive disorder characterized by a high sensitivity to solar light and a dramatic predisposition to cutaneous tumors. XPV cells present a replication defect and an elevated mutagenesis upon UV exposure [Lehmann et al., 1975; Maher et al., 1976; Stry et al., 2003]. This latter feature is presumably caused by inaccurate bypass of photoproducts by alternative TLS polymerases in the absence of a functional polh [Ziv et al., 2009].

The intrinsic error-proneness of TLS polymerases suggests that their access to DNA is precisely controlled. Regulation of TLS is well documented in yeast *S. cerevisiae*, where it was shown to be promoted by mono-ubiquitylation of the DNA sliding clamp PCNA (mUb-PCNA) at stalled forks by the Rad6/Rad18 complex [Hoege et al., 2002]. In human cells, PCNA is also mono-ubiquitylated on the conserved lysine 164 (K164) after UVC and polh interacts preferentially with this modified form [Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004]. The identification of PCNA and ubiquitin binding motifs (PIP for PCNA interacting peptide and UBM or UBZ for ubiquitin binding motif or ubiquitin binding zinc finger) in most Y-family DNA polymerases has provided an attractive molecular mechanism for such an interaction [Bienko et al., 2005; Kannouche et al., 2004; Plosky et al., 2006; Watanabe et al., 2004]. This mode of regulation was further extended to additional roles of polh, which acts in a coordinated manner with mUb-PCNA in response to oxidative stress and in somatic hypermutation, a mechanism involved in immunoglobulin diversification [Langerak et al., 2007; Zlatanou et al., 2011].

However, recent results questioned this model. First, Rad18, the E3 ubiquitin ligase responsible for PCNA

ubiquitylation, is dispensable for in vitro bypass of TT-CPD [Schmutz et al., 2010], although Rad18 is required for polh localization in replication foci in vivo [Watanabe et al., 2004]. Moreover, PCNA K164R mutation and knock-out or knock-down of TLS polymerases have additive effects on UVC sensitivity in mouse embryonic fibroblasts [Hendel et al., 2011; Krijger et al., 2011]. These data suggest that TLS polymerases can act independently of PCNA ubiquitylation. The involvement of ubiquitin binding motifs in TLS was mostly assessed by mutational invalidation of the C₂H₂ UBZ of polh, for which a complementation assay of XPV phenotype is available, and gave rise to contradictory results. Several studies showed that a functional UBZ is required for correct localization of polh in replication foci, total complementation of XPV cell sensitivity and replication defect after UVC and in vitro bypass of TT-CPD [Bienko et al., 2005; Bienko et al., 2010; Gohler et al., 2011; Plosky et al., 2006; Schmutz et al., 2010]. However, data from the Prakash laboratory indicate that the UBZ motif is dispensable for polh function both in yeast and in human [Acharya et al., 2007; Acharya et al., 2008; Acharya et al., 2010].

To clarify these discrepancies, we re-examined the relative contributions of PIP and UBZ motifs of polh in response to UVC. We assessed the capacity of stably expressed untagged single and double mutants to restore UVC resistance and to complement the replication defect of an XPV cell line. We showed that PIP and UBZ motifs cooperate for the retention of polh in replication foci to ensure that sufficient amount of the protein is available for photoproducts bypass. Furthermore, our data revealed that high expression levels of mutant polh triggered by the usual use of a strong promoter may have masked fine regulation mechanisms, precluding reproducible outcomes.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture

Normal (MRC5-V1) and XPV (XP30RO) SV-40 immortalized fibroblasts were maintained in Minimal Eagle Medium (MEM; Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 Ig/ml streptomycin under 5% CO₂. Construction of stable cell lines expressing wild-type (WT) polh, mutated polh or empty pcDNAzeo3.1 vector (EV) from XP30RO cells was described elsewhere [Despras et al., 2010; Stry et al., 2003; Zlatanou et al., 2011]. These cell lines were grown in presence of 100 Ig/ml zeocin (Invivogen).

UVC Irradiation

For UVC irradiation (254 nm), cells were rinsed in pre-heated phosphate buffer saline (PBS) and irradiated without any medium at a fluency of 0.65 J/m²/s.

siRNA Transfection

siRNAs were used to transiently down-regulate the expression of POLH (5⁰-GAAGUUAUGUCCAGAUCUU-3⁰, Eurogentec). Cells were transfected with 10 nM of siRNAs using Interferin (Polyplus) according to the manufacturer's instructions, and were treated 48 h after transfection.

Proliferation Assay

Cells were plated at 1.5×10^5 per well of a six-well plate 24 hr before UVC exposure. In the case of siRNA transfection, cells were transfected 24 hr after seeding at 0.75×10^5 cells per well and grown for 48 hr before irradiation. Cells were incubated for 72 hr in medium supplemented or not with 0.38 mM caffeine (Sigma) and counted with trypan blue using a Neubauer haemocytometer.

Immunofluorescence

Cells were seeded on glass coverslips 48 h before UVC irradiation. For total polh immunostaining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton-x100 in PBS. For detection of replication foci, soluble proteins were extracted in CSK100 buffer (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2% Triton X100, antiproteases (Complete EDTA free, Roche)) for 5 min on ice under gentle agitation. Cells were washed in ice-cold PBS and fixed in 4% formaldehyde. Coverslips were immersed in methanol at -20°C for 10 sec. After washes in PBS, coverslips were blocked in IF buffer (3% BSA, 0.5% Tween 20 in PBS) for 30 min. Antibodies were diluted in IF buffer. Primary antibodies (1/500 rabbit anti-polh Abcam ab17725 or 1/300 rabbit anti-polh H-300 Santa Cruz, 1/500 PCNA PC10 Santa Cruz) were incubated for 1 h at room temperature. Secondary antibodies (1/1,000 anti-rabbit AlexaFluor 488, 1/1,000 anti-mouse Alexa Fluor 594) were incubated for 30 min at room temperature. Coverslips were mounted in mounting medium (Dako) supplemented with DAPI (Sigma). Images were acquired on an Axio Imager Z1 microscope using the Axio Vision software (Zeiss).

Western Blot

For analysis of phosphorylated proteins, cells were scraped directly in NETN buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.5, 0.5% NP-40, antiproteases, antiphosphatases (PhosSTOP, Roche)) and incubated 30 min on ice. Extracts were sonicated 15 sec at amplitude 30%.

For cell fractionation, cells were scraped in cold PBS and centrifuged. Pellet was resuspended in 1 volume of CSK100 buffer and incubated 15 min on ice. Sample was centrifuged at 4,500 g for 5 min at 4°C. Supernatant was

kept as Soluble Fraction (SF). Pellet was washed in CSK50 buffer (50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES pH 6.8, 1 mM EGTA, 0.2% Triton X100, antiproteases). DNA-associated proteins were released in 1 volume of CSK50 buffer supplemented with 25 U benzonase (Roche) per ml for 15 min at room temperature on a wheel. Samples were centrifuged at 15,000 g for 5 min. Supernatant was kept as Chromatin Fraction (CF). Pellet was resuspended in 1 volume of lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% SDS, antiproteases, benzonase), lysed 10 min on a wheel at room temperature to give the P2 fraction. For whole cells extracts (WCE), cells were directly lysed in 2 volumes of lysis buffer as described above. Aliquots were kept for Bradford quantification (Biorad). Laemmli 5x was added and proteins were denatured 10 min at 90°C.

The equivalent of 20 μ g of proteins per samples was separated on SDS-PAGE. Membranes were blotted with antibodies directed the following proteins: Chk1 (Santa Cruz), pS345-Chk1 (Cell Signaling), GAPDH (Abcam), lamin A/C (Santa Cruz), NBS1 (Santa Cruz), pS343-NBS1 (Novus Biologicals), ORC2 (BD Biosciences), PCNA (Santa Cruz), polh (Abcam ab17725 or Santa Cruz H-300), Rad18 (ab57447, Abcam), RPA32 (Calbiochem), pS33-RPA32 (Bethyl) and α -tubulin (Sigma).

Flow Cytometry

To study cell cycle distribution, cells were treated, incubated for the indicated times and 10 μ M bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma) was added to culture medium 10 min prior harvesting. Cells were trypsinised, washed in PBS and fixed in 80% ice-cold ethanol overnight at -20°C. The day of analysis, samples were incubated in 15 mM pepsin (Sigma) for 20 min at 37°C. DNA was denatured in 2 N HCl for 20 min at room temperature. The pellet was washed in Bu buffer (0.1% FCS, 0.1% Tween20, 0.1 M Hepes in PBS), and was incubated with 1/50 mouse anti-BrdU antibody (DAKO) in Bu buffer for 45 min. After centrifugation, pellet was resuspended and incubated with 1/50 anti-mouse-FITC antibody (AbCys). Total DNA was stained in 2.5 μ g/ml propidium iodide and 50 μ g/ml RNase (Sigma) in PBS for 30 min at room temperature. Samples were analyzed on a C6 flow cytometer using the C6 Flow software (BD Accuri). 20,000 cells were counted for each sample.

RESULTS

Establishment of Cell Lines Stably Expressing Regulatory Mutants of DNA Polymerase ϵ

To compare the contribution of polh binding domains to PCNA and ubiquitin on its function, we generated cell

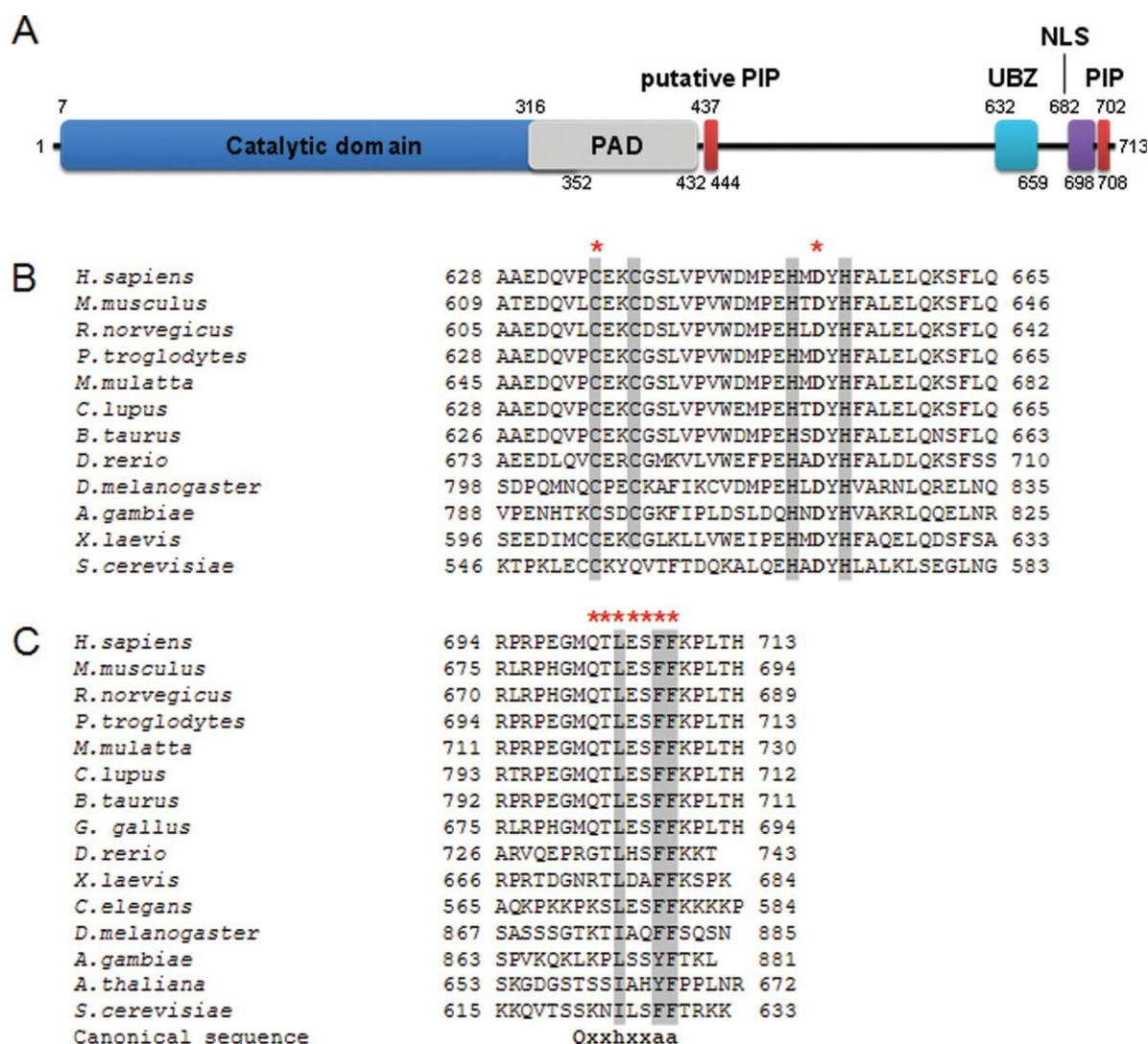


Fig. 1. Regulatory motifs of human DNA polymerase ϵ . A: Schematic representation of human polh. PAD: polymerase associated domain, also referred as little finger; UBZ: ubiquitin-binding zinc finger; NLS: nuclear localization signal; PIP: PCNA-interacting peptide box. B: Sequence alignment of UBZ motif. C: Sequence alignment of PIP motif. The PIP

box consensus sequence is presented below (h, hydrophobic amino acid I/L/M/V; a, aromatic amino acid Y/F). (*): amino acids mutated to alanine in this study. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

lines stably expressing untagged punctual mutants of UBZ and/or PIP motifs (Fig. 1). Critical amino acids (aa) were mutated to alanine using site directed mutagenesis, as already described [Zlatanou et al., 2011]. For the UBZ mutants (UBZ* polh), we targeted either the first cysteine of the C₂H₂ ubiquitin zinc finger (C635) or the conserved aspartate D652 already shown to be required for interaction with ubiquitin [Bienko et al., 2005; Bomar et al., 2007]. For the PIP mutants (PIP* polh), we mutated the seven amino of the C-terminal motif (aa 701-QTLESFF-708).

Constructions were transfected in an SV40-immortalized XPV cell line that does not express polh protein because of a mutation in the POLH gene leading to a pre-

mature stop codon (XP30RO fibroblasts, [Volpe and Cleaver 1995]). Stable reconstitution of XP30RO cells with wild-type polh, termed WT cells in this study, has been described elsewhere [Stary et al., 2003]. Clones (cl) were carefully analyzed by immunofluorescence during the selection process and throughout time in culture to ensure that all cells indeed expressed polh protein (Supporting Information Fig. S1). Moreover, as a fraction of XP30RO cells is tetraploid, flow cytometry analysis was performed to exclude clones with DNA content over 4C (data not shown). Two independent transfections were carried out for the UBZ mutations. The clones arising from the first transfection (clones numbered 1 to 3) displayed higher polh amounts than WT cells (Supporting Information Fig.

S1A) whereas the second transfection (clones numbered 4 to 6) allowed us to obtain clones with polh levels similar to WT cells (Supporting Information Fig. S1B). Western blotting confirmed that polh mutants with unfunctional UBZ were not ubiquitinated (data not shown), in agreement with previous results [Bienko et al., 2005].

Single Mutants of UBZ or PIP Motifs Are Not Sensitized to UVC by Caffeine Whereas Double Mutation Confers an XPV Phenotype

Sensitization to UVC by low concentrations of caffeine is a characteristic of XPV cells used for the diagnosis of patients [Arlett et al., 1975]. So far, survival of cells expressing PIP and UBZ mutants of polh has only been assessed either in the presence of caffeine [Acharya et al., 2008; Bienko et al., 2005; Bienko et al., 2010; Gohler et al., 2011] or after UVC alone [Schmutz et al., 2010]. We therefore compared the proliferation of cells irradiated at various UVC doses and incubated in the presence or not of 0.38 mM caffeine. This concentration increased the sensitivity of XPV cells but had no effect on WT cells (Fig. 2) [Despras et al., 2010].

Invalidation of either UBZ or PIP motif only conferred a slight sensitivity to UVC (Figs. 2A, 2B, 2E, and S2, refer to Supporting Information Table I for statistical analysis of the data). Interestingly, single mutants were not sensitized by caffeine. Simultaneous mutation of UBZ and PIP motifs conferred an XPV phenotype with reduced survival after UVC and sensitization by caffeine (Fig. 2C). After 7 J/m², caffeine induced a 2- to 3-fold increase of the sensitivity of UBZ*/PIP* cells (Fig. 2D). This effect was lower than the one observed in XPV cells (6.6-fold increase), suggesting that UBZ*/PIP* polh still conserved a protective action towards UVC-induced lesions.

Mutations That Affect Zinc Finger Structure or Hamper Interaction With Ubiquitin Result in Similar UVC Sensitivity

We compared the effects of two different punctual mutations within the UBZ motif. Whereas C635 participates in the structure of the C₂H₂ ubiquitin-binding zinc finger, D652 directly interacts with ubiquitin [Bomar et al., 2007]. Mutation of either C635 or D652 to alanine conferred similar UVC or UVC+caffeine sensitivity, although variations were observed among the different clones we analyzed (Fig. 2E). Between 50 and 80% of both C635A and D652A polh-expressing cells survived after 7 J/m², the more resistant clones behaving similarly to WT cells (77.4 ± 12.5%). The variations were not correlated with the amount of polh as, for instance, C635A c11 and C635A C15 displayed similar sensitivities (64.3 ± 6.8% and 67.2 ± 15.37%) whereas polh levels were higher in C625A c11 (Supporting Information Fig. S1). However, readers should keep in mind that polh amounts

exceeded physiological levels in both cases (see below). Hence, variations were likely due to a clonal effect, underlying the importance to analyze different clones in complementation experiments.

Globally, these data suggest that mutation in residue C635 or D652 in UBZ motif confers a same degree of UV sensitivity. Hence, our results are not consistent with the observation made by Acharya et al. that D652A mutation is more deleterious than C635A mutation and their hypothesis that D652A polh acts as a dominant negative [Acharya et al., 2008, 2010].

UBZ and PIP Motifs Cooperate to Promote Polymerase Eta Accumulation in Replication Foci

While Bienko et al. showed that D652A polh is impaired in focus formation [Bienko et al., 2005], Acharya et al. observed no effect of various UBZ mutations, including D652A [Acharya et al., 2008]. This discrepancy was demonstrated to be the consequence of artificial targeting of mutant polh in replication foci by PCNA over-expression in the second study [Sabbioneda et al., 2009]. Even if this particular point was solved out, unanswered questions remained. In the same article, Acharya et al. identified a putative PIP downstream polh catalytic domain (aa 437-444) and suggested a compensatory mechanism between the two PIP boxes. However, experiments were also performed after PCNA over-expression. We then asked whether mutation of the C-terminal PIP was sufficient to impair foci formation at physiological PCNA levels. Moreover, it remained unclear how UBZ* and PIP* polh can confer resistance to UVC if they are not recruited to replication foci.

To assess the capacity of WT and mutant polh to localize in replication factories, we used a procedure in which soluble proteins were extracted prior to fixation and immunostaining with anti-polh and anti-PCNA antibodies. 6 hr after 20 J/m², WT polh formed detergent-resistant bright nuclear foci in 73 ± 12% of PCNA-positive cells (Figs. 3A and 3B). This is in agreement with previous results in human fibroblasts transiently expressing GFP-polh [Kannouche et al., 2001]. Mutation of the UBZ and/or PIP motifs affected the localization pattern of polh, as no bright foci were observed in mock-treated or UVC-irradiated cells (Fig. 3A, Supporting Information Fig. S3). However, in the irradiated UBZ* and PIP* cells, a residual polh staining was detected in 40% of PCNA-positive cells (Figs. 3A and 3B), indicating that single mutants can indeed associate with replication foci. Similar results were obtained with C635A and D652A mutations of the UBZ motif (data not shown). These faint foci were hardly detected in UBZ*/PIP* polh-expressing cells. A similar phenotype was observed 3, 6 and 9 h after UVC exposure (Supporting Information Fig. S3). 24 hr after 20 J/m², the proportions of polh-positive cells further increased in

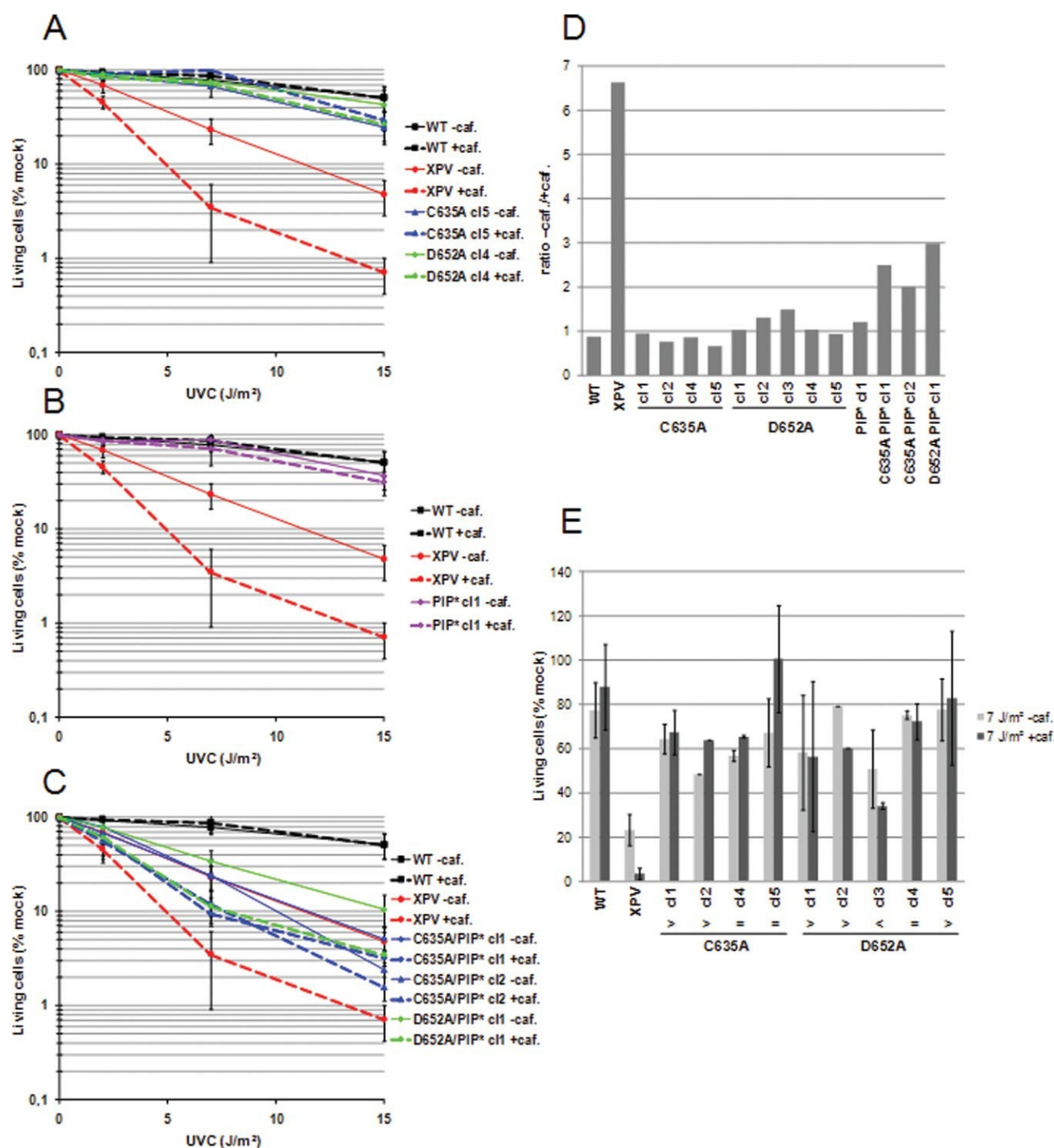


Fig. 2. Simultaneous mutation of UBZ and PIP motifs confers an XP-V phenotype. A–C: Cells were grown for 72 hr after UVC irradiation in medium supplemented or not with 0.38 mM caffeine (dashed and plain lines, respectively). Surviving fraction was expressed as a percentage of unirradiated cells. Survival curves of (A) UBZ* mutants, (B) PIP* mutants, and (C) UBZ*/PIP* mutants compared to XPV cells (red curves) and XPV cells complemented with WT polh (black curves). Values are the mean \pm SD of at least three independent experiments. D:

The ratio between surviving fraction without and with caffeine after 7 J/m^2 is shown for different clones. E: Comparison of UVC sensitivity after 7 J/m^2 of various C635A and D652A polh-expressing clones. Values are the mean \pm SD of at least two independent experiments, except for C635A cl2 and D652A cl2 (1 experiment). 5: polh amount similar to WT cells; >: polh amount higher than in WT cells; <: polh amount lower than in WT cells.

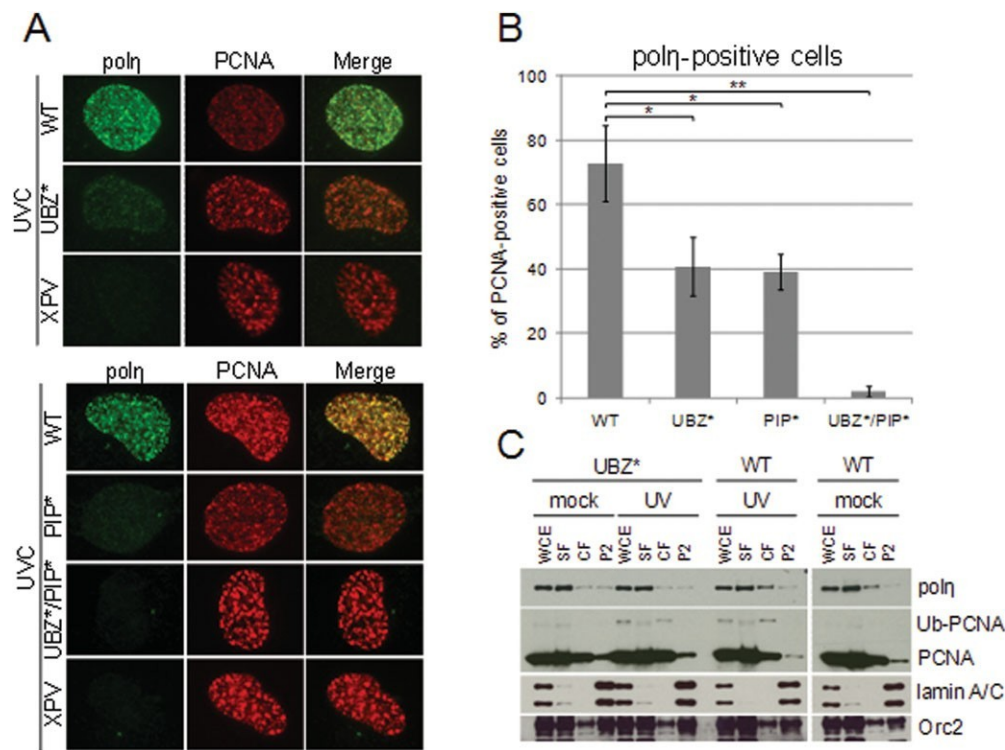


Fig. 3. Both UBZ and PIP motifs are required for efficient localization of polh to UV-damaged sites. A: Cells were irradiated at 20 J/m² and incubated for 6 hr. Soluble proteins were extracted with detergent prior fixation. Polh and PCNA were detected by indirect immunofluorescence. B: Cells were treated as in (A). Cells with detergent-resistant polh staining were counted and expressed as a percentage of cells with PCNA foci. Values are the mean \pm SD of three independent experiments. At least 200 cells were counted per condition and experiment. (*): $P <$

0.01; (**): $P < 0.0005$ (t-test). UBZ*: C635A c15; PIP*: PIP* c11; UBZ*/PIP*: C635A/PIP* c12. C: WT and D652A c11 cells were irradiated at 20 J/m² and incubated for 6 hr. Soluble proteins were extracted with detergent (SF, soluble fraction). Remaining pellet was further fractionated in chromatin-bound fraction (CF) and insoluble fraction (P2) using DNase. Proteins were analyzed by western blotting. WCE: whole cell extract.

UBZ* and PIP* cells. However, the intensity of polh staining remained lower than in WT cells. Furthermore, 15% of PCNA-positive cells also presented faint polh foci in UBZ*/PIP* cells. Although the quantification itself should be taken with caution because of the lethality observed in this cell line at this time point, this observation suggests that additional regulation domains may promote polh association with replication factories when both UBZ and PIP motifs are inactivated.

Altogether, our data indicate that (i) UBZ and PIP motifs cooperate for accumulation of polh at replication foci and (ii) UBZ* and PIP* polh keep the capacity to localize in replication foci, although this association is weak. Moreover, as single mutants were impaired in bright nuclear focus formation, we confirmed that UBZ motif is required for efficient polh accumulation at stalled forks and we demonstrated that the putative PIP identified by Acharya and al. [Acharya et al., 2008] cannot compensate for the invalidation of the C-terminal PIP.

To determine if single polh mutants were able to associate with chromatin, we performed a cellular fractionation in UBZ* cells (D652A) versus WT cells (Fig. 3C). A small

amount of UBZ* polh was indeed found in the chromatin-bound fraction. This amount was not increased after UVC. However, our data suggest that it is sufficient to confer resistance to UVC. This explains why single mutants were able to partially complement XPV cells although their localization in replication foci is difficult to observe.

Resumption of DNA Synthesis After UVC Is Delayed in Single Mutants and Persistently Inhibited in Double Mutant

We and other have previously shown that resumption of DNA synthesis after UVC irradiation is strongly impaired in the absence of polh [Bullock et al., 2001; Cordeiro-Stone et al., 2002; Despras et al., 2010]. In order to unravel the consequences of UBZ and PIP invalidation on S phase progression, cells were pulse-labeled with BrdU at various times after 7 J/m² and analyzed by flow cytometry (Supporting Information Fig. S4). We measured both mean BrdU incorporation, as an estimation of DNA synthesis, and proportion of cells in S phase (Figs. 4A and 4B).

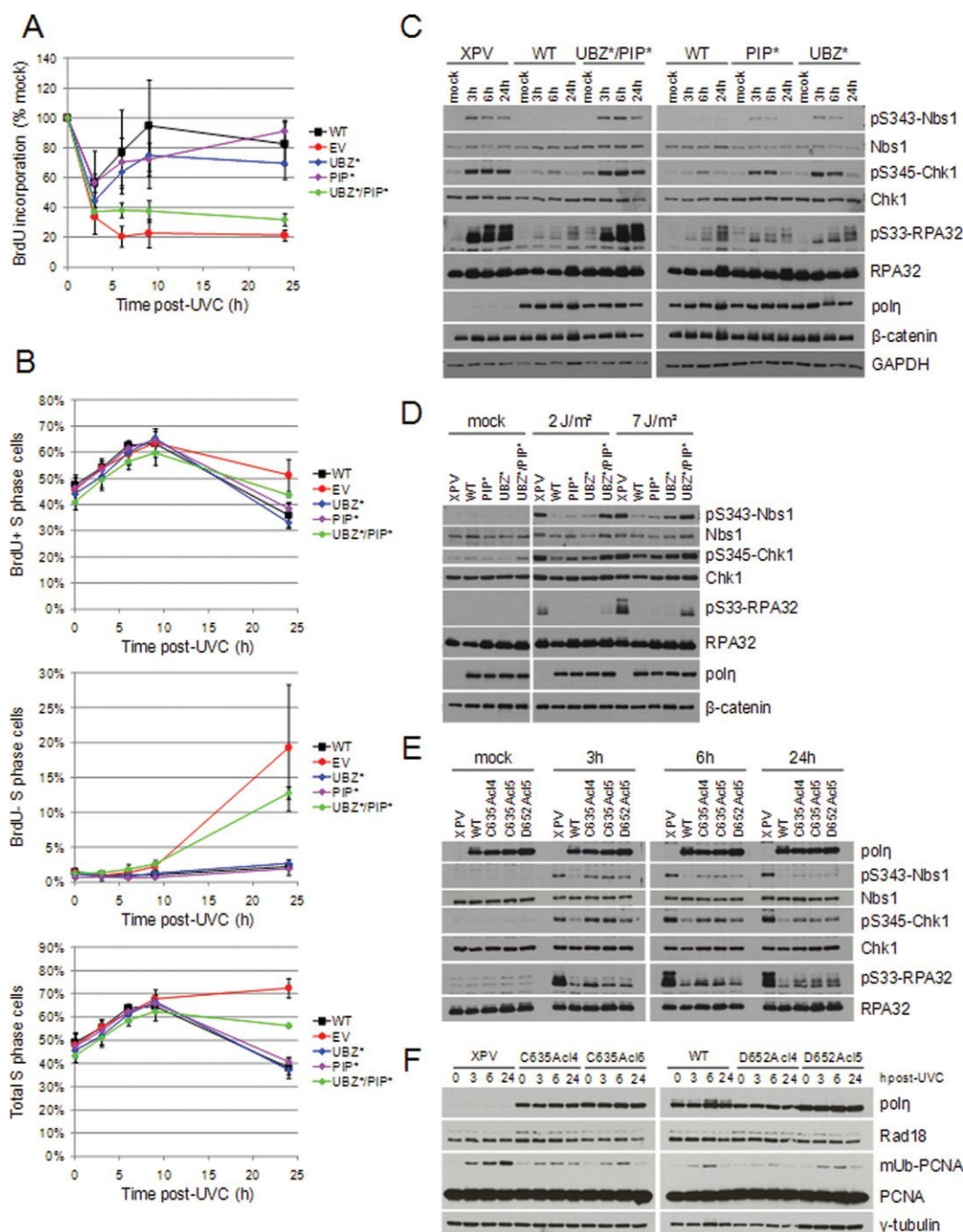


Fig. 4. Persistent inhibition of DNA synthesis is associated with ATR checkpoint sur-activation in UBZ*/PIP* mutant after UVC. A,B: Cells were irradiated at 7 J/m² and grown for the indicated times. Cells were pulsed-labeled with BrdU prior harvesting and analyzed by flow cytometry. A: Mean BrdU fluorescence expressed as a percentage of the signal obtained in unirradiated cells. B: Evolution of S-phase content. Upper panel: BrdU-positive cells, middle panel: BrdU-negative cells; lower panel: total S phase

cells. Values are the mean \pm SD of three independent experiments. C–E: Phosphorylation of ATR targets Chk1, Nbs1 and RPA32 was assessed by western blot at various times after 7 J/m² (C and E) or 6 hr after 2 or 7 J/m² (D). F: The amount of mono-ubiquitinated PCNA (mUb-PCNA) was determined at various times after 7 J/m². UBZ*: C635A cl5; PIP*: PIP* C11; UBZ*/PIP*: C635A/PIP* cl2, otherwise indicated.

BrdU incorporation transiently decreased in WT cells with a minimum of 57% \pm 21% of mock-irradiated cells 3 hr after UVC exposure (Fig. 4A). The inhibition of DNA synthesis was stronger and more persistent in

XPV cells where it remained at around 20% of mock-irradiated cells between 6 and 24 hr after treatment. UBZ*/PIP* cells behaved like XPV cells, BrdU incorporation being only 32% \pm 4.2% of mock-treated cells 24 hr after

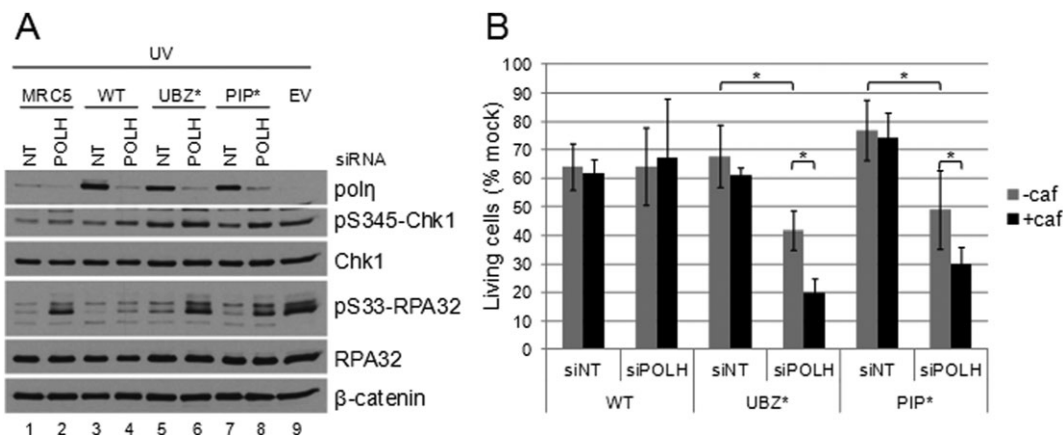


Fig. 5. Reducing UBZ* and PIP* polh amount to physiological levels confers UVC-sensitization by caffeine. Cells were transfected with 10 nM of siRNA directed against POLH mRNA (siPOLH) or unspecific siRNA (siNT). Cells were irradiated at 7 J/m² 48 hr after transfection. A: Analysis of polh amounts and phosphorylation of ATR targets by western blotting 6 hr after UVC exposure. B: Cells were grown for 72 hr after UVC in medium supplemented or not with 0.38 mM caffeine and living cells were counted. Surviving fraction was expressed as a percentage of mock-treated cells. Values are the mean \pm SD of at least three independent experiments. (*): $P < 0.05$ (t-test). UBZ*: C635A c15; PIP*: PIP* c11.

UVC. At this later time point, persistent accumulation in S phase and S phase-arrested cells were observed in both XPV and double mutant cells (Fig. 4B). Single UBZ* and PIP* mutants displayed a slightly delayed resumption of DNA synthesis compared to WT cells (Fig. 4A). Although we observed a high variability of mean BrdU incorporation from an experiment to another, precluding statistical significance (Supporting Information Table 1), this delay was reproducible in all but one of our independent experiments. Accordingly, S phase accumulation was transient in WT cells and single mutants without the appearance of S-phase arrested cells (Fig. 4B). Mutation of D652 to alanine gave similar results (data not shown).

Replication fork stalling at UVC-induced lesions activates a checkpoint regulated by the Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 related (ATR) kinase that allows S phase slow down and stabilization of replication forks [for review, see Cimprich and Cortez, 2008]. We have previously shown that persistent inhibition of DNA synthesis in UVC-irradiated XPV cells was associated with a stronger and persistent activation of ATR checkpoint [Despras et al., 2010]. We analyzed in our cell lines the phosphorylation status of various ATR targets. These included Checkpoint Kinase 1 (Chk1), the key effector of the pathway which is activated upon phosphorylation by ATR on serine 345 [Capasso et al., 2002], Nijmegen Breakage Syndrome 1 (Nbs1) [Olson et al., 2007] and the 32-kDa subunit of Replication Protein A (RPA32) [Olson et al., 2006]. After 7 J/m², these proteins are more strongly phosphorylated in XPV cells than in WT cells and phosphorylation levels remained high 24 hr after UVC exposure in the absence of polh (Fig. 4C), which confirmed previous results [Bomgarden et al., 2006; Cruet-Hennequart et al., 2006; Despras et al., 2010]. When either UBZ (C635A) or PIP motif was mutated, amounts of phosphorylated Chk1 and Nbs1 were intermediate 3 and 6

hr after UVC and restored to background after 24 hr. Hyper-phosphorylated forms of RPA32 increased with time in a similar manner than in WT cells. UBZ*/PIP* cells behaved like XPV cells with a strong and persistent phosphorylation of ATR targets. This was confirmed by a dose response experiment 6 hr after UVC, which showed that ATR checkpoint suractivation was readily visible after 2 J/m² in XPV and UBZ*/PIP* cells (Fig. 4D).

As it was suggested that Chk1 phosphorylation is impaired in D652A polh-expressing cells [Gohler et al., 2011], we compared the effect of C635A and D652A mutations on ATR checkpoint activation (Fig. 4E). We found no evidence of altered ATR pathway when UBZ motif was mutated. Moreover, whereas ubiquitinated PCNA accumulated with time in irradiated XPV cells, it was transiently induced in WT and UBZ* cells (Fig. 4F), suggesting that the signal leading to PCNA ubiquitination was shut down. This was in agreement with the restoration of normal cell cycle profiles 24 hr after irradiation in these cell lines (Supporting Information Fig. S4B and data not shown).

Taken together, our data suggest that UBZ* and PIP* polh retained the capacity to restore replication fork progression, whereas DNA synthesis was strongly impaired when both motifs were mutated or when polh was absent, leading to sustained ATR checkpoint activation.

Expression of UBZ or PIP Mutant at Physiological Levels Confers Sensitization by Caffeine

In this study and all previous works, expression of polh mutants was driven by the strong cytomegalovirus (CMV) promoter. Hence, the amounts of polh protein were above the physiological level (Fig. 5A, compare Lane 1 with Lanes 3, 5, and 7). We reasoned that this could have

masked fine regulation requirements. We used small interfering RNA (siRNA) directed against POLH mRNA (siPOLH) in order to transiently lower the quantities of polh in our cell lines. Our procedure allowed us to reach polh amounts similar to that of normal immortalized MRC5-V1 fibroblasts (Fig. 5A, compare Lane 1 with Lanes 4, 6, and 8). Unspecific siRNA (siNT) was used as a control.

Down-regulation of polh in UBZ* and PIP* cells led to a strong phosphorylation of RPA32 on S33 after UVC, similar to that observed in XPV cells, whereas it had no effect in WT cells (Fig. 5A). Amounts of pChk1 S345 also increased. This suggests that UBZ and PIP motifs are important when polh is not abundant in the cells. In agreement with this hypothesis, lower levels of UBZ* and PIP* polh led to a higher sensitivity to UVC and to a 1.6 to 2-fold sensitization by caffeine after 7 J/m² (Fig. 5B). These effects were not observed in WT cells, presumably because the residual amount of polh, similar to what was observed in normal cells, was sufficient for lesions bypass. Down-regulation of polh in MRC5-V1 cells also led to sustain RPA32 phosphorylation (Fig. 5A) and sensitization by caffeine [Despras et al., 2010]. Altogether, these data suggest that a minimal quantity of polh should be available at replication foci for efficient lesion bypass.

DISCUSSION

In this study, we assessed the relative contribution of the regulatory UBZ and PIP motifs of polh in response to UVC. We showed that simultaneous invalidation of both domains confers sensitivity to UVC, sensitization by low concentrations of caffeine, prolonged inhibition of DNA synthesis and persistent S phase checkpoint activation, which are characteristic features of XPV phenotype. Whereas both motifs are required for efficient localization of polh in replication foci, mutation of one of these domains only confers a slight sensitivity to UVC that is not further increased by caffeine, unless single mutant amounts are reduced to physiological levels. Taken together, these data indicate that PIP and UBZ motifs are not required for recruitment but for retention of polh at sites of stalling. We propose that this is a way to ensure that a sufficient amount of the protein is available for its bypass function.

Formation of Microscopically Visible Foci Is Not a Prerequisite for polg Activity In Vivo

Soon after polh discovery in 1999, it has been demonstrated that the protein accumulates into discrete nuclear foci corresponding to sites of DNA replication after UVC exposure. This feature was used as an informative way to dissect the contribution of polh domains to its function, leading to the conclusion that its C-terminus is required

for its correct localization [Kannouche et al., 2001]. In the literature, polh focus formation was essentially assessed in cells transiently transfected with tagged polh [Acharya et al., 2008; Bienko et al., 2005; Kannouche et al., 2001].

For the first time, we evaluated the focus formation capacity of various stably expressed untagged polh mutants. We showed that single PIP* and UBZ* mutants were able to confer UVC resistance to XPV cells, although they were impaired in accumulation in replication foci. A faint detergent-resistant staining was however visible in some irradiated cells and a small amount of UBZ* polh could be detected in association with chromatin independently of the presence of UVC lesions. Altogether, our data suggest that single mutants are still able to associate weakly and/or transiently to DNA, which preclude the immunodetection of foci but is sufficient for polh function at the UVC doses used in this study. This is in agreement with previously published data on a PIP mutant [Gueranger et al., 2008]. Background immunofluorescent signals were detected with UBZ*/PIP* polh, indicating that UBZ and PIP motifs cooperate for accumulation of polh in replication foci. However, as double mutant cells were less sensitized to UVC by caffeine than XPV cells, we cannot rule out the possibility that UBZ*/PIP* polh retains capacity to be engaged on DNA to an extent below the threshold of our detection procedure and as suggested by the appearance of faint UBZ*/PIP* polh foci at later time. Hence, focus analysis, although informative, is not a reliable tool to assess the bypass capacity of the protein in vivo and should be interpreted with caution.

During our work, we tested three commercial antibodies all raised against the C-terminal region of polh. The ones from Santa Cruz (H-300) and Sigma (not shown in this study) display unspecific nuclear signal, which prompted us to include XPV cells as a negative control in our experiments. The one from Abcam (ab17725) is more specific but show reduced detection of PIP mutants, presumably because it was raised against the very C-terminus of the protein (aa 690-713). Moreover, all these antibodies hardly detect polh foci when polh is expressed at physiological levels. To our knowledge, the intracellular distribution of endogenous polh has never been reported. Therefore, the development of new, highly specific antibodies would be an interesting tool to evaluate the effect of mutations that do not directly impact the polymerase activity of polh on its localization in primary XPV fibroblasts.

What Is the Biological Significance of polg Accumulation in Replication Foci?

After UVC exposure, a replication fork may encounter several photoproducts during its progression, depending

on the dose of irradiation. Moreover, several replication forks progress simultaneously in one replication focus [Cayrou et al., 2010]. Hence, the local accumulation of polh may keep the protein in the vicinity of active replication forks, ready for use whenever the replicative polymerase encounters a photoproduct. This could be a way to limit stalling and subsequent risk of fork collapse. Moreover, the noncanonical PIP-box of polh only confers a weak affinity for PCNA, which could be advantageous to prevent inappropriate access of the polymerase to replicating DNA [Hishiki et al., 2009]. Additionally, polh is in competition with other PIP-box containing proteins [Moldovan et al., 2007]. In the presence of DNA lesions, the accumulation of polh in replication foci may favor polh in this competition by increasing locally its concentration. In parallel, a growing body of evidence suggests that proteins bearing PIP-boxes are degraded after UVC to clear PCNA and allow polh focus formation [Soria et al., 2008; Speroni et al., 2012].

In agreement with our hypothesis, we have recently identified an XPV patient with a mutation leading to an excessive proteasomal degradation of polh without affecting the intrinsic bypass capacity of the protein. When over-expressed in XP30RO cells, this mutant is partially able to restore resistance to UVC, indicating that the XPV symptoms of this patient are likely caused by insufficient amounts of polh protein (S.A.S, P.L.K manuscript in preparation).

Correlation Between ATR Checkpoint Sur-Activation and Sensitization by Caffeine

In a previous work, we demonstrated a correlation between DNA synthesis impairment and ATR checkpoint sur-activation after UVC in the absence of polh [Despras et al., 2010]. This sur-activation is required for resumption of replication fork progression and cell survival, providing a rationale for the effect of caffeine on irradiated XPV cells. The data shown in this study reinforce these findings. Indeed, in UBZ*/PIP* cells or in cells expressing physiological amounts of the single mutants, we both observed a stronger phosphorylation of ATR targets and an effect of a low concentration of caffeine on cellular sensitivity to UVC. This suggests that full ATR checkpoint activation is indispensable when polh localization is impaired. We have previously shown that activating phosphorylation of Chk1 on S345 is significantly reduced by 0.38 mM of caffeine. However, this concentration was not sufficient to abrogate the UVC-induced S phase accumulation in both WT and XPV cells [Despras et al., 2010]. We therefore speculate that the importance of ATR pathway in XPV cells does not rely on its involvement in inhibition of origin firing but rather in promotion of alternative DNA damage tolerance mechanisms either

by direct regulation or through stabilization of stalled forks.

The link between TLS and S phase checkpoint has recently been strengthened by the demonstration that polh is itself a target of ATR and that its phosphorylation depends on an intact UBZ motif [Gohler et al., 2011]. In this article, it was suggested that UVC-induced Chk1 phosphorylation is reduced in cells expressing UBZ mutant of polh. We found that ATR targets, including Chk1, are phosphorylated in UBZ* cells. We do not have a clear explanation for this discrepancy. Our experiments were performed in several clones derived from two independent experiments and similar results were obtained with C635A and D652A mutations. It should be noted that the Lehmann laboratory does not observe the sur-activation of ATR checkpoint in XPV cells, a feature reported in several studies from different groups [Bomgardner et al., 2006; Cruet-Hennequart et al., 2006; Despras et al., 2010]. Moreover, our checkpoint experiments are consistent with flow cytometry analysis, the level of ATR checkpoint activation being correlated with the severity of the S phase defect.

Do Our Data Solve the Debate About the Contribution of UBZ in polg Function?

We found that functional UBZ is required for efficient accumulation of polh in replication foci and complete restoration of XPV cell sensitivity to UVC. Mutations of C635 or conserved D652 led to similar slight sensitivity to UVC associated with slower resumption of DNA synthesis (this paper and data not shown). Therefore, we disagree with the hypothesis that D652A polh acts as a dominant negative [Acharya et al., 2008] and confirm previously published results [Bienko et al., 2010; Gohler et al., 2011; Plosky et al., 2006; Schmutz et al., 2010]. Considering our results after reduction of polh amount, we speculate that the elevated sensitivity of cells expressing a C638A mutant observed in the pioneer work on polh UBZ domain [Bienko et al., 2005] is the consequence of a low expression in the cell line analyzed.

UBZ motif is conserved in rad30, the *S. cerevisiae* ortholog of polh. Mutation of D570, the residue corresponding to D652, reduces interaction with mUb-PCNA and cell survival after UVC [Parker et al., 2007], whereas mutations of the cysteines or the histidines involved in the zinc finger structure have no effects on rad30 function [Acharya et al., 2007]. While human polh UBZ corresponds to the canonical C₂H₂ zinc finger sequence CxxC...Hxxx(xH), rad30 bears a non canonical zinc finger with the two cysteines being adjacent (CC...HADYH). Both domains can associate with a zinc ion that promotes the folding of the zinc finger. However, the UBZ motif of rad30 can bind ubiquitin in a zinc-independent manner [Woodruff et al., 2010]. This *in vitro*

finding provides a molecular basis for the difference observed between human and budding yeast. It suggests that polh binding to ubiquitin strictly rely on proper folding of its zinc finger in human cells, which is consistent with the similar phenotypes observed after C635 and D652 mutation.

How Many PIP Boxes Are There in Human polg?

Acharya et al. identified an additional putative non-canonical PIP box downstream the catalytic domain of human polh (437-STDITSFL-444) and called it PIP1, the C-terminal PIP box being referred as PIP2 [Acharya et al., 2008]. Invalidation of both PIP1 and PIP2 was required to abrogate polh focus formation. However, these findings were achieved under PCNA transient over-expression, a condition that was further shown to artificially target polh to replication foci [Sabbioneda et al., 2009]. Moreover, even if a truncated form of polh bearing its catalytic domain and PIP1 was able to fully complement XPV cells [Acharya et al., 2010], a clear demonstration that PIP1 is indeed needed for polh binding to PCNA lacks so far.

We showed that mutations of the critical amino-acids of the C-terminal PIP box were sufficient to impair polh accumulation in replication foci, suggesting that PIP1 cannot compensate for PIP2 inactivation. Similar observations were made when a PIP2 mutant was expressed in Burkitt's lymphoma cells (BL2) knocked out for POLH gene [Gueranger et al., 2008]. These data are in agreement with the observation that PIP2 but not PIP1 interacts with human PCNA in a yeast two-hybrid assay [Ohmori et al., 2009]. Further investigations are needed to determine if PIP1 is a bona fide PIP-box or may be involved in interaction with other proteins from replication foci. We do not exclude any of these possibilities, as we observed that UBZ*/PIP* mutants are sensitized to UVC by caffeine in smaller extent than XPV cells.

Differential Contributions of UBZ, PIP, and mUb-PCNA in Response to UVC and Oxidative Stress

It was proposed that the conjunction of PIP and UBZ promotes a preferential association of polh with mUb-PCNA among other ubiquitinated proteins [Hishiki et al., 2009]. The recent results described in the Introduction section opened a controversy on the requirement of PCNA mono-ubiquitylation for TLS of photoproducts. Polh barely forms foci in PCNA K164R mouse cells but bypass of TT-CPD is not totally abolished and inactivation of polh further increases the sensitivity to UVC [Hendel et al., 2011; Krijger et al., 2011]. The situation may be somewhat different in human cells. Failure to ubiquitinate PCNA confers UVC sensitivity without additional effect of polh depletion [Niimi et al., 2008]. Surprisingly, Gölher et al. claimed in the discussion of their paper that it does not affect polh localization [Gohler

et al., 2011], suggesting that post-translational modifications of PCNA are dispensable for polh recruitment or retention in replication foci after UVC. This implies that the UBZ motif of polh may be involved in transactions with other ubiquitinated proteins in replication factories.

In addition to its function in bypass of photoproducts, polh is also required for cell survival after oxidative stress and acts in a coordinated manner with mUb-PCNA and the Msh2/Msh6 complex [Zlatanou et al., 2011]. Polh interaction with PCNA is reinforced upon H₂O₂ treatment in a manner dependent of the ubiquitination of PCNA and polh recruitment on oxidized DNA depends on functional UBZ and PIP motifs. Interestingly, H₂O₂ sensitivity of XPV cells cannot be restored by stable expression of either single or double UBZ* and PIP* mutants. This contrasts with the observations reported in this study, the double mutant being more sensitive than the single ones after UVC. A simple explanation may be that different lesions require different protein complexes to be processed. However, we have additional hypotheses. Whereas polh bypasses photoproducts during S phase, it is involved in a replication-independent pathway after oxidative stress [Zlatanou et al., 2011]. In this case, polh may fill in gaps created after lesion recognition by Msh2/Msh6, in a manner reminiscent of mismatch repair or somatic hypermutation. Hence, whereas polh action is concentrated at stalled forks after UVC, it can virtually affect the whole genome after oxidative stress, requiring retention of higher amounts of the protein. Alternatively, the strict requirement on PIP and UBZ motifs for polh function may be context dependent, i.e. forks versus gaps.

On the Limitations of Complementation Studies

We found that UBZ or PIP inactivation only conferred a slight sensitivity to UVC when the mutant was expressed under the control of a strong promoter, in agreement with previous results [Bienko et al., 2010; Gohler et al., 2011]. However, when only physiological amounts of mutated polh were available, cells were more sensitive and sensitized to UVC by caffeine. Our results point at a limitation of complementation studies when analyzing the implication of regulatory domains with standard expression vectors. The use of recently emerged technologies allowing direct manipulation of genomic sequences, like zinc finger nucleases, meganucleases or TALEN [Carroll 2011; Miller et al., 2011; Redondo et al., 2008], would be a benefit to assess the effects of polh mutations in situ.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.D. and P.L.K. designed the experiments. E.D., N.D., C.G., and S.A.S. performed and analyzed the experiments. E.D. prepared the draft figures. E.D. and P.L.K. prepared the manuscript draft with the critical revising of N.D., C.G., and S.A.S. All authors approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to J.E. Cleaver for XP30RO cells. They thank C. Pouvelle for help with cell culture. The P.L.K lab is supported by La Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée).

REFERENCES

- Acharya N, Brahma A, Haracska L, Prakash L, Prakash S. 2007. Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase ϵ do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol Cell Biol* 27:7266–7272.
- Acharya N, Yoon JH, Gali H, Unk I, Haracska L, Johnson RE, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S. 2008. Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase ϵ in translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17724–17729.
- Acharya N, Yoon JH, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S. 2010. DNA polymerase ϵ lacking the ubiquitin-binding domain promotes replicative lesion bypass in humans cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:10401–10405.
- Arlett CF, Harcourt SA, Broughton BC. 1975. The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation. *Mutat Res* 33(2–3):341–346.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, et al. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434:864–870.
- Bienko M, Green CM, Crosetto N, Rudolf F, Zapart G, Coull B, Kannouche P, Wider G, Peter M, Lehmann AR, et al. 2005. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* 310:1821–1824.
- Bienko M, Green CM, Sabbioneda S, Crosetto N, Matic I, Hibbert RG, Begovic T, Niimi A, Mann M, Lehmann AR, et al. 2010. Regulation of translesion synthesis DNA polymerase ϵ by monoubiquitination. *Mol Cell* 37:396–407.
- Bomar MG, Pai MT, Tzeng SR, Li SS, Zhou P. 2007. Structure of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human DNA Y-polymerase ϵ . *EMBO Rep* 8:247–251.
- Bomgardner RD, Lupardus PJ, Soni DV, Yee MC, Ford JM, Cimprich KA. 2006. Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase ϵ on ATR checkpoint signaling. *EMBO J* 25:2605–2614.
- Bullock SK, Kaufmann WK, Cordeiro-Stone M. 2001. Enhanced S phase delay and inhibition of replication of an undamaged shuttle vector in UVC-irradiated xeroderma pigmentosum variant. *Carcinogenesis* 22:233–241.
- Capasso H, Palermo C, Wan S, Rao H, John UP, O'Connell MJ, Walworth NC. 2002. Phosphorylation activates Chk1 and is required for checkpoint-mediated cell cycle arrest. *J Cell Sci* 115(Part 23):4555–4564.
- Carroll D. 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188:773–782.
- Cayrou C, Coulombe P, Mechali M. 2010. Programming DNA replication origins and chromosome organization. *Chromosome Res* 18:137–145.
- Chang DJ, Cimprich KA. 2009. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol* 5:82–90.
- Cimprich KA, Cortez D. 2008. ATR: An essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:616–627.
- Cordeiro-Stone M, Frank A, Bryant M, Oguejiofor I, Hatch SB, McDaniel LD, Kaufmann WK. 2002. DNA damage responses protect xeroderma pigmentosum variant from UVC-induced clastogenesis. *Carcinogenesis* 23:959–965.
- Cruet-Hennequart S, Coyne S, Glynn MT, Oakley GG, Carty MP. 2006. UV-induced RPA phosphorylation is increased in the absence of DNA polymerase ϵ and requires DNA-PK. *DNA Repair (Amst)* 5:491–504.
- Despras E, Daboussi F, Hyrien O, Marheineke K, Kannouche PL. 2010. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. *Hum Mol Genet* 19:1690–1701.
- Gohler T, Sabbioneda S, Green CM, Lehmann AR. 2011. ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase ϵ is needed for efficient recovery from UV damage. *J Cell Biol* 192:219–227.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, et al. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434:907–913.
- Gueranger Q, Stary A, Aoufouchi S, Faili A, Sarasin A, Reynaud CA, Weill JC. 2008. Role of DNA polymerases ϵ , ι and ζ in UV resistance and UV-induced mutagenesis in a human cell line. *DNA Repair (Amst)* 7:1551–1562.
- Hendel A, Krijger PH, Diamant N, Goren Z, Langerak P, Kim J, Reissner T, Lee KY, Geacintov NE, Carell T, et al. 2011. PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Genet* 7:e1002262.
- Hishiki A, Hashimoto H, Hanafusa T, Kamei K, Ohashi E, Shimizu T, Ohmori H, Sato M. 2009. Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 284:10552–10560.
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419:135–141.
- Kannouche P, Broughton BC, Volker M, Hanaoka F, Mullenders LH, Lehmann AR. 2001. Domain structure, localization, and function of DNA polymerase ϵ , defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev* 15:158–172.
- Kannouche P, Stary A. 2003. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie* 85:1123–1132.
- Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR. 2004. Interaction of human DNA polymerase ϵ with monoubiquitinated PCNA: A possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 14:491–500.
- Krijger PH, van den Berk PC, Wit N, Langerak P, Jansen JG, Reynaud CA, de Wind N, Jacobs H. 2011. PCNA ubiquitination-independent activation of polymerase ϵ during somatic hypermutation and DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* 10:1051–1059.
- Langerak P, Nygren AO, Krijger PH, van den Berk PC, Jacobs H. 2007. A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J Exp Med* 204:1989–1998.
- Lehmann A, Kirk-Bell S, Arlett CF, Paterson MC, Lohman PHM, de Weerd-Kastelein EA, Bootsma D. 1975. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:219–223.
- Maher VM, Ouellette LM, Curren RD, McCormick JJ. 1976. Frequency of ultraviolet light-induced mutations is higher in xeroderma pigmentosum variant cells than in normal human cells. *Nature* 261:593–595.
- Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F. 2000. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase ϵ . *EMBO J* 19:3100–3109.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, et al. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29:143–148.

- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129:665–679.
- Niimi A, Brown S, Sabbioneda S, Kannouche PL, Scott A, Yasui A, Green CM, Lehmann AR. 2008. Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16125–16130.
- Ohmori H, Hanafusa T, Ohashi E, Vaziri C. 2009. Separate roles of structured and unstructured regions of Y-family DNA polymerases. *Adv Protein Chem Struct Biol* 78:99–146.
- Olson E, Nievera CJ, Klimovich V, Fanning E, Wu X. 2006. RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *J Biol Chem* 281:39517–39533.
- Olson E, Nievera CJ, Lee AY, Chen L, Wu X. 2007. The Mre11-Rad50-Nbs1 complex acts both upstream and downstream of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR) to regulate the S-phase checkpoint following UV treatment. *J Biol Chem* 282:22939–22952.
- Parker JL, Bielen AB, Dikic I, Ulrich HD. 2007. Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase eta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 35:881–889.
- Plosky BS, Vidal AE, Fernandez de Henestrosa AR, McLenigan MP, McDonald JP, Mead S, Woodgate R. 2006. Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin. *EMBO J* 25:2847–2855.
- Redondo P, Prieto J, Munoz IG, Alibes A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C, et al. 2008. Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature* 456:107–111.
- Sabbioneda S, Green CM, Bienko M, Kannouche P, Dikic I, Lehmann AR. 2009. Ubiquitin-binding motif of human DNA polymerase eta is required for correct localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:E20; author reply E21.
- Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. 2012. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:141–152.
- Schmutz V, Janel-Bintz R, Wagner J, Biard D, Shiomi N, Fuchs RP, Cordonnier AM. 2010. Role of the ubiquitin-binding domain of Poleta in Rad18-independent translesion DNA synthesis in human cell extracts. *Nucleic Acids Res* 38:6456–6465.
- Soria G, Speroni J, Podhajcer OL, Prives C, Gottifredi V. 2008. p21 differentially regulates DNA replication and DNA-repair-associated processes after UV irradiation. *J Cell Sci* 121(Part 19):3271–3282.
- Speroni J, Federico MB, Mansilla SF, Soria G, Gottifredi V. 2012. Kinase-independent function of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the replication of damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7344–7349.
- Stary A, Kannouche P, Lehmann AR, Sarasin A. 2003. Role of DNA polymerase eta in the UV mutation spectrum in human cells. *J Biol Chem* 278:18767–18775.
- Volpe JP, Cleaver JE. 1995. Xeroderma pigmentosum variant cells are resistant to immortalization. *Mutat Res* 337:111–117.
- Watanabe K, Tateishi S, Kawasuji M, Tsurimoto T, Inoue H, Yamaizumi M. 2004. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J* 23:3886–3896.
- Woodruff RV, Bomar MG, D'Souza S, Zhou P, Walker GC. 2010. The unusual UBZ domain of *Saccharomyces cerevisiae* polymerase eta. *DNA Repair (Amst)* 9:1130–1141.
- Yoon JH, Prakash L, Prakash S. 2009. Highly error-free role of DNA polymerase eta in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18219–18224.
- Ziv O, Geacintov N, Nakajima S, Yasui A, Livneh Z. 2009. DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11552–11557.
- Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, Boubakour-Azzouz I, Pouvelle C, Stewart GS, Nakajima S, Yasui A, Ishchenko AA, Kannouche PL. 2011. The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol eta in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell* 43:649–662.

Bibliographie

- Bienko, M., Green, C.M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A. R., et al. (2005). Ubiquitin-binding domains in translesion synthesis polymerases. *403*.
- Bienko, M., Green, C.M., Sabbioneda, S., Crosetto, N., Matic, I., Hibbert, R.G., Begovic, T., Niimi, A., Mann, M., Lehmann, A.R., et al. (2010). Regulation of Translesion Synthesis DNA Polymerase η by Monoubiquitination. *Mol. Cell* *37*, 396–407.
- Biertümpfel, C., Zhao, Y., and Kondo, Y. (2010). Structure and Mechanism of Human DNA Polymerase ϵ . *Nature* *465*, 1044–1048.
- Centore, R.C., Yazinski, S.A., Tse, A., and Zou, L. (2012). Spartan/C1orf124, a Reader of PCNA Ubiquitylation and a Regulator of UV-Induced DNA Damage Response. *Mol. Cell* *46*, 625–1635.
- Chen, Y.-W., Cleaver, J.E., Hatahet, Z., Honkanen, R.E., Chang, J.-Y., Yen, Y., and Chou, K.-M. (2008). Human DNA polymerase ϵ activity and translocation is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16578–16583.
- Davis, E.J., Lachaud, C., Appleton, P., Macartney, T.J., Näthke, I., and Rouse, J. (2012). DVC1 (C1orf124) recruits the p97 protein segregase to sites of DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1093–1100.
- Day, T. a., Palle, K., Barkley, L.R., Kakusho, N., Zou, Y., Tateishi, S., Verreault, A., Masai, H., and Vaziri, C. (2010). Phosphorylated Rad18 directs DNA polymerase η to sites of stalled replication. *J. Cell Biol.* *191*, 953–966.
- Despras, E., Delrieu, N., Garandeau, C., Ahmed-Seghir, S., and Kannouche, P.L. (2012). Regulation of the specialized DNA polymerase ϵ : Revisiting the biological relevance of its PCNA- and ubiquitin-binding motifs. *Environ. Mol. Mutagen.* *53*, 752–765.
- Haracska, L., Kondratick, C.M., Unk, I., Prakash, S., and Prakash, L. (2001). Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase η function. *Mol. Cell* *8*, 407–415.
- Havens, C.G., and Walter, J.C. (2009). Docking of a Specialized PIP Box onto Chromatin-Bound PCNA Creates a Degron for the Ubiquitin Ligase CRL4Cdt2. *Mol. Cell* *35*, 93–104.
- Johnson, R.E., Prakash, S., and Prakash, L. (1999). Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol ϵ . *Science* *283*, 1001–1004.
- Jung, Y.S., Qian, Y., and Chen, X. (2012). DNA polymerase ϵ is targeted by Mdm2 for polyubiquitination and proteasomal degradation in response to ultraviolet irradiation. *DNA Repair (Amst.)* *11*, 177–184.
- Jung, Y.-S., Liu, G., and Chen, X. (2010). Pirh2 E3 ubiquitin ligase targets DNA polymerase ϵ for 20S proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1041–1048.
- Jung, Y.-S., Hakem, A., Hakem, R., and Chen, X. (2011). Pirh2 e3 ubiquitin ligase monoubiquitinates DNA polymerase ϵ to suppress translesion DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 3997–4006.
- Kannouche, P.L., and Lehmann, A.R. (2004). Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* *3*, 1011–1013.
- Kannouche, P., Broughton, B.C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L.H.F., and Lehmann, A.R. (2001a). Domain structure, localization, and function of DNA polymerase ϵ , defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev.* *15*, 158–172.

- Kannouche, P., Broughton, B.C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L.H.F., and Lehmann, A.R. (2001b). Domain structure, localization, and function of DNA polymerase η , defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev.* *15*, 158–172.
- Kannouche, P.L., Wing, J., and Lehmann, A.R. (2004). Interaction of Human DNA Polymerase η with Monoubiquitinated PCNA. *Mol. Cell* *14*, 491–500.
- Kim, S.H., and Michael, W.M. (2008). Regulated Proteolysis of DNA Polymerase η during the DNA-Damage Response in *C. elegans*. *Mol. Cell* *32*, 757–766.
- Lehmann, A.R., Kirk-Bell, S., Arlett, C.F., Paterson, M.C., Lohman, P.H., de Weerd-Kastelein, E. A., and Bootsma, D. (1975). Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 219–223.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. (1999a). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* *399*, 700–704.
- Masutani, C., Araki, M., Yamada, A., Kusumoto, R., Nogimori, T., Maekawa, T., Iwai, S., and Hanaoka, F. (1999b). Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J.* *18*, 3491–3501.
- Mosbech, A., Gibbs-Seymour, I., Kagias, K., Thorslund, T., Beli, P., Povlsen, L., Nielsen, S.V., Smedegaard, S., Sedgwick, G., Lukas, C., et al. (2012). DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1084–1092.
- Sekimoto, T., Oda, T., Pozo, F.M., Murakumo, Y., Masutani, C., Hanaoka, F., and Yamashita, T. (2010). The Molecular Chaperone Hsp90 Regulates Accumulation of DNA Polymerase η at Replication Stalling Sites in UV-Irradiated Cells. *Mol. Cell* *37*, 79–89.
- Strydom, A., Kannouche, P., Lehmann, A.R., and Sarasin, A. (2003). Role of DNA polymerase η in the UV mutation spectrum in human cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 18767–18775.
- Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H., and Yamaizumi, M. (2004). Rad18 guides Pol η to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J.* *23*, 3886–3896.
- Ziv, O., Geacintov, N., Nakajima, S., Yasui, A., and Livneh, Z. (2009). DNA polymerase ζ cooperates with polymerases κ and ι in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 11552–11557.

RESUME

La synthèse translésionnelle (TLS) est un processus important pour franchir des lésions de l'ADN au cours de la duplication du génome dans les cellules humaines. Le modèle « d'échange de polymérases » suggère que la polymérase répliquative est transitoirement remplacée par une polymérase spécialisée, qui va franchir le dommage et permettre de continuer la synthèse d'ADN. Ces ADN polymérases spécialisées appelées Pol η (eta), ι (iota), κ (kappa), ζ (zeta), et Rev1 ont été bien caractérisées pour leur capacité à franchir différents types de lésions *in vitro*. Un concept en émergence est que ces enzymes pourraient également être requises pour répliquer des zones spécifiques du génome qui sont « difficiles à répliquer ». Pol ζ est constituée d'au moins 2 sous-unités : Rev3 qui est la sous-unité catalytique et Rev7 sous-unité augmentant l'activité de Rev3L. Jusqu'ici, la fonction la mieux caractérisée de Pol ζ était de sa capacité à catalyser l'extension d'un mésappariement en face d'une lésion d'ADN. Cependant, il a été montré que la sous unité catalytique Rev3 de levure et humaine interagissent avec les deux sous-unités accessoires de Pol δ que sont pol31 et pol32 chez la levure et p50 et p66 chez l'humain. Il a aussi été mis en évidence que Rev3L est importante pour la répllication des sites fragiles (SFCs) dans les cellules humaines, zones connues pour être à l'origine d'une instabilité génétique et pour être répliquées de manière tardive (en G2/M). Tout ceci suggère que Pol ζ pourrait jouer un rôle dans la répllication du génome non endommagé, et plus spécifiquement lorsque des barrières naturelles (*e.g.* ADN non-B) entravent la progression normale des fourches de répllication.

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'inactivation du gène *rev3* est viable et conduit à une diminution de la mutagenèse spontanée ou induite par des agents génotoxiques suggérant que Pol ζ est impliquée dans le franchissement mutagène de ces lésions. En revanche, l'inactivation du gène *Rev3L* chez la souris est embryonnaire létale alors que la plupart des autres ADN polymérases spécialisées ne sont pas vitales. Ceci suggère que Pol ζ a acquis des fonctions essentielles au cours de l'évolution qui restent inconnues à ce jour. Les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) *Rev3L*^{-/-} présente une grande instabilité génétique spontanée associée une forte augmentation de cassures et de translocations chromosomiques indiquant que Pol ζ est directement impliquée dans le maintien de la stabilité du génome. Afin de clarifier le rôle de cette polymérase spécialisée au cours de la répllication du génome, nous avons entrepris de procéder à une étude sur les relations structure/fonction/localisation de la protéine Rev3L. Notre étude met en évidence que la progression en phase S des cellules *Rev3L*^{-/-} est fortement perturbée, notamment en fin de phase S. Dans ces cellules invalidées pour *Rev3L*, on constate des changements dans le programme de répllication et plus particulièrement dans des régions de transition (TTR) répliquées à partir du milieu de la phase S. Nous montrons aussi un enrichissement global en marques épigénétiques répressives (marques associées à l'hétérochromatine et méthylation de l'ADN) suggérant qu'un ralentissement de la progression de la fourche de répllication à des loci particuliers peut promouvoir une hétérochromatinisation lorsque *Rev3L* est invalidé. De manière intéressante, nous constatons une diminution de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement qui pourrait peut-être expliquer la létalité embryonnaire constatée en absence de Rev3L. Enfin, nous mettons en évidence une interaction directe entre la protéine d'organisation de l'hétérochromatine HP1 α et Rev3L *via* un motif PxVxL. Tout ceci nous suggère fortement que Pol ζ pourrait assister les ADN polymérases répliquatives Pol δ et Pol ϵ dans la répllication des domaines compactés de la chromatine en milieu et fin de phase S.

Frais de reprographie pris en charge par la taxe d'apprentissage collectée par l'IGR.