



HAL
open science

Caractérisation des fonctions des modifications post-traductionnelles de PCNA à l'aide d'un nouvel outil génétique

Frank Dietsch

► **To cite this version:**

Frank Dietsch. Caractérisation des fonctions des modifications post-traductionnelles de PCNA à l'aide d'un nouvel outil génétique. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ014 . tel-02333454

HAL Id: tel-02333454

<https://theses.hal.science/tel-02333454v1>

Submitted on 25 Oct 2019

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.

ED 414 - SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

UMR 7242 – Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Institut de Recherche de l'École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS), Illkirch-Graffenstaden

THÈSE

présentée par :

Frank DIETSCH

Soutenue le **09 avril 2019**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

**Caractérisation des fonctions des
modifications post-traductionnelles de PCNA
à l'aide d'un nouvel outil génétique**

Thèse dirigée par :

M. CHATTON Bruno

Professeur des Universités, IREBS, Strasbourg

Rapporteurs externes :

Mme KANNOUCHE Patricia

Directeur de recherche, Université Paris-Sud, Paris

M. BOYER-GUITTAUT Michaël

Professeur des Universités, Université de Franche Comté, Besançon

Examineur interne :

Mme DANTZER Françoise

Directeur de recherche, IREBS, Strasbourg

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « Dynamique du réplisome et cancer » de l'unité UMR-7242 – Biotechnologie et Signalisation Cellulaire. Les travaux ont été soutenus par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que la fondation ARC.

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, le Pr. Bruno Chatton, pour m'avoir accueilli dans son équipe et encadré durant ces 3 ans et demi de thèse sans oublier mes années de Master. Bruno, je tiens à te remercier pour le temps que tu m'as consacré ainsi que pour tes conseils scientifiques, tes qualités pédagogiques et ta sympathie. Merci, de m'avoir laissé une totale liberté dans le choix d'orientation de mon projet de thèse tout en me soutenant et m'apportant des conseils dans les moments difficiles. J'ai énormément appris au cours de ces années de thèse et je t'en suis reconnaissant.

Je tiens à remercier le Dr. Patricia Kannouche et le Dr. Michaël Boyer-Guittaut, rapporteurs, ainsi que le Dr. Françoise Dantzer, examinateur, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens également à remercier mes plus proches collaborateurs: Mariel Donzeau et Marc Vigneron toujours d'excellents conseils et prêts à rendre service. Je remercie également tous les membres de l'unité UMR-7242 et plus particulièrement, Agnès Cordonnier et Jean-Christophe Amé qui m'ont assisté dans l'élaboration des tests de réplication de l'ADN et de PARylation de PCNA. Je souhaite également remercier Dominique Desplancq ainsi que Giuditta Illuzzi qui m'ont assisté dans la mise en place de la purification des protéines mutantes de PCNA et l'utilisation de notre FACSCalibur. Je remercie tout particulièrement le Pr. Etienne Weiss, pour sa sympathie et son dynamisme à toute épreuve. Merci d'avoir partagé ces discussions à propos de tout et de rien, de m'avoir rassuré sur mon avenir professionnel et d'avoir toujours été de bons conseils. Merci également de m'avoir motivé durant toutes ces années de thèse.

Je remercie le Dr. Hubert Becker et le Dr. Daniel Metzger d'avoir examiné mes travaux de thèse à mi-parcours.

Je remercie mes amis et plus particulièrement la team « Discord », Julien, Lucas, PJ, Aude, Clément, Floriane, Jojo, Justin, Vivien, Raahos et Rag de m'avoir permis de décompresser et de penser à autre chose que les tracas de la thèse. Merci pour les parties endiablées de Rainbow !! Merci également à toutes les personnes de la promo Master d'Immuno 2015. On restera à jamais la meilleure promo d'Immuno !

Je remercie également ma famille pour leur soutien et leurs encouragements. Merci à ma mère et à mon père qui ont toujours eu confiance en moi. Sans eux et leur soutien je n'aurai jamais pu arriver au bout de ces longues années d'études. Comme vous le dites si bien « No risk no fun ». Vous serez toujours pour moi, des modèles à suivre. Merci également à mon petit frère Julien de m'avoir accompagné durant nos sessions de jeux en ligne. Je remercie également mes grands-parents et ma famille proche pour leur gentillesse et leur soutien. Bien sûr je n'oublie pas de remercier mon petit chat Lucky, dont les doux ronronnements m'ont accompagné durant mes longues sessions d'écriture.

Enfin, que serais-je sans ma petite femme, Camille, qui m'a toujours épaulé durant les moments difficiles et qui a toujours été attentionnée à mon égard. Je suis heureux et chanceux de pouvoir partager ma vie avec toi. C'est à toi que je dédie ce manuscrit.

« Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme »

Antoine Lavoisier (1743-1794)

Sommaire

Liste des figures	11
Liste des tableaux	15
Abréviations et symboles	17
Préambule	25
Introduction	29
A. La protéine PCNA	29
1. PCNA, une protéine complexe.....	29
2. Rôle de PCNA dans la réplication de l'ADN.....	35
a. Mécanisme de réplication de l'ADN eucaryote.....	35
b. Mode d'action de PCNA dans la réplication de l'ADN.....	37
3. Rôle de PCNA au sein du cycle cellulaire.....	40
a. Les phases du cycle cellulaire.....	40
b. Les actions de PCNA au sein du cycle cellulaire.....	40
4. Rôles de PCNA dans la synthèse translésionnelle et la réparation des dommages à l'ADN.....	42
a. Implication de PCNA dans la synthèse translésionnelle.....	42
b. Implication de PCNA dans la réparation des dommages à l'ADN.....	45
5. Implication de PCNA et de ses partenaires au sein d'évènements cellulaires annexes.....	47
a. PCNA et le métabolisme des chromatides-sœurs.....	47
b. PCNA et le métabolisme de la chromatine.....	48
B. Les modifications post-traductionnelles de PCNA	50
1. L'ubiquitination de PCNA et ses fonctions.....	50
a. L'ubiquitine.....	50
b. L'ubiquitination de PCNA.....	53
2. Rôle de la SUMOylation de PCNA.....	54
a. La SUMOylation.....	54
b. La SUMOylation de PCNA.....	55

3. La phosphorylation de PCNA nécessaire au maintien de la structure PCNA-chromatine	58
4. Autres modifications post-traductionnelles de PCNA.....	59
a. L'acétylation de PCNA.....	59
b. La méthylation de PCNA.....	59
c. PARylation de PCNA ?	60
C. PCNA, un gène de ménage ou une cible thérapeutique potentielle ?	62
1. Ciblage de PCNA via des peptides.....	64
2. Ciblage de PCNA via de petites molécules chimiques.....	65
D. Développement d'un outil génétique permettant la caractérisation des sites de modifications post-traductionnelles de PCNA	66
1. Le système CRISPR-Cas 9.....	67
2. Système de complémentation fonctionnelle <i>in cellulo</i>	71
E. Rôle de PCNA dans la voie de dégradation ubiquitine dépendante CRL4^{Cdt2}	72
1. Le système ubiquitine-protéasome.....	73
2. Reconnaissance du substrat de l'ubiquitine ligase CRL4 ^{Cdt2} via un degon composite.....	75
3. L'ubiquitine ligase CRL4 ^{Cdt2} empêche le phénomène de re-réplication.....	76
Objectifs de thèse	81
Résultats.....	85
A. Développement et validation de notre outil de complémentation fonctionnelle.....	85
1. Inactivation du gène PCNA via le système CRISPR-Cas 9.....	85
a. Construction des plasmides « pCas9 anti-PCNA GFP » et « pCas9 anti-PCNA Puro »	85
b. Validation du plasmide d'inactivation.....	88
2. Expression d'une protéine PCNA de complémentation.....	90
a. Construction du plasmide « pComp PCNA WT » et de ses dérivés.....	90

b. Validation du plasmide « pComp PCNA WT » et de ses dérivés.....	96
3. Système de complémentation fonctionnelle de la protéine PCNA endogène.....	99
a. Protocole de mise en place du système de complémentation fonctionnelle de la protéine PCNA.....	99
b. Validation du système de complémentation du gène de PCNA.....	101
4. Publication « A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells » (Dietsch et al., 2017; BioTechniques).....	103
a. Introduction de l'article.....	103
b. Résultats et conclusions de l'article.....	104
c. Article « A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells » (Dietsch et al., 2017; BioTechniques)	105
B. Etude de la viabilité cellulaire et de la sensibilité à des agents génotoxiques des cellules exprimant des protéines PCNA mutantes	108
1. Observation de la viabilité cellulaire des cellules mutantes pour PCNA.....	108
2. Tests de sensibilités à des agents génotoxiques des cellules mutantes pour la protéine PCNA.....	111
a. Test de sensibilité au MMS.....	111
b. Test de sensibilité aux UV.....	113
3. Etude de la viabilité des cellules mutantes pour la protéine PCNA D122E, D122N, E124D et E124Q.....	114
C. Les protéines PCNA mutantes D122A et E124A dans la réplication de l'ADN.....	120
1. Trimérisation des protéines PCNA mutantes D122A et E124A.....	120
2. Fixation des protéines PCNA mutantes D122A et E124A sur la chromatine.....	124
3. Les mutations D122A et E124A de la protéine PCNA n'altèrent pas le mécanisme de réplication de l'ADN <i>in vitro</i>	126
4. Les cellules mutantes PCNA D122A et E124A présentent des cassures double-brins à l'ADN	129
D. Implication des protéines PCNA D122A et E124A dans la voie de dégradation ubiquitine-dépendante CRL4^{Cdt2}.....	132
1. Les protéines PCNA mutantes D122A et E124A provoquent l'arrêt du cycle cellulaire.....	133

2. Les cellules mutantes PCNA D122A et E124A présentent une accumulation de la protéine p21.....	136
3. Régulation de la voie de dégradation ubiquitine-dépendante CRL4 ^{Cdt2}	139

Discussion.....145

1. Un nouvel outil génétique.....	145
2. Criblage de mutants létaux de PCNA.....	148
3. PCNA et la voie de dégradation ubiquitine-dépendante CRL4 ^{Cdt2}	149

Matériels et méthodes.....159

Références bibliographiques.....169

Liste des figures

- Figure 1.** Position dans le génome et caractéristiques du gène de PCNA
- Figure 2.** PCNA, une protéine fortement conservée chez les eucaryotes
- Figure 3.** PCNA, une protéine pléiotrope
- Figure 4.** PCNA (homo sapiens) appartient à la famille des clamps à ADN
- Figure 5.** La poche hydrophobe de PCNA
- Figure 6.** Mécanisme d'initiation de la fourche de réplication
- Figure 7.** Le réplisome, un complexe protéique permettant d'orchestrer la réplication de l'ADN
- Figure 8.** Interaction de PCNA avec les protéines régulatrices du cycle cellulaire
- Figure 9.** Schéma représentatif de la synthèse translésionnelle via l'utilisation de l'ADN polymérase η
- Figure 10.** Implication de la protéine PCNA dans divers mécanismes de réparation de l'ADN
- Figure 11.** Schéma représentatif de la mono et poly-ubiquitination
- Figure 12.** Schéma représentatif de la cascade enzymatique menant à l'ubiquitination d'un substrat
- Figure 13.** L'ubiquitination de PCNA et ses conséquences
- Figure 14.** La protéine SUMO et sa cascade enzymatique
- Figure 15.** La SUMOylation de PCNA et ses conséquences
- Figure 16.** ADP-ribosylation de PCNA
- Figure 17.** Schéma récapitulatif des principaux agents ciblant la protéine PCNA
- Figure 18.** Schéma comparatif entre le système CRISPR-Cas 9 natif retrouvé chez la bactérie et l'outil CRISPR-Cas 9 utilisé dans l'édition du génome
- Figure 19.** Schéma du principe de complémentation fonctionnelle plasmidique chez la levure
- Figure 20.** Schéma récapitulatif du système de dégradation ubiquitine-protéasome
- Figure 21.** Schéma comparatif des interactions entre les enzymes CRL1^{Skp2}, CRL4^{Cdt2} et leurs substrats respectifs
- Figure 22.** Plasmide pCas9 anti-PCNA GFP et plasmide pCas9 anti-PCNA Puro
- Figure 23.** Inactivation du gène PCNA à l'aide d'un plasmide d'inactivation
- Figure 24.** Validation du plasmide pCas9 anti-PCNA Puro
- Figure 25.** Plasmide pCEP4

- Figure 26.** Plasmide pComp PCNA WT
- Figure 27.** Construction de la CDS murine humanisée de PCNA
- Figure 28.** Mécanisme d'action du peptide T2A
- Figure 29.** Les sites mutés de la protéine PCNA
- Figure 30.** Validation des plasmides de complémentation pComp PCNA WT et ses dérivés mutés
- Figure 31.** Schéma récapitulatif de notre système de complémentation fonctionnelle du gène PCNA
- Figure 32.** Validation du système de complémentation du gène de PCNA
- Figure 33.** Observation de la viabilité cellulaire suite à la substitution de la protéine PCNA endogène par des formes mutantes de PCNA
- Figure 34.** Test de sensibilité des cellules mutantes pour PCNA à l'agent mutagène MMS
- Figure 35.** Test de la sensibilité aux UV des cellules mutantes pour PCNA
- Figure 36.** Mutants de PCNA D122A, D122N, D122E, E124A, E124Q et E124D
- Figure 37.** Observation de la viabilité cellulaire suite à la substitution de la protéine PCNA endogène par les mutants de PCNA D122A/D122N/D122E/E124A/E124Q/E124D
- Figure 38.** Explication du délai entre la mise en place de la co-transfection et la substitution effective de la protéine endogène par la protéine de complémentation
- Figure 39.** Synthèse des protéines PCNA WT-his et mutantes D122A-his et E124A-his
- Figure 40.** Profils d'élution des protéines PCNA WT-his, D122A-his et E124A-his sur une colonne HiLoad Superdex 200
- Figure 41.** Interaction des protéines PCNA mutantes D122A et E124A avec la chromatine
- Figure 42.** Schéma récapitulatif du test d'élongation de l'amorce couplée au plasmide pUC118.ss
- Figure 43.** Test de réplication de l'ADN *in vitro* en présence des protéines PCNA mutantes D120A, D122A et E124A
- Figure 44.** Accumulation de cassures double-brins au sein des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A
- Figure 45.** Représentation schématique d'une analyse par cytométrie en flux de cellules asynchrones marquées à l'iodure de propidium
- Figure 46.** Blocage du cycle cellulaire en phase G2 au sein des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A
- Figure 47.** Structure 3D du complexe PCNA-peptide p21 (1AXC pdb)
- Figure 48.** Quantification relative des protéines Cdt1 et p21 au sein des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A

- Figure 49.** Test de PARylation *in vitro* des protéines PCNA WT, D120A, D122A et E124A
- Figure 50.** Représentation schématique et hypothétique du mécanisme cellulaire permettant d'expliquer l'origine de la mort des cellules mutantes pour la protéine PCNA (D122A et E124A)

Liste des tableaux

- Tableau 1.** Protéines interagissant avec PCNA durant la réplication de l'ADN
- Tableau 2.** Protéines interagissant avec PCNA dans l'organisation structurale de la chromatine et la régulation génique
- Tableau 3.** Récapitulatif des mutants viables et létaux de la protéine PCNA
- Tableau 4.** Récapitulatif de la viabilité des mutants de l'acide aspartique n°122 et de l'acide glutamique n°124 de PCNA

Abréviations et symboles

³²P	Isotope (32) du phosphore
8N	Cellules « hyper-marquées » à l'iodure de propidium
AAA+	ATPases associées à diverses activités cellulaires
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AmpR	Gène de résistance à l'Ampicilline
AP	Apurinique/apirimidinique
APIM	AlkB homolog 2 PCNA-interacting motif
ARNg	ARN guide
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	ATM-Rad3-related
B+4	4 ^{ème} acide aminé en aval de la PIP box
BER	Base excision repair
Bla promoter	Beta-lactamase promoter
CAF-1	Chromatin assembly factor-1
caPCNA	Cancer-associated proliferating cell nuclear antigen
Cas	CRISPR associated protein
Cbh promoter	Hybrid of cytomegalovirus early enhancer and chicken β -actin promoter
Cdc protein	Cell division cycle protein
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDS	Coding sequence
Cdt1	Chromatin licensing and DNA replication factor 1
Cdt2	Cell division cycle protein
CH₃	Groupe méthyle
CMG	Cdc45:MCM2-7:GINS
CMV	Cytomégalovirus
CONH₂	Groupe amidique
COO⁻	Groupe carboxylate
CpG	Cytosine-phosphate-guanine
CPP	Cell-penetrating peptide
CR6	Cytokine-responsive protein

CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRLs	Cullin-RING ubiquitin ligases
crRNA	CRISPR RNA
CS protein	Cockayne syndrome protein
CSK buffer	Cytoskeletal buffer
CUL4	Cullin-4
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DDB1	DNA damage-binding protein 1
DDK	Dbf4-dependent kinase (Dbf4-Cdc7)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNMT1	DNA methyltransferase 1
dNTPs	Désoxyribonucléotides triphosphates
DSBR	Double strand break repair
DTT	Dithiothréitol
DUB	Déubiquitinases
E. coli	Escherichia coli
E1	Enzyme d'activation de l'ubiquitine
E2	Enzyme de conjugaison
E3	Enzyme ubiquitine ligase
EBNA-1	Epstein–Barr virus nuclear antigen 1
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF	Epidermal growth factor
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Egtazic acid
ERCC1	Excision repair cross-complementation group 1
ESCO	Establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase
EXO1	Exonuclease 1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FEN1	Flap endonuclease 1
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
Gadd45	Growth arrest and DNA damage 45
GG	Dipeptide de glycines

GGR	Global genome repair
GINS	Complexe protéique (Sld5, Psf1, Psf2, and Psf3)
GST	Glutathion S-transferase
HAT	Histone acetyltransferases
Hct-116	Cellules humaines issues du cancer du côlon
HDAC	Histone deacetylases
HECT	Homologous to the E6-AP carboxyl terminus
HEK 293T	Human embryonic kidney 293T
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HGFL	Hepatocyte growth factor-like protein
HLTF	Helicase like transcription factor
HMGB1	High-mobility group box 1
HP1	Heterochromatin protein 1
HygroR	Gène de résistance à l'Hygromycine B
IDCL	Interdomain connecting loop
IgG	Immunoglobuline G
Indels	Insertions ou délétions
ING1	Inhibitor of growth family member 1
ISG	Interferon-stimulated gene
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
MacroD	MACRO domain containing
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MBD1	Methyl-CpG-binding domain protein 1
MCM	Minichromosome maintenance
Mdm2	Mouse double minute 2
MHL	MutL protein homolog
MMR	Mismatch repair
MMS	Methyl methanesulfonate
Mms2	Methyl methanesulfonate sensitivity-related protein 2
MPG	N-methylpurine DNA glycosylase
MPTs	Modifications post-traductionnelles
MRC-5	Fibroblastes embryonnaires humains dérivés d'un tissu pulmonaire
mRFP	Monomeric red fluorescent protein
MSH	MutS protein homolog

Mut protein	Mutator protein
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAD*	Nicotinamide adénine dinucléotide marqué radioactivement avec du ³² phosphore
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non-homologous end joining
ORC	Origin recognition complex
Ori	Origine de répliation
oriP	Origine de répliation du virus Epstein-Barr
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p21PBP	p21 PCNA-binding peptide
PAM	Protospacer-adjacent motif
PARGs	Poly ADP-ribose glycohydrolases
PARI	PCNA associated recombination inhibitor
PARPs	Poly ADP-ribose polymérasés
PARylation	Poly ADP-ribosylation
PBS	Phosphate-buffered saline
PC2	Prohormone convertase 2
pCas9	Plasmide d'invalidation
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCNAc-T2A	Protéine PCNA de complémentation fusionnée au peptide T2A
PCNA-I	PCNA inhibitors
pComp	Plasmide de complémentation
PFA	Paraformaldehyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
PIP box	PCNA-interacting peptide box
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2
Pol	ADN polymérase
PreRC	Pre-replication complex
pUC	plasmid University of California
Puro	Puromycine
PuroR	Gène de résistance à la Puromycine
RanBP2	Ran binding protein 2
Rbx1	RING-box protein 1
RFC	Replication factor C

RH	Recombinaison homologue
RING	Really interesting new gene
RNase	Ribonucléase
RNF8	Ring finger protein 8
RON	Recepteur d'origine Nantais
RPA	Replication protein A
SAE	SUMO-activating enzyme
Scc	Sister chromatid cohesion
SENP	Sentrin-specific protease
Set8	Histone methyl transferase
SETDB1	SET domain bifurcated 1
Smc	Structural maintenance of chromosomes
Spd1	S-phase delaying protein 1
Srs2	Suppressor of rad six
Ss	Single-strand
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
T2A	Thosea asigna virus 2A
T2AA	T2 amino alcohol
T3	Triiodothyronine
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TAT	Trans-activator of transcription
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCR	Transcription-coupled repair
TFIIH	Transcription factor II H
TLS	Translesion synthesis
tracrRNA	Trans-activating crRNA
UAF	Upstream activation factor
Ub	Ubiquitine
UBC E2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2
UNG2	Uracile-ADN glycosylase 2
USP	Ubiquitin-specific protease
UVC	UltraViolet C
UV-DDB	UV-damaged DNA-binding protein
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WSTF	Williams syndrome transcription factor

WT	Wild-Type
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
ZFN	Zinc-finger nucleases
γ-H2ax	Phosphorylated form of H2AX histone

Code acide aminés:

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Acide Aspartique	D	Asp
Asparagine	N	Asn
Cystéine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Acide Glutamique	E	Glu
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sélénocystéine	U	Sec
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Préambule

Préambule

En France, depuis plusieurs décennies et comme dans tous les pays développés, le cancer est maintenant la première cause de décès. L'apparition des cellules cancéreuses est intimement liée à la fois à la dérégulation du cycle cellulaire et de certaines cascades de signalisation aboutissant à la mise en place de nouvelles modifications post-traductionnelles sur de nombreux facteurs cellulaires.

PCNA, (Proliferating Cell Nuclear Antigen) est une protéine essentielle qui intervient dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la réplication de l'ADN et la réparation des dommages à l'ADN. Cette pléiotropie est expliquée par sa capacité d'interaction avec un large panel de partenaires protéiques mettant en jeu parfois des modifications post-traductionnelles de la protéine PCNA. De nombreux sites de PCNA sont potentiellement modifiables, cependant les rôles de ces derniers ne sont pas ou très peu documentés.

Dans le cadre de la thématique générale de notre équipe sur l'effet des modifications post-traductionnelles dans la cancérogénèse, notre objectif a été de développer un outil génétique pour nous aider à définir l'implication de ces résidus modifiés dans les fonctions de PCNA. Cet outil génétique est le fruit d'une combinaison de deux outils biologiques. Le premier est le système CRISPR-Cas 9 utilisé afin d'inactiver le gène endogène de PCNA. Le deuxième est un mécanisme de complémentation fonctionnelle plasmidique qui lorsqu'il est utilisé en parallèle du système CRISPR-Cas 9, nous permet d'exprimer n'importe quelles protéines PCNA mutées comme substituant de la protéine PCNA endogène au sein de cellules en culture.

L'utilisation de ce nouvel outil génétique, nous a permis de caractériser les fonctions de 2 résidus de PCNA impliqués au sein d'une voie de dégradation ubiquitine-dépendante.

Introduction

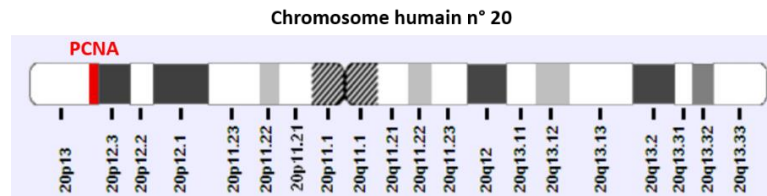
Introduction

A) La protéine PCNA

1) PCNA, une protéine complexe

PCNA (proliferating cell nuclear antigen), est une protéine eucaryote essentielle de la famille des clamps glissants ou « sliding clamp ». PCNA a été initialement découverte comme un antigène réagissant avec des anticorps provenant de sérums de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (Miyachi et al., 1978). Le rôle majeur attribué à cette protéine est sa capacité à augmenter la processivité des ADN polymérase répliquatives chez les eucaryotes et les archées lors de la répllication de l'ADN (Tan et al., 1986; Prelich et al., 1987; Bravo et al., 1987). Son rôle indispensable dans le bon fonctionnement de la répllication de l'ADN catégorise cette protéine comme protéine essentielle.

PCNA est fortement conservée dans toutes les espèces eucaryotes de la levure à l'humain (Stoimenov et al., 2009). Les archées possèdent une protéine homologue structuralement très proche de PCNA (homo sapiens) (Matsumiya et al., 2001). Le gène codant PCNA est situé sur le chromosome humain numéro 20 (région p12,3-p13) et s'étend sur environ 12 kilobases. C'est un gène à copie unique, cependant, plusieurs pseudogènes ont été découverts (Stoimenov et al., 2012). Le gène de PCNA code pour 2 transcrits différents, l'un possédant 6 exons, l'autre 7. Cependant les 2 transcrits codent la même protéine PCNA (Figure 1).



PCNA	Longueur (non épissé)	Longueur (épissé)	Exons	acides aminés
Transcrit primaire 1	11670 pb	1355 pb	7	261
Transcrit primaire 2	5049 pb	1319 pb	6	261

D'après <http://atlasgeneticsoncology.org>

Figure 1: Position dans le génome et caractéristiques du gène de PCNA.

Le gène PCNA de longueur 12 kilobases se situe sur le chromosome n°20 à la jonction des régions p12.3 et p13. La protéine PCNA peut être traduite à partir de deux transcrits différents en taille et en nombre d'exons codants.

Seulement 8 acides aminés sur un total de 261 sont différents entre les séquences protéiques humaine et murine. A noter que les acides aminés qui diffèrent entre les séquences sont cependant majoritairement de la même famille (Stoimenov et al., 2009) (Figure 2).

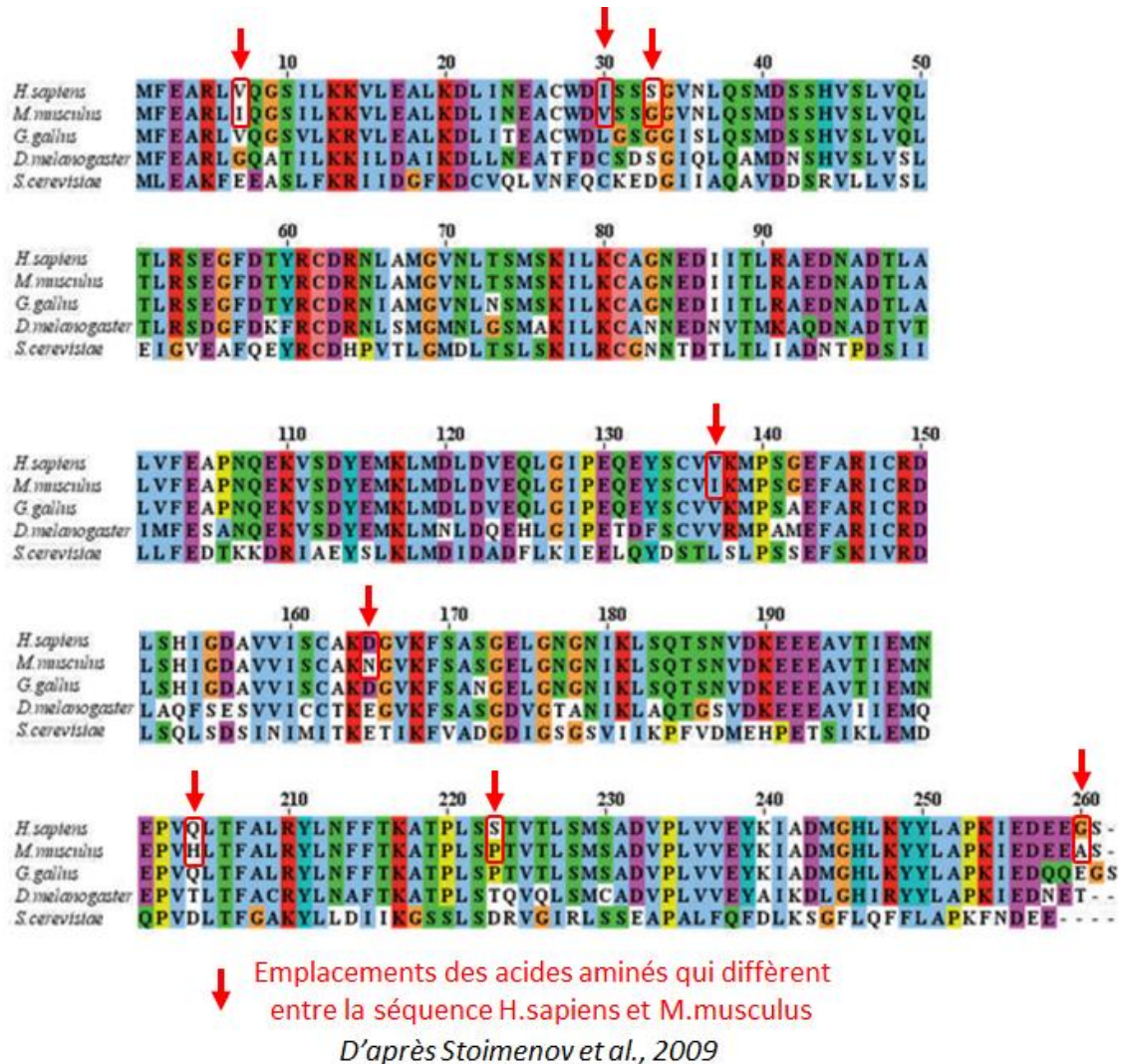


Figure 2: PCNA, une protéine fortement conservée chez les eucaryotes.

Les séquences des protéines PCNA d'Homo sapiens, de Mus musculus, de Gallus gallus, de Drosophila megalonaster et de Saccharomyces cerevisiae présentent une forte conservation.

La protéine PCNA est très largement étudiée et connue pour son rôle de facteur de processivité des ADN polymérases répliquatives. Cependant le rôle de PCNA n'est pas exclusivement cantonné au mécanisme de réplication de l'ADN. PCNA intervient également dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la réparation des dommages à l'ADN, le cycle cellulaire, la ségrégation des chromosomes ainsi que dans

le maintien de la structure de la chromatine (Stoimenov et al., 2009). La protéine PCNA est donc pléiotrope. Les fonctions de PCNA semblent être variées, mais restent cependant englobées dans le métabolisme de l'ADN. La pléiotropie de cette protéine peut être expliquée par sa capacité d'interaction avec un large panel de protéines différentes possédant des rôles divers (Stoimenov et al., 2009) (Figure 3).

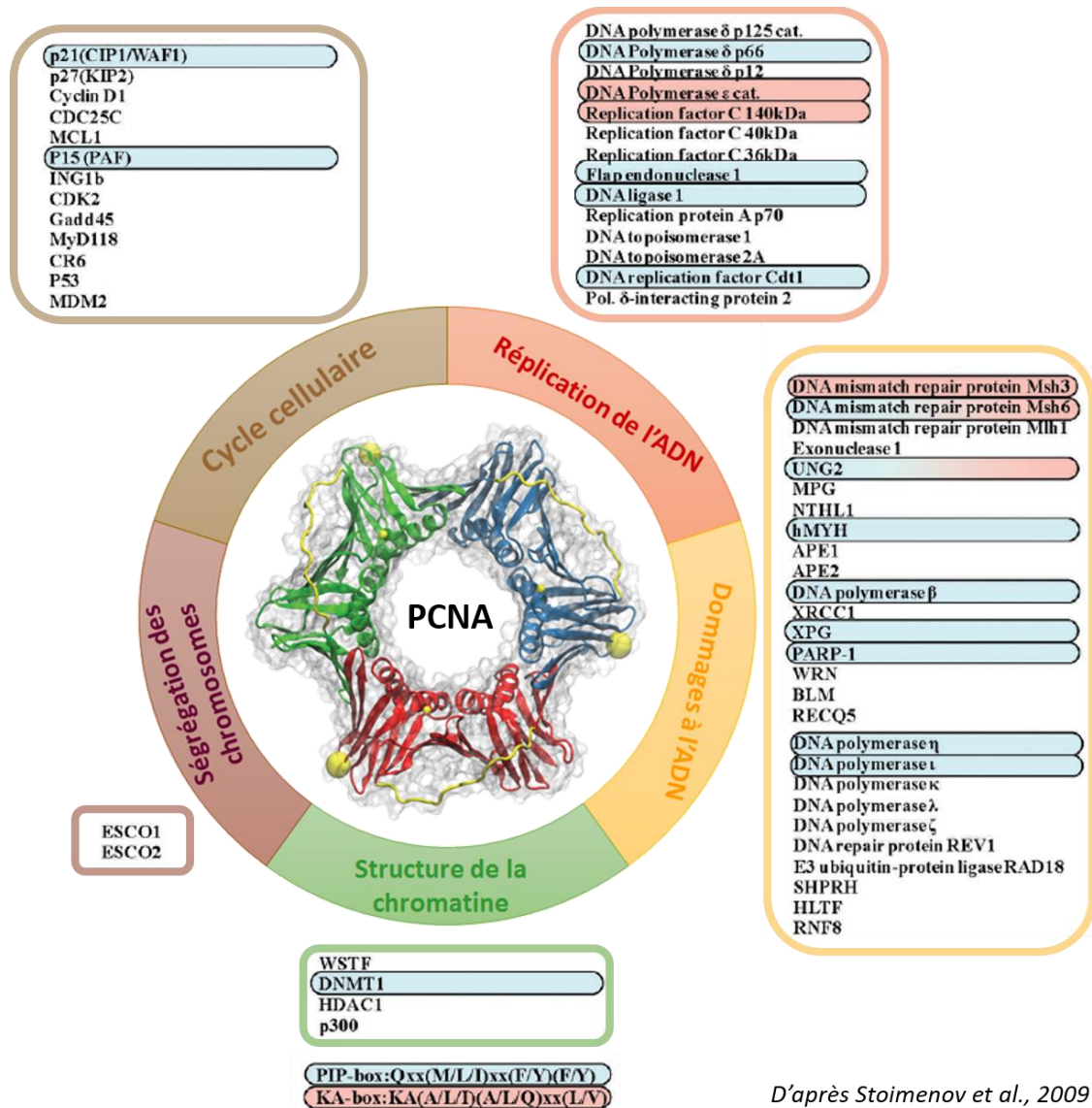


Figure 3: PCNA, une protéine pléiotrope.

La protéine PCNA possède de nombreux interactants participant à de nombreux mécanismes cellulaires tels que la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, la ségrégation des chromosomes ou encore le maintien de la structure de la chromatine. L'interaction avec ces protéines est rendue possible par la présence de 2 types de motifs: les motifs PIP-box et KA-box.

On retrouve dans la séquence protéique de PCNA plusieurs acides aminés qui peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles, dont très peu ont été caractérisées mais dont nous connaissons l'existence via des analyses de spectrométrie de masse. Parmi ces modifications post-traductionnelles, on distingue l'ubiquitination,

la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, la SUMOylation ainsi que la PARylation (Stoimenov et al., 2009; Zhang et al., 2013). Les rôles des modifications comme la mono ubiquitination de la Lysine 164 (K164) et la phosphorylation de la Tyrosine 211 (Y211) ont été caractérisés. Ainsi la mono ubiquitination du résidu K164 a été décrite comme nécessaire pour le recrutement de polymérases spécialisées dans la synthèse translésionnelle avec comme exemple le remplacement de l'ADN polymérase δ par l'ADN polymérase translésionnelle η (Kannouche et al., 2004, Watanabe et al., 2004). Quant à la phosphorylation du résidu Y211, elle aurait un rôle de stabilisation du complexe Chromatine-PCNA (Wang et al., 2006). Les différentes combinaisons de modifications post-traductionnelles de PCNA, ajoutées aux multiples interactions protéiques, expliquent l'implication de PCNA dans un si grand nombre de fonctions cellulaires. Cependant comment peut-on tenter d'expliquer une telle diversité d'interactions possibles d'un point de vue structural ?

La protéine PCNA est constituée de trois monomères identiques liés les uns à la suite des autres par des liaisons hydrogènes, amide-carboxyle, hydrophobes et ioniques formant ainsi un homotrimère circulaire (Krishna et al. 1994; Kelman and O'Donnell 1995; Gulbis et al. 1996). La forme de la protéine PCNA est dite toroïdale. PCNA est un homologue fonctionnel d'autres facteurs de processivité, comme la sous-unité β de l'ADN polymérase III des procaryotes ainsi que le clamp de l'ADN polymérase du bactériophage T4 (Bruck et al., 2001). Ces protéines homologues sont structurées de façon identique à PCNA mais la sous-unité β de l'ADN polymérase III des procaryotes se différencie par la présence uniquement de 2 monomères (Figure 4).

Chaque monomère de la protéine PCNA humaine possède deux domaines globulaires très similaires liés par un pont protéique appelé « interdomain connecting loop » (IDCL). Cette configuration structurale donne à la molécule une symétrie pseudo-hexagonale. Chaque domaine contient deux hélices α bordant la cavité centrale et perpendiculaires à l'ADN. Les hélices α sont soutenues par une structure constituée de 9 feuillets β qui forment l'extérieur de la protéine. La surface extérieure de la molécule de PCNA est chargée globalement négativement; à l'inverse, de nombreux acides aminés situés sur la surface interne de la protéine forment un champ chargé positivement. Ces charges positives permettent l'interaction entre PCNA et les charges négatives du squelette sucre-phosphate de l'ADN. Cette interaction facilite la progression de PCNA le long de la molécule d'ADN lors de la réplication de l'ADN (De March et al., 2017). La protéine PCNA forme ainsi un « anneau » protéique avec en son

centre, la molécule d'ADN. La cavité de l'anneau de la protéine PCNA est d'environ 35 Å de diamètre. PCNA présente une face avant et arrière distinctes. La région IDCL, située sur la face avant de PCNA, est impliquée dans de nombreuses interactions et permet la fixation de protéines comme les ADN polymérases et les ADN ligases (Dieckman et al., 2012) (Figure 4). Le rôle de la face arrière de PCNA est moins bien défini. Cette région agirait comme une zone de stockage de facteurs protéiques jusqu'à ce qu'ils soient nécessaires sur la face avant de PCNA (Dieckman et al., 2012).

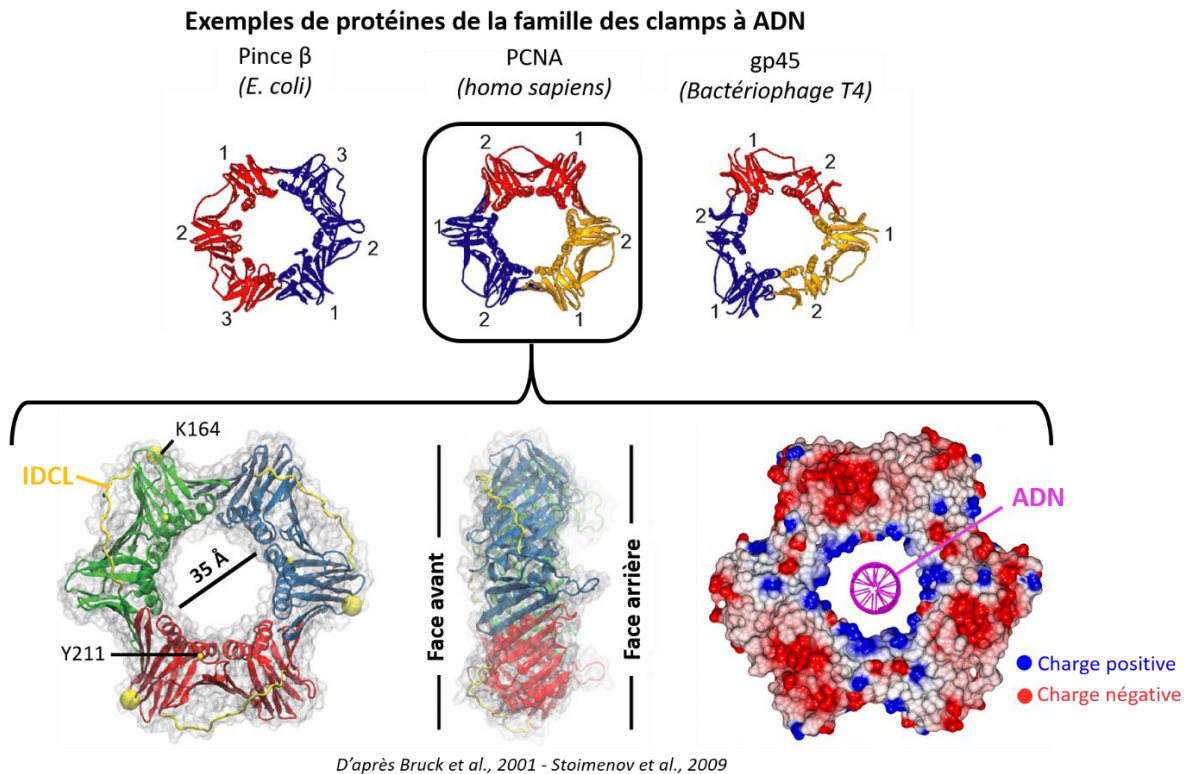
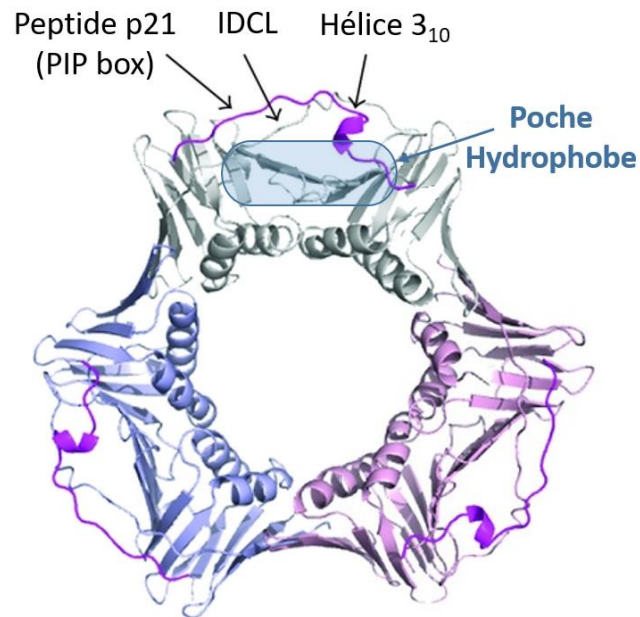


Figure 4: PCNA (*homo sapiens*) appartient à la famille des clamps à ADN

PCNA fait partie de la famille des « sliding clamp ». Les protéines de cette famille présentent des similarités structurales. Elles ont toutes une forme toroïdale, cependant la configuration des sous-unités est différente. Les procaryotes possèdent 2 sous-unités alors que les eucaryotes et les archées en possèdent 3. Les interactions entre PCNA et les protéines partenaires se font au niveau de l'IDCL. La charge positive globale de la cavité interne de PCNA permet son interaction avec le squelette sucre-phosphate de l'ADN chargé négativement.

Les protéines interagissant avec PCNA le font à l'aide de 2 motifs majeurs. Le premier motif, la « PIP-box » (PCNA-interacting peptide box) (Hingorani et al., 2000; Maga et al., 2003; Tsurimoto et al., 1999), ayant pour séquence QXX(M/L/I)XX(F/Y)(F/Y) et qui peut parfois présenter une séquence KA en position N-terminale (Xu et al., 2001). La structure secondaire de la « PIP-box » forme une hélice dite de type "3₁₀" qui est un type de structure secondaire qui se forme aux extrémités des hélices α et qui permet aux protéines de venir se loger dans une poche

hydrophobe formée par la région IDCL de la protéine PCNA (Dieckman et al., 2012) (Figure 5).



D'après Winter et al., 2012

Figure 5: La poche hydrophobe de PCNA.

Interaction entre la PIP-box du peptide p21 et la poche hydrophobe formée par l'IDCL de PCNA.

Le deuxième motif majeur est la « KA-box » ayant pour séquence [KA(A/L/I)(A/L/Q)XX(L/V)]; cette séquence est différente de la PIP-box et est également retrouvée dans plusieurs protéines interagissant avec PCNA (Stoimenov et al., 2009) (Figure 3). La présence de 3 monomères identiques suggère que PCNA pourrait fixer un ensemble de protéines diverses avec des activités complémentaires. Ce cas de figure a été observé chez des archées lors du mécanisme de réplication de l'ADN. Ces dernières possèdent une protéine hétérotrimérique homologue à PCNA chez l'Homme et chacune des 3 sous-unités présente une préférence pour un interactant différent: l'ADN polymérase, la protéine FEN1 (flap endonuclease 1) et l'ADN ligase 1 (Dionne et al., 2003). L'association de ces trois protéines à la protéine PCNA permet de coupler étroitement la synthèse de l'ADN et la maturation des fragments d'Okazaki chez les archées. Il n'est pas impossible d'imaginer ce scénario chez l'humain avec une synergie entre plusieurs protéines reliées par la protéine plateforme PCNA, afin d'optimiser certains mécanismes cellulaires telle que la réplication de l'ADN.

2) Rôle de PCNA dans la réplication de l'ADN

a) Mécanisme de réplication de l'ADN eucaryote

La duplication du génome est nécessaire pour assurer la transmission de l'information génétique aux cellules de la descendance. Il est ainsi primordial d'assurer la fidélité de la réplication de l'ADN. Ce rôle est assuré entre autres par le cofacteur des ADN polymérase, la protéine PCNA. Cette dernière orchestre les différentes étapes qui ont lieu au sein de la fourche de réplication, en jouant le rôle d'une plateforme recrutant les acteurs cruciaux nécessaires à la réplication de l'ADN.

La réplication du génome est assurée par un complexe protéique dynamique appelé le réplisome (Bell et al., 2002; Johnson et al., 2005). Au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, un complexe protéique appelé le « pre-replication complex » (PreRC) se lie à l'ADN au niveau d'une origine de réplication (Takisawa et al., 2000). Ce complexe est composé de 6 sous-unités ATPase nommées ORC 1-6 (complexe ORC), de l'hélicase hexamérique MCM2-7, de Cdt1 et de l'ATPase Cdc6. Le complexe ORC se lie d'abord au niveau de l'origine de réplication, puis recrute Cdc6 et Cdt1. Ensemble, ces protéines agissent pour charger les protéines Mcm2-7 sur l'ADN (Méndez et al., 2003). Une fois que le complexe de pré-réplication est formé, l'activation de ce dernier est déclenchée par l'activité de plusieurs kinases, la kinase cycline dépendante 2 (CDK2) et le complexe Dbf4-Cdc7 (DDK) (Woo et al., 2003) ainsi que le recrutement de facteurs additionnels (cdc45, complexe GINS...) (Moldovan et al., 2007) (Figure 6). La transition du complexe de pré-réplication en complexe d'initiation permet d'initier le recrutement des acteurs principaux de la réplication de l'ADN (Figure 7).

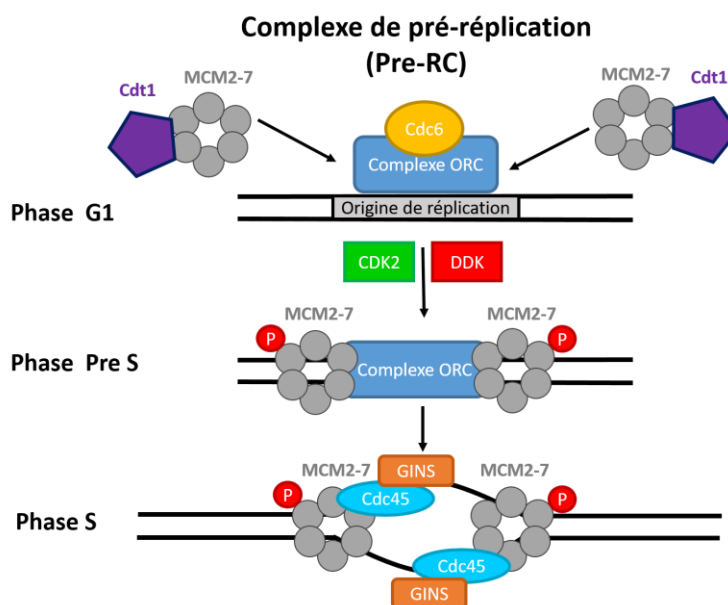


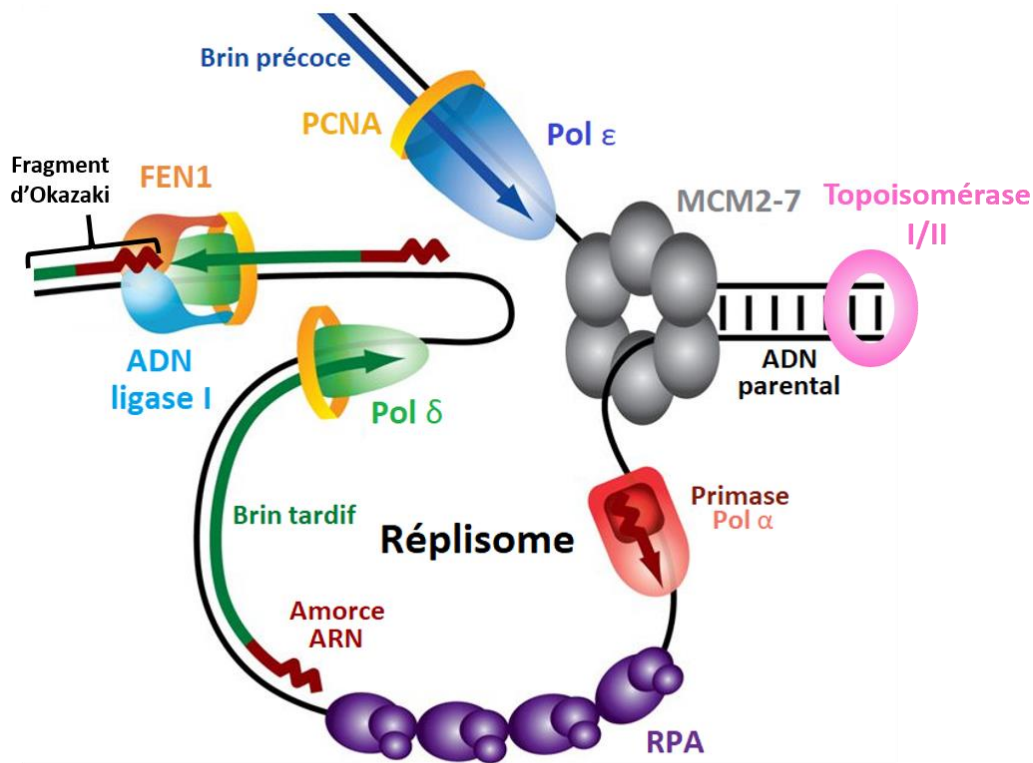
Figure 6: Mécanisme d'initiation de la fourche de réplication

Etapes de la formation du complexe de pré-réplication nécessaire aux recrutements des acteurs principaux de la réplication de l'ADN et la formation du futur réplisome. "P" représente une phosphorylation.

L'activation de l'hélicase permet la séparation des deux brins d'ADN et ainsi la formation de la fourche de réplication bidirectionnelle. Les brins d'ADN sont stabilisés par la présence de la protéine RPA (Sakaguchi et al., 2009). L'étape d'élongation débute. Le cofacteur PCNA est fixé à l'ADN à l'aide de la protéine RFC (Replication factor C) (Majka et al., 2004) et se lie aux ADN polymérases répliquatives δ et ϵ . Pour pouvoir engager la réplication des brins d'ADN, les ADN polymérases doivent se fixer sur une amorce. L'ARN polymérase « primase » synthétise une amorce ARN reconnue par l'ADN polymérase α qui synthétise en aval, une vingtaine de désoxyribonucléotides (Baranovskiy et al., 2016). Cette amorce d'ADN agit comme une plateforme de départ des ADN polymérases δ et ϵ .

Les deux brins d'ADN, « brin précoce » (leading strand) et « brin tardif » (lagging strand) sont répliqués à l'aide de deux mécanismes différents. Le brin précoce est répliqué de façon continue, en effet l'ADN polymérase synthétise le nouveau brin de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' en suivant l'ouverture progressive de la fourche de réplication. Le sens de réplication du brin tardif est quant à lui opposé au sens d'ouverture de la fourche. La réplication est dite alors discontinue et implique un mécanisme différent appelé la synthèse des fragments d'Okazaki (Sakabe et al., 1966; Okazaki et al., 1968). Lors de la synthèse du brin tardif, la polymérase répliquative atteint une extrémité d'un autre fragment d'Okazaki, elle déplace ainsi partiellement ce fragment provoquant une structure appelée une « flap structure ». Grâce à l'activité de l'endonucléase 1 (FEN1), cette structure est sectionnée (Chapados et al., 2004). L'ADN ligase I est alors recrutée afin de lier les deux fragments d'Okazaki consécutifs (Levin et al., 2000). La coordination entre la polymérase δ et FEN1 est plus efficace qu'avec la polymérase ϵ suggérant que la polymérase δ répliquerait préférentiellement le brin tardif, tandis que l'autre polymérase synthétiserait une copie du brin précoce (Garg et al., 2004).

L'action de l'hélicase MCM2-7 provoque des tensions au niveau structurel de la double hélice d'ADN (caténation et super-enroulement positif). Les topoisomérases I et II assurent la progression de la fourche de réplication en résolvant les problèmes topologiques (Champoux et al., 2001) (Figure 7).



D'après Stillman et al., 2008

Figure 7: Le réplisome, un complexe protéique permettant d'orchestrer la réplication de l'ADN
Schéma représentant les acteurs principaux nécessaires à la réplication de l'ADN formant un complexe protéique appelé le réplisome.

b) Mode d'action de PCNA dans la réplication de l'ADN

La protéine PCNA a été étudiée essentiellement pour son rôle de facteur de processivité pour les ADN polymérases (Kuriyan et al., 1993), cependant PCNA ne se présente pas comme un simple cofacteur mais comme une protéine « plateforme » au centre de l'organisation du réplisome (Tableau 1).

La présence de PCNA sur la fourche de réplication est dictée par l'action du complexe protéique RFC (Majka et al., 2004). RFC est un complexe de 5 protéines structurellement similaires, à savoir des ATPases de type AAA+ (Superfamille d'ATPases Associées à diverses Activités cellulaires). La formation du complexe PCNA-RFC est ATP-dépendante. Le complexe RFC reconnaît l'extrémité 3' de l'amorce synthétisée par le complexe primase-ADN polymérase α nécessaire à l'initiation de la réplication de l'ADN. PCNA est alors positionnée de telle sorte que la face avant (voir section Introduction A.1) soit en direction de l'extrémité 3' de l'amorce permettant ainsi le recrutement et une orientation correcte des ADN polymérases répliquatives pour assurer l'élongation de l'ADN. La fixation de PCNA sur l'ADN active alors les ATPases

du complexe RFC qui, en hydrolysant l'ATP, causent la dissociation de ce dernier (Gomes et al., 2001). Le mécanisme menant à la fixation de PCNA sur l'ADN via le complexe RFC permet l'échange du complexe primase-ADN polymérase α par une ADN polymérase répliquative sur l'amorce du brin précoce tout comme sur les fragments d'Okazaki du brin tardif (Maga et al., 2000).

Les ADN polymérases correctement placées et orientées vont bénéficier d'un gain de processivité. En effet la processivité de l'ADN polymérase seule correspond à l'incorporation d'une dizaine de nucléotides avant que cette dernière se dissocie de l'ADN. Une fois l'ADN polymérase fixée à PCNA, la processivité est augmentée, passant d'une dizaine à plusieurs milliers de nucléotides incorporés (Bloom et al., 2009).

Le gain de processivité dont profitent les ADN polymérases n'est pas l'unique avantage fourni par la protéine PCNA. En effet cette dernière agit également comme une plateforme amovible permettant le recrutement des facteurs nécessaires au bon déroulement des étapes de la réplication de l'ADN. Le recrutement de ces facteurs est permis par l'interaction des motifs PIP box de ces derniers avec la poche hydrophobe formée par l'IDCL de PCNA (voir section Introduction A.1). PCNA interagit notamment avec les protéines FEN1 et ADN ligase (Jónsson et al., 1998; Montecucco et al., 1998; Tom et al., 2001) nécessaires à la suture des fragments d'Okazaki entre eux. Elle interagit également avec la topoisomérase II α (Niimi et al., 2001) permettant de diminuer les tensions structurelles de la double hélice d'ADN durant la réplication. Enfin son interaction avec la protéine MCM10 permet le bon déroulement de la réplication de l'ADN via l'activation du complexe CMG hélicase Cdc45:Mcm2-7:GINS (Das-Bradoo et al., 2006).

La protéine PCNA est également impliquée dans la prévention du phénomène de re-réplication. La re-réplication est un évènement indésirable lors de la réplication de l'ADN, durant lequel le génome est répliqué plus d'une fois par cycle cellulaire, pouvant mener à la mort des cellules. Chaque origine de réplication doit être initiée uniquement une seule fois durant le cycle cellulaire pour éviter une aneuploïdie ainsi que des instabilités génomiques. Les concentrations des protéines nécessaires à l'initiation de la réplication de l'ADN sont alors finement régulées. Un exemple en est l'inhibition des protéines ORC, MCM et cdc6 (Matsuda et al., 2007; Weinreich et al., 2001; Nguyen et al., 2001; Archambault et al., 2005) via leurs phosphorylations par la protéine kinase cycline dépendante CDK1 ou encore l'inhibition de la protéine Cdt1 par la protéine géminine (Wohlschlegel et al., 2000). Tout comme la géminine ou la protéine CDK1,

PCNA est impliquée dans la prévention de ce phénomène de re-réplication en régulant la concentration protéique de Cdt1. Cette dernière interagit avec PCNA chargée sur l'ADN. La protéine Cdt1 va alors être poly-ubiquitinée et redirigée ainsi vers le protéasome 26S où elle va être dégradée. La poly-ubiquitination de Cdt1 est permise entre autre par l'action d'une enzyme ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} (Arias et al., 2006; Havens et al., 2012) (Voir section Introduction E.2).

La protéine PCNA n'est donc pas uniquement un facteur de processivité mais agit comme une plateforme centrale amovible orchestrant le recrutement de nombreux facteurs essentiels au bon déroulement des étapes de la réplication de l'ADN ainsi que la prévention d'évènements indésirables tel que le phénomène de re-réplication (Tableau 1).

Rôle de la protéine	Protéine	Organisme	Référence
ADN polymérase répliquatives	ADN polymérase δ p12 p66 p125 Pol32 Cdc27	H. sapiens H. sapiens H. sapiens S. cerevisiae S. pombe	(Li et al., 2006) (Ducoux et al., 2001) (Xu et al., 2001) (Gerik et al., 1998) (Reynolds et al., 2000)
ADN polymérase répliquatives	ADN polymérase ϵ Pol2 Dpb2	S. cerevisiae S. cerevisiae	(Dua et al., 2002) (Dua et al., 2002)
Endonucléase type « FLAP »	FEN-1	H. sapiens	(Warbrick et al., 1997)
ADN Ligase clamps glissants	ADN Ligase I RFC Rfc1 Rfc1 Rfc3 Rfc4	H. sapiens S. cerevisiae S. cerevisiae S. cerevisiae	(Montecucco et al., 1998) (Montecucco et al., 1998) (Bowman et al., 2004) (Bowman et al., 2004) (Bowman et al., 2004)
Facteur d'initiation de la réplication	Mcm10	S. cerevisiae	(Das-Bradoo et al., 2006)
<u>Topoisomérase</u>	<u>Topoisomérase IIα</u>	G. gallus	(Niimi et al., 2001)
Facteur d'initiation de la réplication	Cdt1	X. laevis	(Arias et al., 2006)

D'après Moldovan et al., 2007

Tableau N°1: Protéines interagissant avec PCNA durant la réplication de l'ADN

Liste non exhaustive de protéines eucaryotes impliquées dans le mécanisme de la réplication de l'ADN et qui interagissent avec la protéine PCNA via leurs motifs PIP box.

3) Rôle de PCNA au sein du cycle cellulaire

a) Les phases du cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire est essentielle afin d'assurer le bon déroulement de la division cellulaire. Le cycle cellulaire est séparé en 4 phases dont les transitions sont régulées par des complexes protéiques comprenant des cyclines et des kinases cyclines dépendantes (CDK). La phase G1 correspond à la phase où les cellules grossissent en taille et évaluent leurs statuts métaboliques afin de préparer la réplication de l'ADN. La phase S consiste en la duplication du génome de la cellule. S'en suit la phase G2 où la cellule vérifie l'état de réplication du génome, complète éventuellement des portions d'ADN non répliquées et se prépare pour la division cellulaire. Enfin la phase M correspond à la phase où a lieu la mitose, c'est-à-dire la division de la cellule mère en deux cellules filles génétiquement identiques.

Des analyses biochimiques ont montré que PCNA interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire confirmant une fois de plus que cette protéine est bel et bien une protéine pléiotrope participant à différents mécanismes cellulaires essentiels.

b) Les actions de PCNA au sein du cycle cellulaire

PCNA n'est pas uniquement impliquée dans le mécanisme de réplication de l'ADN mais interagit également avec des protéines régulatrices du cycle cellulaire. PCNA peut ainsi affecter positivement comme négativement le déroulement du cycle cellulaire ainsi que d'autres mécanismes cellulaires dépendant de ce dernier (Figure 8).

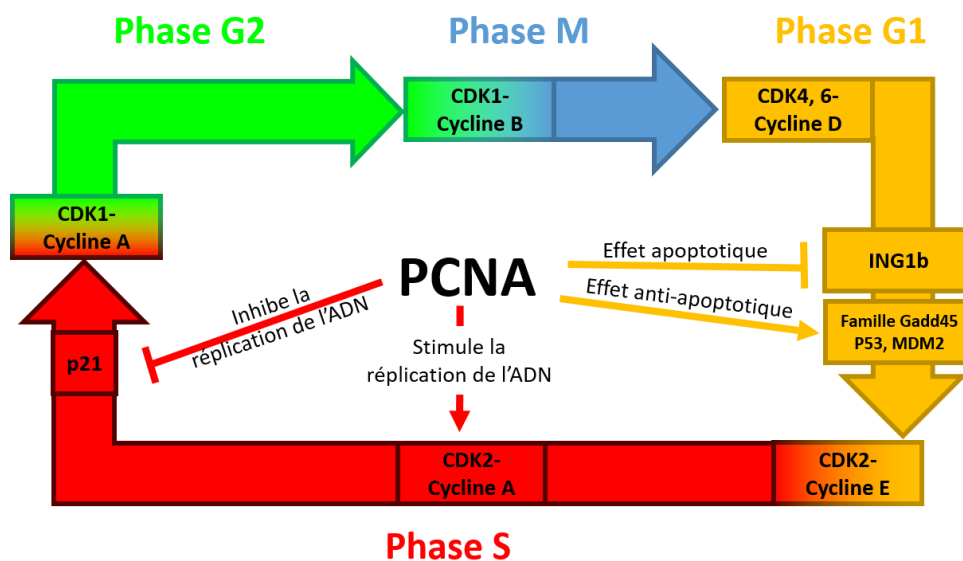


Figure 8: Interaction de PCNA avec les protéines régulatrices du cycle cellulaire

Chaque phase du cycle cellulaire est sous le contrôle de complexes cyclines-CDK. Le complexe CDK4, 6-Cycline D régule la progression de la phase G1, le complexe CDK2-Cycline E est impliqué dans la transition de la phase G1 à la phase S. Le complexe CDK2-Cycline A régule la phase S. Le complexe CDK1-Cycline A est impliqué dans la transition de la phase S à la phase G2. Enfin le complexe CDK1-Cycline B contrôle l'entrée en mitose. En interagissant avec des protéines régulatrices du cycle cellulaire, PCNA influence positivement (indiqué par les flèches) ou négativement (indiqué par les barres en T) les mécanismes cellulaires tels que la réplication de l'ADN ou l'apoptose.

Il a été démontré que PCNA interagit avec le complexe CDK2-Cycline A lors de la phase S et permet l'activation du complexe RFC et de l'ADN ligase I via leurs phosphorylations (Koundrioukoff et al., 2000). La liaison entre le complexe CDK2-Cycline A et la région C-terminale de PCNA produit un complexe ternaire. PCNA agit alors comme une plateforme de recrutement permettant la connexion entre CDK2 et ses substrats. PCNA permet ainsi de réaliser un pont entre deux mécanismes cellulaires essentiels à savoir la réplication de l'ADN et le cycle cellulaire.

Dans l'exemple précédent, l'association du complexe CDK-Cycline et de PCNA permet la synchronisation du cycle cellulaire avec la réplication de l'ADN. Cependant PCNA peut également affecter négativement la réplication de l'ADN, par son interaction avec une protéine régulatrice du cycle cellulaire à savoir la protéine p21. Cette dernière est une protéine dite « suppresseur de tumeur » ayant pour fonction l'arrêt du cycle cellulaire; en effet elle a été identifiée comme un inhibiteur des kinases cycline dépendantes (CDK2 et CDK4). Il a été démontré que l'association de p21 et de PCNA inhibe la réplication de l'ADN. Cette inhibition est causée par l'impossibilité pour les ADN polymérases et le complexe RFC de se fixer à PCNA en présence de la protéine p21 (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994). En effet p21 bloque, par compétition structurale, le site de reconnaissance des motifs PIP box des ligands de PCNA.

La protéine PCNA joue également un rôle crucial dans l'équilibre entre la mort et la survie cellulaire. En fonction de ses ligands, PCNA peut avoir un rôle pro-apoptotique ou anti-apoptotique. L'isoforme ING1b de la protéine suppresseur de tumeur ING1 (inhibitor of growth family member 1) contient une PIP box permettant l'interaction avec PCNA. En réponse à une irradiation aux UV, le taux de PCNA lié à la protéine ING1 augmente de dix fois induisant l'apoptose des cellules (Scott et al., 2001). En effet, il a été démontré que la surexpression d'ING1 provoque l'activation de la transcription de p53 et ainsi par extension, la mort par apoptose des cellules (Shinoura et al., 1999).

D'un autre côté PCNA possède une activité anti-apoptotique en inhibant l'activité des protéines de la famille Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage : Gadd45, MyD118 et CR6). Ces protéines sont des senseurs de stress cellulaire impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire, l'apoptose ainsi que la réparation des dommages à l'ADN. L'interaction de PCNA avec les motifs PIP box de ces protéines provoque l'inhibition de leurs activités pro-apoptotiques (Azam et al., 2001; Vairapandi et al., 1996).

PCNA interagit également avec les protéines p53 et son régulateur négatif, la protéine MDM2 via leurs motifs PIP box. L'inactivation de PCNA provoque une forte accumulation de la protéine p53. La dégradation de MDM2 est dépendante de PCNA. Ces données suggèrent que PCNA contribue à la régulation du taux de protéines p53 dans les cellules (Banks et al., 2006). Cependant le rôle exact de l'interaction de ces protéines avec PCNA reste encore à clarifier.

L'ensemble de ces observations place la protéine PCNA comme étant à l'origine de signaux de régulation positifs et négatifs envers le mécanisme de réplication de l'ADN. Ces régulations sont permises par l'interaction de PCNA avec des protéines régulatrices du cycle cellulaire. PCNA agit également comme une balance entre la survie et la mort cellulaire dictée par les activités pro et anti-apoptotiques de ses ligands.

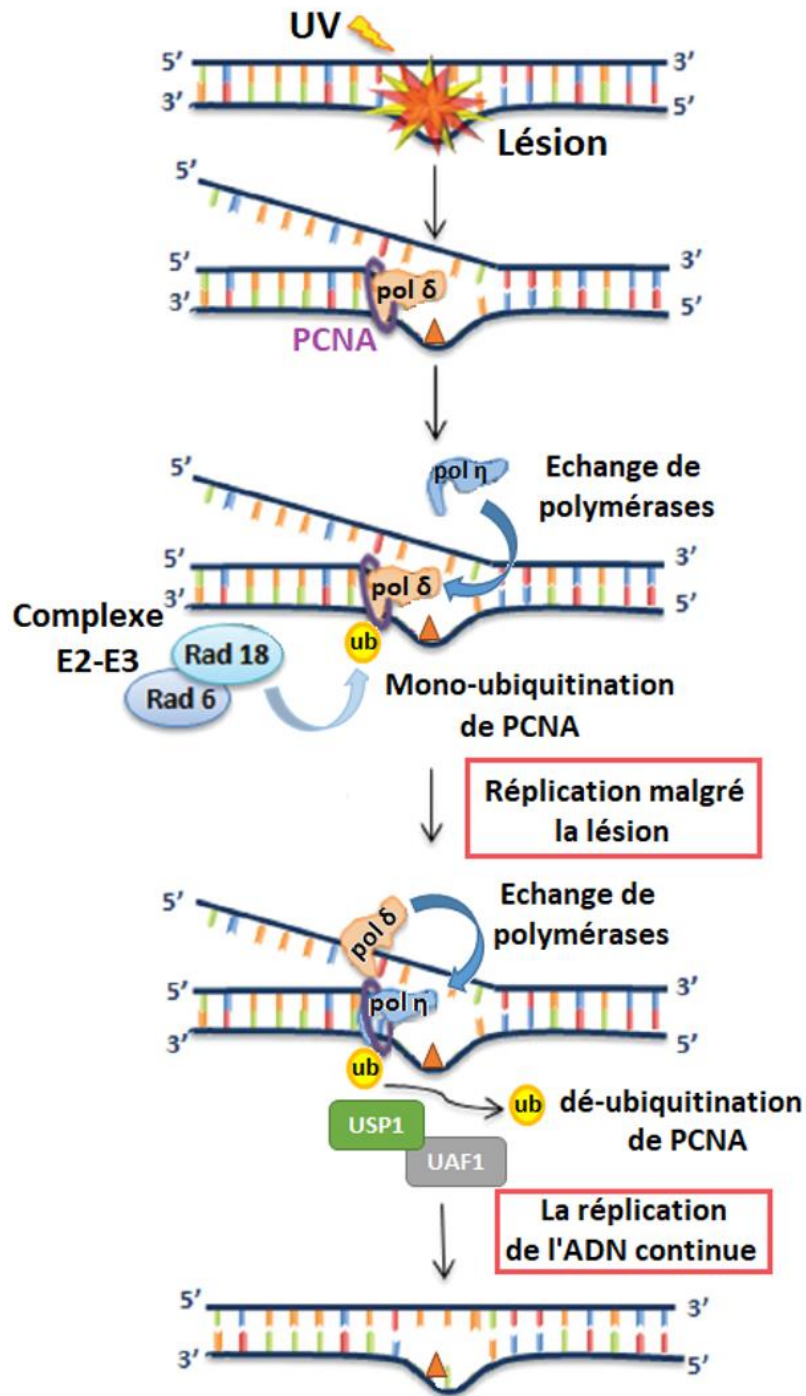
4) Rôles de PCNA dans la synthèse translésionnelle et la réparation des dommages à l'ADN

a) Implication de PCNA dans la synthèse translésionnelle

Durant la réplication de l'ADN eucaryotique, la fourche de réplication peut rencontrer des lésions du brin matriciel pouvant causer l'arrêt de cette dernière. Cet arrêt de la fourche peut potentiellement être la cause de son effondrement. Cependant il existe un mécanisme appelé synthèse translésionnelle (TLS) capable de s'affranchir d'une telle situation (Barbour et al., 2003). La TLS permet de poursuivre la réplication de l'ADN malgré la présence de lésions sur l'ADN grâce à l'activité d'ADN polymérase translésionnelles (ADN polymérase η , ι , κ , ζ , Rev1 et Rev7) (Burgers et al., 2001; Prakash et al., 2005; Takahashi et al., 2005) qui remplacent les ADN polymérase dites de type « classique » (ADN polymérase δ/ϵ). Cette réplication de l'ADN au travers d'une lésion présente un coût; en effet en contrepartie, les ADN polymérase translésionnelles ne sont pas aussi fidèles que les ADN polymérase classiques. Il n'est

alors pas rare d'observer l'incorporation d'un mauvais nucléotide en face de la lésion. Cependant ce mécanisme reste essentiel pour éviter l'arrêt de la fourche de réplication.

Les ADN polymérases translésionnelles sont recrutées sur la fourche de réplication grâce à leurs interactions avec PCNA (Haracska et al., 2001a, b, 2002; Maga et al., 2002) (Figure 9). Le mécanisme de synthèse translésionnelle est régulé; en effet le recrutement des ADN polymérases translésionnelles telles que l'ADN polymérase translésionnelle η est permise par une mono-ubiquitination de la lysine 164 (K164) de la protéine PCNA (Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004). Cette mono-ubiquitination nécessite une enzyme E1 permettant l'activation de l'ubiquitine, une enzyme de conjugaison E2 (Rad 6) qui permet le transport de la molécule d'ubiquitine jusqu'à PCNA et enfin d'une E3 ubiquitine ligase (Rad18) permettant le transfert de la molécule d'ubiquitine sur la K164 de PCNA (Hoegge et al., 2002). Une fois la lésion dépassée par la machinerie de réplication de l'ADN, la mono-ubiquitination de PCNA est éliminée par la déubiquitinase USP10 recrutée suite à une modification post-traductionnelle de la K168 de PCNA, à savoir l'ISGylation. La déubiquitination de la K164 provoque alors le recrutement des ADN polymérases dites « classiques » en remplacement de l'ADN polymérase translésionnelle η (Park et al., 2014). Cette substitution permet le retour à une réplication de l'ADN dite « classique ».



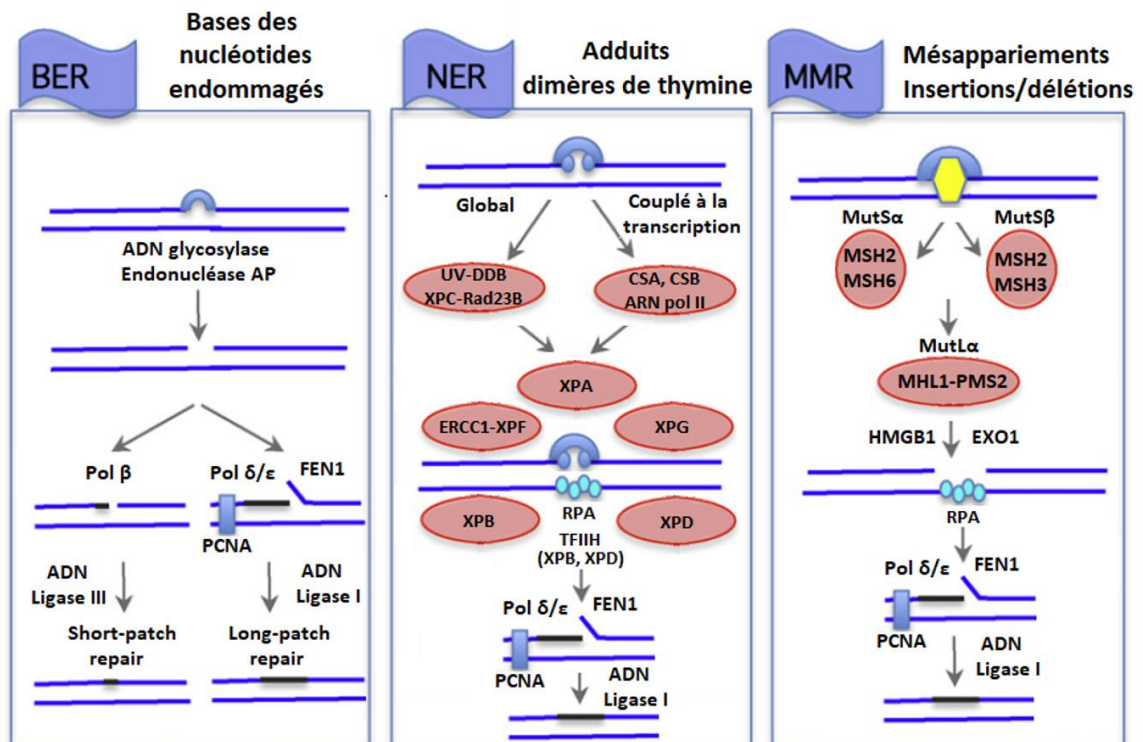
D'après Menck et al., 2014

Figure 9: Schéma représentatif de la synthèse translésionnelle via l'utilisation de l'ADN polymérase η

La fourche de réplication de l'ADN est bloquée par la présence d'une lésion sur l'ADN matriciel. La protéine PCNA subit une mono-ubiquitination et recrute une ADN polymérase translésionnelle η en remplacement de l'ADN polymérase δ . Cet échange de polymérase permet la poursuite de la réplication de l'ADN via l'incorporation de nucléotides en face de la lésion de l'ADN. Une fois la lésion dépassée par la machinerie répliquative, la mono-ubiquitination de PCNA est éliminée par le complexe USP1-UAF1 et l'ADN polymérase η est remplacée par l'ADN polymérase δ afin de poursuivre la réplication de l'ADN.

b) Implication de PCNA dans la réparation des dommages à l'ADN

Les cellules sont exposées en continu à différents facteurs génotoxiques endogènes et exogènes menant à terme, à l'apparition de lésions sur l'ADN. Ces lésions sont de natures différentes et sont prises en charge par divers mécanismes de réparation de l'ADN comme le BER (base excision repair), le NER (nucleotide excision repair), le MMR (mismatch repair) et le DSBR (double strand break repair). PCNA prend part à la dernière étape des mécanismes de réparation lorsque la machinerie de réplication est recrutée pour remplacer les fragments d'ADN lésés qui ont été excisés. Cependant il a été démontré que PCNA possède une deuxième activité. Elle orchestre la mise en place des systèmes de réparation de l'ADN en agissant comme une plateforme recrutant des facteurs essentiels (Figure 10).



D'après Rass et al., 2012

Figure 10: Implication de la protéine PCNA dans divers mécanismes de réparation de l'ADN

PCNA est impliquée dans différents types de mécanismes de réparation de l'ADN : le BER, le NER et le MMR. Le déroulement de ces mécanismes de réparation ainsi que les facteurs mis en jeu sont représentés schématiquement. Le BER permet de corriger les bases endommagées des nucléotides, le NER élimine les adduits et les dimères de thymine tandis que le MMR est impliqué dans la réparation des mésappariements et des insertions/délétions de nucléotides. PCNA agit comme un facteur de processivité au sein de la machinerie de réplication nécessaire pour les dernières étapes des trois mécanismes de réparation de l'ADN. La deuxième activité de PCNA consiste quant à elle, à orchestrer le recrutement de certains des facteurs essentiels à la réparation de l'ADN.

Le système de réparation BER (Sancar et al., 2004) est responsable du remplacement des bases altérées chimiquement (exemple: oxydation) des nucléotides. Le mécanisme de réparation débute avec la suppression de la base endommagée du nucléotide par l'action d'ADN glycosylases (spécifiques de la modification chimique présente) induisant l'apparition d'un site abasique. La liaison 5'-phosphodiester du site abasique est supprimée par des endonucléases AP (apurinique/apyrimidinique). Le système BER peut alors prendre deux directions différentes à savoir le « short-patch repair », lorsqu'un seul nucléotide est excisé, ou le « long-patch repair » lorsqu'un fragment d'ADN a été excisé. Lors du « short-patch repair », l'ADN polymérase β complète l'unique nucléotide manquant et le complexe XRCC1-ADN ligase III scelle la coupure de l'ADN. Le « long-patch repair » implique FEN1, l'ADN ligase I et les ADN polymérases δ/ϵ qui permettent la synthèse d'ADN de façon similaire à la synthèse des fragments d'Okazaki sur le brin tardif. PCNA est impliquée dans le BER bien avant que l'étape de la synthèse de l'ADN n'ait lieu. En effet les ADN glycosylases (UNG2, MPG) (Ko et al., 2005; Otterlei et al., 1999; Xia et al., 2005), les endonucléases AP (NTH1, APE2) (Oyama et al., 2004; Tsuchimoto et al., 2001; Unk et al., 2002) et la protéine XRCC1 (Fan et al., 2004) interagissent avec PCNA suggérant que cette dernière orchestre la mise en place des facteurs du BER.

Le système de réparation NER (Sancar et al., 2004) permet de supprimer les lésions à l'ADN volumineuses (adduits, dimères de thymine) générées par une exposition aux radiations ou à des molécules chimiques. Il existe deux types de NER, le NER dit global (GGR : global genome repair) et le NER couplé à la transcription (TCR : transcription-coupled repair). Pour le GGR, les complexes protéiques UV-DDB et XPC-Rad23B sont requis pour la reconnaissance du dommage tandis que pour le TCR ce sont les protéines CSA, CSB et l'ARN polymérase II qui sont impliquées. Les deux voies de réparation nécessitent le recrutement du facteur de transcription TFIIH (complexe protéique incluant notamment les hélicases XPB, XPD) ainsi que les protéines RPA et XPA. L'ensemble de ces protéines permettent le relâchement de la molécule d'ADN. Les endonucléases ERCC1-XPF et XPG coupent de part et d'autre du dommage à l'ADN. Le fragment d'ADN excisé est re-synthétisé par la machinerie de réplication et son extrémité 3' est scellée par l'ADN ligase I. PCNA est impliquée dans le NER lors de la synthèse de l'ADN mais il a été démontré qu'elle interagit également avec les protéines XPG et XPA (Gary et al., 1997; Aboussekhra et al., 1995; Miura et al., 1996).

Ces résultats suggèrent alors que PCNA est essentielle pour le recrutement de certains facteurs du NER.

Le système de réparation MMR (Jiricny, 2006) corrige les mésappariements entre les bases des nucléotides ainsi que les insertions/délétions générées par des erreurs de réplication de l'ADN. Le complexe protéique MutS α (MSH2-MSH6) reconnaît les mésappariements ainsi que les insertions/délétions de petites tailles tandis que le complexe MutS β (MSH2-MSH3) cible les insertions/délétions de grandes tailles. D'autres facteurs sont recrutés comme le complexe MutL α (MHL1-PMS2), les protéines HMGB1, RPA, ainsi que l'exonucléase EXO1. L'ensemble de ces facteurs protéiques permet l'excision du fragment d'ADN aberrant, suivi par la re-synthèse du fragment manquant par la machinerie de réplication de l'ADN. PCNA n'est pas uniquement requis pour la synthèse d'ADN mais interagit également avec les protéines MSH6, MSH3, MLH1 et EXO1 (Clark et al., 2000; Flores-Rozas et al., 2000; Kleczkowska et al., 2001; Lee et al., 2006) lui permettant d'intervenir dans les étapes de reconnaissance des aberrations et d'excision des fragments d'ADN incorrects lors du MMR.

PCNA présente deux rôles importants dans les divers mécanismes de réparation de l'ADN (BER, NER et MMR). Dans un premier temps, PCNA agit comme une plateforme de recrutement des facteurs essentiels au bon déroulement des mécanismes de réparation de l'ADN. Puis PCNA agit en tant que facteur de processivité au sein de la machinerie de réplication de l'ADN nécessaire à tous mécanismes de réparation.

5) Implication de PCNA et de ses partenaires au sein d'évènements cellulaires annexes

a) PCNA et le métabolisme des chromatides-sœurs

La cohésion des chromatides-sœurs est essentielle pour permettre la séparation coordonnée des chromosomes entre les cellules filles durant la mitose. Cet évènement appelé ségrégation des chromosomes est à l'origine de la distribution fidèle et équitable du matériel génétique entre les cellules filles. La cohésion entre deux chromatides-sœurs est permise par l'action d'un complexe protéique appelé cohésine (Smc1, Smc3, Scc1 et Scc3) (Nasmyth et al., 2005).

Il a été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae* que l'acétyltransférase Eco1 est un facteur essentiel à la mise en place du complexe cohésine. Eco1 interagit avec PCNA via un motif PIP box. Cette interaction est essentielle pour le recrutement de

l'acétyltransférase sur la chromatine (Moldovan et al., 2007). Les protéines humaines ESCO1 et ESCO2 sont de la même famille que la protéine Eco1 et possèdent également un motif PIP box (Moldovan et al., 2007), suggérant ainsi qu'il existe probablement chez l'humain, un mécanisme similaire à celui de *Saccharomyces cerevisiae* impliquant la forme humaine de PCNA.

La protéine PCNA est également à l'origine de la régulation des recombinaisons entre les séquences d'ADN des chromatides-sœurs. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la SUMOylation des lysines 127 et 164 de PCNA permet de recruter l'enzyme Srs2. Cette enzyme dissocie la nucléoprotéine Rad51 de l'ADN dont la présence est essentielle au mécanisme de recombinaison (voir section Introduction B.2.b) (Papouli et al., 2005; Pfander et al., 2005).

b) PCNA et le métabolisme de la chromatine

La molécule d'ADN est compactée en fibres de chromatine ou nucléofilaments (Polo et al., 2006). L'unité de base de ces fibres de chromatine est le nucléosome : l'association de 146 paires de bases d'ADN autour d'un complexe protéique octamérique (2 exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4). L'organisation de la chromatine en nucléosomes correspond au premier niveau de compaction de l'ADN. Les nucléofilaments peuvent adopter des niveaux d'organisation plus compacts qui nécessitent le recrutement de protéines régulatrices et structurales. La protéine PCNA est impliquée dans l'organisation structurale de la chromatine (Tableau 2).

En effet, il a été démontré lors de la réplication de l'ADN que PCNA interagit avec une protéine chaperonne CAF-1 (Krawitz et al., 2002; Zhang et al., 2000) intervenant dans l'assemblage des nucléosomes via le recrutement d'histones H3 et H4 (Smith et al., 1989).

Durant la division cellulaire, l'information génétique n'est pas l'unique donnée transmise aux cellules filles, le patron d'expression génétique doit également être légué. La régulation de ce patron d'expression est appelée « l'épigénétique » et est codée par des modifications chimiques sur l'ADN et les histones. Ces modifications covalentes permettent le relâchement ou la compaction de la chromatine à l'origine de la régulation de l'expression des gènes. PCNA intervient dans de nombreux mécanismes épigénétiques différents (Tableau 2).

PCNA contrôle la méthylation de la position C5 de la cytosine retrouvée dans les îlots CpG (Bird, 2002). Les îlots CpG méthylés localisés au niveau des promoteurs répriment l'expression des gènes qui en sont dépendants. En effet PCNA interagit avec la protéine DNMT1 en la recrutant aux niveaux des « foci de réplication » (Chuang et al., 1997; Iida et al., 2002).

PCNA interagit également avec la protéine CAF-1 permettant le recrutement du complexe MBD1-SETDB1 au niveau de la fourche de réplication afin d'y méthyler la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) (Sarraf et al., 2004). Cette méthylation traduit un statut réprimé de la chromatine (Hediger et al., 2006).

Les régulateurs principaux du statut réprimé ou non de la chromatine sont les acétyltransférases d'histones (HAT: histone acetyltransferases) et les déacétylases d'histones (HDAC: Histone deacetylases). Il a été démontré que la protéine HDAC1 impliquée dans la répression génique se lie à PCNA aux niveaux des « foci de réplication » (Milutinovic et al., 2002). L'acétyltransférase p300 interagit également avec la protéine PCNA; cependant le recrutement de p300 est réalisé aux niveaux de dommages à l'ADN (Hasan et al., 2001). La protéine p300 serait nécessaire pour le remodelage de la chromatine favorisant le bon déroulement des mécanismes de réparation.

D'autres régulateurs de l'organisation structurale de la chromatine interagissent avec PCNA comme le complexe WSTF-SNF2H (Poot et al., 2004), ou bien encore la protéine HP1 (Murzina et al., 1999) (Tableau 2).

PCNA agit directement sur la structure de la chromatine en se liant à des protéines de remodelage. Elle permet également une régulation de l'expression génique, grâce au recrutement de partenaires protéiques de types méthylases, acétyltransférases et déacétylases ciblant les histones et l'ADN.

Rôle de la protéine	Protéine	Organisme	Référence
Mise en place du complexe <u>cohésine</u> entre chromatides-sœurs	<u>Acétyltransférase</u> Eco1 ESCO1 ESCO2	S. cerevisiae H. sapiens H. sapiens	(<u>Moldovan et al., 2006</u>) (<u>Moldovan et al., 2006</u>) (<u>Moldovan et al., 2006</u>)
Répression de la recombinaison entre chromatides-sœurs	Srs2	S. cerevisiae	(<u>Papouli et al., 2005</u> ; <u>Pfander et al., 2005</u>)
Assemblage des nucléosomes	CAF-1	H. sapiens	(<u>Krawitz et al., 2002</u> ; <u>Zhang et al., 2000</u>)
Méthylation des îlots CpG	<u>Méthyltransférase</u> DNMT1	H. sapiens	(<u>Chuang et al., 1997</u> ; <u>Iida et al., 2002</u>)
Méthylation de l'histone H3	MBD1-SETDB1	H. sapiens	(<u>Sarraf et al., 2004</u>)
Répression génique	<u>Déacétylases</u> HDAC1	H. sapiens	(<u>Milutinovic et al., 2002</u>)
Remodelage de la chromatine sur sites de dommages à l'ADN	<u>Acétyltransférase</u> p300	H. sapiens	(<u>Hasan et al., 2001</u>)
Régulateur de l'organisation structurelle de la chromatine	WSTF-SNF2H HP1	H. sapiens H. sapiens	(<u>Poot et al., 2004</u>) (<u>Murzina et al., 1999</u>)

Tableau N°2: Protéines interagissant avec PCNA dans l'organisation structurelle de la chromatine et la régulation génique

Liste non exhaustive de protéines eucaryotes impliquées dans les mécanismes de régulation génique et d'organisation structurelle de la chromatine qui interagissent avec la protéine PCNA via leurs motifs PIP box.

B) Les modifications post-traductionnelles de PCNA

Nous avons vu que PCNA est une protéine intervenant dans de nombreux mécanismes cellulaires différents. Cette diversité de fonctions est expliquée par de multiples interactions avec différents partenaires protéiques. Cependant, ce panel d'interactions n'explique pas à lui seul, la pléiotropie de PCNA. En effet cette protéine possède également de nombreux résidus sujets à diverses modifications post-traductionnelles. Très peu de ces modifications chimiques sont caractérisées, laissant potentiellement beaucoup d'activités de PCNA encore inconnues à ce jour.

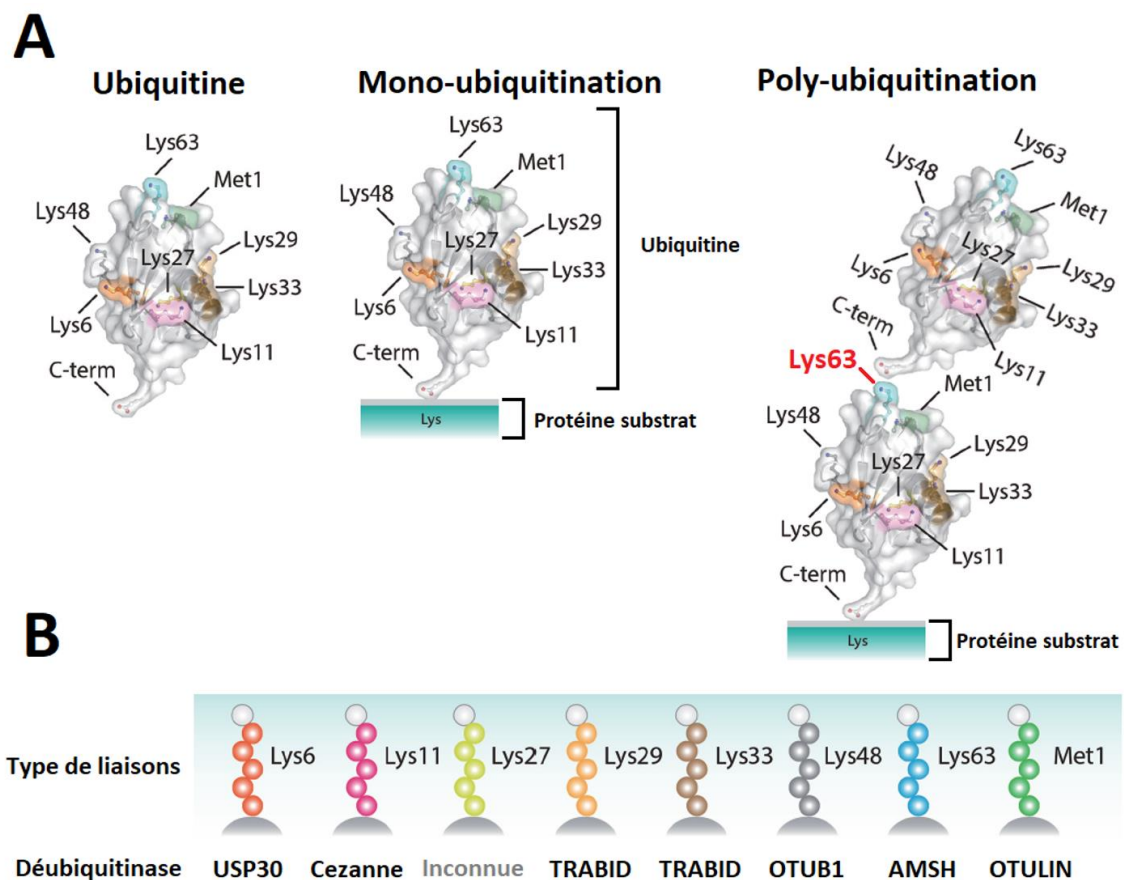
1) L'ubiquitination de PCNA et ses fonctions

a) L'ubiquitine

L'ubiquitination des protéines est une modification post-traductionnelle impliquée dans de nombreux mécanismes biologiques eucaryotiques. C'est une modification en

plusieurs étapes qui mène à la fixation covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (chaînes d'ubiquitines) sur une protéine cible (Swatek et al., 2016).

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés. La première protéine d'ubiquitine est fixée à la protéine substrat via une interaction entre le groupe carboxylate C terminal de l'ubiquitine et une lysine d'une protéine substrat; on appelle alors cette modification une mono-ubiquitination. L'ubiquitine possède 7 lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) et une méthionine (M1). Ces résidus peuvent jouer le rôle de site de liaison pour d'autres ubiquitines (Swatek et al., 2016) (Figure 11A). La formation d'une chaîne d'ubiquitines est appelée une poly-ubiquitination.



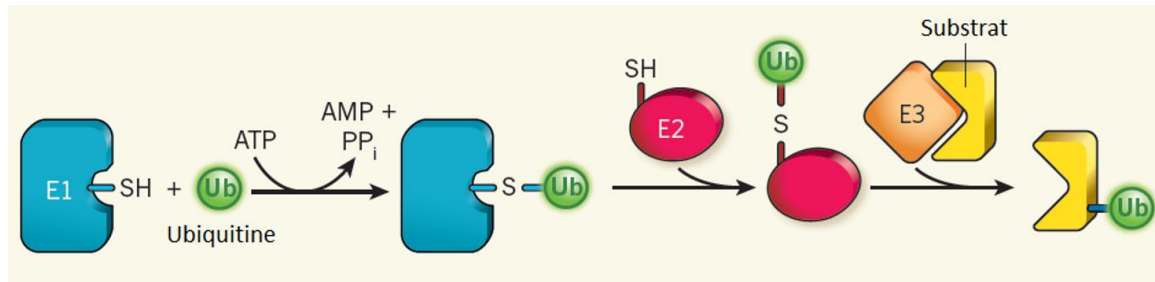
D'après Swatek et al., 2016

Figure 11: Schéma représentatif de la mono et poly-ubiquitination

A Structure protéique de l'ubiquitine, suivie de la représentation de la mono-ubiquitination et d'une poly-ubiquitination par la lysine 63. **B** Liste des différents types de liaisons entre ubiquitines ainsi que les déubiquitinases qui y sont associées.

L'ajout d'une ubiquitine est permise par une cascade enzymatique en trois étapes (Pickart et al., 2001): l'enzyme E1 ligase permet « l'activation » de l'ubiquitine selon un processus ATP dépendant (Schulman et al., 2009), une enzyme de la classe E2 ligase appelé enzyme de conjugaison est chargée par l'ubiquitine (Ye et al., 2009), enfin une

enzyme de la classe E3 ligase permet le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers la protéine cible (Deshaies et al., 2009; Rotin et al., 2009; Komander et al., 2012) (Figure 12).



D'après Bhogaraju et al., 2016

Figure 12: Schéma représentatif de la cascade enzymatique menant à l'ubiquitination d'un substrat

Processus schématisé de l'ubiquitination d'un substrat : L'enzyme E1 active l'ubiquitine via un système ATP dépendant, l'enzyme E2 de conjugaison recrute l'ubiquitine et permet son acheminement vers la cible et l'enzyme E3 transfère l'ubiquitine de l'enzyme E2 vers le substrat.

Des familles spécifiques de protéases (déubiquitinases: DUB) permettent la déubiquitination (voir Figure 11B) (Komander et al., 2009; Clague et al., 2013).

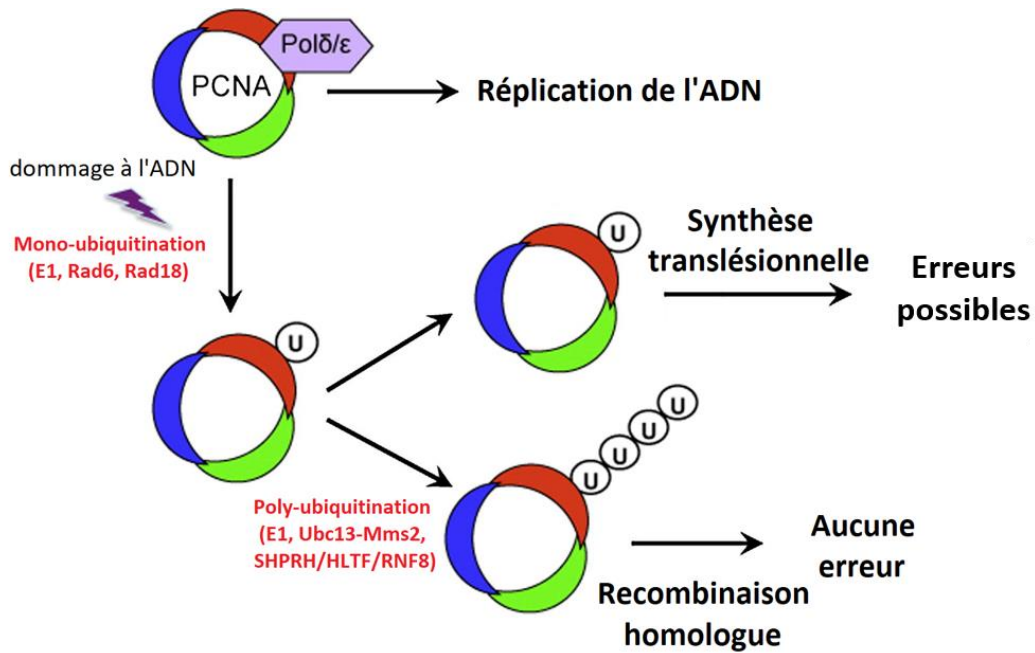
La mono-ubiquitination est impliquée dans la signalisation cellulaire, la réparation de l'ADN, le marquage épigénétique et la localisation de certaines protéines (Komander et al., 2012). La poly-ubiquitination est également engagée dans de nombreuses activités cellulaires. Des analyses protéomiques ont permis de prouver l'existence de toutes les combinaisons de chaînes d'ubiquitines possibles *in vivo* (Kim et al., 2011), cependant certains types de chaînes sont plus représentés que d'autres (Figure 11B). Par exemple, 50% des chaînes d'ubiquitines impliquent la lysine 48. Ce type de chaîne est nécessaire pour la dégradation des protéines poly-ubiquitinées via le protéasome (Hershko et al., 1998). Les chaînes impliquant les lysines 63 des ubiquitines représentent quant à elle, le deuxième type de chaîne le plus fréquemment observé. Elles sont engagées dans diverses activités comme l'activation de protéines kinases ou la réparation de cassures double-brin de l'ADN (Chen et al., 2009). D'autres chaînes d'ubiquitines plus « atypiques » existent également mais leurs fonctions restent encore inconnues (Swatek et al., 2016). On parle du « code ubiquitine » lorsque l'on fait référence aux liens entre les différentes catégories d'ubiquitination et leurs implications biologiques (Komander et al., 2012).

b) L'ubiquitination de PCNA

L'ubiquitination de PCNA représente sa modification post-traductionnelle la plus étudiée. Elle a tout d'abord été découverte dans la levure puis décrite dans les cellules de mammifères (Hoegge et al., 2002; Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004). L'ubiquitination s'effectue sur un résidu hautement conservé de PCNA, à savoir la lysine 164. La lysine peut être mono ou poly-ubiquitinée (Hoegge et al., 2002). La chaîne d'ubiquitines sur la lysine 164 de PCNA diffère d'un point de vue structural des poly-ubiquitinations présentes sur les protéines vouées à la dégradation par le protéasome. En effet ce ne sont pas les lysines 48 mais les lysines 63 qui sont impliquées dans l'assemblage de la chaîne d'ubiquitines. La mono et poly-ubiquitination de PCNA requièrent un panel de protéines différentes.

Comme nous l'avons décrit précédemment dans la section A.4.a, la mono-ubiquitination de PCNA est effectuée par un pool de protéines (enzyme E1, l'enzyme E2: Rad 6 et l'enzyme E3: Rad 18) induisant une cascade enzymatique menant à la mono-ubiquitination de la lysine 164 (Hoegge et al., 2002). Cette modification post-traductionnelle permet un changement de partenaire protéique à savoir le remplacement d'une ADN polymérase dites « classique » par une ADN polymérase translésionnelle. Nous pouvons prendre en exemple le remplacement de l'ADN polymérase δ par l'ADN polymérase translésionnelle η (Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004). Cet échange protéique permet à la machinerie de réplication de passer outre les lésions de l'ADN par un processus appelé la synthèse translésionnelle (Figure 13).

La poly-ubiquitination de PCNA met en jeu le même processus de cascade enzymatique avec un pool de protéines différentes (enzyme E1, l'enzyme E2: Ubc13-Mms2 et les enzymes E3: SHPRH, HLTF et RNF8) (Motegi et al., 2006; Unk et al., 2008; Zhang et al., 2008). La poly-ubiquitination de PCNA est considérée comme un mécanisme parallèle à la TLS. Si la synthèse translésionnelle ne permet pas le passage de la machinerie de réplication de l'ADN à travers la lésion, un deuxième mécanisme assure son remplacement. Des facteurs nécessaires aux mécanismes de recombinaison de l'ADN sont recrutés grâce à la poly-ubiquitination de PCNA. Ce mécanisme permet ainsi une réplication de l'ADN sans erreur contrairement à la TLS (Motegi et al., 2008) (Figure 13).



D'après Zhang et al., 2011

Figure 13: L'ubiquitination de PCNA et ses conséquences

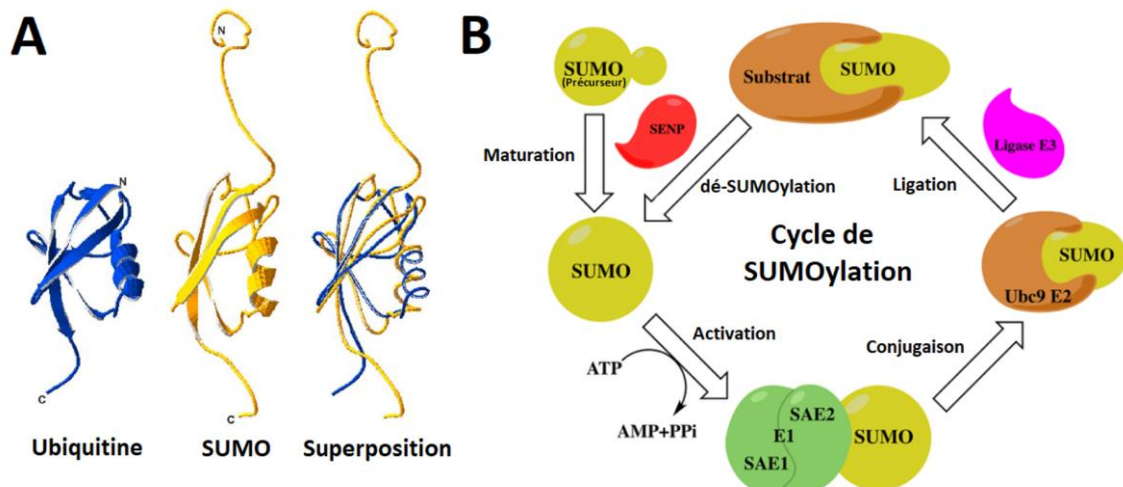
Processus schématisé de l'ubiquitination de la protéine PCNA. La mono-ubiquitination de PCNA est réalisée par une cascade enzymatique comprenant les enzymes suivantes: l'enzyme E1 (activation de l'ubiquitine), l'enzyme E2: Rad 6 (recrutement de l'ubiquitine), l'enzyme E3: Rad 18 (transfert de l'ubiquitine de l'E2 à PCNA). Cette modification de PCNA permet la mise en place de la synthèse translésionnelle avec un risque élevé de mauvaises incorporations de nucléotides. La poly-ubiquitination de PCNA met en jeu le même processus de cascade enzymatique avec un pool de protéines différentes: l'enzyme E1, l'enzyme E2: Ubc13-Mms2, l'enzyme E3: SHPRH/HLTF/RNF8. Cette modification de PCNA permet la mise en place du mécanisme de recombinaison homologue permettant une synthèse d'ADN sans erreurs.

2) Rôle de la SUMOylation de PCNA

a) La SUMOylation

La famille des protéines SUMO (Small ubiquitin-like modifier) est constituée de 4 protéines (SUMO1, SUMO2, SUMO3 et SUMO4) d'une centaine d'acides aminés (Flotho et al., 2013). La SUMOylation est une modification post-traductionnelle ressemblant fortement à l'ubiquitination. En effet la protéine SUMO est très proche de l'ubiquitine d'un point de vue structural (Dohmen et al., 2004) (Figure 14A) et tout comme l'ubiquitination, la SUMOylation aboutit à une liaison d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine de la protéine cible. Le processus biochimique utilisé dans la SUMOylation est très similaire à la cascade enzymatique impliquée dans l'ubiquitination (Figure 14B). La première étape consiste au clivage de la partie C terminale de la protéine SUMO exposant ainsi un dipeptide de glycines (GG). Le

clivage est réalisé à l'aide des protéines de la famille SENP (Sentrin-specific protease) (Drag et al., 2008). Le motif GG est reconnu par l'enzyme E1 (SAE1-SAE2) (Olsen et al., 2010) qui active la protéine SUMO via un processus ATP dépendant. La protéine SUMO est chargée sur l'enzyme de conjugaison E2 (Ubc9) (Watanabe et al., 1996). Enfin la protéine SUMO est transférée sur la protéine cible à l'aide d'enzymes E3 ligases (protéines de la famille PIAS : Protein inhibitor of activated, RanBP2 et PC2) (Yunus et al., 2009; Pichler et al., 2002; Kagey et al., 2003). Comme l'ubiquitination, la SUMOylation est un processus réversible. En effet les protéines de la famille SENP clivent la protéine SUMO de son substrat (Drag et al., 2008). Cependant alors que l'ubiquitination est principalement décrite pour son implication dans le mécanisme de dégradation des protéines via le protéasome, la SUMOylation semble réguler les propriétés biochimiques de nombreuses protéines. Cette modification permet la régulation du trafic intracellulaire, de l'activité transcriptionnelle, de l'organisation de la chromatine, de la réparation de l'ADN, de certaines voies de signalisations ainsi que des interactions de types protéine-protéine ou ADN-protéine (Flotho et al., 2013).



D'après Dohmen et al., 2004; Han et al., 2018

Figure 14: La protéine SUMO et sa cascade enzymatique

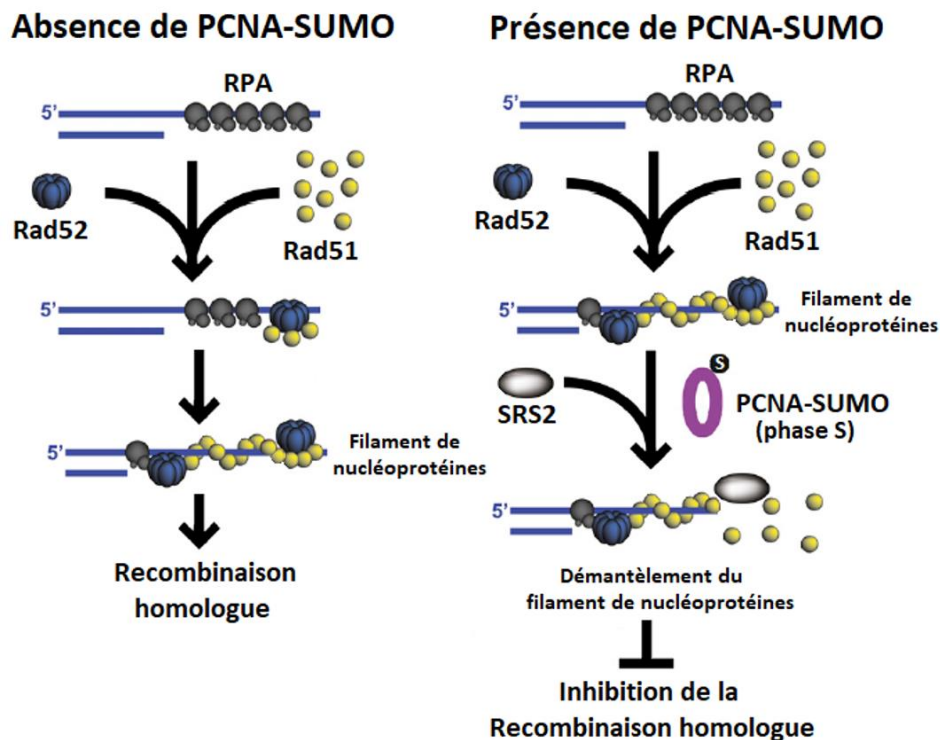
A Ressemblance structurale entre les protéines ubiquitine et SUMO. **B** Processus schématisé de la SUMOylation d'un substrat : Le précurseur de la protéine SUMO subit une maturation par l'action des protéines de la famille SENP. L'enzyme E1 (SAE1-SAE2) active l'ubiquitine via un système ATP dépendant, l'enzyme E2 de conjugaison (Ubc9) recrute l'ubiquitine et permet son acheminement vers la cible et l'enzyme E3 transfère la protéine SUMO de l'enzyme E2 vers le substrat.

b) La SUMOylation de PCNA

Comme nous l'avons mentionné précédemment dans la section Introduction A.5.a, il semblerait que la protéine PCNA de *Saccharomyces cerevisiae* possède deux sites de

SUMOylation à savoir les lysines 164 (également ubiquitinée sur la forme humaine de PCNA) et 127 (absente sur la forme humaine de PCNA) (Hoege et al., 2002).

Lorsque la molécule d'ADN présente un dommage, PCNA est modifiée sur la lysine 164 par mono-ubiquitination, la poursuite de la réplication est alors possible via la TLS mais le risque d'erreur d'incorporation de mauvais nucléotides est élevé (voir section Introduction B.1.b). Au contraire lorsque la lysine 164 est poly-ubiquitinée, la poursuite de la réplication est possible sans erreur grâce à l'utilisation d'un mécanisme de recombinaison homologue de l'ADN (voir section Introduction B.1.b). Durant la phase S, la protéine PCNA de *Saccharomyces cerevisiae* peut être SUMOylée sur les lysines 164 et 127 en absence de dommage à l'ADN. La protéine PCNA-SUMO perturberait alors la voie de signalisation RAD52 essentielle pour le mécanisme de recombinaison homologue (Pfander et al., 2005) (Figure 15). En l'absence de PCNA-SUMO, la protéine Rad52 va charger la protéine Rad51 sur les simples brins d'ADN provoquant la formation de filaments de nucléoprotéines essentielles au mécanisme de recombinaison homologue. Cependant en présence de la protéine PCNA-SUMO, l'Hélicase Srs2 est recrutée. Cette dernière exerce l'activité inverse de Rad52 et va dissocier les protéines Rad51 des simples brins de l'ADN inhibant ainsi le mécanisme de recombinaison homologue. La SUMOylation de PCNA chez *Saccharomyces cerevisiae* permet ainsi le blocage des événements de recombinaison de l'ADN durant la réplication de l'ADN en phase S.



D'après Symington et al., 2014

Figure 15: La SUMOylation de PCNA et ses conséquences

Représentation schématique de la formation des filaments de nucléoprotéines nécessaires au bon déroulement de la recombinaison homologue. La protéine RAD52 recrute et charge Rad51 sur les simples-brins d'ADN protégés par les protéines RPA. En présence de PCNA SUMOylé (PCNA-SUMO), l'hélicase Srs2 est recrutée et dissocie les protéines Rad51 des simples brins d'ADN, causant l'inhibition d'évènements de recombinaison homologue.

Chez l'Humain, la K164 de la protéine PCNA peut être SUMOylée à l'aide de trois isoformes à savoir SUMO1, SUMO2 et SUMO3. En fonction du type de conjugaison, la protéine PCNA SUMOylée n'aura pas les mêmes fonctions. Il a été démontré que la protéine PCNA-SUMO1 permet le recrutement de l'hélicase PARI (PCNA associated recombination inhibitor) qui permet d'inhiber la recombinaison homologue en cas de blocage de la fourche de réplication au niveau de lésions de l'ADN empêchant ainsi la formation de cassures double-brins de l'ADN (Gali et al., 2012). PCNA-SUMO2 quant à elle, limite la transcription via le remodelage de la chromatine lors de la réplication de l'ADN. Ce remodelage de la chromatine est permis notamment par le recrutement de la protéine CAF-1. Le rôle de cette SUMOylation est alors de minimiser l'instabilité génomique pouvant résulter de rencontres catastrophiques entre les mécanismes de réplication et de transcription lors de l'arrêt de la fourche de réplication au niveau de lésions de l'ADN (Li et al., 2018). La SUMOylation de PCNA au niveau de K164 garantirait alors la mise en place préférentielle du mécanisme de la TLS en empêchant

la recombinaison homologue lors d'évènements de blocage de la fourche de réplication au niveau de lésions de l'ADN (Mohiuddin et al., 2018).

Il a été également démontré que PCNA pourrait être poly-SUMOylée. Cette poly-SUMOylation serait la cause du chargement de PCNA sur l'ADN (Parker et al., 2008). Cependant le rôle de cette poly-SUMOylation reste encore incertain. Ces résultats sont issus d'études chez la levure; cependant dans les cellules humaines, le rôle de la SUMOylation de PCNA n'a pas encore été exploré.

3) La phosphorylation de PCNA nécessaire au maintien de la structure PCNA-chromatine

L'ubiquitination et la SUMOylation ne sont pas les seules modifications post-traductionnelles caractérisées pour la protéine PCNA; l'existence d'une phosphorylation de PCNA a été observée (Wang et al., 2006).

Cette phosphorylation est réalisée par la protéine EGFR (epidermal growth factor receptor) et prend place sur la Tyrosine 211 (Y211). L'EGFR est une protéine transmembranaire de la famille ErbB (ErbB1: EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4) qui transduit son signal suite à la liaison du facteur de croissance épidermique (EGF) (Wieduwilt et al., 2008). En effet la fixation d'EGF sur son récepteur permet une dimérisation de ce dernier qui active alors sa fonction de tyrosine kinase. Son autophosphorylation provoque une activation des voies de signalisations conduisant à la synthèse de l'ADN et à la prolifération cellulaire. La phosphorylation de PCNA implique un mécanisme différent de la voie de signalisation dite « classique » d'EGFR. Le récepteur va être « transloqué » vers le noyau, et peut alors cibler des promoteurs et agir en tant que régulateur transcriptionnel ou bien utiliser sa fonction de tyrosine kinase pour phosphoryler des protéines et notamment PCNA. La phosphorylation de PCNA a été observée uniquement sur une fraction de la population de la protéine, à savoir celle liée à la chromatine. Il a été démontré que cette phosphorylation sur la Y211 accroît la stabilité du complexe PCNA-chromatine (Wang et al., 2006). Cette forme phosphorylée de PCNA est retrouvée en grande quantité dans les tissus à fort taux de régénération comme le foie ou les cellules tumorales présentant un fort taux d'EGFR nucléaire (Marti et al., 1995; Marti et al., 2001; Psyrris et al., 2005; Tao et al., 2005). Ces deux types cellulaires présentent une forte activité de réplication. Les forts taux de protéine PCNA phosphorylée pourraient alors être expliqués par la nécessité d'un complexe PCNA-chromatine stable lors du mécanisme de réplication de l'ADN.

L'utilisation d'un peptide bloquant d'EGFR a permis d'inhiber par compétition la phosphorylation de PCNA et ainsi permettre une diminution de la croissance de cellules tumorales de prostates et de cellules tumorales triples négatives du sein (Zhao et al., 2011; Yu et al., 2013).

4) Autres modifications post-traductionnelles de PCNA

a) L'acétylation de PCNA

Il existe d'autres types de modifications post-traductionnelles de PCNA moins étudiées, comme l'acétylation. Les sites spécifiques d'acétylation de PCNA ne sont pas encore caractérisés, cependant l'analyse de profils de migration de PCNA sur des gels d'électrophorèse bidimensionnelle à haute résolution a permis de révéler l'existence de trois isoformes de PCNA (Naryzhny et al., 2004). Une isoforme est non acétylée, l'une « modérément-acétylée » et la dernière « hyper-acétylée ». Les résultats de l'étude ont montré une localisation des isoformes « modérément-acétylée » et « hyper-acétylée » sur la chromatine tandis que l'isoforme « non acétylée » se situe principalement dans le nucléole. Ces données suggèrent alors une translocation dynamique de PCNA qui dépendrait de son statut d'acétylation. De plus, la déacétylation de PCNA semble affecter sa capacité à se fixer aux ADN polymérase δ et ϵ (Naryzhny et al., 2004). Les protéines p300 et HDAC1 ont été co-immunoprécipitées avec PCNA suggérant ainsi leurs implications respectives dans l'acétylation et la déacétylation du facteur de processivité (Naryzhny et al., 2004).

b) La méthylation de PCNA

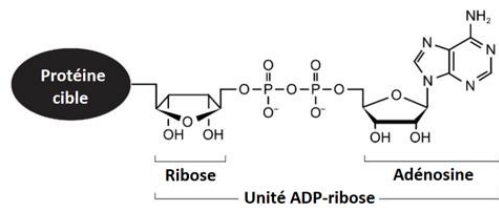
La méthylation de PCNA a été découverte dans des cellules tumorales de cancer du sein. L'isoforme de PCNA méthylée est communément appelée « caPCNA » pour « cancer-associated proliferating cell nuclear antigen ». Le rôle de la méthylation reste encore inconnu mais la forme méthylée de PCNA est proposée comme un biomarqueur candidat pour la détection du cancer du sein (Malkas et al., 2006). La méthylation ou méthyl-estérification de PCNA prend place sur deux types de résidus différents à savoir l'acide aspartique et l'acide glutamique. Après analyse par LC-MS/MS (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) de peptides synthétiques de l'isoforme caPCNA, une quinzaine de résidus de PCNA (dont la majorité sont des acides glutamiques) présentent une méthylation potentielle (Hoelz et al., 2006). Les conséquences de ces méthylations sur la fonction de PCNA restent encore inconnues à

ce jour, cependant la méthylation semble provoquer un changement conformationnel de la protéine. Ces changements pourraient être à l'origine d'interactions protéiques spécifiques ou au contraire de la dissociation de certains ligands de PCNA. En effet ce phénomène de modification structurale a été observé pour certains récepteurs chimiotactiques chez les bactéries (Levit et al., 2002). Sous l'action d'un ligand, les récepteurs sont méthylés et subissent un changement conformationnel qui mène à la transduction du signal dans la cellule.

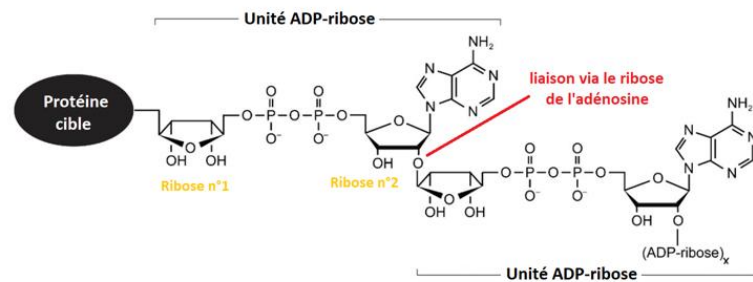
c) PARylation de PCNA ?

La PARylation ou Poly ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle présente majoritairement chez les eucaryotes. Cette modification intervient dans de nombreux mécanismes biologiques comme l'organisation de la chromatine, la réparation de l'ADN, la transcription, la réplication de l'ADN ou encore l'apoptose (Berger et al., 2004; Corda et al., 2003). La PARylation permet l'ajout de plusieurs unités d'ADP-ribose sur une protéine cible aux niveaux de résidus tels que l'aspartate, le glutamate et la lysine (Figure 16). A noter qu'il existe également la mono ADP-ribosylation qui comme son nom l'indique permet l'ajout d'une unique molécule d'ADP-ribose. La source d'unités d'ADP-ribose est le coenzyme NAD (nicotinamide adénine dinucléotide). Les enzymes responsables de la PARylation sont les PARPs (poly ADP-ribose polymérase) (Hottiger et al., 2010; Gibson et al., 2012). Pour former les chaînes de poly ADP-ribose, les unités d'ADP-riboses sont liées entre elles par des ponts ribose-ribose (Miwa et al., 1979). Il existe deux types de connexions différentes entre les riboses. La formation d'une chaîne linéaire nécessite que la liaison se réalise au niveau du ribose de l'adénosine. Tandis que la formation d'une chaîne ramifiée implique une liaison au niveau du ribose qui n'appartient pas à l'adénosine (Miwa et al., 1981). Cette modification est réversible et implique l'enzyme PARG (poly ADP-ribose glycohydrolase) (Hatakeyama et al., 1986). PARG permet la coupure des liaisons ribose-ribose des chaînes d'ADP-riboses cependant elle n'est pas capable d'éliminer la dernière unité d'ADP-ribose laissant ainsi les protéines mono ADP-ribosylées. Trois enzymes (MacroD1, MacroD2 et TARG1) rompent les liaisons covalentes entre la dernière unité d'ADP-ribose et les protéines modifiées (Jankevicius et al., 2013; Rosenthal et al., 2013; Sharifi et al., 2013).

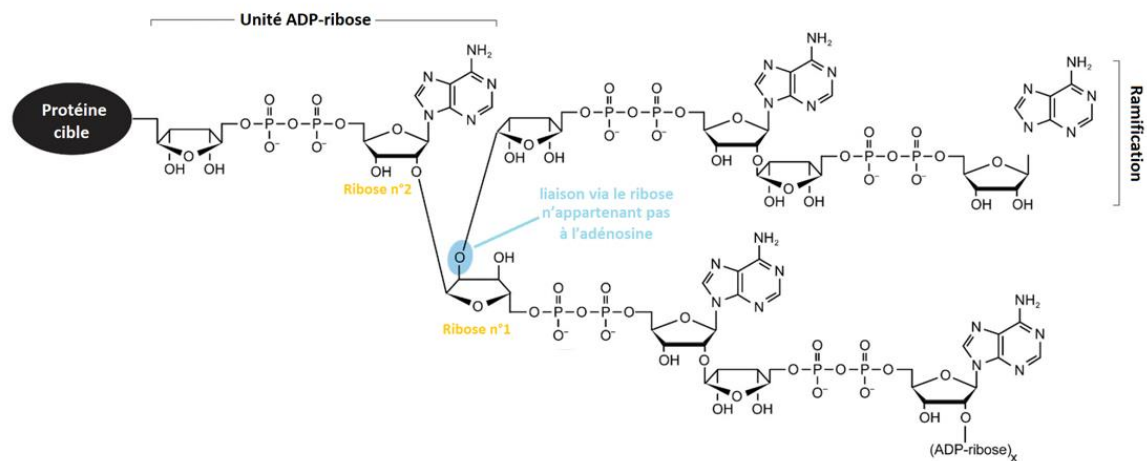
Mono ADP-ribosylation



Poly ADP-ribosylation (chaîne linéaire)



Poly ADP-ribosylation (chaîne ramifiée)



D'après Leung et al., 2014

Figure 16: ADP-ribosylation de PCNA

Représentation schématique de la formation de chaînes d'ADP-riboses sur une protéine cible appelée ADP-ribosylation. La protéine cible peut être modifiée par l'ajout d'une seule unité d'ADP-ribose: Mono ADP-ribosylation. La poly ADP-ribosylation consiste en l'ajout de plusieurs unités d'ADP-riboses sur la protéine cible. La formation d'une chaîne linéaire entre les unités ADP-riboses implique le ribose de l'adénosine (ribose n°2). Des ramifications peuvent avoir lieu impliquant ainsi le ribose n'appartenant pas à l'adénosine (ribose n°1).

Il a été démontré que la protéine PCNA pourrait être potentiellement PARylée. Ces résultats sont issus d'analyses par « Boronate pulldown » de lysats protéiques d'HEK 293T (Human embryonic kidney 293T) (Zhang et al., 2013). Les trois résidus suivants : acide aspartique 120 (D120), acide aspartique 122 (D122) et acide glutamique 124 (E124) pourraient être des sites candidats pour une mono ou poly ADP-ribosylation. Bien que le rôle de la PARylation de PCNA ne soit pas encore connu, il est suggéré que la PARylation éventuelle de ces résidus pourrait causer l'inhibition de certaines

interactions entre PCNA et ses ligands (par exemple PCNA-FEN1) (Zhang et al., 2013). Cette inhibition serait alors provoquée par la modification de la conformation structurelle de la protéine PCNA.

C) PCNA, un gène de ménage ou une cible thérapeutique potentielle ?

La protéine PCNA est étudiée comme une molécule marqueur de la prolifération cellulaire. En effet, PCNA est un acteur essentiel impliqué dans le mécanisme de réplication de l'ADN et donc par extension dans les processus de prolifération cellulaire. Nous avons décrit dans les chapitres précédents, que PCNA est une protéine plateforme sur laquelle de multiples protéines sont recrutées. Cette capacité de recrutement hors norme, permet à PCNA de coordonner de nombreuses fonctions cellulaires essentielles. PCNA est également étudiée comme une cible potentielle dans le cadre d'interventions thérapeutiques pour diverses maladies et notamment le cancer.

La protéine PCNA a tout d'abord été utilisée comme marqueur tumoral, mais il ne semble pas exister une corrélation entre le niveau d'expression de PCNA dans les tissus tumoraux et le pronostic des patients (Visakorpi et al., 1992; Kordek et al., 1996; Dworakowska et al., 2002). Ces résultats sont expliqués par l'existence de deux types de populations de PCNA avec deux statuts fonctionnels différents (Bravo et al., 1987). Seule, la population dite « active » est associée à la chromatine et engagée dans des mécanismes cellulaires comme la réplication de l'ADN. Les outils de diagnostics ne font pas la différence entre les deux types de population de PCNA. Or il serait intéressant d'identifier la population de PCNA impliquée dans la réplication de l'ADN afin de pouvoir marquer les cellules tumorales présentant une forte activité de réplication.

La protéine PCNA est d'avantage étudiée comme une cible thérapeutique anti-cancéreuse (Figure 17). Cependant l'inhibition des activités de PCNA suscite des inquiétudes quant aux impacts négatifs potentiels sur la physiologie des cellules saines. L'inhibition spécifique des modifications post-traductionnelles de PCNA a été proposée comme une alternative à ce problème. En effet, nous avons vu précédemment (voir section Introduction B) que les modifications post-traductionnelles de PCNA

régulent certaines de ses fonctions. La population de PCNA modifiée représenterait alors les protéines dites « actives » fixées sur la chromatine. Il a été notamment démontré que la phosphorylation de PCNA sur la Y211 permet de stabiliser le complexe PCNA-chromatine (Wang et al., 2006). Cette modification post-traductionnelle de PCNA représente un exemple d'une cible thérapeutique dans le traitement du cancer. Il existe d'ores et déjà des peptides bloquants et des petites molécules chimiques qui ciblent directement ou indirectement la protéine PCNA. Le développement de nouveaux agents peptidiques ou chimiques capables d'inhiber des modifications post-traductionnelles de PCNA représente alors une piste thérapeutique intéressante dans la lutte contre le cancer.

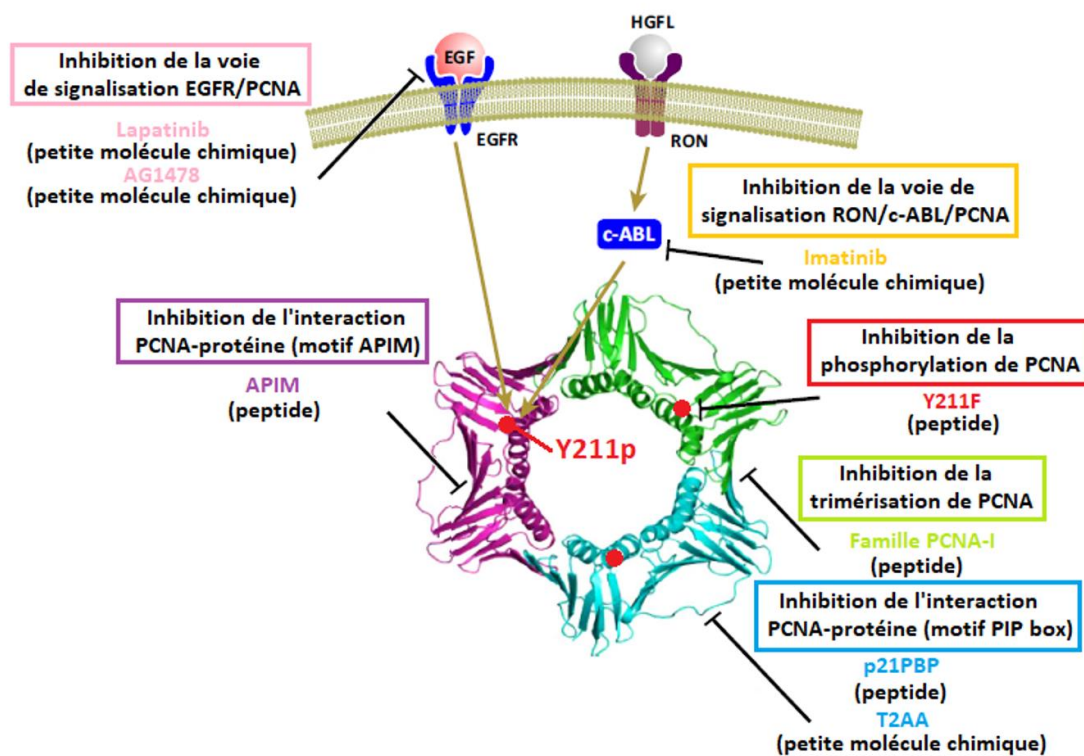


Figure 17: Schéma récapitulatif des principaux agents ciblant la protéine PCNA

Représentation des sites d'actions des agents ciblant la protéine PCNA: Les molécules chimiques Lapatinib et AG1478 sont des inhibiteurs de la tyrosine kinase de PCNA (récepteur EGFR). Ces deux molécules inhibent la voie de signalisation EGFR/PCNA. La molécule Imatinib inhibe l'activité de la tyrosine kinase c-ABL responsable de la phosphorylation de PCNA. Cette molécule inhibe la voie de signalisation RON/c-ABL/PCNA. Le peptide Y211F inhibe la phosphorylation de PCNA via une compétition structurale pour le récepteur EGFR. La famille des protéines PCNA-I inhibe la trimérisation de PCNA en se fixant sur la surface d'interaction entre les monomères du facteur de processivité. Le peptide p21PBP et la molécule chimique T2AA inhibent des interactions PCNA-protéines en bloquant le site de reconnaissance des motifs PIP box. Enfin le peptide APIM inhibe des interactions PCNA-protéines en bloquant le site de reconnaissance des motifs APIM.

1) Ciblage de PCNA via des peptides

Plusieurs types de peptides différents ciblant la protéine PCNA ont été découverts: Le peptide p21PBP (p21 PCNA-binding peptide) (Warbrick et al., 1995) d'une vingtaine d'acides aminés est dérivé du motif PIP box situé sur l'extrémité C-terminale de la protéine p21. La protéine p21 est une protéine inhibitrice des kinases cycline-dépendantes et possède une forte affinité avec la protéine PCNA (voir section Introduction A.3.b). Des analyses structurales ont démontré que la séquence PIP box du peptide interagit avec l'IDCL de PCNA (Gulbis et al., 1996). La fixation de ce peptide à la protéine PCNA provoque l'inhibition de la réplication de l'ADN et du mécanisme NER (Warbrick et al., 1995; Pan et al., 1995).

Un autre peptide a été développé pour inhiber la phosphorylation de la Y211 de PCNA afin de perturber la croissance cellulaire. En effet, la phosphorylation de PCNA sur la Y211 permet de stabiliser le complexe PCNA-chromatine qui est essentiel pour la réplication de l'ADN (Wang et al., 2006) (voir section Introduction B.3). Le peptide synthétique Y211F contient une séquence de 12 acides aminés dérivée de la région proximale du résidu Y211 de PCNA. L'unique différence entre la séquence du peptide synthétique et celle de PCNA réside dans le remplacement du résidu Y211 de la protéine par une phénylalanine (Y211F). Ce peptide Y211F contient également à son extrémité N-terminale, une séquence d'une dizaine d'acides aminés dérivée de la protéine TAT du VIH (virus de l'immunodéficience humaine). Cet ajout de séquence classe ce peptide en tant que « CPP » (cell-penetrating peptide) et permet de faciliter son passage à travers la membrane cellulaire (Green et al., 1989; Vivès et al., 1997). Ce peptide synthétique entre en compétition structurale avec PCNA pour le site actif de la kinase EGFR et permet ainsi une inhibition de la phosphorylation du facteur de processivité. Le peptide Y211F est une piste thérapeutique encourageante pour certains types de cancers (voir section Introduction B.3). Son utilisation *in vitro* permet une diminution du taux de croissance des cellules tumorales issues des cancers du sein « triple négatif ». Ce peptide représente une alternative thérapeutique pour les cancers du sein qui ne répondent pas aux agents thérapeutiques « classiques » comme les inhibiteurs d'ErbB2 et les anti-estrogènes (Yu et al., 2013). De même, ce peptide Y211F représente également une alternative thérapeutique pour les cancers de la prostate insensibles aux traitements hormonaux (Zhao et al., 2011).

Le peptide APIM (AlkB homolog 2 PCNA-interacting motif) permet de bloquer un site de reconnaissance de PCNA pour des protéines qui possèdent un motif APIM et qui sont impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN (Gilljam et al., 2009). Cependant en pratique, l'utilisation de ce peptide APIM ne provoque qu'une faible inhibition de la croissance cellulaire au sein de lignées cellulaires spécifiques (Gilljam et al., 2009; Müller et al., 2013). La plupart des protéines contenant le motif APIM sont impliquées dans la réparation et la réponse aux dommages à l'ADN, il est donc cohérent que l'utilisation du peptide bloquant n'affecte que très peu la prolifération cellulaire. En revanche l'utilisation couplée de ce peptide avec des agents génotoxiques inhibe significativement la croissance cellulaire de certaines populations tumorales (Gilljam et al., 2009; Müller et al., 2013) (Figure 17).

2) Ciblage de PCNA via de petites molécules chimiques

Les peptides ne sont pas les seules molécules utilisées pour cibler la protéine PCNA. Des criblages à haut débit ont permis d'identifier de petites molécules chimiques capables de bloquer l'association entre PCNA et les motifs « PIP box » de certains de ses partenaires protéiques ainsi que d'inhiber certaines voies de signalisation impliquant le facteur de processivité.

Parmi ces petites molécules chimiques, on retrouve la molécule T2AA (T2 amino alcohol) (Punchihewa et al., 2012). Cette dernière est dérivée de la molécule T3, une hormone thyroïdienne appelée triiodothyronine. La molécule T2AA permet la dissociation des interactions de type PCNA-PIP box *in vitro* et empêche l'interaction entre l'ADN polymérase δ et PCNA *in cellulo*. La molécule T2AA inhibe la synthèse d'ADN et induit du stress répliatif via le blocage des fourches de répliation (Punchihewa et al., 2012). Cette molécule inhibe également le mécanisme de la TLS sensibilisant ainsi les cellules cancéreuses aux agents génotoxiques (Actis et al., 2013).

La plupart des molécules étudiées pour cibler directement la protéine PCNA, se fixent sur la surface d'interaction avec les motifs PIP box. Cependant, d'autres inhibiteurs ont été découverts, comme les inhibiteurs de la trimérisation regroupés au sein d'une famille appelée PCNA-I (PCNA inhibitors) qui se fixent au niveau de la surface d'interaction entre les monomères de PCNA (Tan et al., 2012). Le traitement de cellules par ces inhibiteurs provoque une diminution du taux de PCNA fixée sur la chromatine, une inhibition de la répliation de l'ADN ainsi qu'un arrêt dans le cycle cellulaire en phase S et en interphase G2/M (Tan et al., 2012).

Jusqu'à présent nous n'avons référencé que des molécules ciblant directement la protéine PCNA. Il existe aussi des inhibiteurs des activités de PCNA n'interagissant pas directement avec cette dernière. Ces molécules interagissent en amont, au niveau de voies de signalisation de PCNA: l'AG1478 ainsi que le lapatinib (utilisé en clinique), des inhibiteurs spécifiques du récepteur EGFR, diminuent le taux de PCNA phosphorylée (Wang et al., 2002; Zhao et al., 2014). Le récepteur ne peut pas être transloqué au noyau empêchant ainsi son activité tyrosine kinase sur la protéine PCNA. Ces deux molécules empêchent ainsi la phosphorylation de PCNA en inhibant la voie de signalisation d'EGFR.

Il a été démontré qu'une deuxième voie de signalisation était impliquée dans la phosphorylation de PCNA. Cette voie de signalisation appelée Ron/c-ABL/PCNA nécessite l'activation du récepteur tyrosine kinase RON (Recepteur d'origine nantais) via son ligand HGFL (hepatocyte growth factor-like protein). L'activation de ce récepteur entraîne l'activation de différentes voies de signalisation (PI3K, MAPK, SRC, β -catenin) et notamment la voie impliquant la protéine tyrosine kinase c-ABL. Cette tyrosine kinase permet alors la phosphorylation de la Y211 de PCNA (Zhao et al., 2013). L'Imatinib est une molécule inhibitrice de la protéine kinase c-ABL. L'imatinib permet ainsi de bloquer la phosphorylation de PCNA en perturbant la voie de signalisation Ron/c-ABL/PCNA (Zhao et al., 2014) (Figure 17).

D) Développement d'un outil génétique permettant la caractérisation des sites de modifications post-traductionnelles de PCNA

La protéine PCNA possède de nombreux résidus ciblés par des modifications post-traductionnelles (exemple: ubiquitination de la K164, phosphorylation de la Y211). Nous avons vu précédemment que certaines de ces modifications post-traductionnelles sont impliquées dans la régulation de l'activité de PCNA sur la chromatine (voir section Introduction B). Certains de ces sites modifiés chimiquement représentent de potentielles cibles thérapeutiques notamment dans le domaine de la lutte contre le cancer (exemple: l'inhibition de la phosphorylation de la Y211) (voir section Introduction C). Des analyses en spectrométrie de masse de la protéine PCNA ont révélé de nombreux autres résidus modifiés dont les rôles restent encore à définir

(<https://www.phosphosite.org>). Ces résidus modifiés pourraient aussi présenter de potentielles cibles thérapeutiques.

Au sein de notre laboratoire, nous avons développé un outil génétique conçu pour nous aider à définir l'implication de ces résidus modifiés dans la régulation des activités de PCNA. Cet outil génétique est le fruit d'une combinaison de deux outils biologiques. Le premier est le système CRISPR-Cas 9 (Wang et al., 2016) (voir section Introduction D.1) utilisé afin d'inactiver le gène endogène de PCNA. Le deuxième est un mécanisme de complémentation fonctionnelle plasmidique qui nous permet d'exprimer n'importe quelles protéines PCNA mutées au sein de cellules en cultures (voir section Introduction D.2). L'utilisation en parallèle de ces deux systèmes nous permet de créer un modèle cellulaire qui exprime une protéine PCNA muté pour un site d'intérêt et dont le gène PCNA endogène est inactivée (voir section Résultats A.3).

1) Le système CRISPR-Cas 9

Le système CRISPR-Cas (CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Cas: CRISPR-associated protein) est un mécanisme immunitaire adaptatif présent dans de nombreuses souches de bactéries et d'archées (Makarova et al., 2013). Deux classes de systèmes CRISPR-Cas existent (classe 1 et 2), elles-mêmes divisées en plusieurs types (classe 1: types I, III et IV; classe 2: II, V et VI). Les deux classes se différencient par leur méthode de clivage. La classe 1 met en jeu un complexe de plusieurs protéines Cas tandis que la classe 2 utilise une seule endonucléase Cas (Koonin et al., 2017).

Nous nous intéressons au système CRISPR-Cas 9 qui est un système CRISPR de type II (Deltcheva et al., 2011). Ce système permet aux bactéries de se défendre face aux infections de bactériophages (Figure 18). Lors de l'infection, les bactéries possédant le système CRISPR-Cas 9 vont intégrer au sein de leurs propres génomes des fragments d'ADN provenant du génome du bactériophage. Ces fragments d'ADN sont appelés « protospacers ». Les nucléases Cas 1 et Cas 2 vont permettre l'excision des « protospacers » ainsi que leur intégration au niveau du génome de la bactérie (Heler et al., 2015). Cette intégration se réalise au niveau d'une séquence d'ADN appelée CRISPR. Cette séquence CRISPR contient des motifs courts (28 à 37 paires de bases) régulièrement répétés et espacés de séquences appelées « spacers ». Ce sont les séquences « spacers » qui accueillent les fragments d'ADN issus du génome du bactériophage « protospacers » (Barrangou et al., 2014). La séquence CRISPR est

transcrite en ARN non mature appelé « pre-crRNA » (crRNA: CRISPR RNA). Sous l'action de protéines Cas, l'ARN précurseur est épissé en une forme mature « crRNA » (Deltcheva et al., 2011). Un deuxième type d'ARN appelé « tracrRNA » (trans-activating crRNA) transcrit à partir du génome de la bactérie va s'hybrider au niveau d'un motif répété du « crRNA ». Le complexe d'ARN crRNA-tracrRNA est reconnu par l'endonucléase Cas 9. En effet, le « tracrRNA » interagit avec la protéine Cas 9 (Jinek et al., 2012; Deltcheva et al., 2011). Le complexe protéine-ARN (Cas 9-crRNA-tracrRNA) ainsi formé est alors opérationnel. La dernière étape consiste à la reconnaissance et au clivage de la séquence cible au sein du génome du bactériophage. Cette reconnaissance est permise par le « crRNA » et plus particulièrement la séquence ARN correspondant au « protospacer ». On parle alors de guidage de la protéine Cas 9 par le complexe ARN crRNA-tracrRNA. La protéine Cas 9 possède deux domaines correspondant à des nucléases. Le domaine HNH permet de cliver le brin d'ADN contenant la séquence cible tandis que le domaine RuvC permet de cliver le deuxième brin d'ADN (Jinek et al., 2012; Gasiunas et al., 2012). Ainsi l'activité de la Cas 9 provoque l'apparition d'une cassure double brin de l'ADN au sein du génome du bactériophage. La reconnaissance de différentes séquences cibles via le système CRISPR-Cas 9 permet alors de fragmenter le génome des bactériophages et de protéger ainsi la bactérie de l'infection (Mojica et al., 2009; Deveau et al., 2008; Shah et al., 2013).

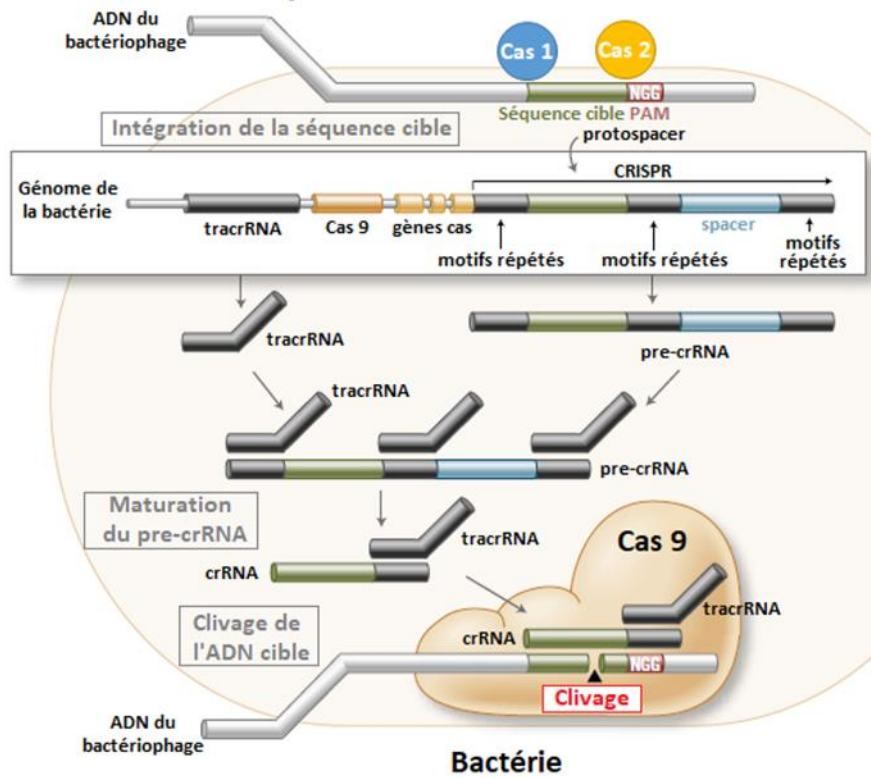
Il est à noter que le clivage est réalisé uniquement en présence d'une séquence PAM (Protospacer-adjacent motif) adjacente à la séquence d'ADN cible. La séquence PAM est constituée de 3 nucléotides (NGG). Le site de clivage se situe alors à 3 nucléotides en amont de la séquence PAM au sein de la séquence d'ADN cible. Le génome de la bactérie est dépourvu de séquences PAM permettant ainsi d'éviter un clivage accidentel par le système CRISPR-Cas 9 (Hsu et al., 2014).

Le système CRISPR-Cas 9 est un mécanisme qui a permis de développer un outil flexible d'édition du génome qui est simplifié et dérivé du système retrouvé chez la bactérie. Cet outil utilise la protéine Cas 9 ainsi qu'un ARN hybride issu de la fusion du « crRNA » et « tracrRNA ». Cet ARN hybride est appelé ARN guide (ARNg) (Jinek et al., 2012). La séquence ARN correspondant au « protospacer » peut être modifiée à souhait permettant ainsi de cibler n'importe quelle séquence du génome à condition qu'une séquence PAM y soit adjacente. La possibilité de cliver n'importe quelle séquence d'ADN a ouvert de larges possibilités concernant l'édition du génome. Le

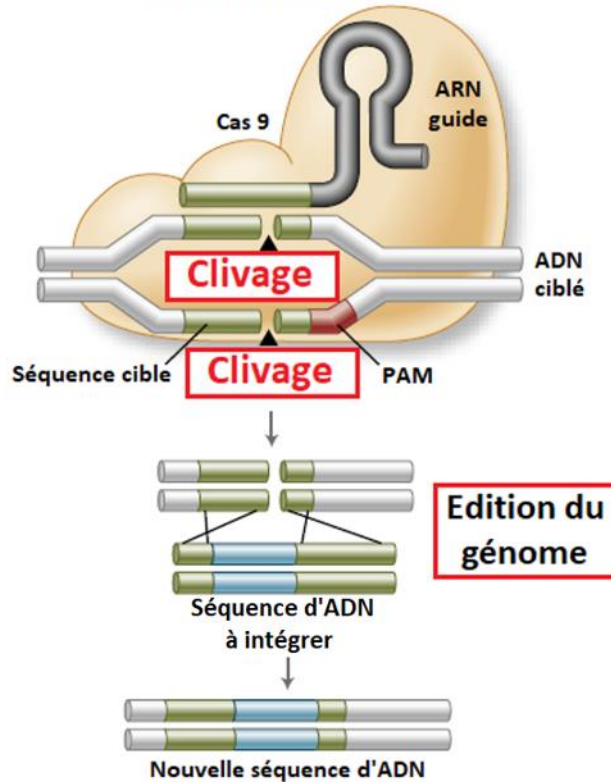
système CRISPR-Cas 9 s'apparente aux systèmes déjà développés de type « TALEN » (transcription activator-like effector nucleases) (Boch et al., 2009) ou encore « ZFN » (zinc-finger nucleases) (Miller et al., 1985).

Des modifications des domaines nucléases de la Cas 9 ont permis de créer des dérivés de l'endonucléase. L'inactivation par mutation d'un des deux domaines de la Cas 9 a permis de créer la nickase. Cette dernière possède la capacité de ne cliver qu'un seul brin de l'ADN (Mali et al., 2013). L'association de deux nickases permet ainsi d'exciser un fragment d'ADN de façon similaire aux systèmes de type « TALEN » (Mali et al., 2013). L'inactivation par mutation des deux domaines de la Cas 9 ont permis la création de la dead Cas 9. Cette forme de l'endonucléase est inactive mais ne perd pas sa capacité d'interaction avec l'ARNg. La dead Cas 9 peut être fusionnée à des protéines effectrices qui peuvent ainsi être dirigées vers des séquences d'ADN spécifiques sans pour autant induire le clivage de ces dernières. La forme non activée est notamment utilisée dans le domaine de la régulation épigénétique (Hilton et al., 2015).

Système CRISPR-Cas 9 natif



Outil CRISPR-Cas 9



D'après Reis, (New England Biolabs)

CRISPR/Cas9 & Targeted Genome Editing: New Era in Molecular Biology

Figure 18: Schéma comparatif entre le système CRISPR-Cas 9 natif retrouvé chez la bactérie et l'outil CRISPR-Cas 9 utilisé dans l'édition du génome

Le système CRISPR-Cas 9 natif: Lors de l'infection d'une bactérie par un bactériophage, des fragments d'ADN du génome viral sont clivés par le couple d'endonucléases Cas 1 et Cas 2. Ces séquences d'ADN appelées « protospacers » vont s'intégrer au niveau de séquences CRISPR contenues dans le génome de la bactérie. La transcription d'une séquence CRISPR entraîne la synthèse d'un ARN non mature, le « pre-crRNA ». Sa forme mature est appelée « crRNA ». Le « crRNA » s'hybride avec un deuxième type d'ARN « tracrRNA » transcrit à partir du génome bactérien formant ainsi un complexe ARN (crRNA-tracrRNA). La protéine Cas 9 s'associe alors avec ce complexe ARN grâce à son interaction avec le « tracrRNA ». Le crRNA permet de diriger l'endonucléase Cas 9 au niveau de la séquence cible du génome du bactériophage. La Cas 9 clive alors l'ADN du bactériophage uniquement en présence d'une séquence PAM (NGG) adjacente à la séquence cible. Le clivage correspond à une coupure double-brins de l'ADN. Le mode d'action de l'outil CRISPR-Cas 9 dérivé est similaire au système natif. L'unique différence consiste au remplacement du complexe ARN (crRNA-tracrRNA) par un seul ARN hybride issu de la fusion des deux types d'ARN.

2) Système de complémentation fonctionnelle *in cellulo*

Le système de complémentation fonctionnelle permet de compenser la perte de l'activité d'une protéine au sein de cellules en culture. Le système de complémentation fonctionnelle plasmidique est surtout connu pour son utilisation dans le domaine de la génétique de la levure (Nasmyth et al., 1980). Ce système a été utilisé notamment afin d'isoler des gènes inconnus exprimant des protéines étudiées chez la levure (Figure 19). Lorsque l'on dispose d'une souche de levure mutante qui n'exprime pas une protéine d'intérêt, il est possible de retrouver le gène qui lui est associé. Il faut pour cela fabriquer une banque de plasmides appelés « plasmides de complémentation » comportant des fragments du génome d'une souche de levure qui elle, exprime cette protéine. La souche mutante est alors transformée avec la banque de plasmides de complémentation. La souche mutante se différencie de la souche sauvage par un caractère observable comme une thermo-sensibilité. L'isolement d'un transformant qui présente une réversion de son caractère de thermo-sensibilité permet d'isoler le plasmide contenant le gène inconnu. On appelle ce principe: la complémentation fonctionnelle plasmidique.

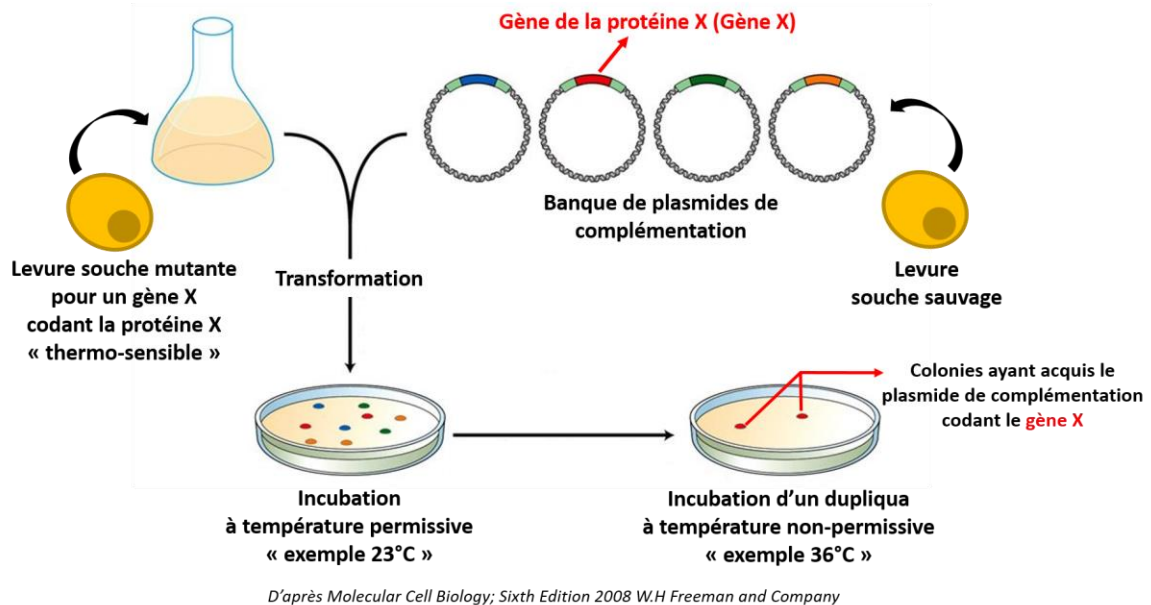


Figure 19: Schéma du principe de complémentation fonctionnelle plasmidique chez la levure

Le système de complémentation fonctionnelle plasmidique de la levure permet d'identifier le gène inconnu (gène X) d'une protéine d'intérêt (protéine X). Une banque de plasmides de complémentation comportant des fragments du génome d'une souche de levure sauvage est créée. Une souche de levure mutante pour le gène X et thermo-sensible est transformée à l'aide de la banque de plasmides de complémentation et les transformants sont cultivés sur boîtes de Pétri à température permissive. Un duplicata de la boîte de Pétri est placé en condition de température non-permissive. L'isolement d'un transformant qui présente une réversion de son caractère de thermo-sensibilité permet d'isoler le plasmide contenant le gène inconnu X.

Dans notre cas, nous nous sommes inspirés de ce principe afin de créer des plasmides de complémentation capables d'exprimer des protéines PCNA mutées au sein de cellules en cultures (voir Section Résultats A.2).

E) Rôle de PCNA dans la voie de dégradation ubiquitine dépendante CRL4^{Cdt2}

L'utilisation de notre outil génétique (voir section Introduction D.3) nous a permis de remplacer *in cellulo* la protéine PCNA endogène par des formes mutantes de cette même protéine. Nous avons ainsi pu déterminer si les mutants de PCNA étaient viables ou non. En effet, PCNA étant une protéine essentielle, si la mutation d'un résidu altère une de ses fonctions critiques, la complémentation échoue et cause la mort des cellules. Parmi les mutants de PCNA étudiés, certains ont provoqué une mort cellulaire (voir section Résultats B.1). L'étude approfondie du mécanisme impliqué dans la mort des cellules nous a amené à étudier la voie de dégradation ubiquitine dépendante impliquant l'ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}.

1) Le système ubiquitine-protéasome

La régulation de la dégradation des protéines fait partie intégrante de la physiologie des cellules eucaryotes. De nombreux événements cellulaires tels que le déroulement du cycle cellulaire, le maintien de l'intégrité du génome ou encore la signalisation cellulaire nécessitent une régulation de la concentration des protéines impliquées. Une protéolyse permet de réguler la concentration de ces protéines. Il existe 2 systèmes de protéolyse: le système ubiquitine-protéasome dans lequel la conjugaison de molécules d'ubiquitine (poly-ubiquitination) à des substrats provoque leur dégradation par le protéasome (Ciechanover et al., 2015) et le système de dégradation lysosomale (autophagie) par lequel des composants cytoplasmiques (protéines et organites) sont dégradés par le lysosome (Cha-molstad et al., 2015). Dans cette partie, nous nous focaliserons sur le système ubiquitine-protéasome (Figure 20). Afin de mettre en place ce système de dégradation, il est nécessaire pour le protéasome d'identifier correctement les protéines à cibler. L'identification de ces protéines est permise par une modification post-traductionnelle à savoir la poly-ubiquitination (voir section Introduction B.1.a) qui consiste dans la synthèse d'une chaîne de molécules d'ubiquitines dont les liaisons impliquent la lysine 48 ou plus rarement la lysine 11 et le groupement carboxylate C-terminal de l'ubiquitine (Hershko et al., 1998). L'ajout d'une molécule d'ubiquitine nécessite une cascade enzymatique en trois étapes (voir section Introduction B.1.a). La première étape consiste en l'activation de l'ubiquitine par E1 (enzyme d'activation de l'ubiquitine) selon un processus ATP dépendant (Schulman et al., 2009). S'en suit la deuxième étape avec le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E1 vers l'enzyme E2 (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine) (Ye et al., 2009). La liaison entre l'ubiquitine et les enzymes E1 et E2, implique la formation d'esters de thiol entre les cystéines des enzymes E1 et E2 et le carboxylate situé à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. La troisième étape implique la formation d'un complexe comportant les enzymes E2 (chargée avec l'ubiquitine), E3 (enzyme ubiquitine ligase) et le substrat. Une fois le complexe formé, l'ubiquitine est transférée de l'enzyme E2 vers une lysine du substrat sous l'action de l'enzyme E3 (Deshaies et al., 2009; Rotin et al., 2009; Komander et al., 2012). Cette cascade enzymatique en 3 étapes est répétée de façon identique à ceci près que la dernière étape consiste dorénavant à l'ajout d'une molécule d'ubiquitine non pas sur une lysine du substrat mais sur la lysine 48 de l'ubiquitine précédente (4^{ème} étape). Une chaîne d'ubiquitines est alors synthétisée

(Hershko et al., 1998). Le protéasome 26S reconnaît cette chaîne d'ubiquitines comme un signal de dégradation (5^{ème} étape). Le protéasome déplie le substrat selon un processus ATP-dépendant et élimine la chaîne d'ubiquitine par l'action d'une enzyme ubiquitine hydrolase associée à ce dernier. La protéine « dépliée » est alors dégradée par le protéasome (6^{ème} étape) (Pickart et al., 2001).

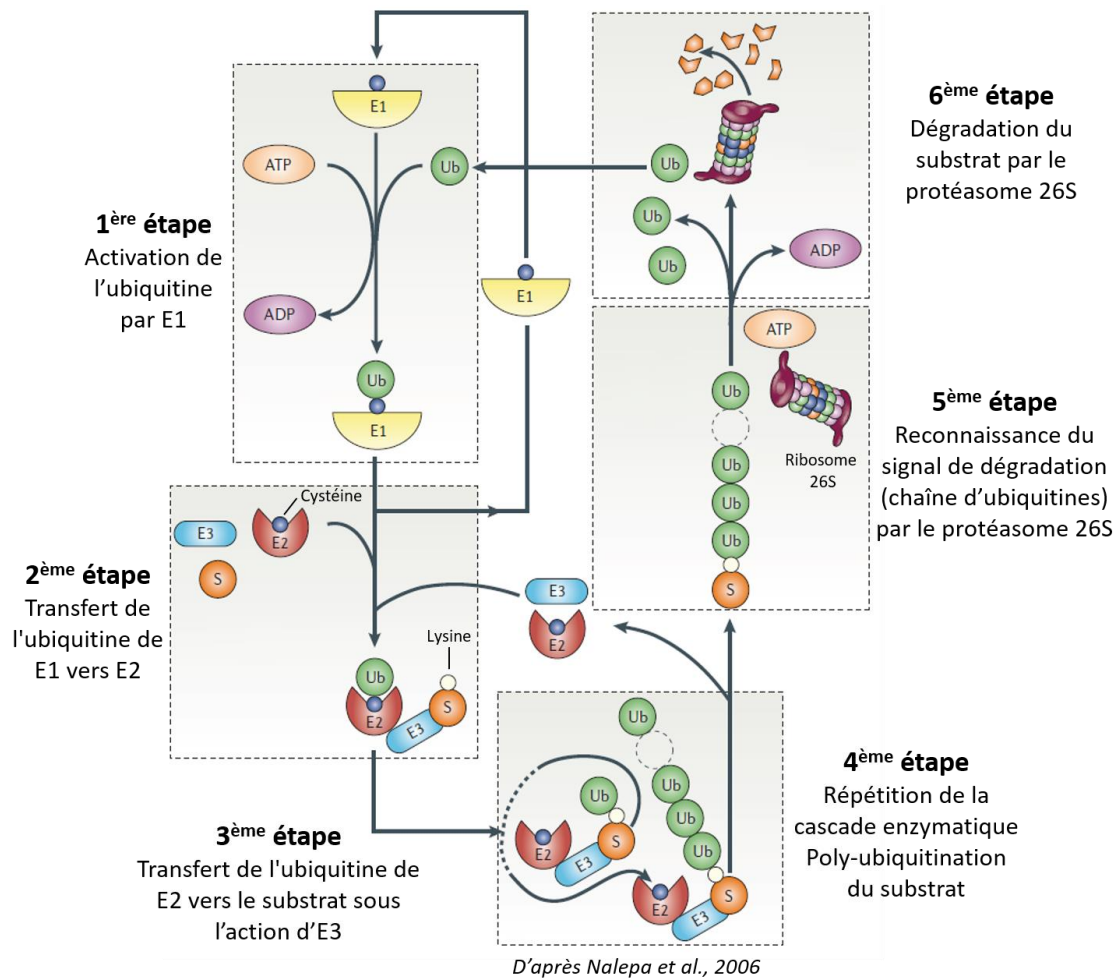


Figure 20: Schéma récapitulatif du système de dégradation ubiquitine-protéasome

Le système de dégradation ubiquitine-protéasome est un processus en plusieurs étapes qui a pour but la dégradation de protéines marquées à l'aide d'une poly-ubiquitination. La 1^{ère} étape consiste en l'activation de l'ubiquitine (Ub) par l'enzyme d'activation E1 selon un processus ATP-dépendant. Lors de la 2^{ème} étape, l'ubiquitine est transférée de E1 vers l'enzyme de conjugaison E2. L'enzyme E2 est à présent chargée avec une molécule d'ubiquitine (E2-Ub). La 3^{ème} étape implique la formation d'un complexe Substrat-E3-(E2-Ub) permettant le transfert de l'ubiquitine de E2 vers le substrat sous l'action de l'enzyme ubiquitine ligase E3. Cette cascade enzymatique se répète permettant la synthèse d'une chaîne d'ubiquitine (Poly-ubiquitination) sur le substrat (4^{ème} étape). La 5^{ème} étape consiste en la reconnaissance du signal de dégradation (chaîne d'ubiquitine) par le protéasome 26S. Enfin en dernière étape le protéasome dégrade la protéine ciblée par le signal de poly-ubiquitination.

2) Reconnaissance du substrat de l'ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} via un degron composite

Il existe de nombreuses voies de dégradation ubiquitine-protéasome différentes. L'ensemble de ces voies cible divers types de protéines et implique toutes des enzymes différentes. Cependant il est à noter que le schéma de déroulement de la cascade enzymatique reste conservé et comparable entre ces voies de dégradation. La différence de spécificité de ces voies de dégradation est directement reliée à l'existence d'une grande variété d'enzymes de la classe E2 et E3 (Ravid et al., 2008; Jin et al., 2008).

En règle générale, l'interaction entre E3 et son substrat implique qu'une sous-unité de l'enzyme se fixe au niveau d'un motif de 6 à 8 acides aminés de la protéine ciblée appelé « degron ». Il existe deux types de famille d'ubiquitine E3 ligases caractérisés soit par la présence d'un domaine RING soit d'un domaine HECT (Ardley et al., 2005; Deshaies et al., 2009). Les E3 ligases possédant le domaine RING permettent le transfert direct de la molécule d'ubiquitine chargée sur l'enzyme E2 vers le substrat. En revanche les E3 ligases possédant le domaine HECT fixent en premier lieu la molécule d'ubiquitine puis la transfèrent sur le substrat. L'enzyme ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} est un complexe protéique possédant un domaine RING. Ce complexe comporte 3 sous-unités à savoir Cul4, Ddb1 et Cdt2 (Havens et al., 2011). L'extrémité N-terminale de Cul4 interagit avec la protéine « adaptateur » Ddb1. La sous-unité Cdt2 représente le « récepteur du substrat » et se fixerait à la sous-unité Ddb1. La structure de Cdt2 n'étant pas encore résolue à ce jour, la structure de CRL4^{Cdt2} reste encore hypothétique. L'extrémité C-terminale de la sous-unité Cul4 interagit avec la protéine Rbx1. Cette dernière joue le rôle d'intermédiaire entre l'ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} et l'enzyme E2 chargée avec l'ubiquitine.

L'ubiquitine Ligase CRL4^{Cdt2} présente une particularité qui concerne son mode d'interaction avec le substrat (Figure 21). La plupart des interactions E3-substrat dites « classiques », se réalisent grâce à la reconnaissance du motif « degron » du substrat par une ubiquitine E3 ligase. Par exemple, l'enzyme ubiquitine ligase CRL1^{Skp2} qui interagit avec le degron du substrat p27: CRL1^{Skp2} permet l'entrée du cycle cellulaire en phase S grâce à la dégradation de la protéine inhibitrice de CDK (kinases cycline-dépendantes) p27 (Carrano et al., 1999). En revanche l'interaction entre CRL4^{Cdt2} et son substrat Cdt1 présente une particularité. L'interaction implique un 3^{ème} facteur, à savoir la protéine PCNA. L'interaction entre CRL4^{Cdt2} et Cdt1 se base toujours sur la

reconnaissance d'un degron par l'ubiquitine ligase. Cependant CRL4^{Cdt2} reconnaît uniquement le substrat Cdt1 si ce dernier est fixé à la protéine PCNA, elle-même chargée sur l'ADN (Havens et al., 2012). CRL4^{Cdt2} reconnaît alors un degron dit « composite » représentant une structure protéique mixte associant à la fois des résidus du substrat Cdt1 mais également des résidus de la protéine PCNA.

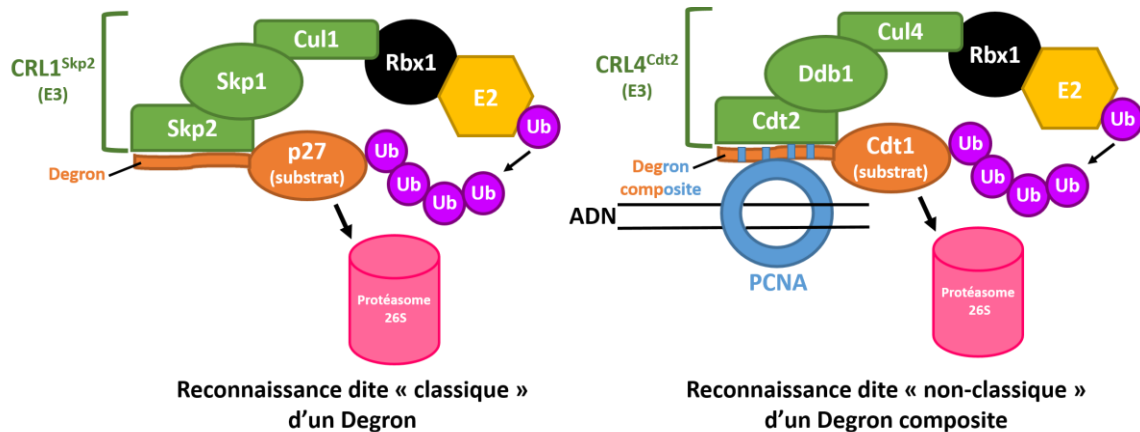


Figure 21: Schéma comparatif des interactions entre les enzymes CRL1^{Skp2}, CRL4^{Cdt2} et leurs substrats respectifs

L'une des étapes du système de dégradation ubiquitine-protéasome consiste en la formation d'un complexe protéique constitué des enzymes E3, E2 chargée avec une molécule d'ubiquitine (Ub) et du substrat. L'ubiquitine ligase E3 interagit à la fois avec l'enzyme E2 chargée avec l'ubiquitine ainsi qu'avec un motif appelé degron présenté par le substrat. L'ubiquitine ligase CRL1^{Skp2} permet une reconnaissance dite « classique » du motif degron présenté par le substrat p27. En revanche, l'ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} ne reconnaît pas un motif degron classique. Le motif reconnu est un degron composite. La sous-unité Cdt2 (récepteur du substrat) reconnaît une structure protéique mixte associant à la fois des résidus du substrat Cdt1 mais également des résidus de la protéine PCNA. Ainsi la reconnaissance du substrat par l'ubiquitine ligase met en jeu un 3^{ème} facteur à savoir la protéine PCNA, elle-même chargée sur l'ADN.

3) L'ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} empêche le phénomène de re-réplication

Il est nécessaire pour la cellule de réguler les concentrations des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN ou sa régulation et ce durant la phase S ou lors d'évènements de réparation de dommages à l'ADN nécessitant la machinerie répliative. Une mauvaise régulation de ces protéines peut provoquer un phénomène dit de « re-réplication ». Ce phénomène est le résultat d'une sur-réplication du génome c'est-à-dire lorsque le génome est répliqué plus d'une fois lors du cycle cellulaire. La re-réplication de l'ADN provoque ainsi des instabilités génomiques pouvant mener à la mort cellulaire. La régulation de ces protéines et la prévention du phénomène de re-réplication est permise notamment par le système ubiquitine-protéasome.

Cdt1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1), p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) et Set8 (histone methyl transferase) sont des exemples de protéines qui nécessitent une régulation durant la phase S ou lors d'évènements de réparation de dommages à l'ADN. En effet, la surexpression de ces dernières provoque des évènements de re-réplication de l'ADN (Vaziri et al., 2003; Kim et al., 2008c; Abbas et al., 2010). La protéine Cdt1 est un facteur d'initiation de la réplication de l'ADN essentiel à l'assemblage du complexe de pré-réplication. La protéine p21 est une protéine inhibitrice des CDK connue pour inhiber les complexes CDK2 et CDK4 et permettre ainsi l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin la protéine Set8 est une histone méthyl-transférase permettant la mono-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 nécessaire notamment à la compaction de la chromatine. Chez les vertébrés, l'enzyme E3 ligase CRL4^{Cdt2} permet l'ubiquitination des protéines Cdt1, p21 et Set8 qui sont par la suite prises en charge par le protéasome 26S pour y être dégradées. Il est à noter que CRL4^{Cdt2} reconnaît uniquement ces substrats s'ils interagissent avec la protéine PCNA elle-même chargée sur l'ADN (Havens et al., 2012). Par conséquent, la dégradation des substrats Cdt1, p21 et Set8 prend place uniquement durant la phase S du cycle cellulaire ou lors d'évènements de réparation de dommages à l'ADN. CRL4^{Cdt2} contribue ainsi au blocage d'évènements de « re-réplication » de l'ADN.

L'enzyme CRL4^{Cdt2} cible d'autres substrats, tels que le facteur de transcription E2F chez la *D. melanogaster*, l'ADN polymérase η chez *C. elegans* ou encore Spd1, l'inhibiteur de la ribonucléotide réductase au sein de la levure *S. pombe* (Zielke et al., 2011; Kim et al., 2008b; Liu et al., 2005).

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

PCNA est une protéine pléiotrope possédant de nombreux sites de modifications post-traductionnelles et interagissant avec une multitude de protéines impliquées dans divers mécanismes cellulaires. La plupart des fonctions des résidus modifiés de PCNA restent encore inconnues à ce jour. Le projet de thèse a eu pour but de développer un outil génétique qui nous a assisté dans la caractérisation fonctionnelle de certains de ces sites de modifications post-traductionnelles.

Mon travail de thèse est divisé en 3 axes principaux. Dans un premier temps nous avons développé un outil génétique (voir section Résultats A) nous permettant de substituer *in cellulo* la protéine PCNA endogène à l'aide d'une protéine mutante dite de complémentation. La mise en place de cet outil a nécessité le développement de deux types de plasmides: un plasmide d'inactivation permettant le déploiement du système CRISPR-Cas 9 permettant d'inactiver le gène endogène de PCNA et un plasmide de complémentation permettant l'expression d'une protéine mutante de substitution. Il a été nécessaire de valider cet outil génétique en confirmant la réussite de la complémentation fonctionnelle de la protéine PCNA.

Une fois le système maîtrisé et validé nous avons testé la viabilité de différentes cellules exprimant des formes mutées de PCNA (voir section Résultats B). Les mutations ciblaient un panel de résidus potentiellement sujets à des modifications post-traductionnelles. Nous avons réalisé une étape de criblage où nous avons sélectionné deux mutants de PCNA létaux (D122A et E124A) que nous avons considérés comme intéressants à étudier.

Dans la dernière partie de mon travail de thèse, nous avons cherché à déterminer quelles activités de PCNA étaient altérées par les mutations des deux résidus D122 et E124 (voir section Résultats C et D). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que ces résidus sont essentiels au bon déroulement d'une voie de dégradation ubiquitine-dépendante impliquant l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} nécessaire à la dégradation d'un cocktail de protéines (Cdt1, p21 et Set8) durant la phase S du cycle cellulaire.

Nos résultats préliminaires suggèrent qu'un des deux sites (E124) semble être sujet à PARylation, représentant ainsi, une piste d'étude intéressante concernant une éventuelle régulation de cette voie de dégradation ubiquitine-dépendante à l'aide d'une modification post-traductionnelle de la protéine PCNA.

Résultats

Résultats

A) Développement et validation de notre outil de complémentation fonctionnelle

1) Inactivation du gène PCNA via le système CRISPR-Cas 9

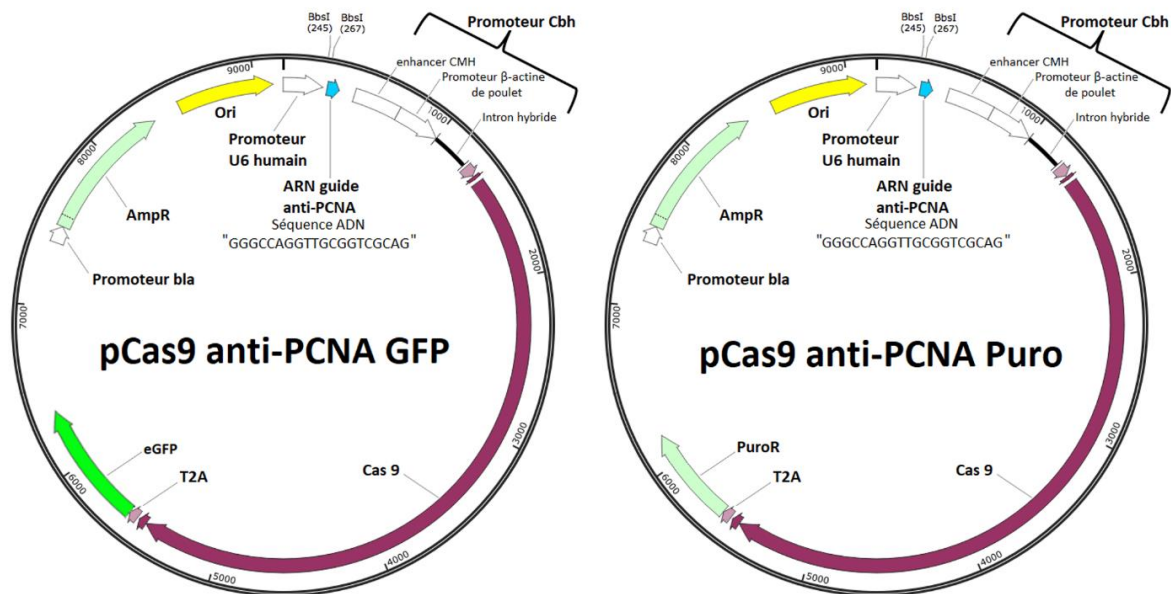
a) Construction des plasmides « pCas9 anti-PCNA GFP » et « pCas9 anti-PCNA Puro »

Le développement de notre outil génétique a nécessité l'utilisation du système CRISPR-Cas 9. L'objectif a été d'inactiver fonctionnellement le gène codant PCNA au sein de cellules en culture. Afin de permettre cette inactivation, il a été nécessaire d'incorporer au sein de cellules en culture, l'ensemble des facteurs nécessaires pour le déploiement du système CRISPR-Cas 9 ainsi qu'un ARN guide ciblant le gène PCNA. Une fois transfectés, les plasmides commerciaux pSpCas9(BB)-2A-GFP et pSpCas9(BB)-2A-Puro (référencés respectivement PX458 et PX459, addgene) permettent d'exprimer l'ensemble de ces facteurs. Nous avons modifié ces deux plasmides afin de créer respectivement les plasmides pCas9 anti-PCNA GFP et pCas9 anti-PCNA Puro. Les deux plasmides dérivés possèdent une séquence d'ADN identique codant le même ARN guide. Ainsi les deux plasmides dérivés présentent la même fonction à savoir l'inactivation spécifique du gène codant PCNA. L'unique différence concerne la méthode de sélection employée lors de la sélection des cellules transfectées.

Les plasmides PX458 et PX459 sont des plasmides d'expression eucaryotiques qui ont pour origine la bactérie *Streptococcus pyogenes*. Ils contiennent une séquence d'ADN codant un ARN guide sous le contrôle du promoteur U6 humain. La séquence d'ADN correspondant à l'ARN guide est délimitée par deux sites de restriction BbsI. Il est ainsi possible d'incorporer n'importe quelle séquence d'ADN par digestion enzymatique avec l'enzyme BbsI. Les deux plasmides contiennent également une séquence permettant l'expression de la protéine Cas 9 sous le contrôle d'un promoteur Cbh, qui est une fusion du promoteur CMV et d'un promoteur β -actine de poulet. Les plasmides PX458 et PX459 ne possèdent pas le même marqueur de sélection. En effet, le plasmide PX458 possède une séquence d'ADN codant la protéine eGFP alors que

PX459 a une séquence d'ADN codant le gène de résistance à la Puromycine (PuroR). L'utilisation de ces marqueurs de sélection permet de trier les cellules ayant incorporé les plasmides PX458 et PX459, à l'aide respectivement d'une sélection par FACS (fluorescence activated cell sorting) ou d'un traitement à la Puromycine. Les deux séquences correspondant aux marqueurs de sélection sont localisées en aval de la séquence codant la protéine Cas 9 et sont fusionnées à cette dernière par une petite séquence T2A. Elles sont ainsi sous le contrôle du même promoteur Cbh. La séquence T2A code un peptide permettant la traduction de deux protéines distinctes à partir d'un seul ARNm (voir section Résultats A.2.a). Enfin les deux plasmides PX458 et PX459 codent également pour le gène de résistance à l'ampicilline, sous le contrôle du promoteur bla, nécessaire lors des étapes de clonage chez la bactérie.

La modification par clonage de ces plasmides PX458 et PX459 nous a permis de construire respectivement les plasmides pCas9 anti-PCNA GFP et pCas9 anti-PCNA Puro (Figure 22). Les deux plasmides dérivés présentent la même séquence d'ADN de 20 nucléotides « GGGCCAGGTTGCGGTTCGCAG » complémentaire à une séquence contenue dans l'exon 1 du gène de PCNA codant l'ARN guide.



D'après « <https://www.addgene.org> »

Figure 22: Plasmide pCas9 anti-PCNA GFP et plasmide pCas9 anti-PCNA Puro

L'inactivation du gène PCNA est permise par la transfection des cellules en culture à l'aide des plasmides « pCas9 anti-PCNA GFP » (dérivé du plasmide PX458, addgene) ou « pCas9 anti-PCNA Puro » (dérivé du plasmide PX459, addgene). Les plasmides permettent l'expression de l'ensemble des facteurs du système CRISPR-Cas 9. Ils contiennent également une séquence d'ADN codant un ARN guide ciblant l'exon 1 de PCNA sous le contrôle d'un promoteur U6 humain. Cette séquence d'ADN est constituée de 20 nucléotides « GGGCCAGGTTGCGGTCGCAG ». Les deux plasmides dérivés contiennent également une séquence codant la protéine Cas 9. Cette dernière est située en amont d'une séquence codant le peptide T2A, qui elle-même, précède la séquence du marqueur de sélection. La séquence du marqueur de sélection pour le plasmide « pCas9 anti-PCNA GFP » correspond à la protéine eGFP. La séquence du marqueur de sélection pour le plasmide « pCas9 anti-PCNA Puro » correspond quant à elle au gène de résistance à la Puromycine (PuroR). L'ensemble de ces séquences sont ainsi sous le contrôle du même promoteur Cbh, une fusion du promoteur CMV et d'un promoteur β -actine de poulet. Enfin, les deux plasmides contiennent une séquence codant le gène de résistance à l'ampicilline (AmpR) sous le contrôle du promoteur bla.

pCas9 anti-PCNA GFP et pCas9 anti-PCNA Puro font partie d'une même classe de plasmides que l'on appellera par la suite « plasmide d'invalidation ». Le plasmide d'invalidation est introduit dans des cellules en culture par transfection. L'expression des différents éléments codés par ce plasmide induit la formation d'un complexe ARN guide-Cas 9 permettant de cibler le gène codant la protéine PCNA (Figure 23). L'utilisation de ce système provoque une coupure double brin au niveau de la séquence cible. La réparation de cette coupure double brin peut être prise en charge par deux mécanismes différents à savoir le NHEJ (non-homologous end joining) ou la recombinaison homologue (RH) (Rouet et al., 1994a, 1994b; Rudin et al., 1989; Plessis et al., 1992; Choulika et al., 1995). Le NHEJ est un système de réparation qui peut introduire des insertions ou des délétions de séquence (indels). Ces événements peuvent être la cause d'un décalage du cadre de lecture « frameshift » menant à terme à l'expression d'une protéine PCNA altérée. Cependant la réparation peut être également prise en charge par le système de recombinaison homologue. Ce système de réparation n'entraîne pas de modifications de la séquence d'ADN. Cependant la séquence d'ADN réparée est alors reconnue à nouveau par le système CRISPR-Cas 9. Un clivage en boucle de l'ADN peut alors être initié par le système CRISPR-Cas 9 et cessera uniquement lorsque la séquence cible aura été altérée par le système de réparation NHEJ. Ce phénomène assure ainsi l'inactivation du gène cible qui est dans notre cas le gène de la protéine PCNA.

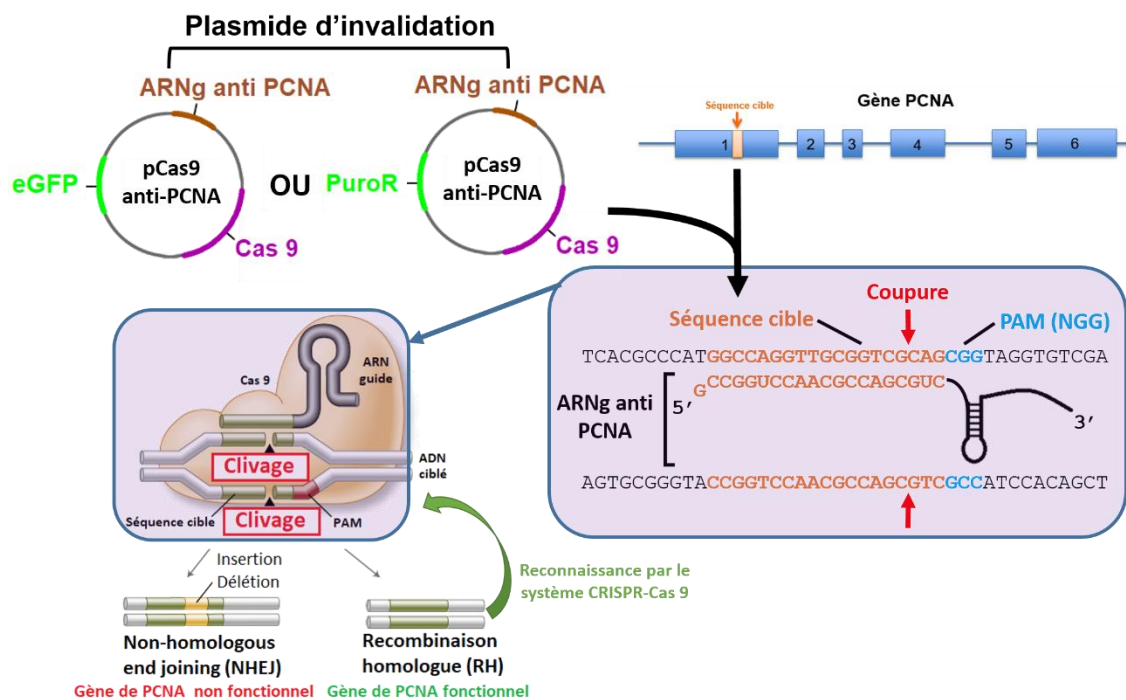


Figure 23: Inactivation du gène PCNA à l'aide d'un plasmide d'invalidation

Suite à l'expression du plasmide d'invalidation dans les cellules transfectées, l'ARNg anti PCNA couplé à la Cas 9 cible une séquence d'ADN contenue dans l'exon 1 du gène de PCNA. Le système CRISPR-Cas 9 provoque alors l'apparition d'une cassure double brin de l'ADN. Cette dernière est prise en charge par 2 types de mécanismes de réparation: Le mécanisme du NHEJ permet la réparation mais peut causer l'apparition d'évènements de type insertion ou délétion qui peuvent causer un décalage du cadre de lecture et provoquer ainsi l'expression d'une protéine altérée. Dans notre cas le gène de PCNA est alors inactivé. Le mécanisme de recombinaison homologue permet quant à lui la réparation de la cassure double brin sans aucune introduction d'erreurs. Le gène de PCNA reste alors fonctionnel. Cependant la séquence d'ADN réparée est à nouveau reconnue par le système CRISPR-Cas 9. Les coupures d'ADN se succèdent tant que la séquence cible n'est pas altérée par le système de réparation NHEJ.

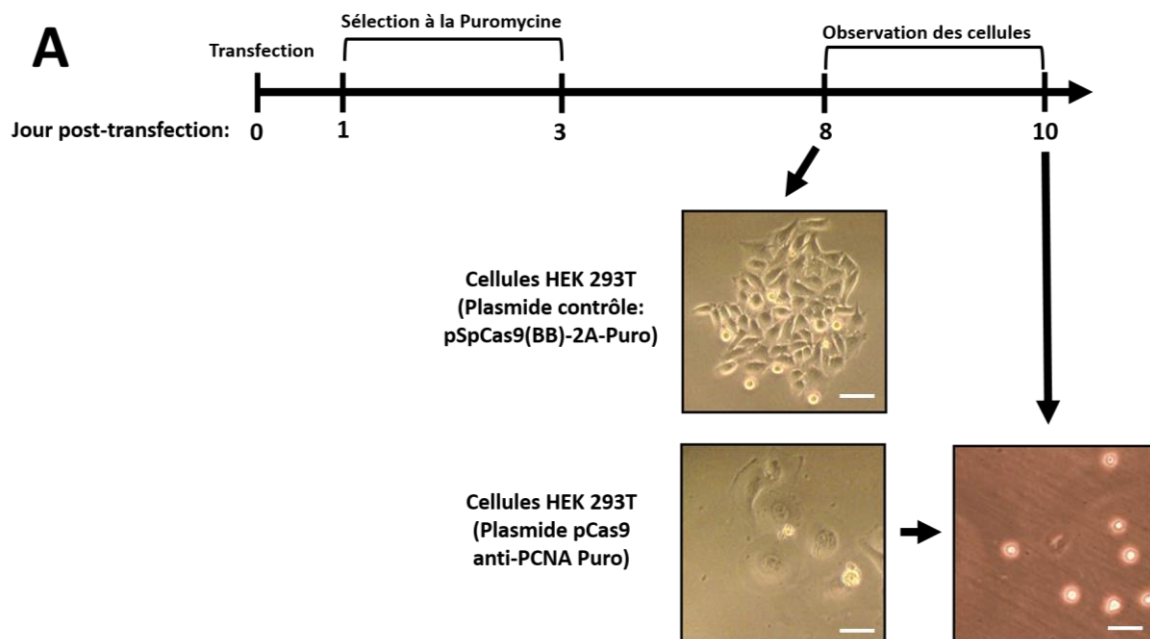
b) Validation du plasmide d'invalidation

Une fois les plasmides pCas9 anti-PCNA GFP et pCas9 anti-PCNA Puro obtenus, nous avons voulu confirmer leurs efficacités à inactiver le gène de PCNA *in cellulo* (Figure 24). Pour ce faire, nous avons cultivé une lignée de cellules embryonnaires humaines de reins (HEK 293T). Les cellules HEK 293T ont été transfectées soit avec le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro soit avec le plasmide contrôle pSpCas9(BB)-2A-Puro (plasmide d'invalidation vide). Le plasmide d'invalidation vide ne présente pas de séquence d'ADN codant un ARN guide. Après 24h de culture cellulaire, le niveau d'expression du gène de résistance à la Puromycine est suffisamment élevé pour procéder à la sélection des cellules transfectées. Un traitement de 2 jours à la Puromycine nous permet de sélectionner les cellules transfectées par le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro. Les cellules sélectionnées sont alors observées aux 8^{ème} et 10^{ème} jours post-transfection et la viabilité cellulaire est comparée entre les cellules contrôles

HEK 293T ayant acquis le plasmide d'inactivation vide et les cellules HEK 293T transfectées avec le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro (Figure 24A). Les cellules transfectées par le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro présentent un phénotype de mort cellulaire 8 jours après la transfection. La plupart des cellules sont mortes au 10^{ème} jour post-transfection. Les cellules « contrôle » ne présentent quant à elles aucun signe de mort cellulaire au 10^{ème} jour post-transfection.

La mort cellulaire des cellules transfectées avec le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro est liée à l'inactivation du gène de PCNA par le système CRISPR-Cas 9 causant ainsi une perte de l'expression de PCNA. Pour confirmer cette hypothèse nous avons cherché à détecter la protéine PCNA par immunofluorescence (Figure 24B). Au 8^{ème} jour post-transfection, nous observons la présence de la protéine PCNA au sein des noyaux des cellules « contrôle ». Cependant nous ne détectons plus ou peu la protéine PCNA au sein des noyaux des cellules transfectées par le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro. Il est à noter que ces dernières présentent un phénotype cellulaire particulier caractérisé par une forte augmentation de la taille du noyau et du cytoplasme. Ce phénotype cellulaire particulier a déjà été observé dans la littérature lors de l'utilisation d'un fragment d'anticorps bloquant l'activité de l'ADN polymérase α (Fab SJK 132) (Desplancq et al., 2016). Ce phénomène semble apparaître lors du blocage fonctionnel d'acteurs essentiels de la réplication de l'ADN.

L'efficacité du plasmide pCas9 anti-PCNA GFP a également été validé de façon similaire au plasmide pCas9 anti-PCNA Puro (voir section Résultats A.4.2) (Dietsch et al., 2017).



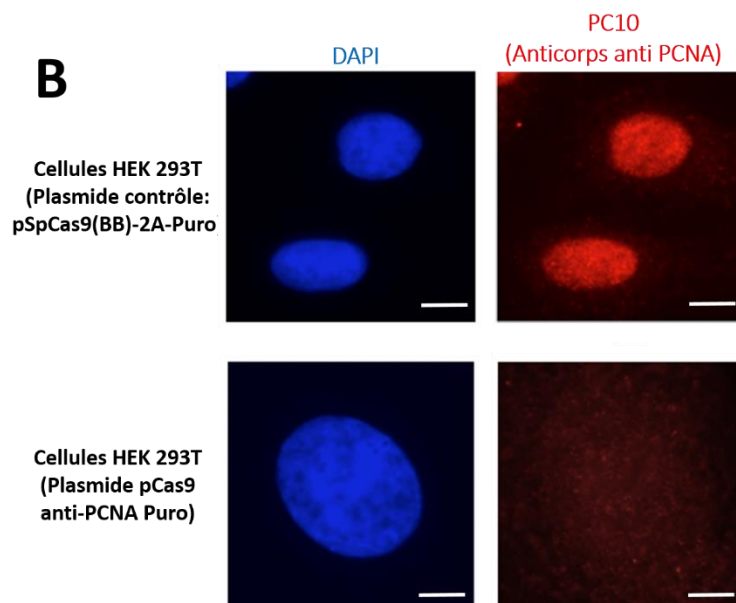


Figure 24: Validation du plasmide pCas9 anti-PCNA Puro

A Nous avons cultivé une lignée de cellules embryonnaires humaines de rein (HEK 293T). Les cellules HEK 293T ont été transfectées avec le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro ou le plasmide contrôle pSpCas9(BB)-2A-Puro (plasmide d'inactivation vide: aucune séquence d'ADN correspondant à un ARN guide). Après 24h, nous sélectionnons les cellules ayant acquis le plasmide « contrôle » ou le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro à l'aide d'un traitement de 2 jours à la Puromycine. La viabilité cellulaire des cellules sélectionnées est alors observée aux 8^{ème} et 10^{ème} jours post-transfection. Les cellules possédant le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro présentent un phénotype de mort cellulaire 8 jours après la transfection et meurent au 10^{ème} jour post-transfection. Les cellules « contrôle » ne présentent aucun signe de mort cellulaire au 10^{ème} jour post-transfection. **B** Nous avons cherché à détecter la protéine PCNA par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-PCNA: PC10. Au 8^{ème} jour post-transfection, nous observons la protéine PCNA par immunofluorescence dans le noyau des cellules « contrôle », cependant nous ne détectons plus ou peu la protéine PCNA au sein des cellules ayant acquis le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro. La mort des cellules transfectées par le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro est liée à la perte d'expression de la protéine essentielle PCNA dont le gène a été inactivé par le système CRISPR-Cas 9.

2) Expression d'une protéine PCNA de complémentation

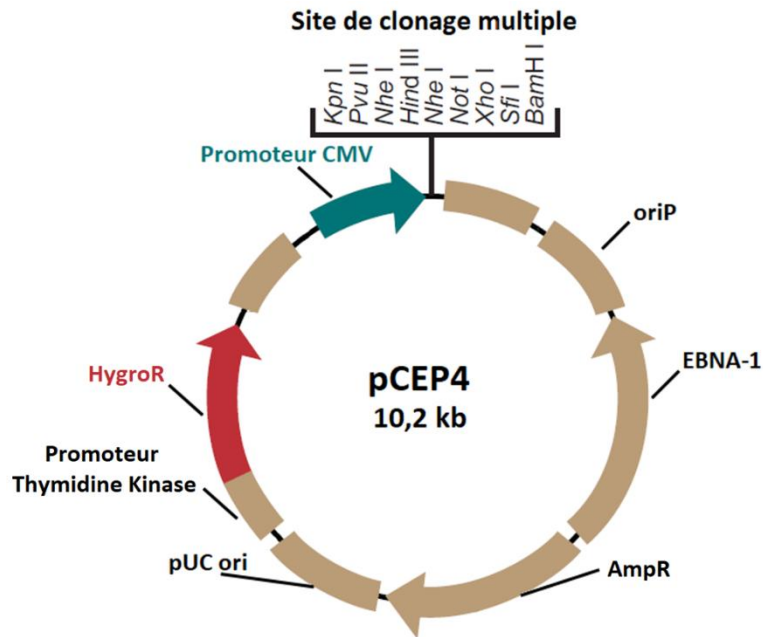
a) Construction du plasmide « pComp PCNA WT » et de ses dérivés

Nous avons développé un vecteur d'expression appelé plasmide de complémentation. Ce plasmide a été conçu pour être utilisé en parallèle des plasmides pCas9 anti-PCNA GFP et pCas9 anti-PCNA Puro (voir section Résultats A.1.a). En effet, ce plasmide a pour rôle d'exprimer des formes mutées de la protéine PCNA afin de remplacer la protéine PCNA endogène dont le gène est ciblé par le système CRISPR-Cas 9. Les mutations de la protéine PCNA sont situées au niveau de résidus soupçonnés d'être la cible d'une ou plusieurs modifications post-traductionnelles. L'utilisation en parallèle d'un système CRISPR-Cas 9 ciblant le gène PCNA et du plasmide de complémentation, nous a permis d'étudier l'effet de mutations d'un site spécifique de

PCNA dans la physiologie de la cellule et ce sans la perturbation de la protéine sauvage (Wild-type) (voir section Résultats A.3). L'utilisation de cet outil génétique nous a permis une caractérisation fonctionnelle de certains résidus de PCNA potentiellement modifiés.

Le système de complémentation fonctionnelle est surtout connu pour son utilisation dans le domaine de la génétique de la levure (voir section Introduction D.2). Dans notre cas, le système CRISPR-Cas 9 permet l'inactivation du gène de PCNA, il est donc nécessaire d'utiliser un système de complémentation fonctionnelle afin de substituer la perte de cette protéine endogène. Pour cela, nous transfectons un plasmide de complémentation codant soit une protéine PCNA mutée afin d'étudier la fonction d'un résidu en particulier soit la protéine PCNA WT utilisée comme contrôle. Ces protéines sont appelées protéines de complémentation. Dans cette partie des résultats nous décrirons la composition ainsi que la fonction de notre plasmide de complémentation. Dans un deuxième temps nous expliquerons comment à partir de ce plasmide de complémentation d'origine, nous avons construit une mini-banque de vecteurs dérivés exprimant des mutants de la protéine PCNA.

Afin de créer ce plasmide de complémentation, nous avons modifié un plasmide commercial pCEP4 (*invitrogen*) (Figure 25). Le plasmide pCEP4 est un vecteur d'expression eucaryote de type épisomal, se répliquant de manière autonome en utilisant la machinerie de répllication de l'ADN de la cellule hôte sans pour autant s'intégrer au sein du génome. Le plasmide pCEP4 possède la séquence promoteur/« enhancer » du cytomégalovirus (CMV) qui permet une forte transcription des gènes recombinants insérés dans la cassette de clonage située en aval. Le plasmide pCEP4 contient également l'origine de répllication du virus Epstein-Barr (oriP) et le gène EBNA-1. Ce sont ces deux séquences qui donnent la capacité au plasmide pCEP4 de se répliquer de façon autonome. En effet, l'association de l'antigène nucléaire du virus d'Epstein-Barr (EBNA-1) sur l'origine de répllication oriP permet la fixation du plasmide sur les chromosomes mitotiques assurant ainsi sa répllication. Le pCEP4 contient également deux CDS de gènes de résistance: le gène de résistance à l'Hygromycine B (HygroR) sous le contrôle du promoteur Thymidine Kinase pour une sélection stable des cellules de mammifères (humaines, primates et canines) transfectées par le plasmide ; et le gène de résistance à l'ampicilline nécessaire lors des étapes de clonage chez la bactérie. Le vecteur possède également une origine de répllication procaryote: pUC ori.



D'après « <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V04450> »

Figure 25: Plasmide pCEP4

Le plasmide pCEP4 est un vecteur d'expression eucaryotique épisomal. Le vecteur possède le promoteur/« enhancer » du cytomégalovirus (CMV) en amont du site de clonage multiple. Le plasmide pCEP4 contient également l'origine de réplication du virus Epstein-Barr (oriP) et le gène EBNA-1, deux séquences qui donnent la capacité au plasmide pCEP4 de se répliquer de façon autonome. Le plasmide contient également deux CDS de gènes de résistance : un gène de résistance à l'Hygromycine B (HygroR) jouant le rôle de marqueur de sélection pour les cellules eucaryotes ainsi qu'un gène de résistance à l'Ampicilline (AmpR) jouant le rôle de marqueur de sélection pour les bactéries. Le vecteur possède également une origine de réplication procaryote: pUC ori.

Ce plasmide pCEP4 nous a servi de plasmide support afin de créer notre premier plasmide de complémentation (pComp PCNA WT) (Figure 26). Ce plasmide dérivé du plasmide pCEP4 contient la CDS de la protéine PCNA WT. Nous appellerons cette protéine, la « protéine PCNAc WT » (protéine PCNA WT de complémentation).

Dans le plasmide pComp PCNA WT, la séquence PCNAc WT est clonée en amont d'une séquence permettant l'expression d'une protéine fluorescente rouge, la mCherry. Ces 2 séquences sont séparées par une courte séquence en phase codant le peptide T2A (Thosea asigna virus 2A).

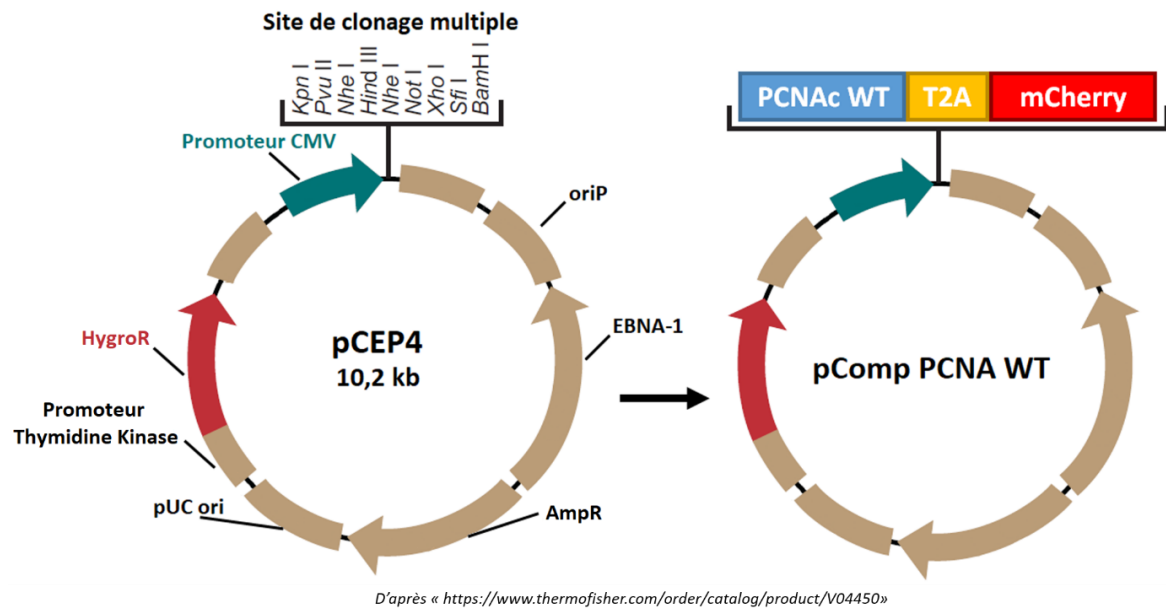
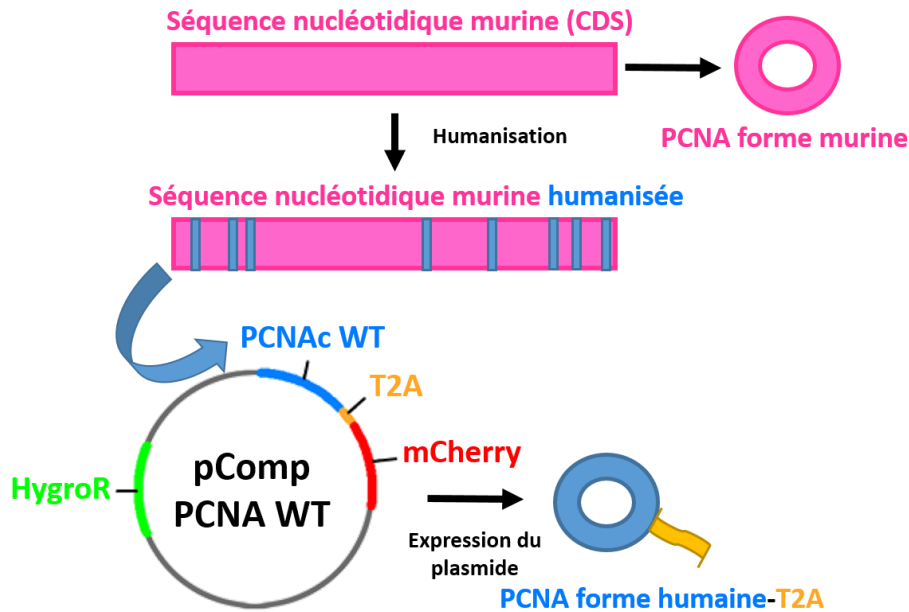


Figure 26: Plasmide pComp PCNA WT

Le plasmide pComp PCNA WT est dérivé du plasmide pCEP4. L'expression du plasmide dérivé permet la synthèse de la protéine PCNA WT de complémentation (PCNAc WT). La CDS de la protéine PCNAc WT est suivie d'une séquence codant le peptide T2A, elle-même en amont d'une séquence codant la protéine fluorescente mCherry. L'ensemble de ces 3 séquences sont sous le contrôle du même promoteur CMV. Pour plus d'informations sur le plasmide pCEP4 d'origine, veuillez-vous référer à la figure 25.

La CDS de la protéine PCNA WT est dite « hybride » et correspond à la CDS de la protéine PCNA murine que nous avons humanisée (Figure 27). Si l'on compare les séquences protéiques de PCNA murine et humaine, seuls 8 acides aminés sont différents. Nous avons ainsi modifié les 8 codons correspondant à ces 8 acides aminés afin d'humaniser la CDS murine, et ainsi permettre l'expression d'une protéine PCNA « humaine ». L'utilisation d'une séquence nucléotidique murine humanisée nous a permis de protéger le plasmide de complémentation du système CRISPR-Cas 9 déployé par nos plasmides d'inactivation (voir section Résultats A.1.a). En effet l'ARNg produit par les plasmides d'inactivation reconnaît uniquement la séquence nucléotidique humaine de PCNA et non pas la séquence murine humanisée contenue dans le plasmide pComp PCNA WT.



**Comparaison des séquences protéiques de
PCNA murine et humaine**

Mus musculus	MFEARLIQGSILKKVLEALKDLINEACWDVSSGGVNLQSMDSHSHVSLVQLTLR
Homo sapiens	MFEARLVQGSILKKVLEALKDLINEACWDISSGVNLQSMDSHSHVSLVQLTLR
Mus musculus	SEGFDTYRCDRNLAMGVNLTSMKILKCAGNEDIITLRAEDNADTLALVFEAP
Homo sapiens	SEGFDTYRCDRNLAMGVNLTSMKILKCAGNEDIITLRAEDNADTLALVFEAP
Mus musculus	NQEKVSDYEMKMLDLDVEQLGIPEQEYSCVIKMPSGEFARICRDLSHIGDAVV
Homo sapiens	NQEKVSDYEMKMLDLDVEQLGIPEQEYSCVVKMPSGEFARICRDLSHIGDAVV
Mus musculus	IISCAKNGVKFSASGELGNGNIKLSQTSNVDKKEEAVTIEMNEPVHLTFALRYL
Homo sapiens	IISCAKDGVKFSASGELGNGNIKLSQTSNVDKKEEAVTIEMNEPVQLTFALRYL
Mus musculus	NFFTKATPLSPFTVTLMSADVPLVVEYKIADMGHLYLAPKIEDEEAS
Homo sapiens	NFFTKATPLSSTVTLMSADVPLVVEYKIADMGHLYLAPKIEDEEGS

Figure 27: Construction de la CDS murine humanisée de PCNA

Seuls 8 acides aminés différencient la séquence protéique murine et humaine de PCNA. La CDS murine de la protéine PCNA a été humanisée. Cette dernière représente une séquence hybride entre la CDS murine et la CDS humaine. La séquence de la CDS hybride ne peut pas être ciblée par notre système CRISPR-Cas 9 anti-PCNA. Cependant cette dernière permet l'expression d'une protéine identique à la protéine PCNA humaine.

Le peptide T2A fait partie de la famille des « self-cleaving 2A peptide ». Le rôle des peptides 2A est de permettre l'expression de plusieurs protéines distinctes à partir d'un transcrit polycistronique c'est-à-dire un transcrit codant plusieurs chaînes polypeptidiques (Figure 28). Cette synthèse particulière est permise par un évènement appelé « saut du ribosome » (Ribosomal skipping). Dans notre cas un seul ARNm sera transcrit, codant à la fois la séquence de la protéine PCNA suivie de celle du peptide T2A, elle-même en amont de la séquence codant la protéine mCherry. La traduction de cet ARNm va permettre la synthèse de deux protéines distinctes, à savoir la protéine PCNA fusionnée au peptide T2A ainsi que la protéine mCherry. La traduction du transcrit permet la synthèse de la première protéine suivie sans interruption de la

synthèse du peptide T2A. Cependant, le peptide naissant T2A provoque au sein du ribosome un blocage structural du site catalytique peptidyltransférase et ainsi permet le relargage de la protéine naissante. Dans notre cas la première protéine synthétisée correspond à la protéine PCNA suivie des 20 premiers acides aminés du peptide T2A (PCNAc WT-T2A). La traduction se poursuit et permet ainsi la synthèse d'une deuxième protéine, la mCherry possédant le 21^{ème} et dernier acide aminé (proline) du peptide T2A, en position N-terminale de la protéine fluorescente. Il est bon de noter que l'ajout des 20 acides aminés à la protéine PCNA et de la proline à la mCherry n'affecte en rien leurs fonctions.

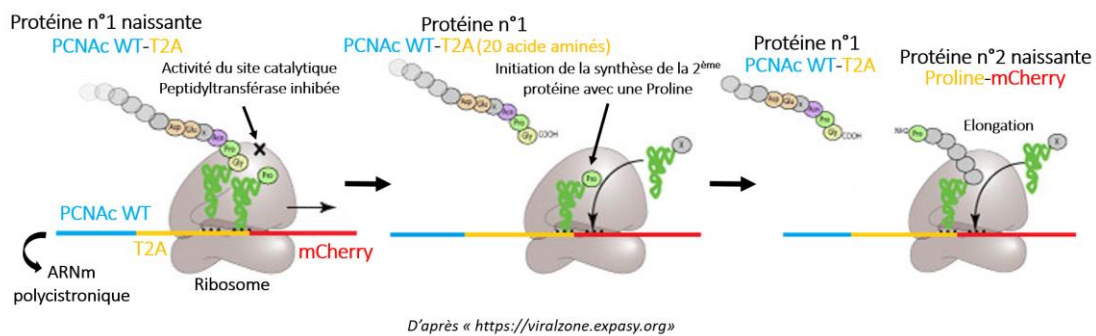


Figure 28: Mécanisme d'action du peptide T2A

Les peptides de la famille 2A permettent l'expression de plusieurs protéines distinctes à partir d'un transcrite polycistronique. Cette synthèse protéique particulière est causée par un évènement appelé « saut du ribosome » (Ribosomal skipping). Dans le schéma ci-dessus, le mécanisme d'action du peptide T2A est décrit. La traduction du transcrite polycistronique permet la synthèse de la protéine n°1 suivie sans interruption de la synthèse du peptide T2A. Cependant la synthèse du peptide T2A provoque un blocage structural du site catalytique peptidyltransférase du ribosome et le relargage de la protéine PCNA fusionnée aux 20 premiers acides aminés du peptide T2A. La traduction se poursuit par la synthèse de la protéine n°2. Cette deuxième protéine correspond à la mCherry possédant à son extrémité N-terminale le 21^{ème} et dernier acide aminé du peptide T2A (Proline).

La mCherry ou mRFP (monomeric red fluorescent protein) est une protéine fluorescente monomérique dérivée de la protéine fluorescente rouge tétramérique appelée DsRed. Cette protéine fluorescente nous permet d'identifier les cellules transfectées par le plasmide de complémentation.

Nous avons utilisé ce plasmide pComp PCNA WT afin de créer une mini-banque de plasmides de complémentation exprimant des protéines PCNA mutantes (K77R, K80R, Y114F, K117R, D120A, D122A, E124A, K164R, K168R, Y211F, K248R) (Figure 29). Ces dernières sont mutées au niveau de résidus suspectés d'être modifiés post-traductionnellement et dont les fonctions sont inconnues. Ces plasmides de complémentation ont été obtenus par mutagenèse dirigée de la séquence codant la protéine PCNA dans le plasmide pComp PCNA WT.

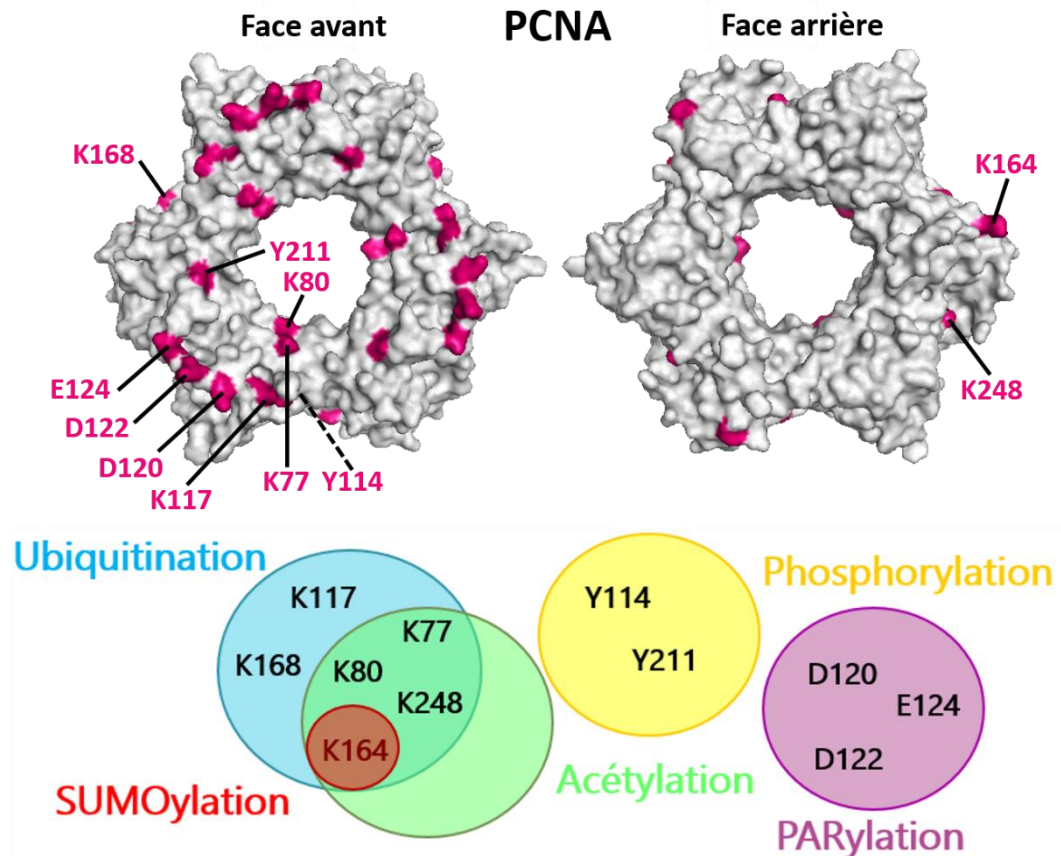


Figure 29: Les sites mutés de la protéine PCNA

Localisation des résidus mutés de la protéine PCNA. Les résidus sont regroupés en fonction des modifications post-traductionnelles qu'ils peuvent subir.

b) Validation du plasmide « pComp PCNA WT » et de ses dérivés

Une fois le plasmide pComp PCNA WT construit, il a fallu nous assurer que l'expression de ce vecteur permette la synthèse de la protéine PCNA WT de complémentation (PCNAc WT) dans les cellules en culture (Figure 30). Nous pouvons vérifier la présence de cette protéine de 2 façons différentes:

L'expression de la protéine PCNAc WT est accompagnée de l'expression de la protéine fluorescente mCherry. En effet nous avons vu précédemment (voir section Résultats A.2.a) que les séquences codantes pour la protéine PCNAc WT, le peptide T2A et la protéine mCherry sont fusionnées en phase. L'ARN polycistronique qui en résulte va être traduit et le peptide T2A va permettre la synthèse de deux protéines distinctes; la protéine PCNAc WT et la protéine mCherry. Ainsi la présence de la protéine mCherry est un témoin direct de l'expression de la protéine PCNAc WT. Nous avons transfecté le plasmide pComp PCNA WT. 24 heures après transfection, les

cellules transfectées sont sélectionnées par un traitement à l'Hygromycine B durant 3 jours puis observées au microscope à fluorescence. On observe alors que l'ensemble de ces cellules présente une fluorescence rouge. Le plasmide pComp PCNA WT s'exprime correctement et permet la synthèse de la protéine mCherry. Par extension, nous pouvons supposer que la protéine PCNA WT est également synthétisée. Cette fluorescence rouge causée par l'expression de la mCherry est absente au sein des cellules contrôles HEK 293T non transfectées par le plasmide de complémentation (Figure 30A).

Nous avons analysé les extraits protéiques provenant de cellules transfectées ou non avec le plasmide pComp PCNA WT par la technique du Western Blot (Figure 30B). La protéine PCNA est révélée à l'aide d'un anticorps commercial monoclonal de souris PC10. Nous avons également utilisé un anticorps polyclonal de lapin anti-T2A qui nous permet d'identifier spécifiquement la protéine PCNA WT et non la forme endogène de PCNA. Cet anticorps cible la séquence protéique T2A présente à l'extrémité C-terminale de la protéine PCNA de complémentation. Dans l'extrait protéique des cellules HEK 293T « contrôle » on ne détecte qu'une bande de protéines migrant au niveau du marqueur moléculaire 35 kDa. La protéine correspond à PCNA endogène car cette dernière est révélée par l'anticorps PC10 mais n'est pas reconnue par l'anticorps anti-T2A. Dans l'extrait protéique provenant des cellules transfectées par le plasmide pComp PCNA WT, on retrouve les deux types de protéines; la 1^{ère} protéine migrant au niveau du marqueur moléculaire 35 kDa correspond à la protéine PCNA endogène tandis que la 2^{ème} protéine migrant aux alentours de ~ 40 kDa correspond à la protéine PCNA WT-T2A. En effet, cette dernière est reconnue à la fois par l'anticorps PC10 et l'anticorps anti-T2A.

L'expression de l'ensemble des plasmides de complémentation de la mini-banque a été validée par analyse en Western Blot (Figure 30C). Pour chacun des extraits protéiques, nous avons confirmé la présence de la protéine PCNA de complémentation migrant légèrement au-dessus (~ 40 kDa) de la protéine PCNA endogène (~35 kDa).

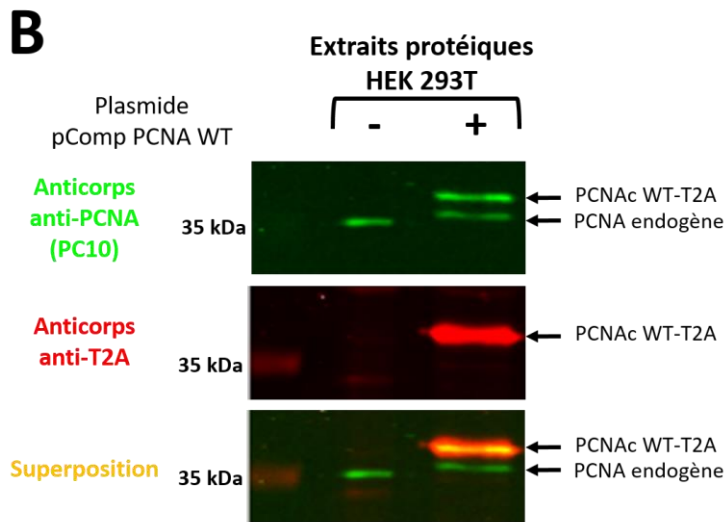
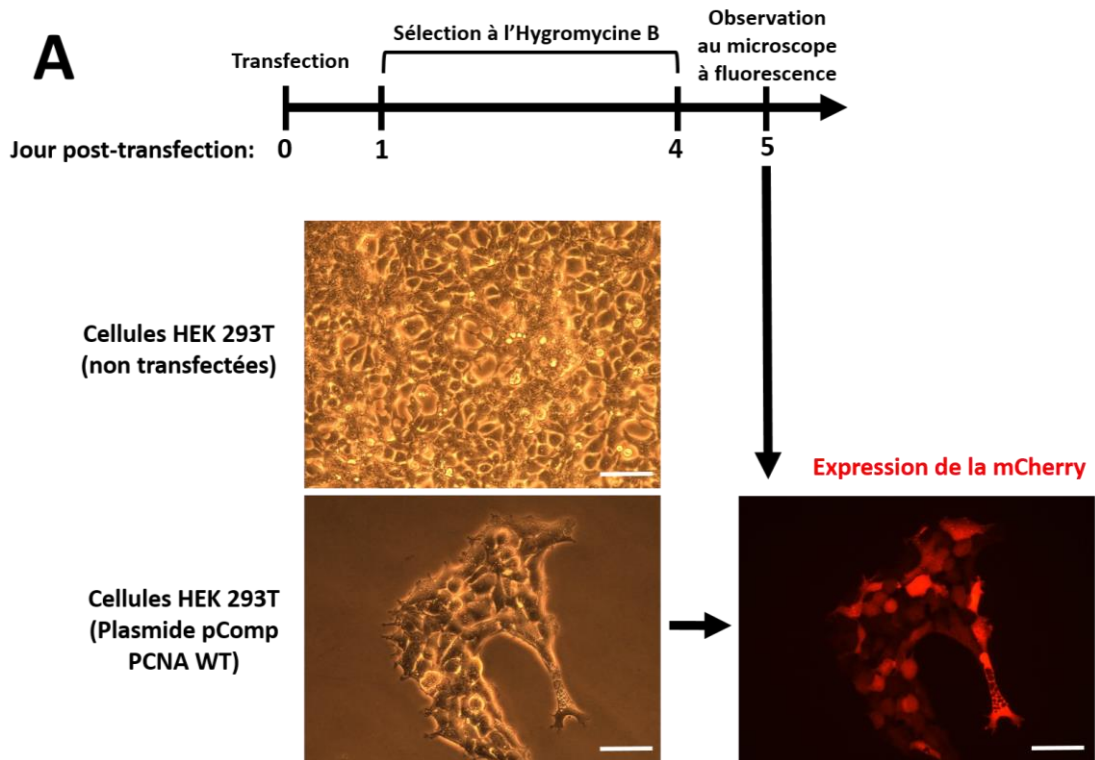


Figure 30: Validation des plasmides de complémentation pComp PCNA WT et ses dérivés mutés
A Une transfection du plasmide pComp PCNA WT a été réalisée dans des cellules HEK 293T en culture. Les cellules sont sélectionnées via un traitement à l'Hygromycine B durant 3 jours puis observées au microscope à fluorescence. L'ensemble de ces cellules présentent une fluorescence rouge due à l'expression de la protéine mCherry. Cette fluorescence est absente au sein des cellules contrôles HEK 293T non transfectées. La présence de la mCherry est un témoin de l'expression du plasmide pComp PCNA WT et permet de confirmer la présence de la protéine PCNA WT de complémentation au sein des cellules en culture. **B** Des extraits protéiques de cellules contrôles HEK 293T et de cellules HEK 293T transfectées à l'aide du plasmide pComp PCNA WT ont été analysés par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-PCNA (PC10) et d'un anticorps anti-T2A. L'extrait protéique des cellules HEK 293T « contrôle » présente la protéine PCNA endogène (35 kDa) qui est reconnue uniquement par l'anticorps PC10. L'extrait protéique des cellules transfectées par le plasmide pComp PCNA WT présente deux types de protéines; la protéine PCNA endogène (35 kDa) et la protéine PCNAc WT-T2A (~40 kDa). En effet, la protéine PCNAc WT-T2A est reconnue par les deux anticorps PC10 et anti-T2A. L'expression de l'ensemble des plasmides de complémentation de la mini-banque a été validée par analyse de Western Blot. Le résultat du Western Blot des extraits protéiques des cellules HEK 293T transfectées par les plasmides pComp PCNA WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K164R, K168R, Y211F et K248R est représenté ci-dessus.

3) Système de complémentation fonctionnelle de la protéine PCNA endogène

a) Protocole de mise en place du système de complémentation fonctionnelle de la protéine PCNA

Nous avons développé deux types de plasmides aux fonctions différentes. Le 1^{er} type de plasmide (pCas9 anti-PCNA GFP ou pCas9 anti-PCNA Puro) provoque le déploiement du système CRISPR-Cas 9 et permet ainsi l'inactivation du gène codant la protéine PCNA (voir section Résultats A.1.a). Le 2^{ème} type de plasmide pComp PCNA WT ou l'un de ses dérivés mutés permet la mise en place d'un système de complémentation via l'expression d'une protéine PCNA de complémentation (voir section Résultats A.2.a). L'utilisation de ces deux types de plasmides en parallèle provoque *in cellulo* le remplacement de la protéine PCNA endogène par une forme mutante de notre choix. La création de ces modèles cellulaires m'a assisté dans l'étude des caractéristiques fonctionnelles des résidus ciblés par mutation.

La première étape de la mise en place de cet outil génétique (Figure 31) consiste à la transfection simultanée (co-transfection) des deux types de plasmides au sein de cellules en culture. Le plasmide n°1 dit plasmide « d'invalidation » est le plasmide pCas9 anti-PCNA GFP ou le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro. Le plasmide n°2, dit plasmide « de complémentation », est l'un des plasmides issu de notre mini-banque (pComp PCNA WT ou l'un de ses dérivés mutés). Deux versions du système de complémentation du gène PCNA ont été développées et ce en fonction du type de plasmide d'invalidation choisi (pCas9 anti-PCNA GFP ou pCas9 anti-PCNA Puro).

La 1^{ère} version du système de complémentation du gène PCNA met en jeu le plasmide pCas9 anti-PCNA GFP et un plasmide de complémentation de la mini-banque (dans notre exemple: pComp PCNA WT). Les cellules ayant acquis les deux plasmides par co-transfection sont par la suite sélectionnées à l'aide d'une technique de FACS. En effet, ces cellules appelées « double-positives » expriment à la fois la protéine GFP et la protéine mCherry codées respectivement par le plasmide pCas9 anti-PCNA GFP et le pComp PCNA WT.

La 2^{ème} version du système de complémentation du gène PCNA met en jeu cette fois-ci le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro ainsi qu'un plasmide de complémentation de la mini-banque (dans notre exemple: pComp PCNA WT). Une fois la co-transfection des cellules effectuée et l'expression des deux plasmides effective, nous avons sélectionné les cellules ayant acquis les deux types de vecteurs à l'aide d'un traitement simultané avec deux antibiotiques (Puromycine et Hygromycine B). Il est à noter que nous pouvons confirmer la présence du plasmide de complémentation au sein des cellules en culture par microscopie en fluorescence, car ces dernières expriment alors la protéine fluorescente mCherry.

Dans les deux versions du système de complémentation du gène PCNA, les cellules en sortie de sélection n'expriment plus la protéine PCNA endogène grâce au déploiement du système CRISPR-Cas 9. En revanche, ces cellules expriment alors une protéine PCNA de complémentation (dans notre exemple PCNAc WT-T2A) en fonction du plasmide choisi dans la mini-banque.

En conclusion, l'utilisation de notre outil biologique nous permet donc de créer des cellules pouvant exprimer des mutants de PCNA et ce sans aucune interférence de la part de la protéine PCNA endogène. Notre outil biologique se place comme une méthode alternative au mécanisme de recombinaison homologue « Knock-in » à ceci près que notre outil biologique dans l'état actuel ne permet pas encore une intégration de la séquence mutante de PCNA dans le génome de la cellule.

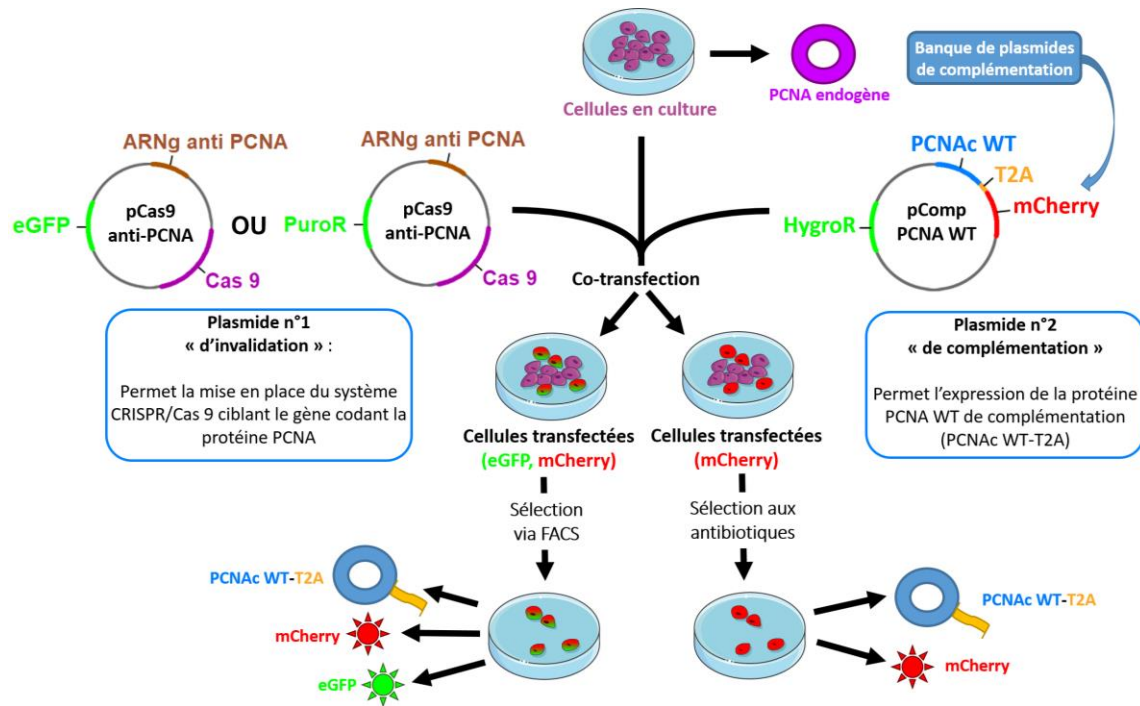


Figure 31: Schéma récapitulatif de notre système de complémentation fonctionnelle du gène PCNA

Nous avons développé un outil biologique permettant d'exprimer *in cellulo* une protéine PCNA mutante et ce en l'absence de toute interférence de la protéine PCNA endogène. Le système met en jeu une co-transfection de 2 types de plasmides: Le plasmide n°1 dit plasmide d'inactivation contient l'ensemble des facteurs nécessaire au déploiement du système CRISPR-Cas 9. Le vecteur permet ainsi d'inactiver le gène de PCNA. Le plasmide n°2 dit plasmide de complémentation permet l'expression d'une protéine fluorescente mCherry et d'une protéine PCNA dit de complémentation (PCNAc) fusionnée à une séquence protéique « TAG » (T2A). Dans l'exemple ci-dessus, la protéine de complémentation correspond à la forme WT de PCNA (PCNAc WT) mais cette dernière peut être remplacée par une forme mutée de la protéine en fonction du type de plasmide de complémentation choisi. Les deux plasmides d'inactivation et de complémentation présentent respectivement des gènes de résistances à la Puromycine (PuroR) et à l'Hygromycine B (HygroR). Ainsi les cellules sélectionnées par le traitement des deux antibiotiques n'expriment plus la protéine PCNA endogène mais une version de complémentation (PCNAc WT-T2A).

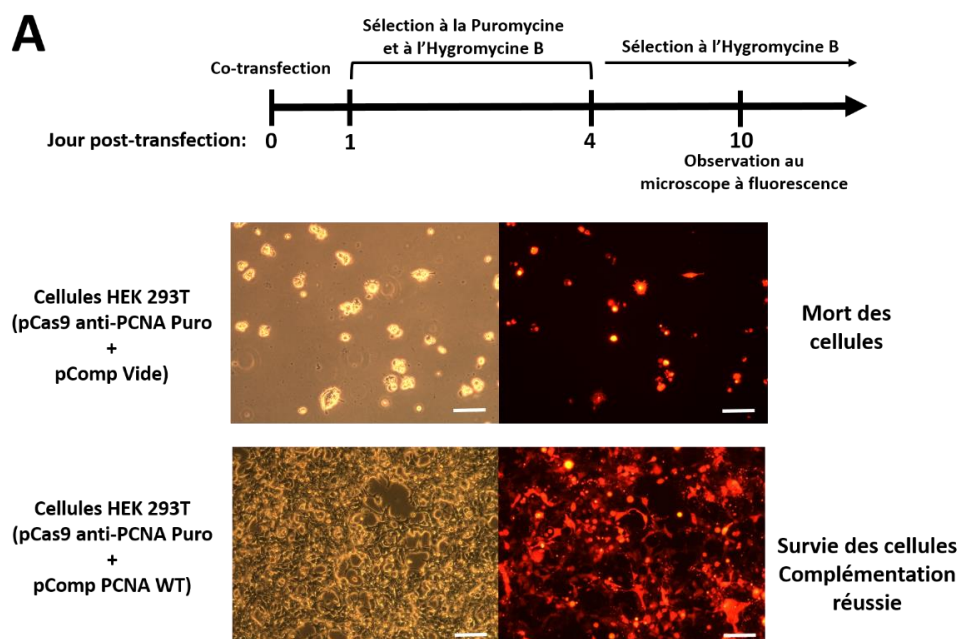
b) Validation du système de complémentation du gène de PCNA

Une fois les plasmides d'inactivation et de complémentation obtenus, nous avons voulu valider l'efficacité de notre système de complémentation fonctionnelle de PCNA. Des cellules HEK 293T en culture sont co-transfectées soit avec un couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp « vide » soit avec un couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp PCNA WT puis ces dernières sont sélectionnées durant 3 jours à l'aide d'un traitement double-antibiotiques Puromycine et Hygromycine B puis par la suite uniquement à l'aide d'Hygromycine B. Le plasmide pComp Vide correspond à un vecteur pCEP4 dans lequel nous avons inséré uniquement la séquence codant la protéine mCherry. Contrairement au plasmide pComp PCNA WT, le plasmide pComp « vide » ne contient pas de séquence codant la protéine PCNA ni de

séquence codant le peptide T2A. Les cellules « contrôle » transfectées par les plasmides pCas9 anti-PCNA Puro et pComp Vide meurent à partir du 10^{ème} jour après la transfection. Les cellules ont été invalidées pour le gène de PCNA grâce à l'expression du plasmide pCas9 anti-PCNA Puro, cependant le plasmide pComp Vide ne permet pas de compenser cette perte de la protéine PCNA. L'absence de la protéine essentielle entraîne ainsi la mort des cellules. Les cellules co-transfectées avec le couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp PCNA WT sont également invalidées pour le gène de PCNA mais cette perte de protéine est compensée par l'expression de la protéine PCNAc WT-T2A exprimée par le plasmide pComp PCNA WT. La complémentation fonctionnelle est en place et confirmée par l'absence de phénotype de mort cellulaire au jour 10 post-transfection (Figure 32A).

Les extraits protéiques des cellules co-transfectées par le couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp PCNA WT sont comparés à des extraits protéiques de cellules contrôles HEK 293T non transfectées à l'aide de la technique Western Blot (Figure 32B). L'anticorps anti-PCNA (PC10) est utilisé comme anticorps de révélation. L'extrait protéique des cellules contrôles HEK 293T non transfectées présente uniquement une protéine correspondant à PCNA endogène. L'extrait protéique des cellules HEK 293T transfectées quant à lui ne présente aucune trace de la protéine PCNA endogène cependant on note la présence de la protéine PCNAc WT-T2A.

On en déduit donc que le système de complémentation du gène de PCNA développé est fonctionnel et peut être utilisé dans le cadre d'une substitution de la protéine PCNA endogène par une protéine PCNA mutante de notre choix.



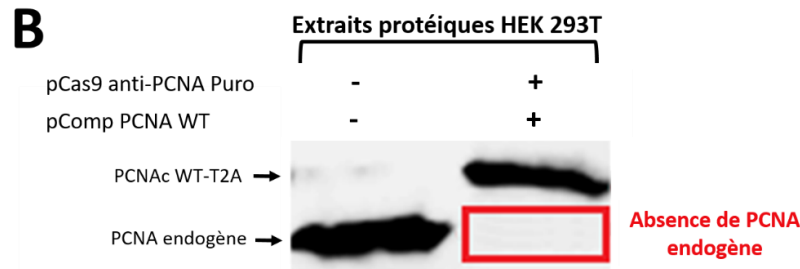


Figure 32: Validation du système de complémentation du gène de PCNA

A Des cellules HEK 293T en culture ont été co-transfectées soit avec un couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp Vide (vecteur pCEP4 codant la protéine mCherry seule) soit avec un couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp PCNA WT. Ces cellules sont sélectionnées à la Puromycine et à l'Hygromycine B pendant 3 jours puis par la suite uniquement avec de l'Hygromycine B. Les cellules contrôles ayant acquis les plasmides pCas9 anti-PCNA Puro et pComp Vide meurent au bout de 10 jours de culture post-transfection. Le plasmide pComp Vide ne permet pas de compenser la perte de la protéine PCNA provoquée par l'expression du plasmide pCas9 anti-PCNA Puro. Les cellules co-transfectées avec le couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp PCNA WT ne présentent pas de phénotype de mort cellulaire au 10^{ème} jour post-transfection. Le plasmide pComp PCNA WT exprime la protéine PCNAc WT-T2A et permet ainsi de compenser la perte de la protéine PCNA endogène causée par l'expression du plasmide pCas9 anti-PCNA Puro. **B** Des extraits protéiques de cellules HEK 293T contrôles non transfectées et de cellules HEK 293T co-transfectées par le couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp PCNA WT ont été analysés par Western Blot à l'aide de l'anticorps anti-PCNA (PC10). Contrairement à l'extrait protéique des cellules contrôles HEK 293T non transfectées, l'extrait protéique des cellules co-transfectées ne présente pas la protéine PCNA endogène mais on observe cependant la présence de la protéine PCNAc WT-T2A. Cette protéine de complémentation permet de compenser l'absence de la protéine PCNA endogène.

4) Publication « A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells » (Dietsch et al., 2017; BioTechniques)

a) Introduction de l'article

Suite à la construction des différents types de plasmides d'inactivation (voir section Résultats A.1.a) et de complémentation (voir section Résultats A.2.a) ainsi que leurs validations fonctionnelles individuelles par transfection (voir section Résultats A.1.b, A.2.b) ou en collaboration par co-transfection (voir section Résultats A.3.b), nous avons voulu tester notre système de complémentation fonctionnelle afin de caractériser les fonctions de certains résidus de la protéine PCNA.

Cependant avant d'étudier les rôles encore inconnus de ces résidus de PCNA, nous avons voulu valider notre outil génétique avec l'étude de résidus de PCNA dont les fonctions sont déjà connues et décrites dans la littérature. Nous avons choisi de substituer la forme endogène de PCNA par deux mutants à savoir PCNA K164R et PCNA Y211F. La mono-ubiquitination du résidu K164 et la phosphorylation de la Y211 ont été décrites respectivement pour leur rôle dans le recrutement de l'ADN

polymérase translésionnelle η (Kannouche et al., 2004, Watanabe et al., 2004) et dans la stabilisation du complexe Chromatine-PCNA (Wang et al., 2006). La substitution de la protéine PCNA par les mutants PCNA K164R et PCNA Y211F a été réalisée à l'aide des deux versions de notre système de complémentation fonctionnelle (voir section Résultats A.4) (Dietsch et al., 2017) impliquant une sélection des cellules co-transfectées soit par FACS soit par traitements double antibiotiques.

Les cellules mutantes pour la protéine PCNA (K164R et Y211F) ont subi une irradiation aux UV afin de tester leurs éventuelles sensibilités. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec des cellules « contrôle » inactivées pour le gène de PCNA et complémentées avec la protéine PCNA WT.

Nous avons également montré que notre système de complémentation fonctionnelle ne se limite pas seulement à l'étude fonctionnelle de la protéine PCNA. Nous avons ainsi inactivé un gène essentiel codant pour la sous-unité PolD2 de l'ADN polymérase δ et tenté de compenser la perte de la protéine par l'expression d'une protéine PolD2 WT de compensation.

b) Résultats et conclusions de l'article

Notre système de complémentation fonctionnelle a permis de substituer *in cellulo*, les protéines endogènes PCNA et PolD2 par leurs protéines de complémentation WT. Ces substitutions ont été réalisées avec les deux versions de notre système de complémentation mettant en jeu la sélection des cellules co-transfectées soit par FACS soit par traitement double antibiotiques. Nous avons vérifié que la viabilité de ces cellules est bien due à l'expression des protéines de complémentation. En effet, les cellules contrôles transfectées uniquement avec un plasmide d'inactivation meurent en culture. Ainsi notre système de complémentation fonctionnelle semble pouvoir être dérivé pour l'étude de n'importe quelle protéine voulue.

L'utilisation de notre système de complémentation fonctionnelle nous a également permis de confirmer que les cellules mutantes PCNA K164R présentent une sensibilité accrue aux UV en comparaison avec des cellules sauvages. Ce résultat est un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse concernant l'implication du résidu K164 de la protéine PCNA dans la synthèse translésionnelle. Ces résultats ont permis de confirmer les données de la littérature (Hendel et al., 2011), notre système de complémentation fonctionnelle est donc valide.

c) Article « A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells » (Dietsch et al., 2017; BioTechniques)

Benchmarks

A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells

Frank Dietsch, Mariel Donzeau, Agnes M. Cordonnier, Etienne Weiss, Bruno Chatton, and Marc Vigneron
Université de Strasbourg, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch, France

BioTechniques 62:80-83 (February 2017) doi 10.2144/000114518
Keywords: human complementation assay; Cas9; pCEP4

Supplementary material for this article is available at www.BioTechniques.com/article/114518.

Here we developed a complementation method for the study of essential genes in live human cells using the CRISPR/Cas9 system. Proteins encoded by essential genes were expressed using a derivative of the pCEP4 compensating plasmid in combination with Cas9 endonuclease targeting of the chromosomal genes. We show that this strategy can be applied to essential genes, such as those coding for proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) and DNA polymerase delta subunit 2 (*POLD2*). As demonstrated for the PCNA protein, our method allows mutational analysis of essential protein-coding sequences in live cells.

The systematic analysis of the functions of non-essential genes has recently become achievable using the bacterial CRISPR/Cas9 endonuclease (1). Its selective guide RNA (gRNA)-directed cleavage of DNA ultimately yields indel mutations that inactivate targeted genes. When targeting a coding sequence, the encoded protein will be altered, most often yielding inactive or unstable translation products, potentially leading to visible and measurable cellular phenotypes. One limit of this approach is the required viability of the mutated cells, precluding the study of essential proteins.

To address this problem, we adapted the classical yeast complementation assay to human cells (2). Cas9-mediated inactivation of an essential gene was compensated with a derivative of the plasmid pCEP4 (Invitrogen, Paisley, UK) encoding the same protein (Figure 1A). The compensating plasmid was engineered to simultaneously express, under the control of a CMV

promoter, the protein of interest together with a selectable fluorescent mCherry protein, enabling convenient detection of transfected cells. In addition, this plasmid contains a hygromycin resistance gene (Figure 1A). In the presence of this plasmid, the chromosomal sequences can be knocked out using an appropriately targeted CRISPR/Cas9 endonuclease without killing the cell. The compensating plasmid is designed to escape the CRISPR/Cas9 endonuclease action and does not contain the Cas9-targeted sequence. This was achieved in two different ways (see below). The functions of two essential genes were tested using this system: the proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) and the DNA polymerase delta subunit 2 (*POLD2*) genes, which are both involved in nuclear DNA replication and cancer progression (3,4).

We explored two different strategies allowing the compensating plasmid to escape the Cas9 activity, one for *PCNA*

and the second for *POLD2*, but both may be applied for any gene. The PCNA protein is quite conserved evolutionarily, as the mouse and human orthologs differ by only 8 residues (97% identity). However, their nucleotide coding sequences (CDS) differ by 88 out of 785 nucleotides (89% identity). We synthesized an artificial CDS derived from a mouse cDNA mutated to encode a PCNA protein fully matching the human amino acid sequence. The homology between the artificial CDS and the human CDS was reduced as much as possible, allowing a variety of gRNAs against the endogenous human gene to be tested. In the case of *POLD2*, the CDS expressed from the compensating plasmid corresponds to the wild-type endogenous human cDNA. The Cas9 targets consisting of 20-bp recognition sequences were chosen to overlap splice junctions in the gene, with the cut site being located within the exonic CDS (red arrow, Figure 1A) so that the chromosomal genes are selectively inactivated, while the compensating plasmid is insensitive to Cas9 (further details are included in the Supplementary Material).

In order to express the Cas9 protein together with the gRNA, we used two constructs (plasmids #48138, pCas9-2A-GFP and #62988, pCas9-2A-Puro; Addgene, Cambridge, MA) (5) (Figure 1A, right). HEK293T cells were co-transfected with either of these plasmids together with the compensating plasmid described above. Doubly fluorescent cells (red and green) were selected using FACS and allowed to grow (Figure 1B). Alternatively, co-transfected cells were selected by successively adding puromycin (0.5 µg/mL for 48 h) and hygromycin (0.2 mg/mL for 48 h) to the culture medium (Figure 1C). Using both methods, expression of the compensating protein (*PCNA* or *POLD2*) by the compensating plasmid led to the growth of a large number of colonies (Figure 1, B and C, right). In contrast, essentially all of the knockout cells died 8–10 days after selection in the presence of an empty compensating plasmid (Figure 1, B and C, left). As can be seen, some clones survived the selection process; this is inherent to the Cas9 system itself. Notably, some alleles escape the

METHOD SUMMARY

Because Cas9 endonuclease-mediated knockout of an essential gene is lethal, we constructed an EBNA-based episomal expression vector to complement the absence of the essential protein. The compensating vector restores viability following CRISPR/Cas9-induced gene knockout, allowing a systematic mutagenesis of the essential protein of interest to define its domains and functions.

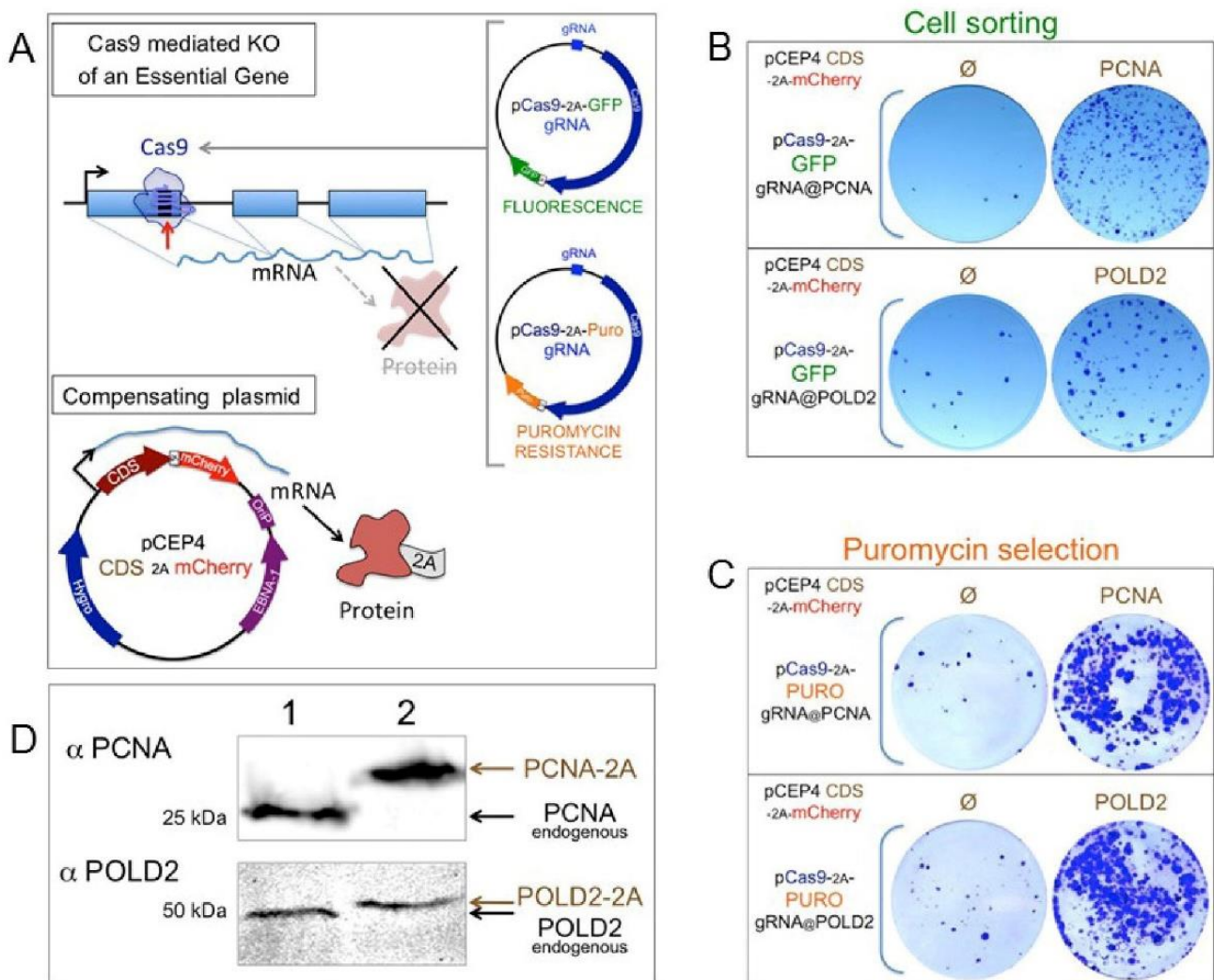


Figure 1. PCNA and POLD2 knock-out compensation in human cells. (A) Schematic representation of the strategy: An essential target gene is knocked out using a targeted Cas9 endonuclease complex (red arrow) encoded by two alternative constructs allowing either fluorescence or puromycin-resistance selection. A compensating pCEP4-derivative plasmid allows the cell to survive by expressing the compensating protein together with a mCherry fluorescent reporter protein, yielding a protein with an additional C-terminal 22-amino-acid peptide encoded by the 2A sequence. (B) HEK293T cells were co-transfected using a pCas9-2A-GFP plasmid expressing a guide RNA (gRNA) targeting either the *PCNA* or *POLD2* gene (top and bottom panels, respectively), as well as an empty pCEP4 plasmid or a pCEP4 plasmid expressing *PCNA* or *POLD2* as indicated. Transfected cells (2500 cells total) were selected using a cell sorter and allowed to grow in 5-cm Petri dishes. After 10 days, the colonies were stained using crystal violet. (C) HEK293T cells were co-transfected using a pCas9-2A-Puro plasmid expressing a gRNA directed to either the *PCNA* or *POLD2* gene (top and bottom panels, respectively) as well as the indicated pCEP4 plasmids. Cells were selected for resistance to puromycin and hygromycin for 2 days, successively. After 12 days, the colonies were stained using crystal violet. (D) Western blot. Total cell extracts either from control HEK293T cells (1) or from selected cells (2) were electrophoresed on 9%–11% SDS acrylamide gels. After transfer to nitrocellulose membranes the proteins were visualized using the appropriate antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) as indicated on the left (for PCNA: PC-10, Sc-56; and for POLD2: C-20, Sc-8800).

action of the Cas9 complex, although with a very low frequency, leading to cells in which a wild-type allele can be found together with alleles exhibiting the typical Cas9-induced indel mutations (data not shown).

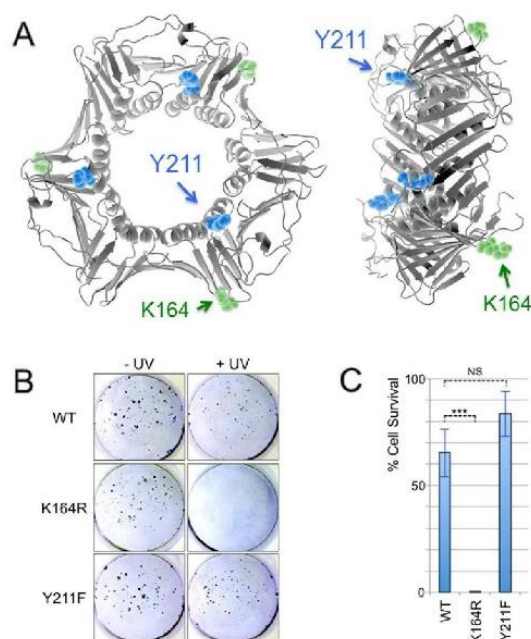
To verify that the endogenous protein was effectively replaced by the plasmid-encoded protein, we performed western blots using total cell extracts of selected cells (Figure 1D). The endogenous PCNA and POLD2 proteins were both detectable in control HEK293T cells (Figure 1D, lane 1). In contrast, these proteins were absent in the selected compensated cells, whereas

the same antibodies revealed a shifted band as expected due to the presence of the 2A-encoded C-terminal extension (Figure 1D, lane 2). This result confirmed the specificity of both the Cas9 targeting and the antibody recognition. Remarkably, the expression levels of the complementing and endogenous POLD2 proteins were very similar, while expression of the complementing PCNA was 3- to 4-fold higher than that of the endogenous protein. The same results were obtained irrespective of the cell selection method (data not shown). The presence of remaining wild-type chromosomal alleles in a

recently complemented cell population was undetectable by western blot (see Figure 1D, lane 2). However, after 2 months of culture without any selective pressure, the endogenous proteins were detectable again (data not shown). To avoid this drawback, one may select cellular clones that are known not to contain any wild-type alleles. Alternatively, an additional hygromycin selection quite effectively removes cells with a wild-type genomic allele from the population, and only the compensating plasmid-encoded protein remains detectable after this treatment (data not shown).

Figure 2. Analysis of PCNA mutants.

(A) Front and side views of human PCNA protein structure (1axc.pdb, RCSB Protein Data Bank) highlighting the K164 (green) and Y211 (blue) residues. (B) Clonogenic assays. One thousand cells were distributed in each well of a 6-well plate and subjected to UV irradiation (254 nm, 5 J/m²) or left untreated. After 8 days of incubation, the cells were fixed and stained with crystal violet. The PCNA-inactivated cells expressed the wild-type (WT), K164R, or Y211F PCNA proteins from the compensating plasmids, as indicated. (C) The ratio of the number of UV-surviving colonies compared with the untreated cells in four independent experiments is shown. Standard deviation (SD) and statistical significance as determined by Student's *t*-test are shown: NS = nonsignificant; *** *P* < 0.001.



To illustrate the utility of our system for mutational analysis, we tested the complementation potential of two PCNA mutants: K164R and Y211F (6,7) (Figure 2A). Both mutations impair post-translational modifications, but they did not affect the viability of the complemented cells (data not shown). The PCNA K164R mutation has been shown to impair ubiquitination of PCNA in response to UV irradiation, thereby preventing initiation of the DNA damage response (6); in contrast, Y211 phosphorylation has been shown to be involved in PCNA stability (7). We therefore performed a UV sensitivity assay on complemented cells (Figure 2B). Mild UV irradiation (254 nm) efficiently killed the K164R PCNA-complemented cells, while only moderately affecting both WT and Y211F-complemented cells. Under these conditions, the % cell survival dropped from 65% and 80% for the WT and Y211F mutants, respectively, to 0.1% for the K164R mutant, demonstrating that the UV sensitivity phenotype of the

PCNA K164R mutant was detectable using our test (Figure 2C).

Using a pCEP4-compensating plasmid, we are able to compensate for the loss of essential gene functions in HEK293T cells when Cas9 is used to inactivate the corresponding chromosomal copy of the gene. This co-transfection system mimics the classical yeast complementation assay (2), and its application opens the possibility of fast and cheap mutational analysis of essential proteins in living mammalian cells in which the EBNA origin of replication is functional (primate/human or canine). The single-stranded oligodeoxynucleotide donor (ssODN)-mediated gene editing of any gene—including those that are essential—at its endogenous locus is an alternative technique that can be used for the same purpose. Since mutated genes remain under native expression control, this method would be preferable (8). It is, however, much more difficult technically, while our assay is quite easy to carry out.

Author contributions

F.D. performed the experiments. M.D., A.C. performed a critical analysis of the results. E.W., B.C., and M.V. conceived the assay strategy. E.W. and M.V. wrote the paper.

Acknowledgments

This work was supported by funds and/or fellowships from the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Strasbourg, the French Ministry of Research, the Ligue Régionale contre le Cancer (CCIR-GE), and the Fondation ARC n°PJA 20151203337.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

- Doudna, J.A. and E. Charpentier. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096.
- Hazoumé, A., K. Naderi, E. Candolfi, C. Kedinger, B. Chatton, and M. Vigneron. 2011. A genetic analysis of *Plasmodium falciparum* RNA polymerase II subunits in yeast. *Mol. Biochem. Parasitol.* 176:127-130.
- Stoimenov, I. and T. Helleday. 2009. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 37:605-613.
- Baldeck, N., R. Janel-Bintz, J. Wagner, A. Tissier, R.P. Fuchs, P. Burkovics, L. Haracska, E. Despras, et al. 2015. FF483-484 motif of human Pol eta mediates its interaction with the POLD2 subunit of Pol delta and contributes to DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res.* 43:2116-2125.
- Ran, F.A., P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, and F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8:2281-2308.
- Hoegel, C., B. Pfander, G.-L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419:135-141.
- Wang, S.-C., Y. Nakajima, Y.-L. Yu, W. Xia, C.-T. Chen, C.-C. Yang, E.W. McIntush, L.-Y. Li, et al. 2006. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat. Cell Biol.* 8:1359-1368.
- Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B. and Mashimo T. 2016. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun.* 7:10431.

Received 06 October 2016; accepted 08 December 2016.

Address correspondence to Marc Vigneron, Université de Strasbourg, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, CS10413, 67412 Illkirch, Cedex, France. E-mail: marc.vigneron@unistra.fr

To purchase reprints of this article, contact: biotechniques@fosterprinting.com

B) Etude de la viabilité cellulaire et de la sensibilité à des agents génotoxiques des cellules exprimant des protéines PCNA mutantes

1) Observation de la viabilité cellulaire des cellules mutantes pour PCNA

Après avoir validé le système de complémentation fonctionnelle, nous l'avons utilisé afin d'étudier le rôle de résidus de PCNA potentiellement ciblés par des modifications post-traductionnelles. Pour ce faire nous avons utilisé les divers plasmides de complémentation dérivés du plasmide pComp PCNA WT (voir section Résultats A.2.a) que nous avons associé avec le plasmide d'inactivation pCas9 anti-PCNA Puro. Les plasmides de complémentation nous permettent l'expression d'un panel de différentes protéines PCNA mutantes. Le choix de ces mutants de PCNA a été dirigé par des recherches bibliographiques et la collecte de données de spectrométrie de masse. Dans un premier temps, nous avons vérifié si les protéines PCNA mutantes pouvaient compléter ou non l'absence de la protéine PCNA endogène. L'observation de nos cellules co-transfectées nous a permis de juger de la viabilité ou non des mutations de PCNA.

La lignée cellulaire MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains dérivés d'un tissu pulmonaire) a été utilisée comme support pour les co-transfections du plasmide d'inactivation pCas9 anti-PCNA Puro ainsi qu'un des plasmides de complémentation pComp PCNA, le plasmide pComp PCNA WT étant utilisé comme contrôle. 24 heures après la transfection, les cellules sont traitées avec les deux antibiotiques Puromycine et Hygromycine B durant 3 jours puis par la suite uniquement à l'aide d'un seul antibiotique à savoir l'Hygromycine B. Les cellules résistantes sont alors observées du 8^{ème} au 10^{ème} jour post-transfection (Figure 33A). Parmi les 11 mutants de PCNA, 9 d'entre eux (K77R, K80R, Y114F, K117R, D120A, K164R, K168R, Y211F et K248R) permettent de compenser la perte de l'expression de la protéine PCNA endogène et sont donc considérés comme viables. Cependant 2 mutants (D122A et E124A) ne semblent pas assurer une activité fonctionnelle suffisante pour assurer la substitution de la protéine endogène et sont donc considérés comme létaux (Tableau 3).

Mutation de PCNA	K77R	K80R	Y114F	K117R	D120A	D122A	E124A	K164R	K168R	Y211F	K248R
Viable	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓
Létale						☠	☠				

Tableau N°3: Récapitulatif des mutants viables et létaux de la protéine PCNA

Tableau récapitulatif de la capacité ou l'incapacité des mutants de PCNA à se substituer à la protéine PCNA endogène et assurer ainsi la viabilité cellulaire.

Les 2 mutants D122A et E124A présentent un phénotype de mort cellulaire dès le 8^{ème} jour post-transfection. On observe alors un accroissement du volume cytoplasmique et de la taille des noyaux des cellules mutantes. Ces dernières finissent par se détacher du support de culture et meurent à partir du 10^{ème} jour post-transfection.

Ces complémentations fonctionnelles ont également été réalisées à l'aide des cellules HEK 293T. Des extraits protéiques des cellules HEK 293T inactivées pour le gène PCNA et exprimant les protéines PCNA (WT, D120A, D122A et E124A) ont été réalisés 10 jours après la transfection, puis analysés par Western Blot à l'aide des anticorps anti-PCNA et anti-T2A (Figure 33B). La révélation par l'anticorps anti-T2A nous a permis de confirmer la présence des protéines PCNA de complémentation (WT, D120A, D122A et E124A) dans les cellules transfectées. Aucune révélation par l'anticorps anti-T2A n'est observée pour l'extrait protéique des cellules « contrôle » HEK 293T sauvages. Néanmoins on observe bien la présence de la protéine PCNA endogène à l'aide de l'anticorps anti-PCNA (PC10).

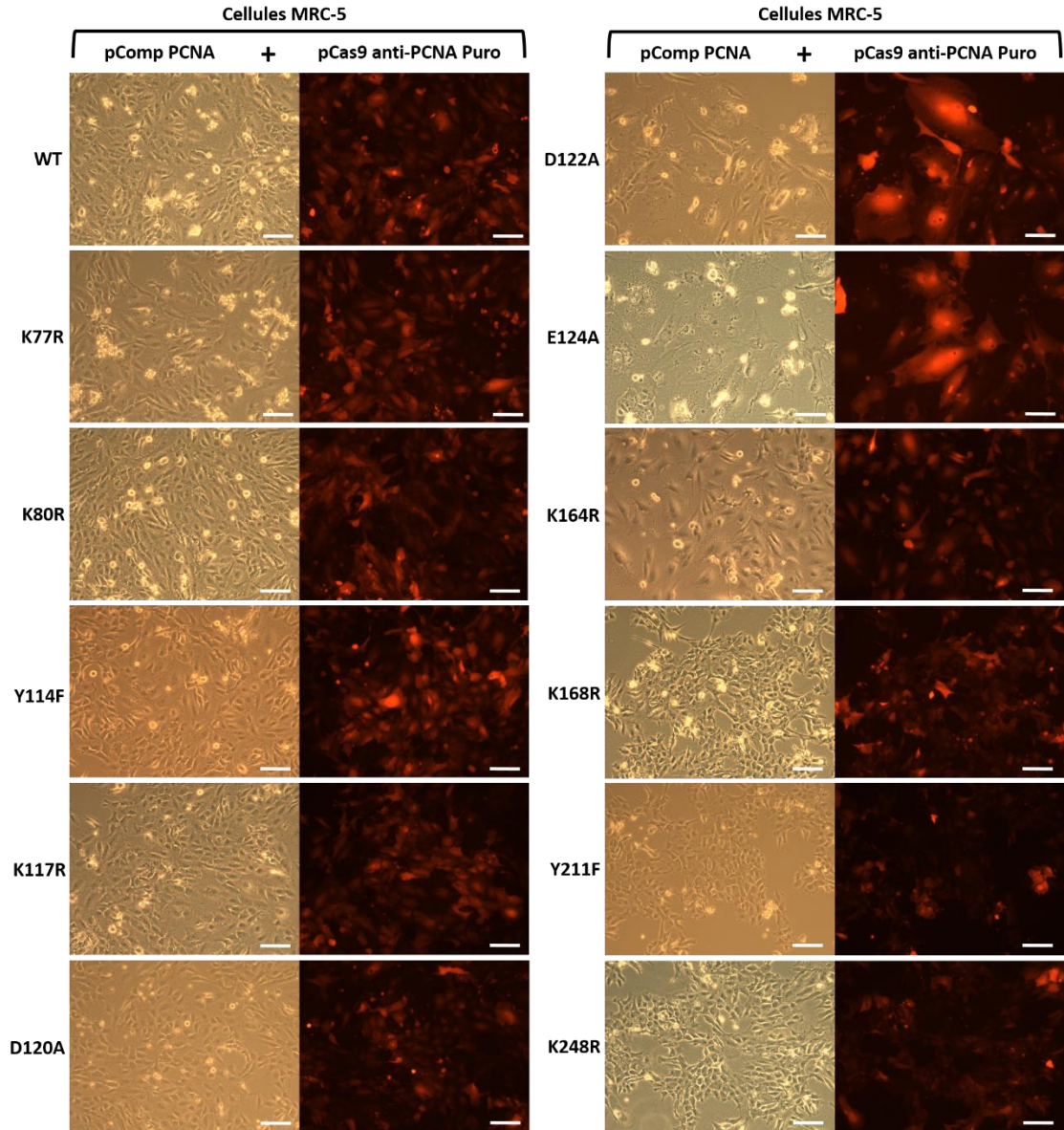
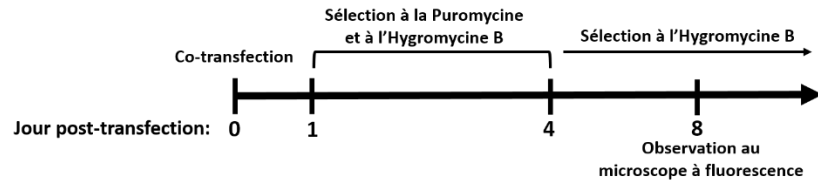
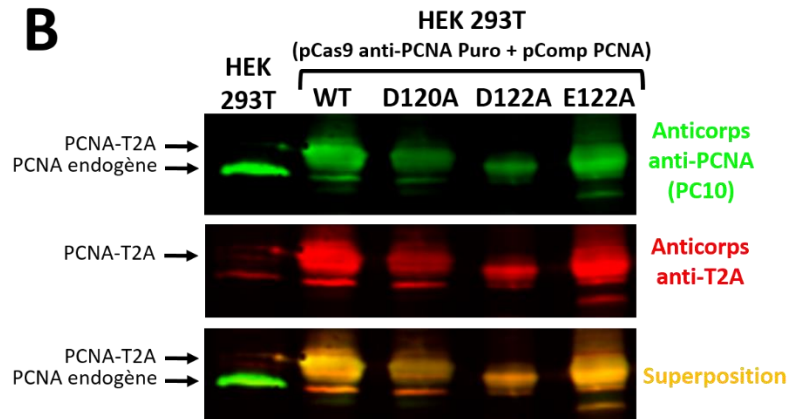
A**B**

Figure 33: Observation de la viabilité cellulaire suite à la substitution de la protéine PCNA endogène par des formes mutantes de PCNA

A Des cellules MRC-5 sont co-transfectées à l'aide du plasmide pCas9 anti-PCNA Puro et de l'un des plasmides pComp PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, D120A, D122A, E124A, K164R, K168R, Y211F ou K248R). 24 heures après la transfection, les cellules sont traitées avec les deux antibiotiques Puromycine et Hygromycine B durant 3 jours puis par la suite uniquement à l'aide d'un seul antibiotique à savoir l'Hygromycine B. Les cellules résistantes sont observées par microscopie en contraste de phase et par microscopie à fluorescence au 8^{ème} jour post-transfection. Parmi la liste des 11 mutants de PCNA, 9 d'entre eux (K77R, K80R, Y114F, K117R, D120A, K164R, K168R, Y211F et K248R) sont viables et 2 mutants (D122A et E124A) sont létaux. **B** Des cellules HEK 293T sont co-transfectées à l'aide du plasmide pCas9 anti-PCNA Puro et de l'un des plasmides pComp PCNA (WT, D120A, D122A et E124A). 24 heures après la transfection, les cellules sont traitées avec les deux antibiotiques Puromycine et Hygromycine B durant 3 jours puis par la suite uniquement à l'aide d'un seul antibiotique à savoir l'Hygromycine B. 10 jour après la transfection, des extraits protéiques ont été réalisés, puis analysés par Western Blot à l'aide des anticorps anti-PCNA (PC10) et anti-T2A.

2) Tests de sensibilités à des agents génotoxiques des cellules mutantes pour la protéine PCNA

L'utilisation de notre système de complémentation fonctionnelle de la protéine PCNA nous a permis de juger de la viabilité ou non des mutants de PCNA. La réussite de la substitution de la protéine PCNA endogène par une forme mutante implique que le résidu muté n'est pas impliqué dans une des activités critiques de PCNA pour la survie cellulaire. Cependant le résidu muté peut très bien être impliqué dans une activité non essentielle à la survie cellulaire.

Nous avons donc fait subir des tests de stress génotoxique à des cellules HEK 293T inactivées pour le gène PCNA et exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K164R, K168R, Y211F et K248R). Le stress génotoxique a été induit soit par l'utilisation de l'agent mutagène Méthanesulfonate de méthyle (MMS), soit par l'irradiation des cellules aux UV. Nous avons ainsi tenté de révéler une éventuelle accentuation de la sensibilité des cellules mutantes face au stress génotoxique afin de révéler un éventuel dysfonctionnement dans les mécanismes de réparation ou de « by-pass » de ces dommages à l'ADN (TLS).

a) Test de sensibilité au MMS

Les cellules HEK 293T exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K164R, K168R, Y211F et K248R) ont été incubées 1 heure en présence de différentes concentrations de MMS. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont fixées puis révélées par une coloration au cristal violet (Figure 34). Le MMS est un agent alkylant qui provoque la méthylation de l'ADN sur les positions N7-désoxyguanosine et N3-désoxyadénosine. Ces méthylations induisent le blocage de la

progression des fourches de réplication (Lundin et al., 2005) et entraînent ainsi un stress réplicatif au sein des cellules traitées par l'agent alkylant. La concentration de 1,8 mM de l'agent MMS correspond à la concentration minimale qui provoque la mort cellulaire pour les cellules exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K168R, Y211F et K248R). L'unique type cellulaire qui déroge à cette règle est représenté par les cellules mutantes qui expriment la protéine PCNA K164R. Ces dernières présentent une diminution de la viabilité cellulaire pour une concentration égale à $1,8 \cdot 10^{-3}$ mM et meurent à la concentration de $1,8 \cdot 10^{-1}$ mM de l'agent mutagène MMS. Cette sensibilité accrue des cellules mutantes PCNA K164R à l'agent MMS a déjà été décrite (Niimi et al., 2008).

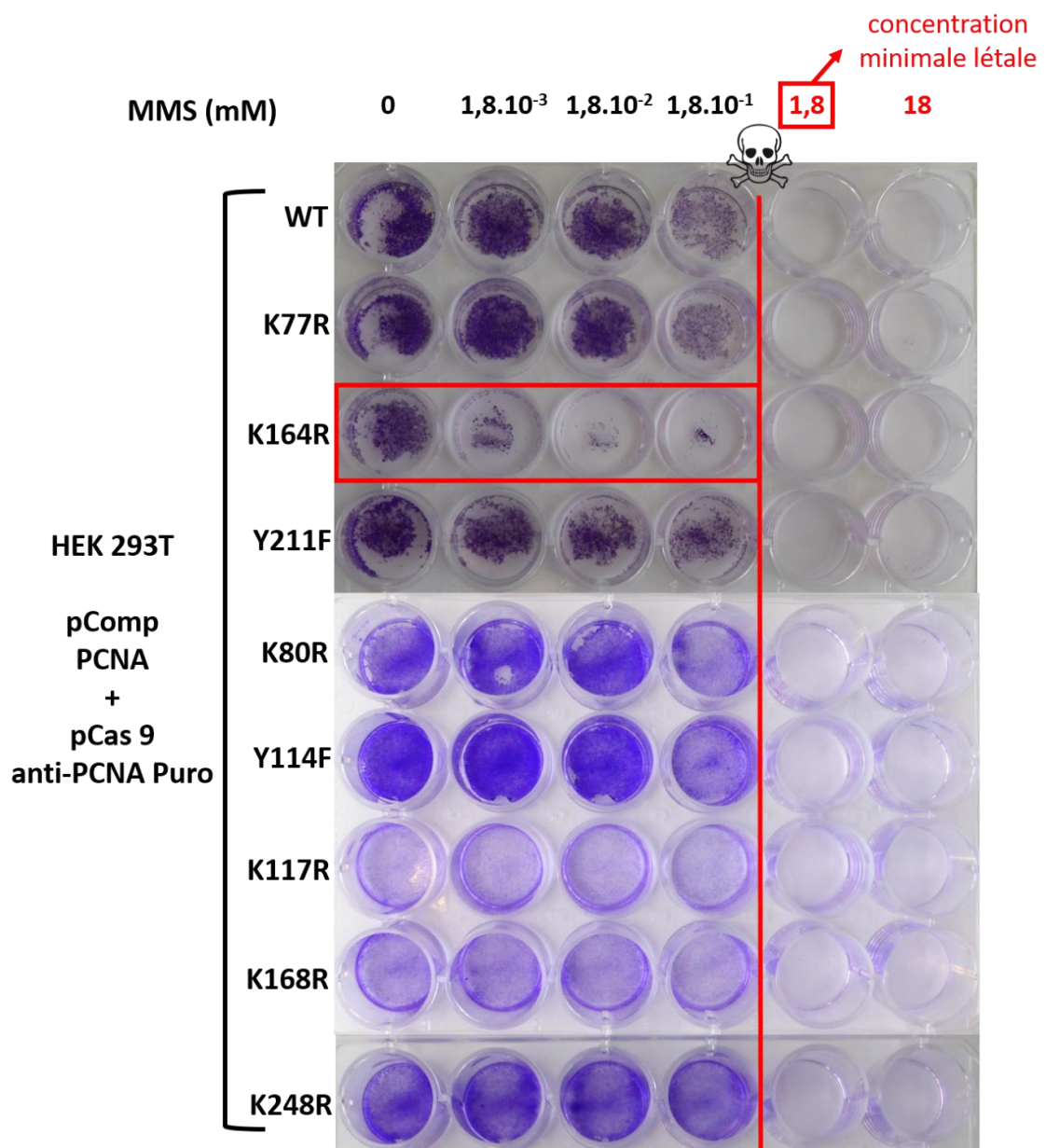


Figure 34: Test de sensibilité des cellules mutantes pour PCNA à l'agent mutagène MMS

Des cellules HEK 293T inactivées pour le gène PCNA et exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K164R, K168R, Y211F et K248R) ont été réparties dans 6 puits de culture cellulaire. Pour chaque type cellulaire, le nombre de cellules incubées dans les 6 puits est équivalent. Les cellules ont été traitées durant 1h avec des concentrations différentes. Chaque puits correspond à l'une de ces concentrations: $0/1,8.10^{-3}/1,8.10^{-2}/1,8.10^{-1}/1,8/18$ mM. Après 24h d'incubation, les cellules sont fixées puis révélées par une coloration au cristal violet. Les cellules HEK 293T exprimant les protéines (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K168R, Y211F et K248R) survivent jusqu'à une concentration égale à $1,8.10^{-1}$ mM de MMS et meurent à partir de la concentration de 1,8 mM de MMS. Les cellules HEK 293T exprimant la protéine mutante PCNA K164R présentent une sensibilité accrue à l'agent MMS. En effet, on observe une diminution de la viabilité cellulaire à partir de la concentration de $1,8.10^{-3}$ mM et une forte mort cellulaire dès l'utilisation de la concentration égale à $1,8.10^{-1}$ mM de MMS.

b) Test de sensibilité aux UV

Le test de sensibilité à l'agent mutagène MMS ne révélant pas de sensibilité particulière hormis pour les cellules HEK 293T exprimant la protéine mutante PCNA K164R, nous avons voulu réaliser un test de sensibilité aux UV. Les UV provoquent des dommages à l'ADN tels que la formation de dimères de thymines ou la naissance de photoproduits 6-4 pyrimidine-pyrimidones. Ces dommages à l'ADN ralentissent les ADN polymérase et provoquent un blocage de la réplication de l'ADN lorsque ces derniers sont présents en trop grande quantité, entraînant alors un stress répliatif. Il est à noter que les cellules mutantes exprimant la protéine PCNA K164R sont décrites dans la littérature comme fortement sensibles aux UV. Cette sensibilité est causée par une altération du mécanisme de la synthèse translésionnelle (Hendel et al., 2011). Ces résultats ont également été confirmés par notre laboratoire (Dietsch et al., 2017) (voir section Résultats A.4)

Les cellules HEK 293T exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K164R, K168R, Y211F et K248R) ont été incubées puis traitées ou non par les UV (5 Joules/m²). Après 72 heures d'incubation, les cellules sont fixées puis révélées par une coloration au cristal violet (Figure 35). Seules les cellules mutantes exprimant la protéine PCNA K164R présentent une sensibilité notable à l'irradiation aux UV. L'effet de l'irradiation sur les cellules HEK 293T exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K168R, Y211F et K248R) est négligeable.

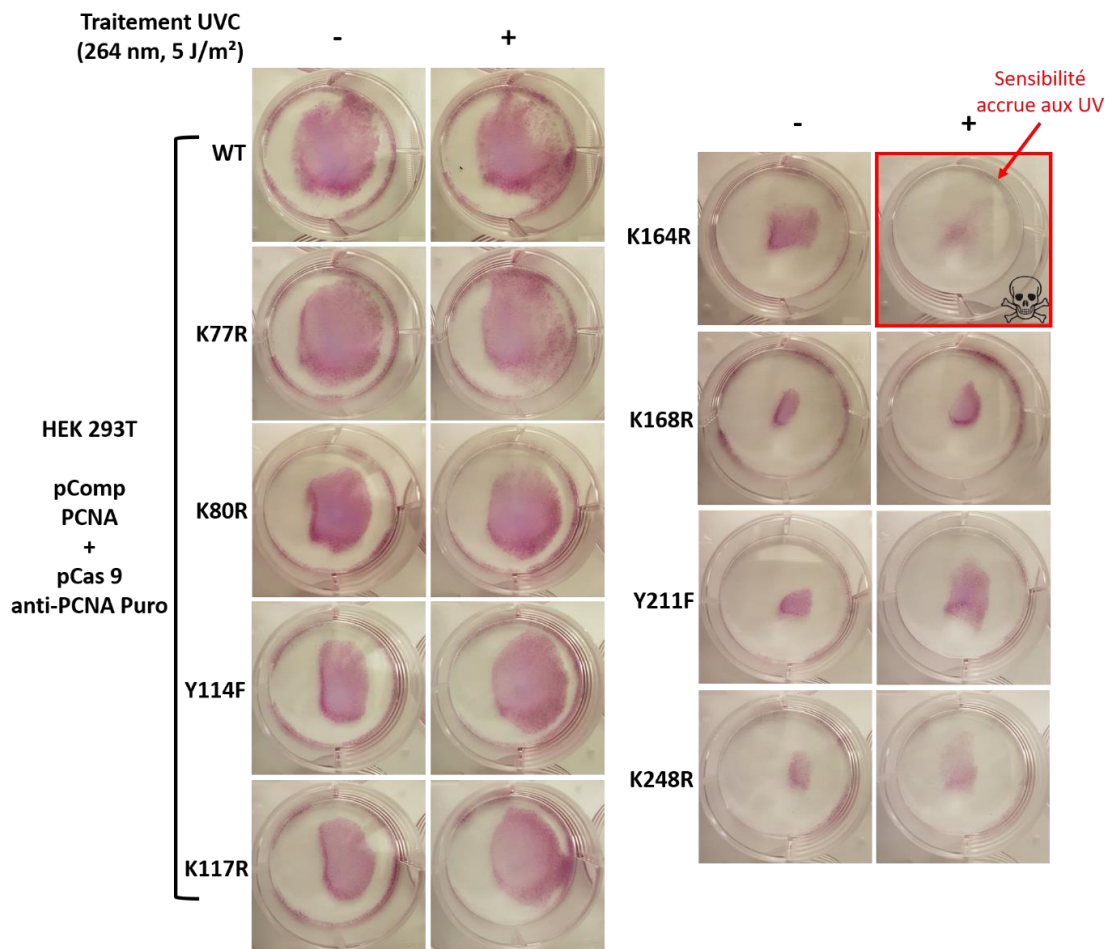


Figure 35: Test de la sensibilité aux UV des cellules mutantes pour PCNA

Des cellules HEK 293T inactivées pour le gène PCNA exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K164R, K168R, Y211F et K248R) ont été dispatchées dans 2 puits de culture cellulaire. Pour chaque type cellulaire, le nombre de cellules incubées dans les 2 puits est équivalent. Les cellules ont subi ou non une irradiation par des UVC (254 nm, 5 Joules/m²). Après 72 heures d'incubation, les cellules sont fixées puis révélées par une coloration au cristal violet. Les cellules HEK 293T exprimant les protéines PCNA (WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, K168R, Y211F et K248R) ne présentent pas de sensibilité particulière à l'irradiation par UV, cependant on observe une forte sensibilité des cellules HEK 293T exprimant la protéine PCNA K164R.

3) Etude de la viabilité des cellules mutantes pour la protéine PCNA D122E, D122N, E124D et E124Q

Les tests de sensibilité au MMS et aux UV étant négatifs pour l'ensemble des mutants viables de PCNA à l'exception du mutant PCNA K164R, nous nous sommes concentrés sur l'étude des deux mutants létaux à savoir PCNA D122A et E124A. Nous avons voulu comprendre comment les substitutions de l'acide aspartique et de l'acide glutamique par une alanine (D122A et E124A) pouvaient causer la mort cellulaire. Nous avons cherché une éventuelle implication des charges ou encore de la structure de la chaîne latérale des résidus D122 et E124 (Figure 36). Nous avons ainsi produit 4

nouveaux plasmides de complémentation permettant l'expression des protéines PCNA D122N, D122E, E124Q et E124D. L'acide aspartique ainsi que l'acide glutamique possèdent au niveau de leurs chaînes latérales un groupement carboxylate (COO⁻) qui peut être potentiellement la cible de modifications post-traductionnelles telle que la PARylation. La substitution de la protéine PCNA sauvage par le mutant de PCNA D122A ou E124A, provoque le remplacement du groupement carboxylate par un groupement méthyle (CH₃). Ce dernier correspond à la chaîne latérale de l'alanine. Ainsi, la structure et la charge des acides aminés aux positions 122 et 124 n'est plus du tout comparable entre la protéine PCNA sauvage et ces mutants.

Nous avons voulu mimer la structure de l'acide aspartique et de l'acide glutamique en les remplaçant respectivement par l'asparagine et la glutamine. Les mutants D122N et E124Q se rapprochent structuralement de la protéine PCNA WT, cependant la charge n'est pas équivalente. Nous avons également voulu mimer la charge de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. Pour ce faire nous avons remplacé l'acide aspartique par l'acide glutamique et vice versa. Les mutants D122E et E124D possèdent ainsi la même charge que la protéine PCNA sauvage, cependant la structure des acides aminés en position 122 et 124 n'est pas tout à fait équivalente. En effet, la chaîne latérale de l'acide glutamique possède un CH₂ supplémentaire par rapport à la chaîne latérale de l'acide aspartique.

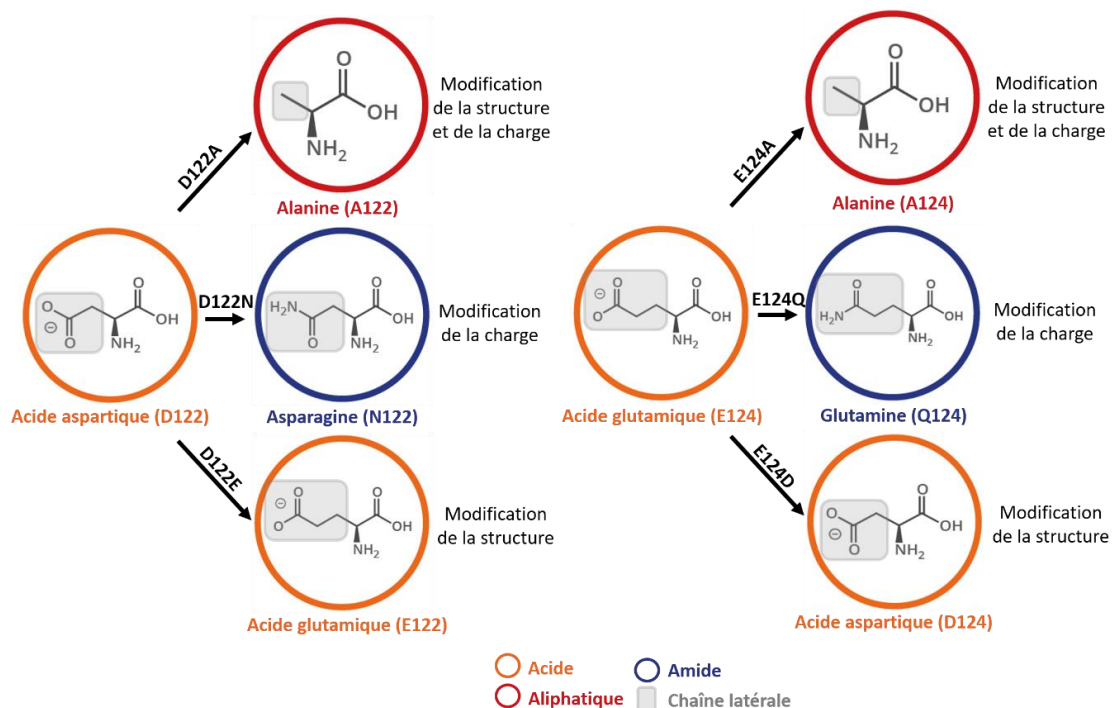


Figure 36: Mutants de PCNA D122A, D122N, D122E, E124A, E124Q et E124D

Comparaison de la structure et de la charge entre les différents mutants de la protéine PCNA (D122A, D122N, D122E, E124A, E124Q et E124D). Les mutants de PCNA D122A et E124A présentent une alanine comme substituant respectivement de l'acide aspartique (D122) et de l'acide glutamique (E124). L'alanine est différente de par sa charge et de par sa structure avec l'acide aspartique et l'acide glutamique. Les mutants D122N et E124Q se rapprochent structurellement de la protéine PCNA sauvage, cependant la charge n'est pas équivalente. Les groupements carboxylates de l'acide aspartique et de l'acide glutamique ne sont pas présents ni sur l'asparagine ni sur la glutamine. Les mutants D122E et E124D possèdent la même charge que la protéine PCNA WT, cependant la structure des acides aminés en position 122 et 124 n'est pas tout à fait équivalente. La chaîne latérale de l'acide glutamique possède un CH₂ supplémentaire par rapport à la chaîne latérale de l'acide aspartique.

Nous avons testé l'efficacité de complémentation des mutants de PCNA D122N, D122E, E124Q et E124D que nous avons comparé aux mutants dit « létaux » PCNA D122A et E124A et à la protéine « contrôle » PCNA WT. Suite à la co-transfection, les cellules MRC-5 sont incubées durant 24 heures. Après l'incubation, les cellules sont traitées avec de la Puromycine et de l'Hygromycine B pendant 3 jours puis uniquement par de l'Hygromycine B. Les cellules MRC-5 sont observées du 8^{ème} au 10^{ème} jour post-transfection (Figure 37). Les mutants de PCNA D122E, E124Q et E124D permettent de compenser la perte de l'expression de la protéine PCNA endogène. En effet, les cellules exprimant ces mutants de PCNA ne présentent pas de phénotype de mort cellulaire au 8^{ème} jour post-transfection. Les mutants D122E, E124Q et E124D sont donc considérés comme viables. Cependant les cellules exprimant la forme PCNA mutante D122N présente le même phénotype de mort cellulaire que les cellules « contrôle » exprimant les protéines PCNA D122A et E124A. Le mutant PCNA D122N est donc considéré comme létal (Tableau 4).

Mutation de PCNA	D122A	D122N	D122E	E124A	E124Q	E124D
Viable			✓		✓	✓
Létale	☠	☠		☠		

Tableau N°4: Récapitulatif de la viabilité des mutants de l'acide aspartique n°122 et de l'acide glutamique n°124 de PCNA

Tableau récapitulatif de la capacité ou l'incapacité des mutants de PCNA D122A, D122N, D122E, E124A, E124Q et E124D à substituer la protéine PCNA endogène au sein de cellules en culture.

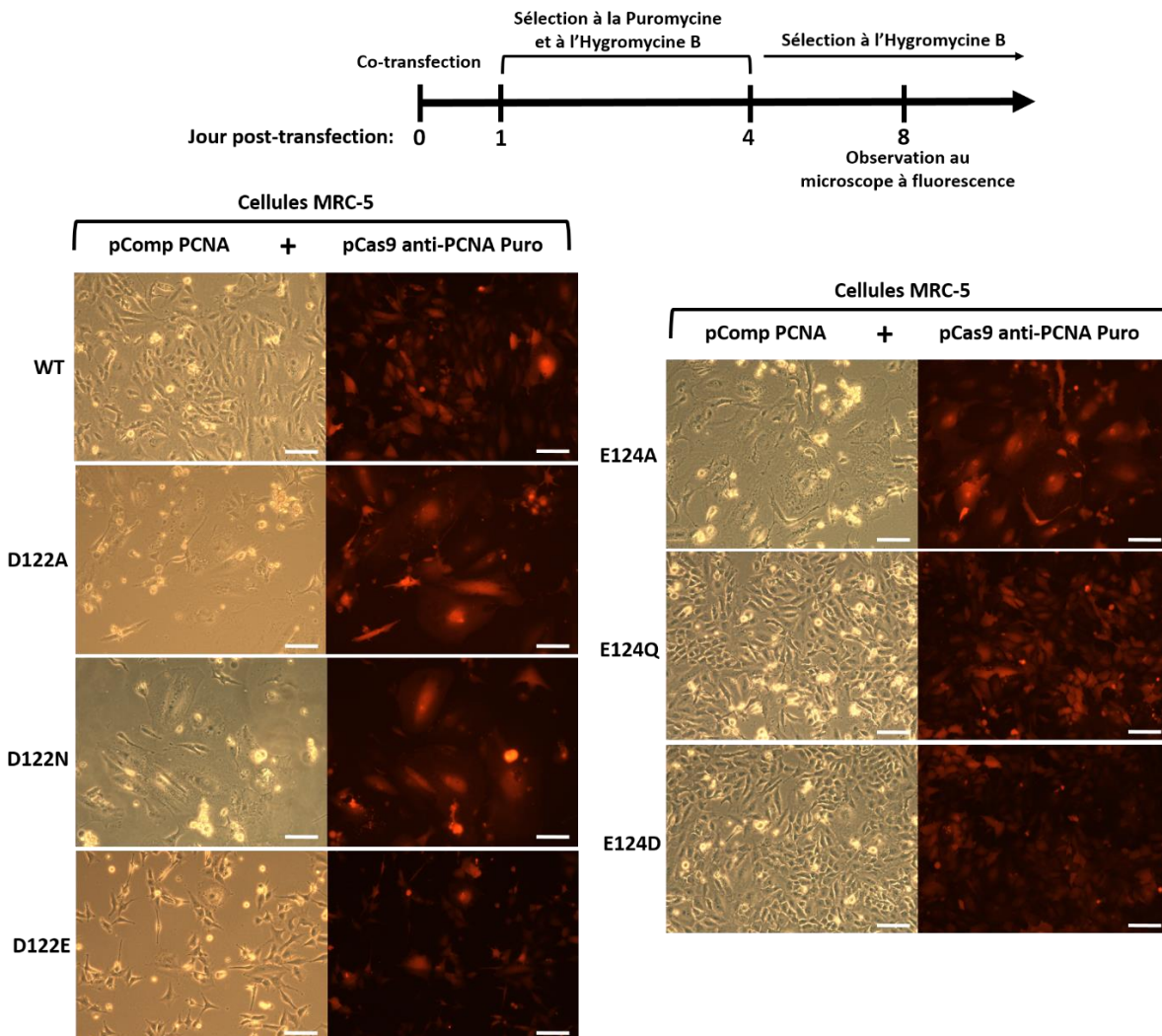


Figure 37: Observation de la viabilité cellulaire suite à la substitution de la protéine PCNA endogène par les mutants de PCNA D122A/D122N/D122E/E124A/E124Q/E124D

Les cellules MRC-5 sont co-transfectées à l'aide des plasmides pCas9 anti-PCNA Puro et l'un des plasmides pComp PCNA (WT/D122A/D122N/D122E/E124A/E124Q/E124D). Suite à la co-transfection, les cellules MRC-5 sont incubées durant 24 heures. Après l'incubation, les cellules sont traitées avec de la Puromycine et de l'Hygromycine B pendant 3 jours puis uniquement par de l'Hygromycine B. Au 8^{ème} jour post-transfection, les cellules sont observées au microscope à fluorescence. Les mutants de PCNA D122E, E124Q et E124D sont viables tandis que les mutants de PCNA D122A, D122N et E124A sont létaux.

Ces résultats indiquent que le groupement carboxylate au niveau de l'acide aminé n°122 de la protéine PCNA semble être essentiel pour une activité critique de PCNA et donc par extension pour la viabilité cellulaire. En effet, le remplacement de l'acide aspartique n°122 par un acide glutamique (possédant également un groupement carboxylate) ne semble pas affecter la viabilité cellulaire, cependant sa substitution par de l'asparagine (possédant un groupement amidique CONH₂ à la place du groupement carboxylate) provoque la mort des cellules.

Le groupement carboxylate de l'acide aminé 124 de la protéine PCNA quant à lui ne semble pas essentiel à la viabilité cellulaire. En effet, le remplacement de l'acide

glutamique n°124 par une glutamine (possédant également un groupement amidique) ne semble pas affecter la viabilité cellulaire. Cependant la structure spatiale de la chaîne latérale de l'acide aminé à la position 124 semble être déterminante pour la viabilité cellulaire. En effet, la substitution de l'acide glutamique à la position 124 par un acide aminé avec une structure spatiale très différente comme l'alanine provoque la mort des cellules tandis que son remplacement par un acide aminé possédant une structure moléculaire très proche comme la glutamine est viable.

Le phénotype de mort cellulaire présenté par les cellules mutantes PCNA D122A, D122N, E124A n'apparaît qu'aux alentours du 8^{ème} jour post-transfection. Ce délai peut être expliqué par le fait que la substitution de la protéine PCNA endogène par la protéine mutante n'est pas immédiate (Figure 38A). Dans un premier temps le gène de PCNA va être invalidé par le système CRISPR-Cas9. L'expression de PCNA n'est alors plus assurée, cependant les cellules contiennent toujours encore un « pool » de protéines endogènes qui va diminuer au fil du temps suite à la dégradation de cette dernière. La diminution de la concentration de PCNA est relativement lente de par sa demi-vie très longue (20 heures) (Yu et al., 2009). En parallèle, l'expression du plasmide de complémentation permet la synthèse de la protéine mutante. La cellule passe alors par une phase où les deux types de protéines endogène et mutante coexistent. Le ratio protéines endogènes/protéines mutantes diminue jusqu'à un seuil limite où l'activité des protéines endogènes n'est plus assurée. En effet les protéines mutantes présentes en trop grande quantité peuvent provoquer une inhibition par compétition. Si les protéines mutantes n'assurent pas les fonctions critiques de PCNA, on observe alors la mort des cellules.

Cette substitution de la protéine endogène par une protéine de complémentation peut être suivie par analyse d'extraits protéiques via Western Blot. Des extraits protéiques de cellules HEK 293T co-transfectées avec les plasmides pCas9 anti-PCNA Puro et pComp PCNA WT ont été analysés par Western Blot au 5^{ème}, 10^{ème} et 15^{ème} jour post-transfection (Figure 38B). L'extrait protéique de cellules HEK 293T sauvages a été utilisé comme contrôle. Au 5^{ème} et 10^{ème} jour post-transfection, on observe la présence des deux types de protéines à savoir la protéine PCNA endogène et la protéine PCNA WT de complémentation. Au 15^{ème} jour post-transfection, on observe uniquement la présence de la protéine PCNA WT de complémentation. Le résultat de ce Western Blot illustre le délai entre la mise en place de la co-transfection et la substitution effective de la protéine endogène par la protéine de complémentation.

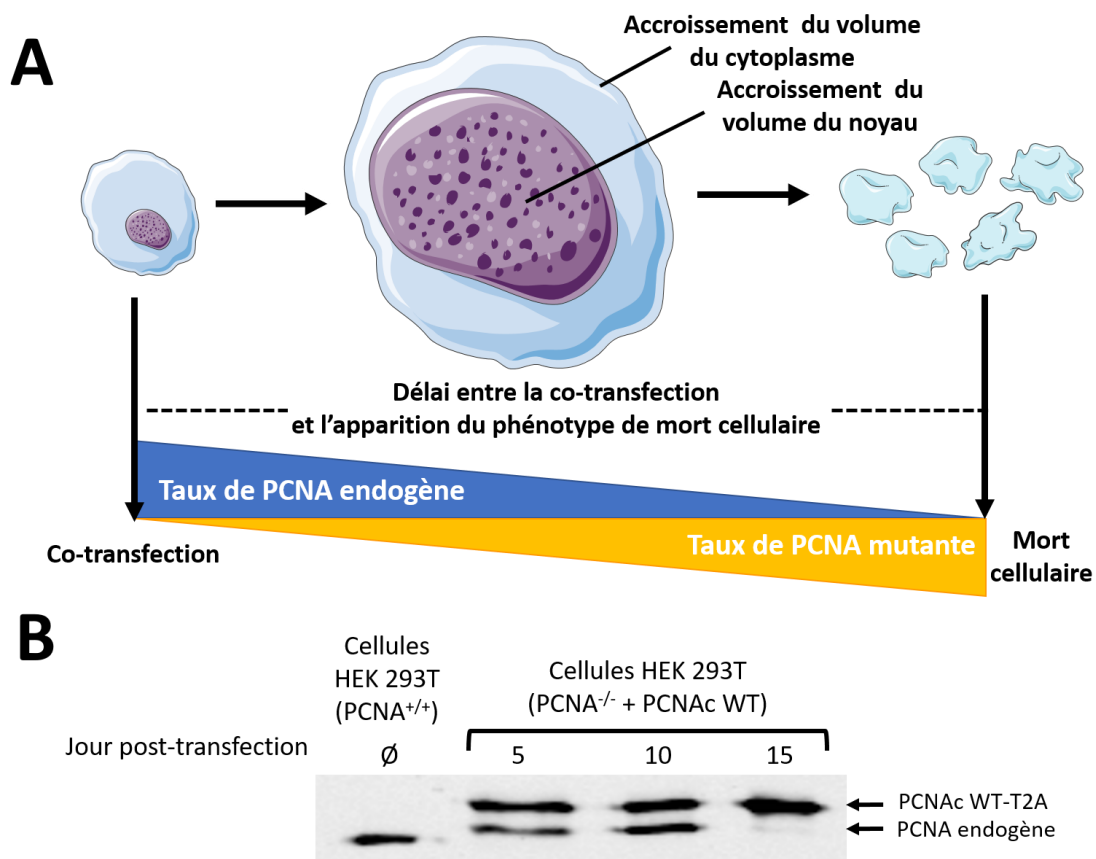


Figure 38: Explication du délai entre la mise en place de la co-transfection et la substitution effective de la protéine endogène par la protéine de complément

A Le phénotype de mort cellulaire présenté par les cellules mutantes PCNA D122A, D122N, E124A n'apparaît qu'aux alentours du 8^{ème} jour post-transfection. En effet, la substitution de la protéine PCNA endogène par la protéine mutante n'est pas immédiate. Le gène de PCNA va être invalidé par le système CRISPR-Cas 9. La concentration des protéines PCNA endogènes diminue dû au principe de « turnover ». En parallèle, l'expression du plasmide de complément permet la synthèse de la protéine mutante. La cellule passe par une phase où les deux types de protéines; endogène et mutante coexistent. Les protéines PCNA endogènes finissent par être substituées par les protéines mutantes. Si ces dernières ne sont pas viables, on observe alors la mort des cellules. **B** Des extraits protéiques de cellules HEK 293T co-transfectées par le couple de plasmides pCas9 anti-PCNA Puro/pComp PCNA WT ont été analysés par Western Blot à l'aide de l'anticorps anti-PCNA (PC10) au 5^{ème}, 10^{ème} et 15^{ème} jour post-transfection. Ces extraits ont été comparés à l'extrait de cellules HEK 293T contrôles non transfectées. Au 5^{ème} et 10^{ème} jour post-transfection, on observe la présence de la protéine PCNA endogène et de la protéine PCNA WT de complément. Au 15^{ème} jour post-transfection, uniquement la protéine PCNA WT de complément est observable. La substitution effective de la protéine endogène par la protéine de complément se situe donc entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour post-transfection.

C) Les protéines PCNA mutantes D122A et E124A dans la réplication de l'ADN

PCNA est une protéine pléiotrope qui est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires (voir section Introduction A.2, A.3, A.4 et A.5). Il est donc difficile de savoir quel est le mécanisme cellulaire altéré à l'origine de la mort des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A. Nous avons observé que ces cellules mutantes présentent un phénotype particulier lors de leur mort cellulaire avec un accroissement fort du volume cytoplasmique et nucléaire. Dans le cas des cellules mutantes exprimant la protéine PCNA D122A, la mort cellulaire serait potentiellement associée à l'absence du groupement carboxylate de l'acide aminé en position 122, alors que pour les cellules exprimant la protéine PCNA D124A, la mort cellulaire serait causée par le changement de la structure spatiale de l'acide aminé en position 124. Nous avons émis une 1^{ère} hypothèse afin de tenter d'expliquer la mort des cellules mutantes, à savoir l'incapacité des mutants de PCNA D122A et E124A à jouer leur rôle de facteur de processivité au sein du mécanisme de réplication de l'ADN.

1) Trimérisation des protéines PCNA mutantes D122A et E124A

Avant d'étudier le rôle fonctionnel des protéines PCNA D122A et E124A dans le mécanisme de réplication de l'ADN, nous avons tout d'abord vérifié que les protéines PCNA mutantes D122A et E124A pouvaient encore s'associer sous forme de trimères. Sans la trimérisation, la protéine PCNA ne peut pas être chargée sur la molécule d'ADN rendant ainsi la protéine inactive. Un cas d'inhibition de la trimérisation d'une protéine PCNA mutante a déjà été décrit dans la littérature. Cette inhibition est causée par une mutation de la tyrosine 114 en alanine (Jónsson et al., 1995).

Les séquences codant les protéines PCNA WT, D122A et E124A ont été clonées au sein d'un plasmide d'expression bactérien de type pET. Une séquence d'ADN codant un « TAG » poly-histidine (correspondant à une succession de six résidus histidine) a été fusionnée à chacune des extrémités 3' des séquences ADN codant les protéines PCNA. Ces vecteurs ont servi à transformer des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) pLys S permettant ainsi l'expression des protéines PCNA WT-his, D122A-his et E124A-his. Des extraits protéiques issus des bactéries en culture ont été réalisés en vue de purifier

les protéines PCNA WT-his, D122A-his et E124A-his par chromatographie d'affinité. La séparation des protéines PCNA-his des autres protéines de l'extrait est permise par l'interaction du « TAG » poly-histidine avec le support en Nickel de la colonne. Les protéines fixées sur la colonne sont ainsi éluées par compétition avec de l'imidazole, puis chargées sur une colonne HiLoad Superdex 200 afin de réaliser une chromatographie d'exclusion. Cette étape a permis d'éliminer les impuretés afin d'obtenir les solutions protéiques les plus pures possibles (Figure 39).

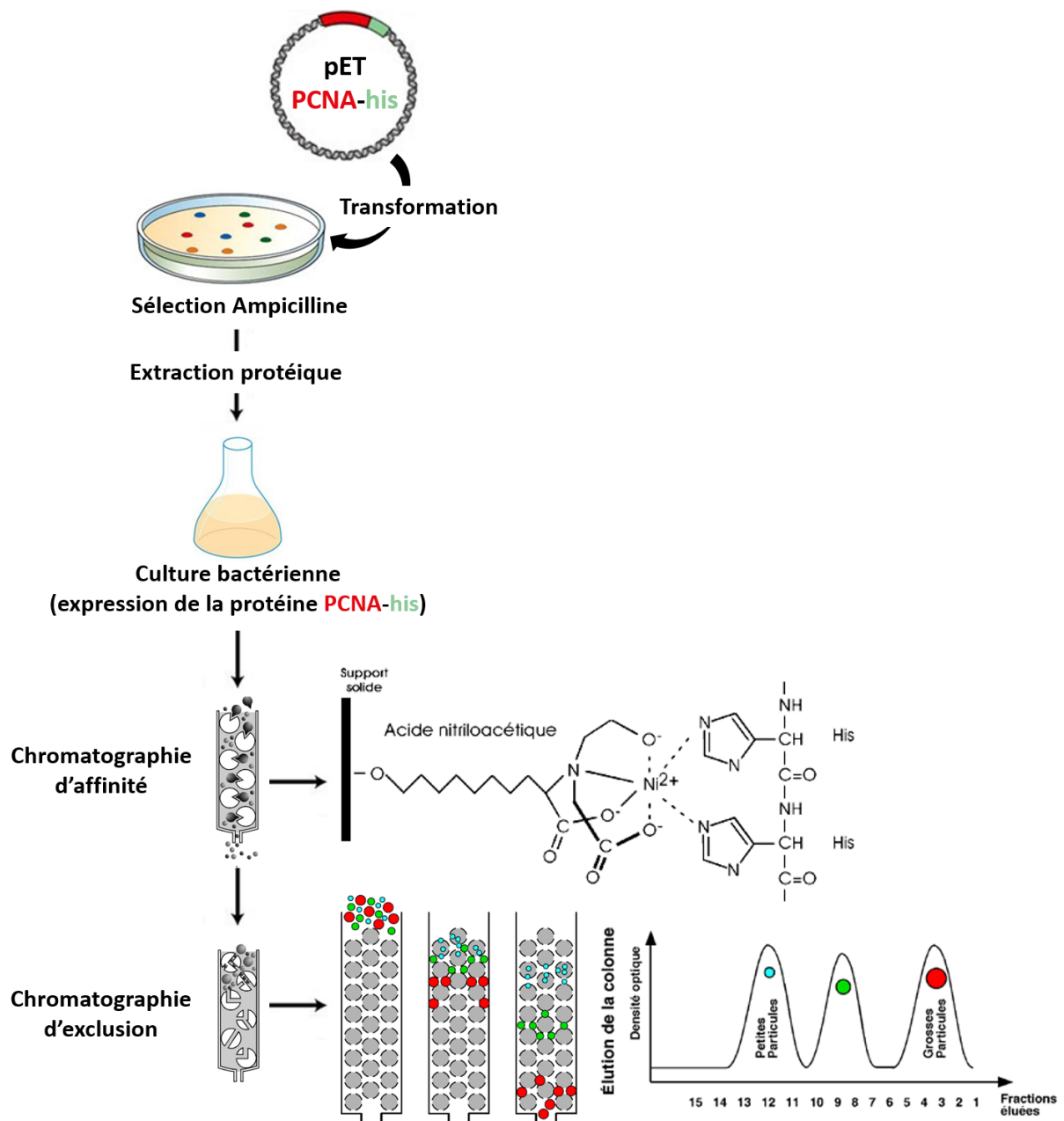


Figure 39: Synthèse des protéines PCNA WT-his et mutantes D122A-his et E124A-his

Nous avons construit des plasmides d'expression bactériens de type pET codant pour les protéines PCNA WT, D122A et E124A suivies d'une séquence poly-his (6 histidines). Des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) pLys S ont été transformées à l'aide des différents types de plasmides pET PCNA-his puis des extraits protéiques ont été réalisés à partir des cultures bactériennes. Les protéines PCNA WT-his, D122A-his et E124A-his ont été isolées par chromatographie d'affinité. Cette séparation des protéines est permise grâce à l'interaction du « TAG » poly-histidine avec le support en Nickel de la colonne. Les protéines fixées sont éluées par compétition avec l'imidazole, puis chargées sur une colonne HiLoad Superdex 200 afin de réaliser une chromatographie d'exclusion permettant de purifier nos protéines.

Les données issues des chromatographies d'exclusion nous ont permis de comparer les profils d'éluion de la protéine PCNA WT et les protéines PCNA mutantes D122A et E124A (Figure 40). Aucune différence notable n'a été observée entre les 3 profils d'éluion. Les protéines sont exclues de la colonne aux mêmes volumes d'éluion. Le profil d'éluion d'un monomère de PCNA et d'un trimère de PCNA n'étant pas identique, nous pouvons ainsi affirmer que les protéines PCNA mutantes D122A et E124A sont capables de former un trimère stable.

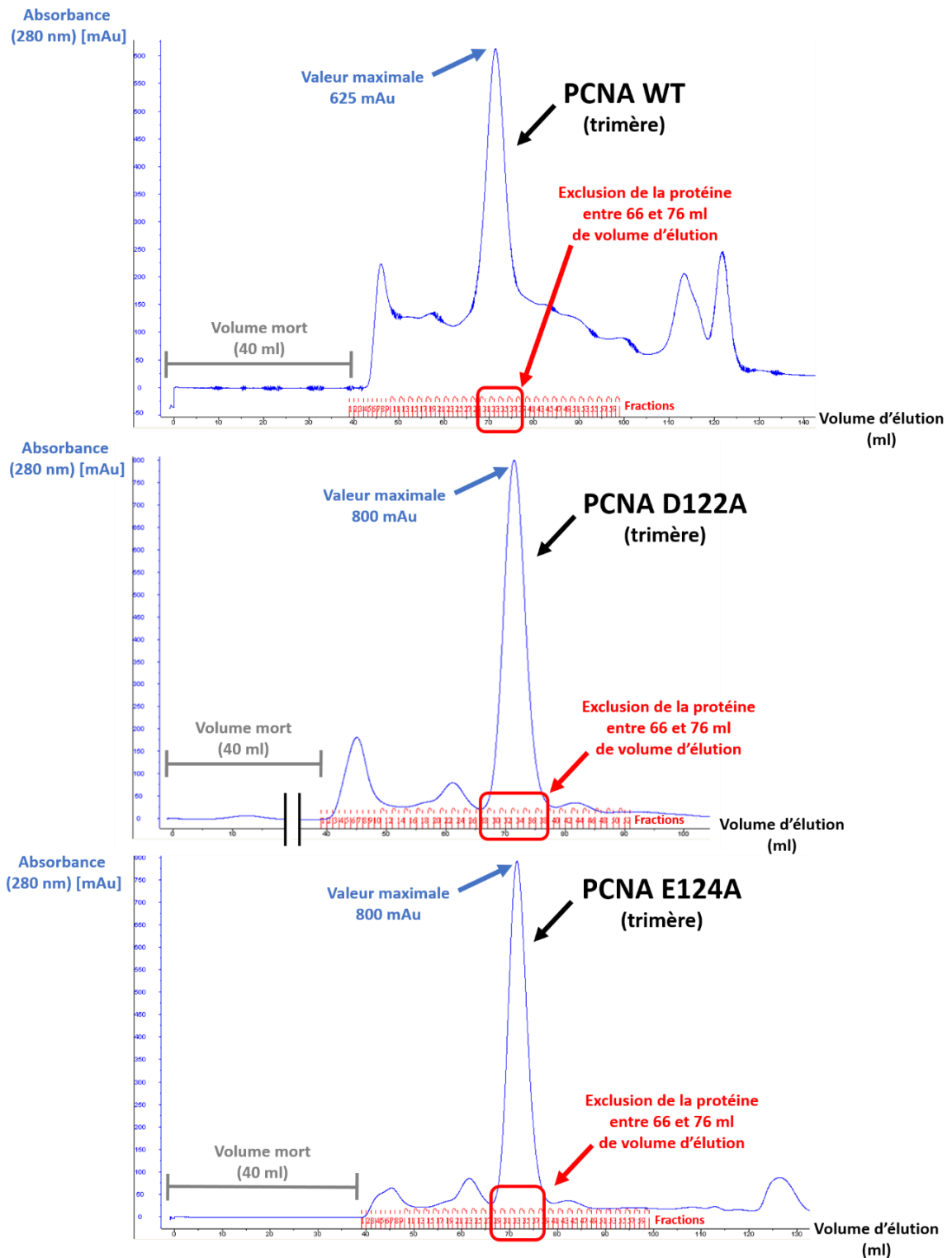


Figure 40: Profils d'élution des protéines PCNA WT-his, D122A-his et E124A-his sur une colonne HiLoad Superdex 200

Les solutions protéiques contenant les protéines PCNA WT-his, D122A-his et E124A-his issues de la chromatographie d'affinité sur colonne de nickel ont été purifiées par chromatographie d'exclusion. Les solutions protéiques ont été déposées sur une colonne HiLoad Superdex 200. Les profils d'élution sont représentés ci-dessus. On observe le même volume d'élution (66-76 ml) nécessaire pour exclure les protéines PCNA WT-his, D122A-his et E124A-his de la colonne. Les 3 protéines sont trimériques.

2) Fixation des protéines PCNA mutantes D122A et E124A sur la chromatine

La capacité des protéines PCNA mutantes D122A et E124A à former des trimères a été validée. Afin de vérifier que ces protéines peuvent être chargées sur l'ADN, nous avons recherché par immunofluorescence la localisation de ces dernières et nous l'avons comparée avec celle de la protéine PCNA WT (Figure 41). Pour ce faire, il a été nécessaire d'identifier la population de PCNA dite « active » qui est chargée sur l'ADN. Des cellules MRC-5 sauvages ainsi que des cellules MRC-5 inactivées pour le gène de PCNA exprimant les protéines PCNA WT, D120A, D122A ou E124A ont d'abord subi un traitement « CSK » (Cytoskeletal buffer). Le tampon CSK contient notamment du détergent Triton x-100 (0,2%) qui permet de perméabiliser les cellules. L'association de ce traitement CSK avec un lavage PBS, permet d'éliminer les protéines dites solubles. Les cellules contiennent alors uniquement les protéines fixées à la chromatine dont fait partie la protéine PCNA. Les cellules sont fixées puis observées par microscopie à fluorescence. La protéine PCNA est révélée à l'aide d'un anticorps anti-PCNA (PC10). Les protéines PCNA mutantes D120A, D122A et E124A se fixent correctement sur la chromatine tout comme la protéine contrôle PCNA WT. Le même résultat est observé pour la protéine PCNA endogène des cellules MRC-5 sauvages. Aucune différence d'intensité du marquage n'a été observée entre les noyaux des cellules mutantes et les noyaux des cellules sauvages. On note cependant encore une fois la présence d'un volume nucléaire important (voir marquage au DAPI) pour les cellules MRC-5 exprimant les protéines PCNA mutantes D122A et E124A. Il est normal de retrouver ce phénotype car les cellules mutantes ont été analysées par immunofluorescence au 8^{ème} jour post-transfection.

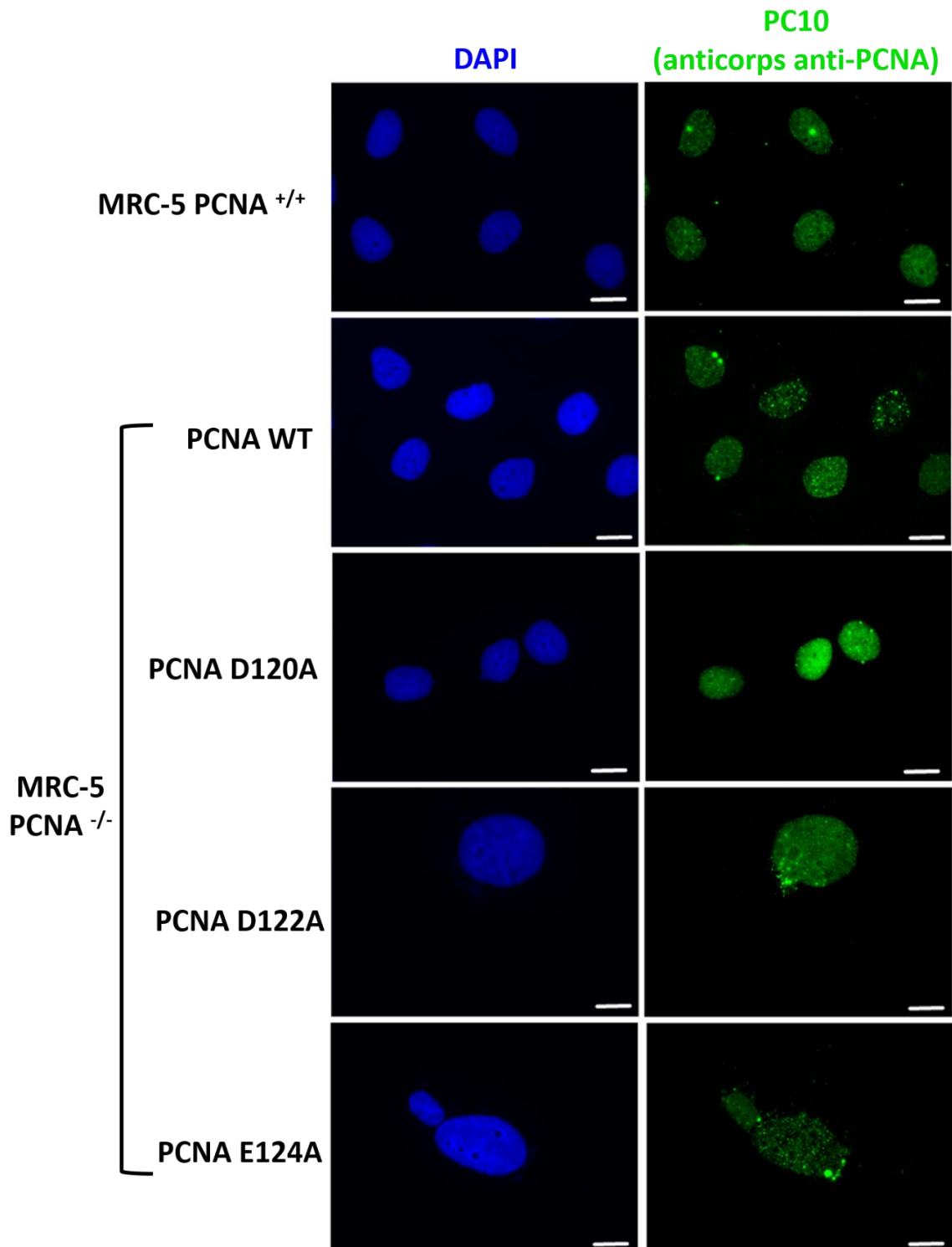


Figure 41: Interaction des protéines PCNA mutantes D122A et E124A avec la chromatine

Des cellules MRC-5 ont été co-transfectées avec le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro et l'un des plasmides de complémentation pComp PCNA WT/D120A/D122A/E124A. Au 8^{ème} jour post-transfection, les cellules sélectionnées (traitement antibiotique) sont perméabilisées par une solution tampon CSK afin d'éliminer les protéines cellulaires solubles. Les cellules ont été observées par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-PCNA: PC10. Les protéines PCNA WT, D120A, D122A et E124A se fixent sur la chromatine tout comme la protéine PCNA endogène au sein des cellules MRC-5 sauvages.

3) Les mutations D122A et E124A de la protéine PCNA n'altèrent pas le mécanisme de réplication de l'ADN *in vitro*

Les protéines PCNA mutantes D122A et E124A ne présentent pas d'altération dans leurs structures trimériques et peuvent être chargées sur la molécule d'ADN. Malgré ces données, nous ne pouvons pas encore affirmer que les protéines PCNA mutantes n'affectent pas le mécanisme de réplication de l'ADN. Nous avons donc réalisé un test de réplication de l'ADN *in vitro* en présence des protéines mutantes D120A, D122A et E124A (Figure 43). Ce test nous a permis de confirmer si oui ou non les protéines PCNA mutantes D122A et E124A assurent encore leurs activités en tant que facteur de processivité.

Afin de mettre en place notre test de réplication de l'ADN *in vitro*, nous avons préparé des extraits cellulaires à partir de cellules en culture de MRC-5. Une partie de ces extraits protéiques a subi une déplétion de la protéine PCNA à l'aide de billes de sépharose couplées au peptide Con1. Ce peptide de 16 acides aminés SAVLQKKITDYFHPKK est dérivé de la séquence protéique correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine p21 et présente une forte affinité pour la protéine PCNA humaine (Zheleva et al., 2000). Une deuxième partie des extraits protéiques n'a pas subi de déplétion de la protéine PCNA, en effet les billes de déplétion utilisées étaient couplées à un peptide n'ayant aucune affinité avec la protéine PCNA (peptide Mock). Le test de réplication *in vitro* consiste en l'utilisation d'un plasmide simple brin pUC118.ss, sur lequel est hybridée une amorce radio-marquée (32 gamma-phosphate) à son extrémité 5' à partir de laquelle nous visualiserons l'élongation (Figure 42). Celle-ci est réalisée en présence d'un extrait de protéines déplété pour la protéine PCNA endogène, et complété à l'aide d'une des protéines PCNA que nous avons purifiées (PCNA WT, D120A, D122A ou E124A) (voir section Résultats C.1). Le but de l'expérience est d'observer si la protéine purifiée est capable ou non d'assurer son rôle de facteur de processivité. Dans le cas où la protéine est fonctionnelle, on observe la synthèse de fragments d'ADN issus de l'extension de l'amorce par l'ADN polymérase δ . Si la protéine ne joue plus son rôle de facteur de processivité, alors aucun fragment d'ADN n'est synthétisé par l'ADN polymérase δ . Les fragments d'ADN synthétisés suite à l'élongation de l'amorce sont de tailles différentes. Ceci est expliqué par la présence de séquences d'ADN qui forment des structures « tiges-boucles » sur l'ensemble du plasmide simple-brin. Lors de l'extension de l'amorce, les structures tiges-boucles

peuvent provoquer dans certains cas la libération prématurée de l'ADN polymérase δ . Suite à l'élongation des amorces, nous avons réalisé une digestion par l'enzyme Pvu II. Deux sites de cette enzyme de restriction sont présents sur le plasmide. Le premier site est retrouvé juste en amont de la séquence complémentaire à l'amorce. Le deuxième site quant à lui est situé à 322 nucléotides en aval. Afin de confirmer l'efficacité de la réplication de l'ADN, nous avons cherché à détecter la présence du fragment d'ADN de 322 nucléotides issu de la digestion par PvuII. Ce fragment d'ADN représente le témoin d'une réplication complète du plasmide.

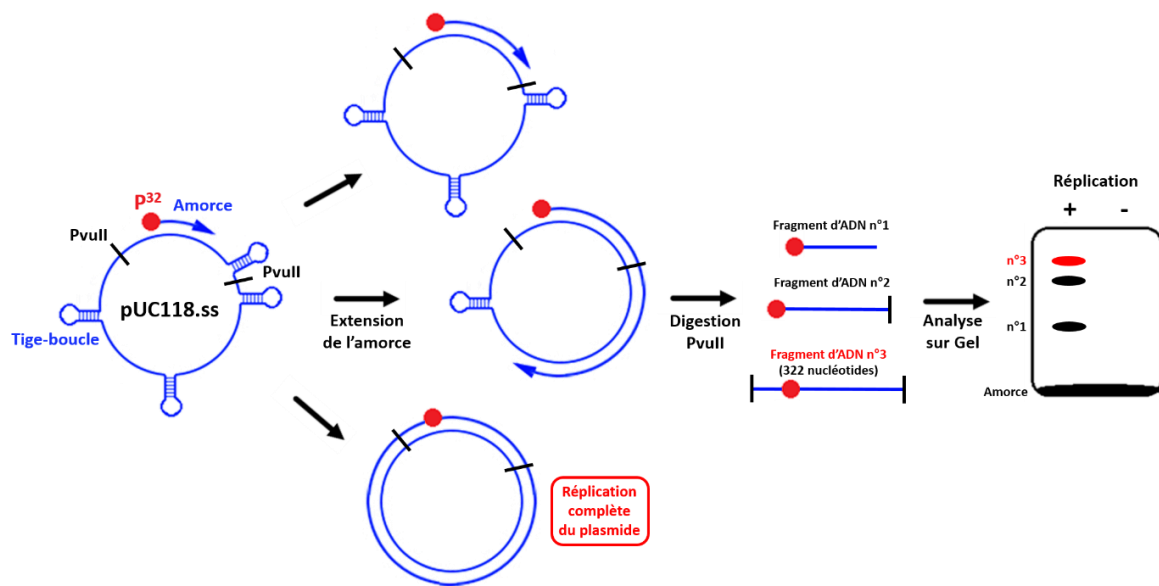


Figure 42: Schéma récapitulatif du test d'élongation de l'amorce couplée au plasmide pUC118.ss

Un test d'élongation d'amorce couplée au plasmide pUC118.ss a été réalisé afin de tester la réplication de l'ADN en présence des protéines de synthèse PCNA WT, D120A, D122A et E124A. Le plasmide couplé à l'amorce radioactive est mis en présence avec un extrait de protéines des cellules MRC-5 déplété pour la protéine PCNA endogène puis complété à l'aide d'une des protéines de synthèse. Après extension des amorces, on digère l'ADN double-brin néoformé par l'enzyme PvuII. Deux sites de cette enzyme de restriction sont présents sur le plasmide pUC118.ss. Un site est retrouvé en amont de la séquence complémentaire à l'amorce et le deuxième site est situé à 322 nucléotides en aval. Si la réplication de l'ADN est fonctionnelle (+), on observe la synthèse de fragments d'ADN de différentes tailles dont un fragment de 322 nucléotides. Ce fragment d'ADN de 322 nucléotides représente le témoin d'une réplication du plasmide au complet. Dans le cas où la réplication de l'ADN n'est pas fonctionnelle (-), aucun fragment d'ADN n'est alors synthétisé.

En présence des protéines de synthèse PCNA WT, D120A, D122A et E124A, l'élongation des amorces couplées aux plasmides pUC118.ss est fonctionnelle (Figure 43A). En effet, on observe sur gel de polyacrylamide dénaturant la présence de fragments d'ADN et notamment un fragment de 322 nucléotides de longueur. Des résultats identiques ont été observés lors de l'utilisation d'un extrait protéique complet non déplété en PCNA endogène (extrait Mock). Cependant aucun fragment d'ADN n'est observé pour la condition mettant en jeu uniquement un extrait déplété en PCNA

endogène. En effet, en absence de la protéine PCNA, aucune élongation de l'amorce n'est initiée par l'ADN polymérase δ . Ces données permettent d'affirmer que les protéines mutantes D122A et E124A assurent leurs rôles de facteur de processivité *in vitro*.

Des analyses par Western Blot d'aliquots des réactions ont été réalisées (Figure 43B). La protéine PCNA a été révélée à l'aide d'un anticorps anti PCNA (PC10). Nous avons pu vérifier que les quantités de protéines PCNA WT, D120A, D122A et E124A utilisées étaient équivalentes dans l'ensemble des conditions. Nous avons également vérifié l'absence de la protéine PCNA dans la réaction utilisant l'extrait protéique déplété pour cette dernière. La révélation de la sous-unité p125 de l'ADN polymérase δ via l'anticorps anti-p125 a permis de confirmer que la quantité d'extrait de protéine était équivalent dans l'ensemble des conditions.

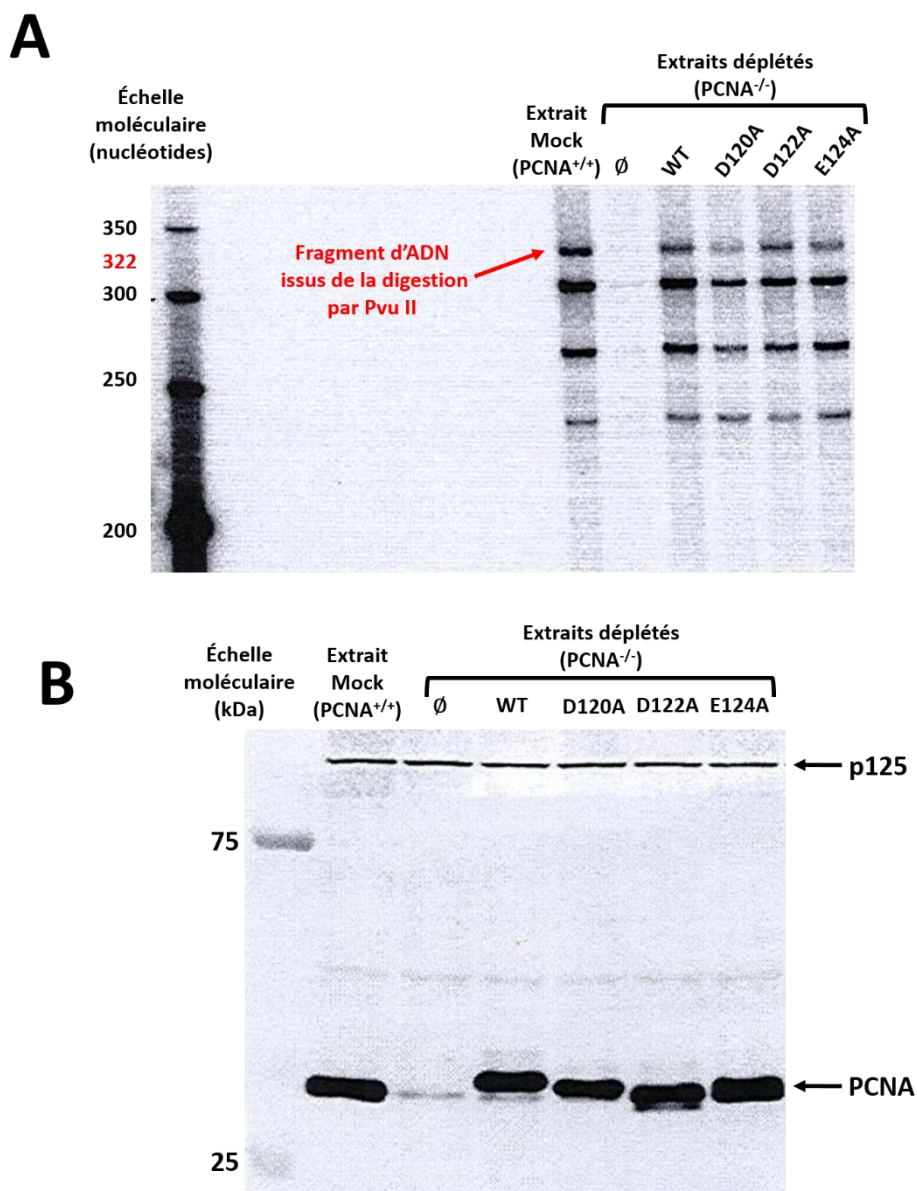


Figure 43: Test de réplication de l'ADN *in vitro* en présence des protéines PCNA mutantes D120A, D122A et E124A

A Le test de réplication *in vitro* a été réalisé à l'aide d'un extrait protéique déplété pour la protéine PCNA endogène et complété avec des protéines PCNA purifiées WT, D120A, D122A ou E124A. **B** Des analyses par Western Blot des aliquots des réactions ont été réalisées à l'aide d'anticorps anti-PCNA (PC10) et anti-p125. Les quantités de protéines PCNA endogène, WT, D120A, D122A et E124A sont équivalentes dans l'ensemble des conditions. L'absence de la protéine PCNA dans l'extrait protéique déplété pour cette dernière a été confirmée. La révélation de la sous-unité p125 de l'ADN polymérase δ via l'anticorps anti-p125 a permis de confirmer que la quantité d'extrait de protéine était équivalente dans l'ensemble des conditions.

4) Les cellules mutantes PCNA D122A et E124A présentent des cassures double-brins à l'ADN

Nous avons prouvé que les protéines PCNA mutantes D122A et E124A possèdent la capacité de se trimériser. Ces dernières peuvent être chargées sur la chromatine et ne

semblent pas avoir perdu leurs rôles de facteur de processivité *in vitro*. Nous en avons donc déduit que le mécanisme de réplication de l'ADN ne semble pas être altéré au sein des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A. Cependant d'autres mécanismes cellulaires critiques mettent en jeu la protéine PCNA. L'altération d'un de ces mécanismes est à l'origine de la mort des cellules mutantes.

Les cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A ont été observées par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX) (Figure 44). Cette forme phosphorylée de l'histone H2AX représente un biomarqueur des cassures double-brins de l'ADN (Kuo et al., 2008). En effet, une cassure double-brin de l'ADN entraîne la phosphorylation de l'histone H2AX par des kinases telles qu'ATM (ataxia telangiectasia mutated) ou ATR (ATM-Rad3-related). Cette phosphorylation permet de recruter les protéines nécessaires à la mise en place du mécanisme de réparation des cassures double-brins. Sans stress cellulaire particulier, le taux de γ -H2AX présent dans les cellules est très faible.

Les cellules MRC-5 inactivées pour le gène de PCNA et complémentées avec les protéines PCNA WT ou PCNA D120A ne présentent que très peu de γ -H2AX. Le marquage par l'anticorps anti- γ -H2AX est à peine détectable tout comme le marquage des cellules MRC-5 sauvages. Cependant on note une forte présence de γ -H2AX au sein des cellules MRC-5 inactivées pour le gène de PCNA et complémentées avec les protéines PCNA D122A ou PCNA E124A tout comme pour les cellules MRC-5 « contrôle » ayant subi une irradiation aux UVC (254 nm, 5 Joules/m²). Ce fort taux de γ -H2AX témoigne d'un très grand nombre de cassures double-brins de l'ADN au sein des cellules mutantes exprimant la protéine PCNA D122A et E124A. A ce stade nous ne pouvons pas déterminer si l'accumulation des cassures double-brins est à l'origine ou est la conséquence de la mort des cellules mutantes.

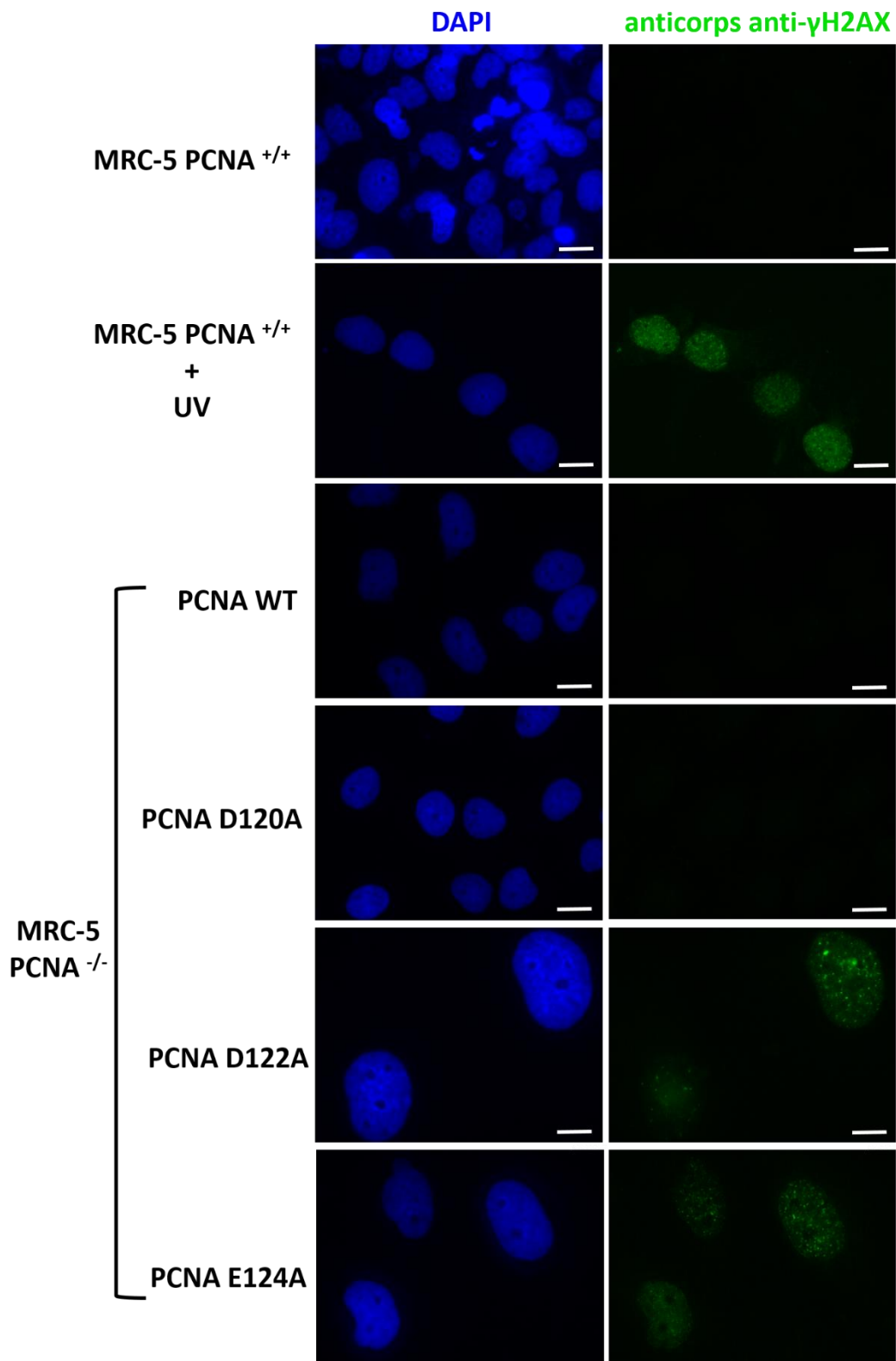


Figure 44: Accumulation de cassures double-brins au sein des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A

Des cellules MRC-5 ont été co-transfectées avec le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro et l'un des plasmides de complémentation pComp PCNA WT/D120A/D122A/E124A. Au 8^{ème} jour post-transfection, les cellules ont été observées par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti- γ -H2AX. Les cellules MRC-5 « sauvage » et les cellules exprimant les protéines PCNA WT et D120A se révèlent être négatives au marquage par l'anticorps anti- γ -H2AX. Très peu d'évènements de cassure double-brins de l'ADN ont lieu au sein de ces cellules. Par contre, les cellules exprimant les protéines PCNA D122A et E124A ainsi que les cellules MRC-5 « contrôle » ayant subi une irradiation aux UVC (254 nm, 5 Joules/m²) présentent de nombreux évènements de cassure double-brins de l'ADN comme en témoigne le marquage intense des noyaux par l'anticorps anti- γ -H2AX.

D) Implication des protéines PCNA D122A et E124A dans la voie de dégradation ubiquitine-dépendante CRL4^{Cdt2}

Les protéines PCNA mutantes D122A et E124A ne semblent pas affecter le mécanisme de réplication de l'ADN. La mort de ces cellules mutantes a donc certainement pour origine le dysfonctionnement d'un autre mécanisme cellulaire. Ces cellules mutantes présentent un phénotype particulier caractérisé par l'accroissement du volume nucléaire et cytoplasmique (voir section Résultats B.1). Ces dernières présentent également un grand nombre d'évènements de cassures double-brins de l'ADN (voir section Résultats C.4). Des recherches bibliographiques nous ont mené sur la piste d'un phénomène cellulaire appelé la « re-réplication » de l'ADN, qui est un évènement indésirable durant lequel le génome de la cellule est répliqué plus d'une fois par cycle cellulaire (voir section Introduction E.3). Il a été démontré notamment que des cellules inactivées pour la Géminine, une protéine qui régule négativement l'activation des origines de réplication, présentent ce phénomène de re-réplication (Melixetian et al., 2004). Ces cellules sont caractérisées par l'apparition d'un phénotype cellulaire identique au phénotype observé au sein de nos cellules mutantes, c'est à dire un accroissement du volume nucléaire et cytoplasmique et présentent également de nombreux évènements de cassures double-brins. Il a été démontré que la mort cellulaire est causée par un défaut de synchronisation entre la réplication de l'ADN et le cycle cellulaire. En effet, les cellules présentent une activation trop importante des origines de réplication, le cycle cellulaire est alors stoppé provoquant ainsi la mort des cellules. Nous avons donc cherché à savoir si la mort de nos cellules mutantes exprimant les protéines D122A et E124A est potentiellement due à une

désynchronisation entre la réplication de l'ADN et le cycle cellulaire. Pour ce faire, nous avons étudié le déroulement du cycle cellulaire au sein de nos cellules mutantes.

1) Les protéines PCNA mutantes D122A et E124A provoquent l'arrêt du cycle cellulaire

Afin de déceler un éventuel dysfonctionnement dans le cycle cellulaire de nos cellules mutantes, l'ADN de ces dernières a été marqué à l'iodure de propidium. Ce composé fluorescent est un agent intercalant des acides nucléiques (ADN ou ARN). Le marquage de l'ADN via l'iodure de propidium permet de déterminer à quelles étapes du cycle cellulaire se situent les cellules. En effet, l'intensité du marquage à l'iodure de propidium corrèle avec la quantité d'ADN présent dans la cellule. Les cellules en phase S contiennent une plus grande quantité d'ADN que les cellules en phase G₀/G₁. Les cellules en phase G₂ seront approximativement 2x fois plus marquées que les cellules G₀/G₁, dû à la réplication du génome au courant de la phase S (Figure 45).

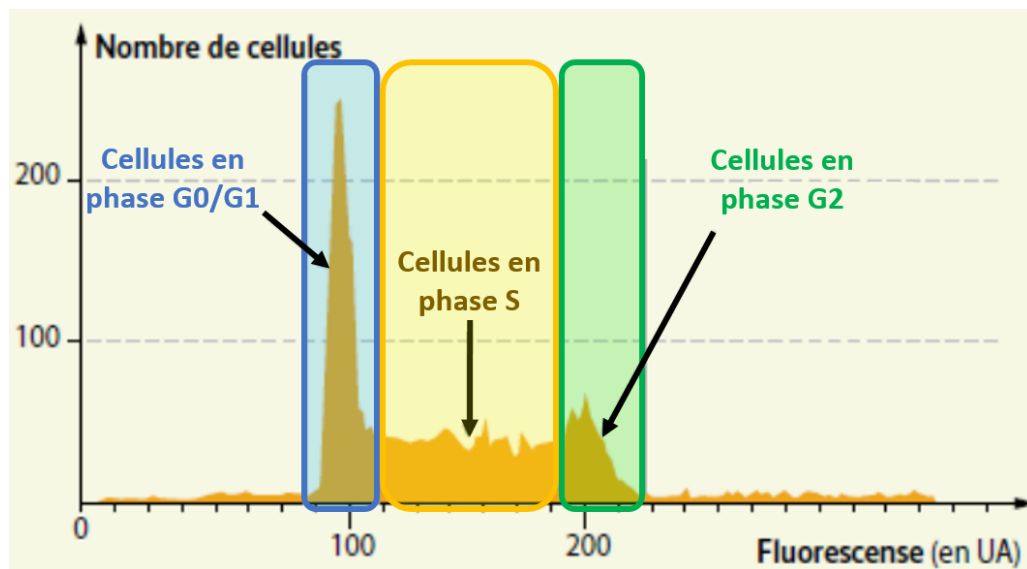


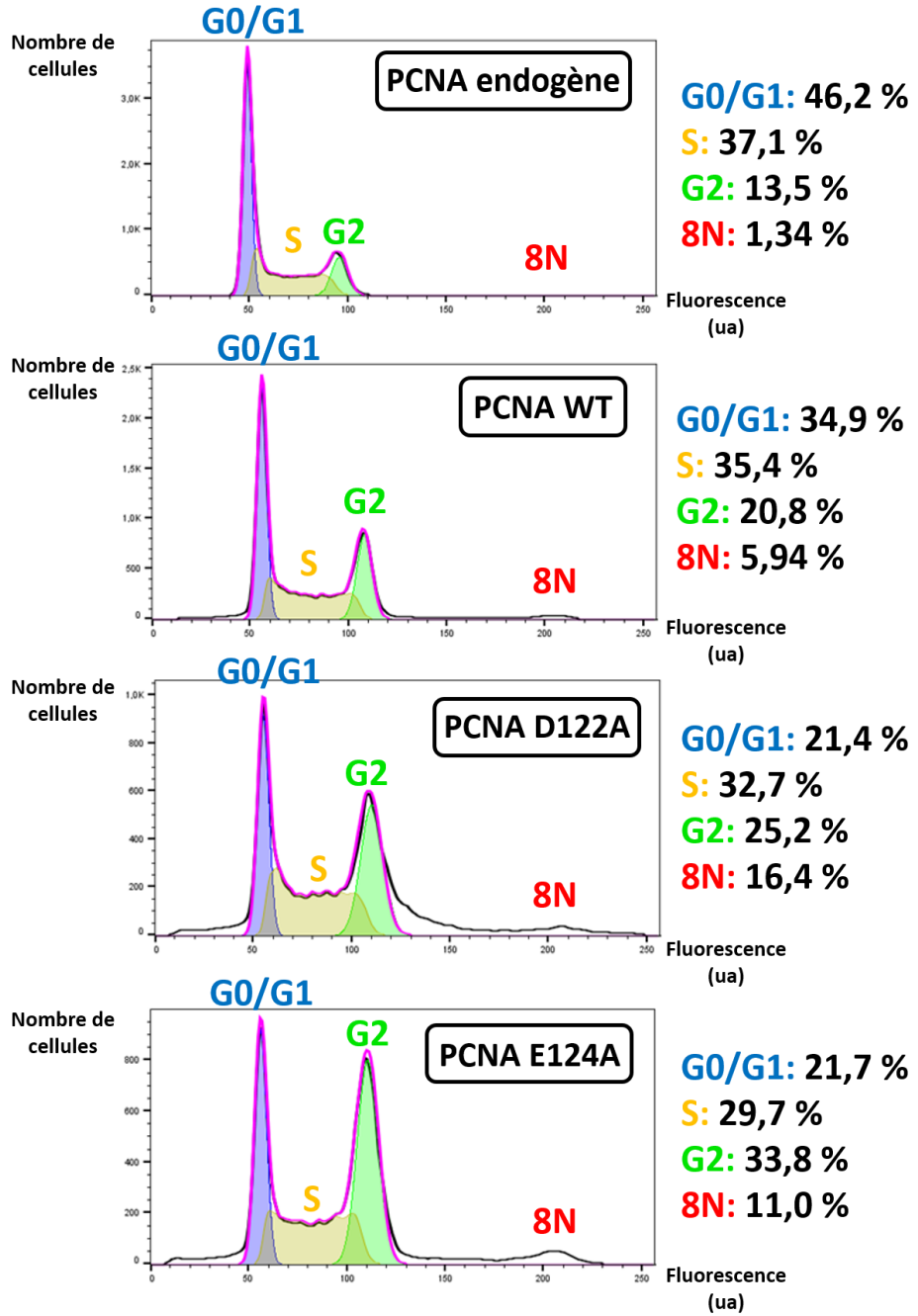
Figure 45: Représentation schématique d'une analyse par cytométrie en flux de cellules asynchrones marquées à l'iodure de propidium

Ci-dessus est représenté le résultat fictif d'une analyse par cytométrie en flux de cellules asynchrones marquées à l'iodure de propidium. Les cellules en phase S contiennent une plus grande quantité d'ADN que les cellules en phase G₀/G₁ et présentent donc une intensité de fluorescence plus importante. Les cellules en phase G₂ seront approximativement 2x fois plus marquées à l'iodure de propidium que les cellules G₀/G₁ dû à la réplication du génome au courant de la phase S.

Des cellules MRC-5 sauvages ainsi que des cellules MRC-5 inactivées pour le gène PCNA exprimant les protéines de complémentation PCNA WT, D122A ou E124A ont été marquées à l'iodure de propidium puis analysées par cytométrie en flux (Figure 46). Le profil des cellules MRC-5 inactivées pour le gène PCNA et exprimant la protéine

PCNA WT nous sert de profil de référence (Figure 46A). On observe un grand nombre de ces cellules en phase G₀/G₁ (34,9 %) ainsi qu'en phase S (35,4 %) mais très peu de cellules en phase G₂ (seulement 20,8 %). Les cellules MRC-5 mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A présentent quant à elles des profils bien différents. Le pourcentage de cellules mutantes en phase G₀/G₁ est plus faible (environ 21 %). On observe également un fort pourcentage de cellules mutantes se situant en phase G₂ (PCNA D122A: 25,2 % et PCNA E124A: 33,8 %) (Figure 46B). Les cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A semblent s'accumuler au niveau de la phase G₂. Il est possible que le cycle cellulaire de ces cellules soit stoppé au niveau du checkpoint G₂/M empêchant ainsi ces dernières d'entrer en mitose. On observe également une population de cellules mutantes « hyper-marquées » à l'iodure de propidium qui se démarque des autres populations de cellules. On nommera cette population de cellules « 8N » (PCNA D122A: 16,4% et PCNA E124A: 11%) (Figure 46B). En effet, cette population semble posséder une quantité anormale d'ADN correspondant à environ 2 fois la quantité d'ADN contenue dans les cellules en phase G₂. La population de cellules hyper-marquées semble avoir répliqué plus d'une fois son génome durant le temps d'un cycle cellulaire. Cette augmentation brutale de la quantité d'ADN pourrait être expliquée par un phénomène de re-réplication de l'ADN.

A



B

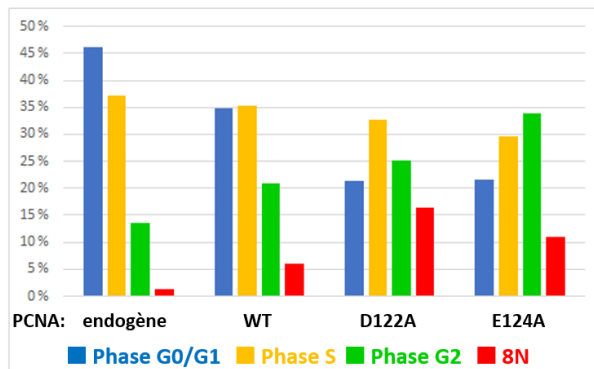


Figure 46: Blocage du cycle cellulaire en phase G2 au sein des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A

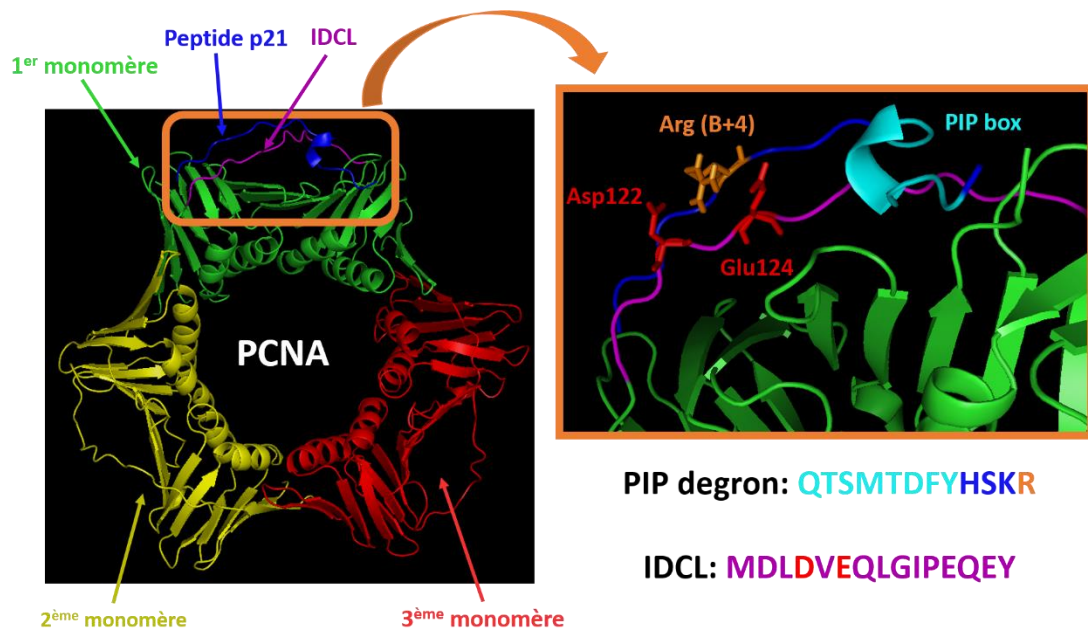
A Des cellules MRC-5 sauvages ainsi que des cellules MRC-5 inactivées pour le gène PCNA qui expriment les protéines de complémentation PCNA WT, D122A ou E124A ont été marquées à l'iodure de propidium puis analysées par cytométrie en flux. **B** Les pourcentages des cellules en phase G0/G1, S, G2 ainsi que le pourcentage de cellules hyper marquées (8N) ont été reportés dans un histogramme.

2) Les cellules mutantes PCNA D122A et E124A présentent une accumulation de la protéine p21

L'analyse des données récoltées concernant les cellules mutantes semblent mettre en évidence que ces dernières subissent un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Les cellules mutantes semblent également sujettes au phénomène de re-réplication de l'ADN. L'hypothèse d'une désynchronisation entre la réplication de l'ADN et le cycle cellulaire semble de plus en plus plausible comme étant à l'origine de la mort de nos cellules mutantes. Nous avons cherché à mettre en évidence l'évènement qui cause cette désynchronisation des deux mécanismes cellulaires.

Il a été démontré chez le Xénope que la protéine PCNA et plus particulièrement les acides aminés en position 122 et 124 sont impliqués dans une voie de dégradation ubiquitine dépendante mettant en jeu une E3 ubiquitine-ligase, CRL4^{Cdt2} (Havens et al., 2012). Cette voie CRL4^{Cdt2} fait partie des nombreuses voies de dégradation ubiquitine-dépendante existant au sein de la cellule. Ces dernières sont nécessaires à la régulation de la concentration de protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires tels que le déroulement du cycle cellulaire, le maintien de l'intégrité du génome ou encore la signalisation cellulaire. La dégradation des protéines est permise par l'action du protéasome 26S (voir section Introduction E.1). La voie de dégradation ubiquitine dépendante (CRL4^{Cdt2}) permet de réguler la concentration de certaines protéines au courant de la phase S du cycle cellulaire, telle que la protéine Cdt1: un facteur d'initiation de la réplication de l'ADN, la protéine p21: une protéine inhibitrice des CDK2 et CDK4 et la protéine Set8: une histone méthyl-transférase (Havens et al., 2012). Cette régulation est essentielle afin d'empêcher l'accumulation de ces protéines durant la phase S et donc de prévenir l'apparition d'un phénomène de re-réplication au sein des cellules (Vaziri et al., 2003; Kim et al., 2008c; Abbas et al., 2010) (voir section Introduction E.3). Les acides aminés en position 122 et 124 de la protéine PCNA sembleraient essentiels afin d'assurer la reconnaissance des protéines cibles (Cdt1, p21 et Set8) par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}. En effet, l'association d'une des protéines

cibles avec PCNA, elle-même chargée sur l'ADN, provoque la formation d'un motif appelé « PIP degron » reconnu par CRL4^{Cdt2}. Ce motif est constitué d'un motif PIP box présenté par la protéine cible et d'un acide aminé basique adjacent appelé « B+4 » (4^{ème} acide aminé en aval de la PIP box). Le motif PIP box est reconnu par une région acceptrice de l'IDCL de la protéine PCNA. L'acide aminé basique B+4 s'intercale entre l'acide aspartique 122 et l'acide glutamique 124 du facteur de processivité. Ce motif PIP degron est dit « composite » c'est-à-dire qu'il est issu de l'association de plusieurs protéines (PCNA et protéine cible) (Figure 47). Le motif PIP degron est spécifique de la voie de dégradation CRL4^{Cdt2}. De manière plus conventionnelle, les E3 ubiquitine ligases reconnaissent directement la protéine cible via un motif dit « classique » de 6 à 8 acides aminés connu sous le nom de « degron » (voir section Introduction E.2).



D'après la structure 1AXC (pdb) Structure de la région C-terminale de la protéine p21 complexée avec la protéine PCNA

Figure 47: Structure 3D du complexe PCNA-peptide p21 (1AXC pdb)

Présentation de la structure 3D du complexe PCNA-peptide p21. Le peptide se fixe au niveau d'une région de l'IDCL de la protéine PCNA. L'association des deux chaînes polypeptidiques permet la formation d'un motif PIP degron. Ce motif composite est constitué d'une PIP box présentée par le peptide p21 et d'une arginine adjacente (B+4: 4^{ème} acide aminé basique en aval de la PIP box). La PIP box interagit avec une région IDCL acceptrice de la protéine PCNA, tandis que l'arginine s'intercale entre l'acide aspartique 122 et l'acide glutamique 124 du facteur de processivité. Le motif PIP degron est reconnu par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}.

Nous avons donc formulé une nouvelle hypothèse quant à l'origine de la mort de nos cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A. Les mutations de PCNA seraient à l'origine d'un dysfonctionnement de la voie de dégradation impliquant l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}. L'altération de la voie CRL4^{Cdt2} provoquerait ainsi l'accumulation des protéines telles que Cdt1, p21 et Set8, et ceci

aurait pour conséquence le blocage du cycle cellulaire et l'apparition du phénomène de re-réplication de l'ADN.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons cherché à mettre en évidence une éventuelle accumulation des protéines p21 et Cdt1 au sein de nos cellules mutantes. Des cellules Hct 116 sauvages (cellules humaines issues du cancer du côlon) et des cellules Hct 116 inactivées pour le gène de PCNA endogène exprimant les protéines PCNA de complémentation WT, D122A ou E124A ont été cultivées. Au 8^{ème} jour post-transfection, nous avons préparé, à partir de ces cellules, des extraits protéiques que nous avons analysés par Western Blot à l'aide d'anticorps poly-clonaux anti-Cdt1, anti-p21 et anti-Actine (Figure 48A). Les intensités de marquage des protéines Cdt1 et p21 ont été rapportées à l'intensité de marquage de la protéine Actine. Nous avons ainsi pu comparer les quantités relatives de protéines p21 et Cdt1 dans les différents types cellulaires (Figure 48B). Les cellules Hct 116 mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A présentent une forte accumulation de la protéine p21 en comparaison avec les cellules contrôles Hct 116 sauvages et les cellules Hct 116 exprimant la protéine PCNA WT. Cependant aucune différence notable dans la quantité relative de la protéine Cdt1 n'a été observée entre les différents types cellulaires. Il semblerait que la régulation de la protéine Cdt1 ne soit pas altérée au sein de nos cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A. La découverte d'une accumulation de la protéine p21 dans les cellules mutantes semble conforter l'hypothèse d'un défaut de la voie de dégradation impliquant l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}.

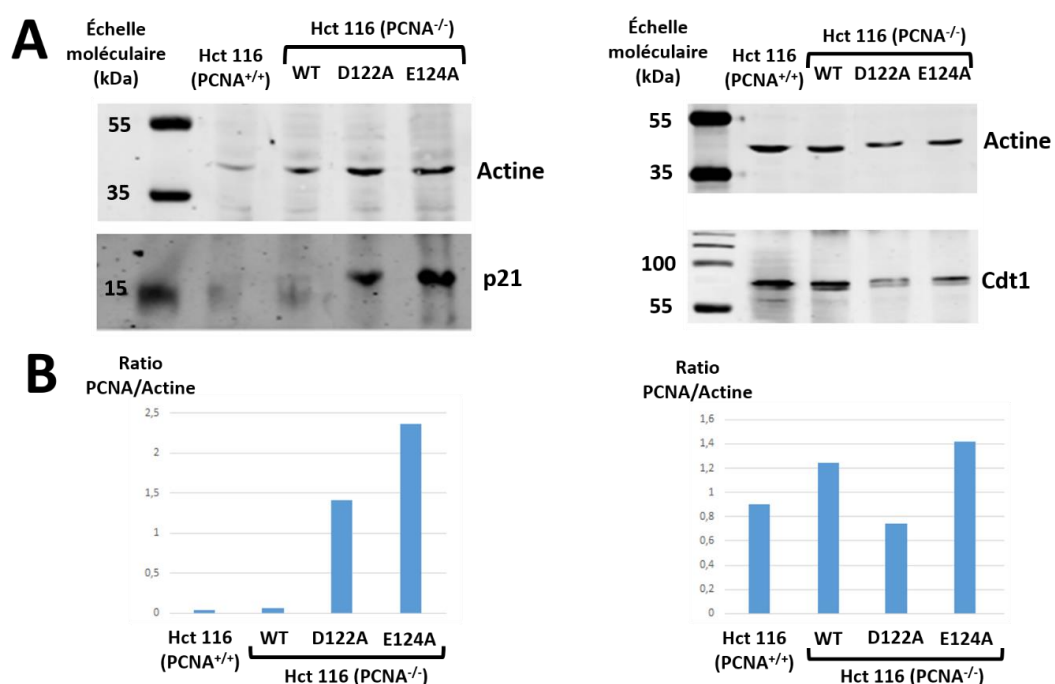


Figure 48: Quantification relative des protéines Cdt1 et p21 au sein des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A

A Des cellules Hct 116 ont été co-transfectées avec le plasmide pCas9 anti-PCNA Puro et l'un des plasmides de complémentation pComp PCNA WT, D122A ou E124A. Au 8^{ème} jour post-transfection, les extraits protéiques des cellules ont été analysés par Western Blot à l'aide d'anticorps poly-clonaux anti-Cdt1, anti-p21 et anti-Actine. **B** Les intensités de marquage des protéines Cdt1 et p21 ont été rapportées à l'intensité de marquage de la protéine Actine.

Il a été démontré que la protéine p21 joue le rôle de régulateur de la transition entre les phases G1/S et entre les phases G2/M (Bunz et al., 1998; Niculescu et al., 1998). Suite aux analyses effectuées sur le cycle cellulaire de nos cellules mutantes, il est probable que l'accumulation de la protéine p21, cause le blocage du checkpoint G2/M menant à terme à la mort cellulaire.

3) Régulation de la voie de dégradation ubiquitine-dépendante CRL4^{Cdt2}

Suite à la découverte de la voie de dégradation ubiquitine dépendante impliquant CRL4^{Cdt2}, une question c'est posée quant à la régulation de cette dernière. En effet, cette voie de dégradation nécessite d'être régulée afin de permettre la dégradation des protéines cibles uniquement durant la phase S du cycle cellulaire ou lors de l'apparition de dommages à l'ADN. Il semblerait que l'action de CRL4^{Cdt2} serait régulée de façon « passive ». En effet, il a été démontré que la reconnaissance des protéines cibles par CRL4^{Cdt2} est possible uniquement si ces dernières interagissent avec la protéine PCNA chargée sur l'ADN (Havens et al., 2009) et donc par extension uniquement lors de la réplication de l'ADN en phase S ou lors de l'utilisation de la machinerie répliquative lors de la réparation de dommages à l'ADN.

Au vu de la nature des acides aminés D122 et E124, nous nous sommes demandés si la reconnaissance des protéines cibles par CRL4^{Cdt2} pouvait être régulée de façon « active » à l'aide par exemple d'une modification post-traductionnelle de ces acides aminés. En effet des analyses par spectrométrie de masse de la protéine PCNA ont suggéré que cette dernière pouvait être la cible de PARylation au niveau des acides aminés suivants: D120, D122 et E124 (Zhang et al., 2013). Nous avons ainsi réalisé un test de PARylation *in vitro* afin de déterminer si les protéines PCNA mutantes D122A et E124A pourraient être PARylables (Figure 49).

Les protéines PCNA de synthèse WT, D120A, D122A ou E124A (voir section Résultats C.1) ont été mises en présence avec la protéine PARP1 et du NAD⁺ marqué radioactivement avec du ³²phosphore (NAD^{*}). La réaction de PARylation a été réalisée

à l'aide d'un tampon contenant du NAD froid ainsi que de l'ADN activé. L'ADN activé représente un plasmide contenant de multiples cassures simple-brin permettant d'initier l'activité de PARylation de la protéine PARP1. La protéine PARP1 va permettre la PARylation de la protéine PCNA ainsi que son auto-PARylation à l'aide d'un mélange NAD froid/NAD*. La synthèse de chaînes de poly-ADP riboses sur les protéines PCNA et PARP1 permet ainsi de les marquer radioactivement. Deux conditions de contrôle ont également été réalisées avec le même milieu réactionnel en omettant soit la protéine PCNA de synthèse (Condition contrôle PCNA-) soit la protéine PARP1 (Condition contrôle PARP1-). Après incubation, les protéines PARylées radioactives sont analysées après séparation sur gel de polyacrylamide dénaturant et révélées par autoradiographie (Figure 49A). En parallèle, des aliquots des solutions réactionnelles ont été déposés sur un deuxième gel de polyacrylamide dénaturant puis analysés par Western Blot à l'aide des anticorps anti-PCNA (PC10) et anti-PARP1 (Figure 49B).

Seule la protéine PARP1 est PARylée pour la condition contrôle PCNA-. En effet la protéine PCNA est absente du milieu réactionnel comme le prouve le résultat de l'analyse par Western Blot. Nous avons ainsi situé la protéine PARP1 PARylée au niveau du marqueur moléculaire de 130 kDa. Le marquage radioactif de la protéine PARP1 est le fruit de son activité d'auto-PARylation.

Aucune trace de protéine marquée n'est observée pour la condition contrôle PARP1- et ce malgré la présence de la protéine PCNA. La PARylation est donc bien réalisée uniquement en présence de la protéine PARP1.

La protéine PCNA WT est PARylée par la protéine PARP1; en effet on observe un marquage radioactif au niveau du marqueur moléculaire de 35 kDa. Les intensités de marquage des protéines PCNA WT, D120A, D122A et E124A PARylées ont été rapportées à l'intensité de marquage de la protéine PCNA totale pour chacune des conditions (Figure 49C). La quantité relative de protéines mutantes D120A et D122A PARylées est plus importante que la quantité relative de protéines WT PARylées, en revanche, la quantité relative de protéines mutantes E124A PARylées est beaucoup moins importante.

Au vu de ces résultats *in vitro*, il semblerait que la mutation E124A provoque une diminution de la capacité de PARylation de la protéine PCNA mutante. L'acide glutamique en position 124 pourrait alors représenter un site majeur de PARylation de la protéine PCNA.

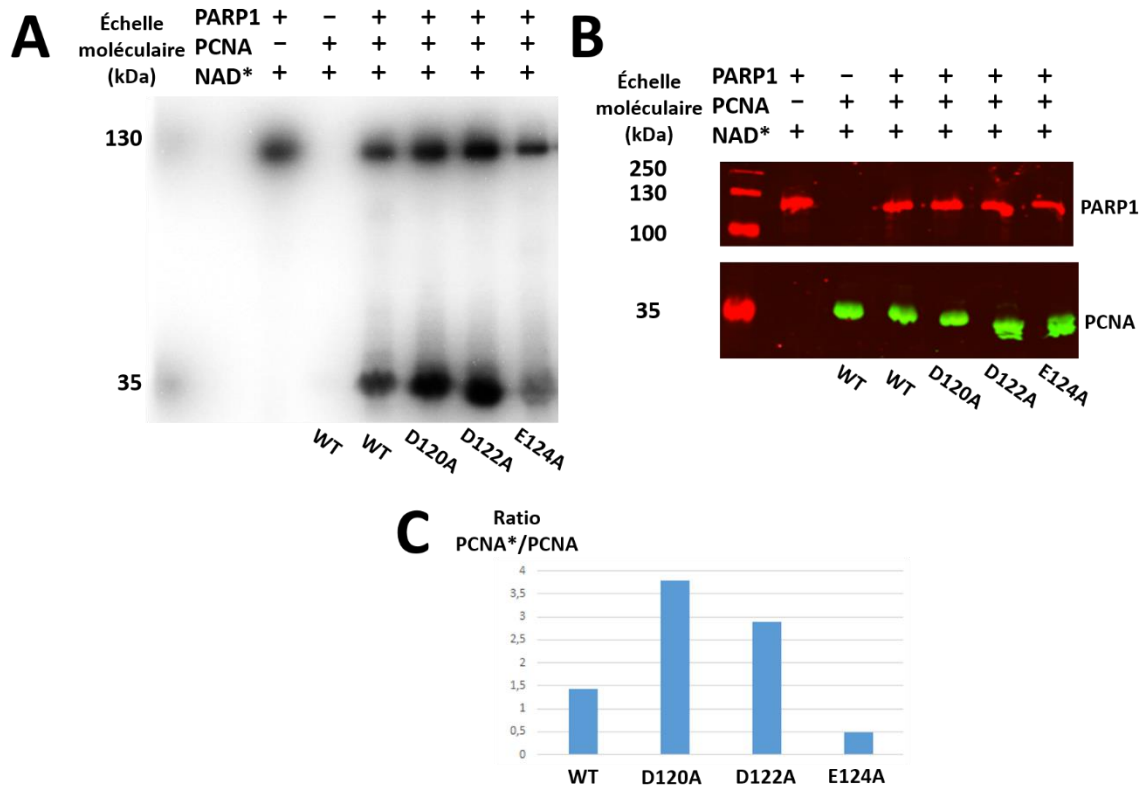


Figure 49: Test de PARylation in vitro des protéines PCNA WT, D120A, D122A et E124A.

A Test de PARylation in vitro des différentes formes de PCNA. Les protéines PCNA WT, D120A, D122A ou E124A ont été mises en présence avec la protéine PARP1 et du NAD⁺ marqué radioactivement avec du ³²phosphore (NAD*). Après incubation, les solutions réactionnelles sont déposées sur gel de polyacrylamide. Les protéines PARylées et radioactives sont révélées par autoradiographie. **B** Des aliquots des solutions réactionnelles ont été déposés sur gel de polyacrylamide dénaturant et analysés par Western Blot à l'aide des anticorps anti-PCNA (PC10) et anti-PARP1. La protéine PCNA PARylée se situe au niveau du marqueur moléculaire de 35 kDa. **C** Les intensités de marquage des protéines PCNA WT, D120A, D122A et E124A PARylées ont été rapportées à l'intensité de marquage de la protéine PCNA totale pour chacune des conditions.

Discussion

Discussion

1) Un nouvel outil génétique

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un nouvel outil génétique permettant *in cellulo*, de substituer la protéine endogène PCNA par une version de la protéine dite de complémentation à l'aide d'une co-transfection de plasmides. Ceci a nécessité la construction de deux vecteurs d'expression permettant le déploiement de deux systèmes différents. Le plasmide d'inactivation pCas9 anti-PCNA (Puro/GFP) a permis de déployer le système CRISPR-Cas 9 afin de cibler et d'inactiver le gène codant la protéine PCNA endogène. En parallèle le plasmide de complémentation pComp a permis l'expression de la protéine PCNA de complémentation. Plusieurs versions mutantes de la protéine ont été exprimées par le plasmide de complémentation, permettant ainsi la construction d'une mini-banque de plasmide pComp. Chacune des mutations de PCNA cible un résidu susceptible de subir des modifications post-traductionnelles dont les fonctions sont encore inconnues. Le but de notre projet était de caractériser les phénotypes des cellules exprimant les protéines PCNA mutantes afin d'éclaircir une éventuelle implication de certains résidus dans les activités de PCNA.

Ce système de complémentation fonctionnelle présente une alternative à un système déjà existant appelé « Knock-in » qui permet de remplacer par substitution, la séquence d'ADN codant une protéine d'intérêt par une version de la séquence d'ADN mutante de la protéine. Cette substitution est réalisée à l'aide d'un mécanisme dit de recombinaison homologue. La séquence d'ADN mutante est alors sous le contrôle du promoteur natif de la séquence d'ADN remplacée permettant ainsi une régulation de l'expression de la protéine mutante identique à la protéine sauvage.

L'utilisation de notre système de complémentation fonctionnelle présente des avantages conséquents mais également certains inconvénients. Tout comme le système de Knock-in, notre outil génétique peut être adapté afin de cibler n'importe quelle protéine. Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes contentés d'étudier la protéine PCNA, cependant il est tout à fait envisageable d'utiliser ce système de complémentation fonctionnelle afin d'étudier une autre protéine de notre choix. Au sein de notre laboratoire, nous avons par exemple utilisé cet outil génétique afin de

cibler le gène de la sous-unité PolD2 de l'ADN polymérase δ (voir section Résultats A.4)

Le système de complémentation fonctionnelle est simple d'utilisation. En effet, ce dernier n'utilise pas le système de recombinaison homologue du système Knock-in, relativement contraignant de par sa faible efficacité. Il consiste en une simple co-transfection des cellules à l'aide de deux vecteurs d'inactivation et de complémentation. Ce système de complémentation fonctionnelle est reproductible et facile à mettre en place.

La mise en place effective de la substitution de la protéine cible par sa forme mutante est réalisée très rapidement suite à la co-transfection des deux vecteurs d'expression. Il est à noter que le délai de mise en place d'une substitution effective dépend du mécanisme de « turnover » de la protéine (voir section Résultats B.3). Ce turnover dépend de la quantité de la protéine endogène présente dans la cellule et de la demi-vie de cette dernière. Dans notre cas, la protéine PCNA est une protéine essentielle très fortement exprimée et possède une demi-vie relativement longue, environ 20h (Yu et al., 2009); nous considérons que la substitution de la forme endogène par la forme mutante de PCNA est effective entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour post-transfection. Il est donc possible de produire des lignées cellulaires mutantes pour la protéine PCNA relativement rapidement suite à la co-transfection des plasmides d'inactivation et de complémentation.

Le système présente l'avantage de pouvoir créer des modèles cellulaires exprimant uniquement une protéine d'intérêt sans aucune interférence de la protéine endogène. Cependant ce système présente également un désavantage en comparaison du système Knock-in. Le principal point négatif concerne l'absence de régulation de l'expression de la protéine de complémentation. En effet, le plasmide de complémentation possède un promoteur de type CMV (voir section Résultats A.2), ainsi l'expression de la protéine de complémentation est forte et constante durant l'entièreté du cycle cellulaire. Dans le cas de la protéine PCNA, le manque de régulation n'empêche pas la réussite de la complémentation fonctionnelle. En effet, la protéine PCNA est exprimée en très forte quantité dans les cellules en culture. PCNA présente une variation de son expression au cours du cycle cellulaire avec un pic d'expression lors de la phase S

(Kurki et al., 1986), cependant on observe une forte concentration basale de la protéine PCNA durant l'intégralité du cycle cellulaire. Par ailleurs, nous avons observé que la quantité de protéine PCNA endogène exprimée par les cellules sauvages est relativement comparable à la quantité de protéines PCNA de complémentation exprimées par les cellules mutantes et ce pour le même nombre de cellules analysées (voir section Résultats A.3.b). Cependant l'absence de régulation peut être très handicapante lors de l'étude de protéines qui nécessitent une régulation fine durant les phases du cycle cellulaire. Nous pourrions adapter notre système afin de contourner ce problème en remplaçant le promoteur CMV du plasmide de complémentation par le promoteur natif de la protéine d'intérêt. Nous pourrions également envisager d'adapter notre système afin de rendre notre plasmide de complémentation intégratif. En modifiant le vecteur pour le rendre intégratif, nous pourrions ainsi nous séparer du plasmide d'inactivation. Cependant l'efficacité de la recombinaison homologue étant relativement faible, la facilité d'utilisation de notre système en serait affectée.

Ce système de complémentation fonctionnelle n'est cependant pas efficace à 100%. En effet, lorsque l'on conserve les lignées cellulaires mutantes en culture sur une trop longue période, on observe une dérive avec l'apparition de cellules qui expriment à nouveau la protéine endogène. En effet, malgré une efficacité importante de la sélection aux antibiotiques, il arrive que des cellules, ne présentant aucun marqueur de sélection, échappent à la sélection. Après 3 jours de traitement à l'Hygromycine et à la Puromycine, la majorité des cellules présentent les deux plasmides d'inactivation et de complémentation. Cependant il est possible dans certains cas que la sélection, trop courte dans le temps, ne soit pas efficace à 100%. On observe alors des cellules ne possédant aucun plasmide, des cellules possédant uniquement le plasmide d'inactivation ou encore des cellules possédant uniquement le plasmide de complémentation. Les cellules ne possédant aucun plasmide ou ayant acquis uniquement le plasmide d'inactivation sont éliminées en réalisant une deuxième sélection à l'Hygromycine sur le long terme. Nous pouvons conserver cette sélection grâce au caractère épisomal du vecteur de complémentation. En revanche, nous ne pouvons pas conserver la sélection à la Puromycine à long terme afin d'éliminer les cellules possédant uniquement le plasmide de complémentation. En effet le plasmide d'inactivation ne se répliquant pas de façon autonome, ce dernier se perd au cours des divisions cellulaires. Il est donc impossible de conserver la sélection par la Puromycine

sans provoquer la mort de toutes les cellules en culture. Malgré l'incroyable efficacité du système CRISPR-Cas 9, dans certains cas le gène de PCNA n'a pas été inactivé et ce malgré la présence du plasmide d'inactivation. En effet une délétion ou une insertion en phase peut provoquer la synthèse d'une protéine modifiée mais fonctionnelle et ce malgré l'action de l'endonucléase Cas 9. Ces événements sont très rares mais ne peuvent pas être évités. Suite à une longue période de culture cellulaire, on observe alors une dérive avec l'apparition d'une population de cellules exprimant à nouveau la protéine endogène. Ces cellules prennent le dessus sur les cellules mutantes de par leur capacité de prolifération accrue. En effet, nous avons remarqué que les cellules exprimant la protéine endogène prolifèrent plus rapidement que les cellules ayant subi une complémentation fonctionnelle et ce même si la substitution est réalisée avec la forme WT de PCNA (données non présentées). Nous préconisons donc de ne pas conserver plus d'un mois en culture les lignées cellulaires mais de plutôt recréer ces dernières lorsque l'on observe une dérive.

2) Criblage de mutants létaux de PCNA

L'utilisation du système de complémentation nous a permis de caractériser les mutations D122A et E124A de la protéine PCNA. Nous avons choisi d'étudier ces deux mutants parmi l'ensemble des protéines mutantes de PCNA, car ce sont les seuls mutants qui, lorsqu'ils remplacent la protéine endogène, provoquent la mort cellulaire. Nous avons donc cherché parmi les activités critiques de PCNA, laquelle implique les résidus D122 et E124. Il est à noter que la mort des cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A n'est pas due à un défaut de la trimérisation des protéines mutantes mais bien au changement de nature des acides aminés en position 122 et 124 (voir section Résultats C.1). Nous n'avons pas déterminé quel est le processus de mort cellulaire engagé pour les cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A et E124A. Au vu de nos résultats et de nos observations, nous émettons l'hypothèse que nos cellules mutantes meurent par apoptose. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en réalisant un marquage de nos cellules à l'aide d'annexine V-FITC et d'iodure de propidium ou en réalisant des tests d'activités pour les Caspases telles que la Caspase 3.

3) PCNA et la voie de dégradation ubiquitine-dépendante CRL4^{Cdt2}

Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse d'un défaut des protéines PCNA mutantes à assurer leur rôle de facteur de processivité dans le mécanisme de réplication de l'ADN. Nous avons confirmé (par immunofluorescence) que les protéines mutantes de PCNA étaient encore capables de se fixer à la chromatine (voir section Résultats C.2). En effet, aucune différence flagrante d'interaction n'a été observée entre les protéines WT ou mutantes et la chromatine. Il ne semble donc pas que ces mutations affectent le chargement de la protéine PCNA sur l'ADN via le complexe protéique RFC. Cependant, l'utilisation de la technique d'immunofluorescence nécessite de fixer les protéines. Ainsi on observe l'interaction des protéines PCNA sauvages et mutantes avec l'ADN à un instant donné. Il serait intéressant d'étudier la cinétique d'interaction entre les protéines PCNA WT ou mutantes et l'ADN. Nous pourrions ainsi calculer le délai entre la fixation de PCNA sur l'ADN et sa dissociation. Pour ce faire, nous devons utiliser une technique de FRAP « Fluorescence Recovery After Photobleaching ». Cette technique nécessite l'utilisation d'une protéine fluorescente que l'on couplerait aux différentes formes de PCNA. Une région du noyau de la cellule serait alors exposée à un laser afin d'inactiver de façon irréversible la fluorescence des protéines chimériques. Ce mécanisme est appelé le « photobleaching ». Le délai entre l'extinction et la réapparition de la fluorescence peut être calculé et représente le temps passé par la protéine PCNA sur la chromatine.

Après avoir confirmé la fixation des protéines PCNA mutantes sur l'ADN, nous avons réalisé un test de réplication de l'ADN *in vitro* à l'aide de ces dernières (voir section Résultats C.3). Il s'est avéré que les protéines mutantes permettent encore d'assurer leur rôle de facteur de processivité et ne semblent pas affecter négativement le mécanisme de réplication de l'ADN. Il est à noter que ce test a été réalisé *in vitro*, il ne reflète donc pas les conditions *in cellulo*. En effet, le test de réplication *in vitro* mettait en jeu des extraits protéiques déplétés pour la protéine PCNA puis complétés avec des protéines PCNA WT ou mutantes exprimées chez la bactérie *E. coli*. Lors de l'expression des protéines au sein des bactéries, aucune modification post-traductionnelle ne peut être effectuée. De plus la protéine peut dans certain cas se replier de façon différente du à l'absence de protéines chaperonnes spécifiques des

cellules eucaryotes. Il serait donc judicieux de réaliser à nouveau ce test de réplication de l'ADN en utilisant des extraits de cellules exprimant directement les protéines PCNA mutantes. Nous pourrions également envisager un test de réplication de l'ADN *in cellulo* à l'aide d'un marquage de l'ADN en cours de synthèse par intégration d'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) un analogue de la thymidine (Salic et al., 2008). Ce test nous permettrait ainsi de visualiser en temps réel la progression de la synthèse de l'ADN au sein des cellules en culture.

L'hypothèse concernant un défaut de réplication de l'ADN au sein des cellules mutantes a été réfutée; cependant nous avons observé une présence anormalement élevée de γ -H2AX. Ce bio-marqueur témoigne de la présence d'un très grand nombre d'évènements de cassures doubles-brins de l'ADN (voir section Résultats C.4). La présence de cassures double-brins, associée à un phénotype particulier d'accroissement important du volume nucléaire et cytoplasmique, nous ont guidé sur la piste d'un phénomène appelé « re-réplication de l'ADN ». Ce phénomène de réplication de l'ADN non contrôlée est expliqué par une sur-activation des origines de réplication. Cette sur-activation est provoquée par une dérégulation de l'expression de protéines impliquées dans l'initiation des origines de réplication. Nous pouvons prendre en exemple l'inactivation de la protéine Géminine (Melixetian et al., 2004) ou encore la surexpression des protéines Cdt1 et Cdc6 (Vaziri et al., 2003) qui provoquent ce phénomène de re-réplication de l'ADN. Il est à noter que ce phénomène de re-réplication de l'ADN est toujours accompagné par des évènements de cassures double-brins, qui à terme, provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules. Nous avons donc formulé une nouvelle hypothèse qui visait à corrélérer la mort des cellules mutantes avec l'apparition d'un phénomène de re-réplication de l'ADN.

Nous avons entrepris une analyse du cycle cellulaire des cellules mutantes. Nous avons démontré que ces dernières semblent s'accumuler au niveau de la phase G2 sans avoir la capacité d'entrer en mitose. On note également la présence d'une population cellulaire présentant une quantité anormalement forte d'ADN. La présence de cette forte quantité d'ADN peut être due au phénomène de re-réplication de l'ADN. Il est possible que le checkpoint G2/M impliquant le complexe Cycline B-Cdc2 soit à l'origine de cet arrêt du cycle cellulaire. En effet l'inhibition de l'activité du complexe Cycline B-Cdc2 est initiée lorsque les cellules détectent la présence de dommages à

l'ADN. Les cellules sont alors bloquées en phase G2 et l'entrée en mitose est alors initiée uniquement lorsque l'ensemble des dommages à l'ADN a été réparé. Nous avons observé que les cellules mutantes présentent un très grand nombre d'évènements de cassures double-brins qui pourrait expliquer cet arrêt du cycle cellulaire en phase G2. L'origine de ces cassures double-brins reste encore floue mais il semblerait qu'elles soient la cause du phénomène de re-réplication de l'ADN (Davidson et al., 2006; Green et al., 2006; Melixetian et al., 2004; Mihaylov et al., 2002; Zhu et al., 2004). L'initiation excessive d'origines de réplication causerait des évènements de collision entre les fourches de réplication menant ainsi à la formation de fragments d'ADN double-brins. La présence de ces fragments d'ADN pourrait ainsi expliquer l'observation d'un fort taux de γ -H2AX au sein de nos cellules mutantes. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire d'étudier de façon plus approfondie les protéines impliquées dans le checkpoint G2/M. Nous pourrions éventuellement étudier la cinétique d'expression du couple Cycline B-Cdc2 durant le cycle cellulaire des cellules mutantes. En effet, l'augmentation de concentration de la cycline B et Cdc2 en fin de phase G2 entraîne l'entrée des cellules en mitose. Il serait intéressant de comparer le profil d'expression de ces protéines pour les cellules mutantes et les comparer au profil de cellules exprimant la forme WT de PCNA.

Suite à l'analyse de nos données, il semblerait que le phénomène de re-réplication de l'ADN soit à l'origine de la mort de nos cellules mutantes. Nous avons cherché quel mécanisme cellulaire impliquant la protéine PCNA pourrait être à l'origine de ce phénomène de re-réplication de l'ADN. Nous nous sommes aperçus que la protéine PCNA, et plus particulièrement la région IDCL incluant l'acide aspartique 122 et l'acide glutamique 124, semble être essentielle pour la mise en place d'une voie de dégradation ubiquitine dépendante. En effet la reconnaissance des protéines substrats par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} serait dépendante de l'interaction entre ces dernières et la protéine PCNA (Havens et al., 2012). L'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} est connue pour être un régulateur important du cycle cellulaire, en ciblant plusieurs protéines telles que Cdt1, p21 et Set8 afin de permettre leur dégradation via le protéasome 26S. Cette étude a démontré *in vitro* que les acides aminés en position 122 et 124 de la protéine PCNA semblent être essentiels pour la dégradation des protéines Cdt1, p21 et Set8 via la voie de dégradation ubiquitine dépendante CRL4^{Cdt2} (Havens et al., 2012). En effet, les protéines cibles se fixent sur la protéine PCNA à l'aide d'un motif PIP box mais

également grâce à la présence d'un acide aminé basique appelé « B+4 » (4^{ème} acide aminé en aval de la PIP box) qui interagit avec les deux acides aminés D122 et E124 du facteur de processivité. L'étude a démontré que la mutation D122A de la protéine PCNA n'affecte pas l'interaction des protéines cibles avec le facteur de processivité mais en revanche bloque la reconnaissance de ces dernières par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}. Suite à ces résultats, nous avons tenté de mettre en évidence un éventuel défaut de la voie de dégradation CRL4^{Cdt2} au sein des cellules mutantes. Pour ce faire nous avons cherché à mettre en évidence une accumulation des protéines Cdt1 et p21. Nous avons démontré que les cellules mutantes, exprimant la protéine PCNA D122A et E124A, présentent une accumulation de la protéine p21 par rapport aux cellules « contrôle » exprimant la forme WT de PCNA. Cependant aucune accumulation de la protéine Cdt1 n'a été observée au sein de ces cellules. Il est surprenant de ne pas observer d'accumulation de la protéine Cdt1, en effet il est admis que la protéine Cdt1 est ciblée par le complexe CRL4^{Cdt2} et que sa reconnaissance entraîne alors sa dégradation durant la phase S du cycle cellulaire (Havens et al., 2011; Jin et al., 2006; Higa et al., 2006; Sansam et al., 2006). Notre résultat contradictoire pourrait être expliqué par la présence d'une autre voie de dégradation ubiquitine-dépendante qui se chargerait de la dégradation de la protéine Cdt1 dans l'éventualité où la voie de dégradation CRL4^{Cdt2} serait inactive. L'accumulation de la protéine p21 pourrait être à l'origine du phénomène de re-réplication de l'ADN et par extension à l'origine de la mort des cellules mutantes. En effet, il a été décrit dans la littérature qu'une inactivation de la voie de dégradation CRL4^{Cdt2} permet une accumulation de la protéine p21 qui elle-même provoque un phénomène de re-réplication (Kim et al., 2008c). Cette réplication non contrôlée est expliquée par une accumulation de Cdc6, un facteur d'initiation des origines de réplication (Kim et al., 2008a). En effet, l'export nucléaire de la protéine Cdc6 durant la phase S est un mécanisme permettant de réguler négativement l'activation des origines de réplication. Ce mécanisme d'export est dépendant de la protéine p21. Lors d'une accumulation de la protéine p21, on observe une inhibition de l'export nucléaire de Cdc6. L'accumulation de Cdc6 entraîne alors une « sur-activation » des origines de réplication qui provoque le phénomène de re-réplication de l'ADN. De plus il est à noter que l'accumulation de la protéine p21 cause également l'arrêt du cycle cellulaire au niveau du checkpoint G2/M en inactivant le couple Cycline B-Cdc2 (Harper et al., 1995).

Au vu de nos résultats préliminaires, nous proposons un mécanisme cellulaire hypothétique permettant d'expliquer l'origine de la mort des cellules mutantes pour la protéine PCNA (D122A et E124A) (Figure 50). Au sein des cellules mutantes, aucune dégradation de la protéine p21 n'est initiée par le protéasome 26S. En effet, la protéine p21 ne peut pas être poly-ubiquitinée car cette dernière n'est pas reconnue par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}. Ce défaut de reconnaissance est directement lié à une instabilité de l'interaction entre la protéine p21 et la protéine PCNA, provoquée par la substitution d'un des deux acides aminés D122 et E124 par une alanine. L'accumulation de la protéine p21 inhibe alors l'export nucléaire de la protéine Cdc6 au cours de la phase S, entraînant ainsi une sur-activation des origines de réplication. Ce phénomène est connu sous le nom de re-réplication de l'ADN. L'initiation d'un trop grand nombre d'origines de réplication provoque des collisions entre les fourches de réplication menant à terme à la synthèse de fragment d'ADN double-brins. Les extrémités des fragments d'ADN double-brins sont alors reconnues par les mécanismes de réparation cellulaire comme des cassures d'ADN double-brins. Les cellules mutantes sont alors dans l'impossibilité d'entrer en mitose et l'arrêt prolongé du cycle cellulaire en phase G2 finit par causer la mort des cellules mutantes.

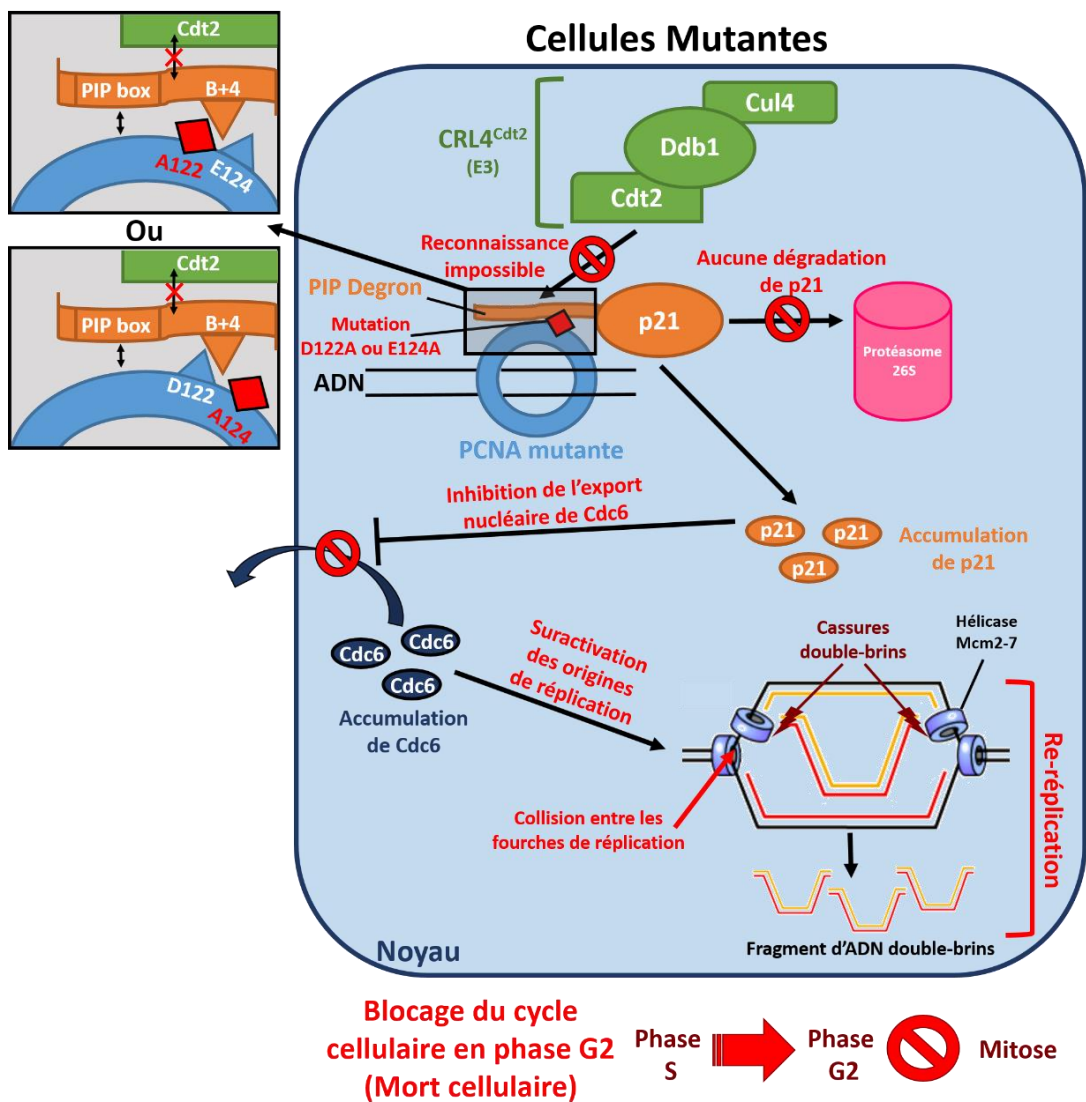
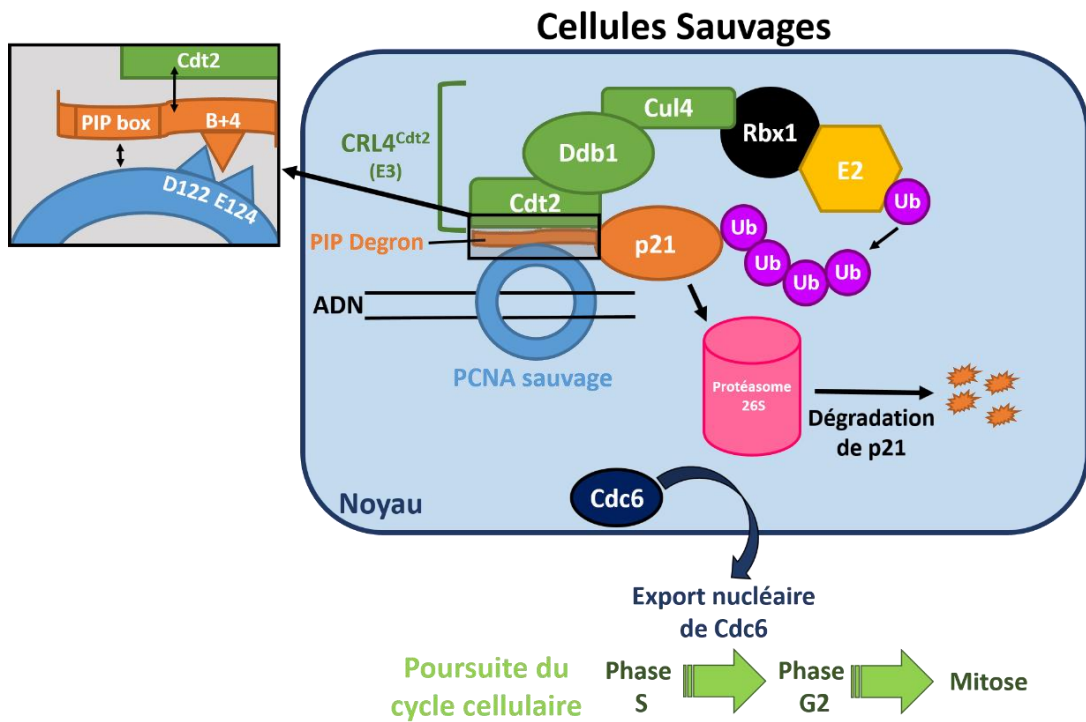


Figure 50: Représentation schématique et hypothétique du mécanisme cellulaire permettant d'expliquer l'origine de la mort des cellules mutantes pour la protéine PCNA (D122A et E124A)

Ci-dessus, la représentation schématique du mécanisme de reconnaissance de la protéine p21 par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} dans les cellules sauvages ou mutantes pour la protéine PCNA (D122A ou E124A). Dans les cellules sauvages, la protéine p21 s'associe à la protéine PCNA chargée sur l'ADN à l'aide de son motif PIP degron. Le complexe multi-protéique PCNA-p21 est reconnu par CRL4^{Cdt2}. L'E3 ubiquitine ligase interagit avec la protéine Rbx1 qui permet de recruter E2, une enzyme de conjugaison chargée avec une molécule d'ubiquitine. L'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} provoque la poly-ubiquitination de p21 qui permet la dégradation cette dernière par le protéasome 26S. En absence de la protéine p21, la protéine Cdc6 est exportée en dehors du noyau durant la phase S. La régulation de la concentration de la protéine Cdc6 est essentielle pour la régulation de l'initiation des origines de réplication de l'ADN. Au sein des cellules mutantes, aucune dégradation de la protéine p21 n'est initiée par le protéasome 26S. En effet, la protéine p21 ne peut pas être poly-ubiquitinée car cette dernière n'est pas reconnue par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}. Ce défaut de reconnaissance est directement lié à une instabilité de l'interaction entre la protéine p21 et la protéine PCNA provoquée par la substitution d'un des deux acides aminés D122 et E124 par une alanine. L'accumulation de la protéine p21 inhibe alors l'export nucléaire de la protéine Cdc6 au cours de la phase S, entraînant ainsi une sur-activation des origines de réplication. Ce phénomène est connu sous le nom de re-réplication de l'ADN. L'initiation d'un trop grand nombre d'origines de réplication provoque des collisions entre les fourches de réplication menant à terme à la synthèse de fragment d'ADN double-brins. Les extrémités des fragments d'ADN double-brins sont alors reconnues par les mécanismes de réparation cellulaire comme des cassures d'ADN double-brins. Les cellules mutantes sont alors dans l'impossibilité d'entrer en mitose et l'arrêt prolongé du cycle cellulaire en phase G2 finit par causer la mort des cellules mutantes.

Aucune régulation active de la voie de dégradation CRL4^{Cdt2} n'a encore été découverte. L'hypothèse actuelle met en jeu un mécanisme de régulation dit « passif ». La reconnaissance des protéines cibles par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} est rendue possible uniquement si ces dernières interagissent avec la protéine PCNA, elle-même chargée sur l'ADN (Haven et al., 2009). La nécessité d'une interaction entre PCNA et l'ADN suffit à expliquer l'initiation de la voie de dégradation CRL4^{Cdt2} uniquement durant la phase S ou lors d'évènements de réparation de dommages à l'ADN. Nous nous sommes demandés s'il existait une régulation dite « active » de cette voie de dégradation CRL4^{Cdt2}. En effet, des analyses par spectrométrie de masse de la protéine PCNA ont suggéré que les sites D122 et E124 pouvaient être la cible de PARylation (Zhang et al., 2013) cependant aucune étude à ce jour n'a permis de mettre en lien ces PARylations potentielles avec une éventuelle fonction de la protéine PCNA. Nous nous sommes posés la question s'il était alors possible de réguler la reconnaissance des protéines cibles par CRL4^{Cdt2} via la PARylation des résidus en position 122 et 124 de la protéine PCNA. Nous avons réalisé un test de PARylation *in vitro* à l'aide de la protéine PARP1 qui nous a permis de mettre en évidence que le site E124 pourrait être un des sites majeurs de PARylation de la protéine PCNA. Nous pourrions ainsi imaginer que la PARylation du résidu E124 représente un système de régulation de la dégradation des protéines telles que Cdt1, p21 et Set8. La PARylation aurait pour but de déstabiliser l'interaction entre la protéine PCNA et la protéine cible afin d'empêcher la

reconnaissance du complexe protéique par l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2}. Nos résultats préliminaires ont été réalisés *in vitro* à l'aide de protéines PCNA purifiées. Il serait judicieux de réaliser à nouveau un test de PARylation à l'aide d'extraits protéiques de cellules mutantes exprimant les protéines PCNA D122A ou E124A en présence de différentes protéines PARP. Il serait également intéressant de réaliser des études d'interactions protéiques entre la protéine Cdt2 (sous-unité du complexe CRL4^{Cdt2} représentant le récepteur des protéines cibles), les protéines cibles et les protéines PCNA mutantes PARylées ou non. La formation des complexes protéiques pourra être visualisée sur gel de polyacrylamide non dénaturant. Nous pourrions ainsi déceler une éventuelle inhibition de l'interaction entre le complexe PCNA-protéine cible et l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{Cdt2} lorsque la protéine PCNA est PARylée. Jusqu'à présent aucune corrélation n'a été découverte entre la régulation de la voie de dégradation CRL4^{Cdt2} et la PARylation de la protéine PCNA, cependant nos résultats *in vitro* présentent une piste d'étude intéressante concernant le rôle éventuel de la PARylation du résidu E124.

Le développement de notre outil génétique, nous a permis de mettre en évidence l'implication des résidus D122 et E124 de la protéine PCNA dans la voie de dégradation ubiquitine-dépendante CRL4^{Cdt2}. De plus, nos résultats préliminaires sur la PARylation de PCNA, laisse une perspective d'étude concernant un éventuel système de régulation de la voie CRL4^{Cdt2}.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Construction des plasmides d'inactivation et de complémentation:

Les plasmides d'inactivation pCas9 anti-PCNA GFP et pCas9 anti-PCNA Puro ont été construits respectivement à partir des plasmides d'origine pSpCas9(BB)-2A-GFP (référence PX458 #48138) et pSpCas9(BB)-2A-Puro (référence PX459 #62988) (addgene™, Cambridge, Massachusetts, États-Unis). Les plasmides PX458 et PX459 ont été digérés par l'enzyme de restriction BbsI (New England Biolabs™, Massachusetts, États-Unis). Un fragment d'ADN de 20 nucléotides codant pour un ARN guide dirigé contre une région de l'exon 1 du gène de PCNA (GGGCCAGGTTGCGGTCGCAG) a été introduit dans le site BbsI par ligation via une T4 ADN Ligase (New England Biolabs™). Pour plus d'informations sur la composition des plasmides d'inactivation, veuillez-vous reporter à la section Résultats A.1.a.

La mini-banque de plasmides de complémentation pComp PCNA WT, K77R, K80R, Y114F, K117R, D120A, D122A, D122N, D122E, E124A, E124Q, E124D, K164R, K168R, Y211F et K248R a été construite à partir du même plasmide d'origine pCEP4 (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Un fragment d'ADN comportant une séquence codant la protéine PCNA murine humanisée (IDT™, Coralville, Iowa, États-Unis) suivie d'une séquence codant le peptide T2A elle-même suivie d'une séquence codant la protéine mCherry, a été inséré au sein de la cassette de clonage du plasmide pCEP4 préalablement digérée par les enzymes de restriction BamHI et KpnI (New England Biolabs™). Pour plus d'informations sur la nature des plasmides de complémentation, veuillez-vous reporter à la section Résultats A.2.a.

Culture cellulaire:

Nous avons utilisé trois lignées cellulaires différentes: les HEK 293T sont des cellules embryonnaires humaines de rein qui ont été cultivées dans le milieu Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) avec 4,5 g/l de glucose + GLUTAMAX™ -I + 10% de fetal calf serum (FCS) + 1% pénicilline–streptomycine (IGBMC, Illkirch, France) et incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humains dérivés d'un tissu pulmonaire) et les cellules Hct-116 (cellules humaines issues du cancer du côlon) ont été cultivées en présence du milieu Gibco™ DMEM avec 4,5 g/l de glucose + GLUTAMAX™ -I + 10% de FCS + 1mM Pyruvate de

sodium + 0.1% de Gentamycine (IGBMC, Illkirch, France) et incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂

Méthode de transfection plasmidique:

Les cellules en cultures (boîtes 6 puits) ont été transfectées à l'aide d'une solution d'Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific™): 100 µl/puits contenant 1 µg de chaque plasmide et du TransIT (Mirus™, Madison, États-Unis) avec un ratio de 3 µl de TransIT par µg de plasmide. La solution de transfection est appliquée directement sur les cellules en culture. On observe les cellules à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence Leica™ DMIL, 24h après la transfection.

Sélection antibiotique:

Suite à la transfection des plasmides d'inactivation et de complémentation, les cellules ayant acquis les deux plasmides contiennent des gènes de résistances aux antibiotiques suivants: Puromycine et Hygromycine B. Dans un premier temps, les cellules co-transfectées sont sélectionnées 72 heures à l'aide d'un traitement double-antibiotique. Le milieu de culture présente alors une concentration finale de 0,5 µg/ml de Puromycine (Thermo Fisher Scientific™) et de 0,2 mg/ml d'Hygromycine B (Merck™, Kenilworth, New Jersey, États-Unis). S'en suit en deuxième étape, un traitement antibiotique à durée indéterminée. Le milieu de culture présente alors une concentration finale de 0,2 mg/ml d'Hygromycine B.

Western Blot:

La plupart des analyses par Western Blot ont été réalisées à partir d'extraits protéiques issus de cultures cellulaires, les autres analyses par Western Blot ont été réalisées lors des tests de réplication de l'ADN et de PARylation de PCNA *in vitro*. Des aliquots d'extraits protéiques ont été déposés soit sur des gels de polyacrylamide dénaturants standard 12%, ou soit sur des gels gradients dénaturants (10 à 15%). Après migration des protéines, nous avons effectué un transfert de ces dernières sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare Life Sciences™, Chicago, Illinois, États-Unis). Cette membrane a d'abord été saturée à l'aide d'une solution PBS (Phosphate-buffered saline) 1X contenant 5% de lait, puis incubée sur la nuit à 4°C à l'aide d'une solution de PBS-Tween 0,1% contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Les anticorps primaires utilisés dans l'analyse des extraits protéiques sont les

suivants: l'anticorps monoclonal de souris anti-PCNA (PC10) (Santa Cruz Biotechnology™, Dallas, Texas, États-Unis), l'anticorps polyclonal de lapin anti-T2A (IGBMC), l'anticorps polyclonal de lapin anti-actine (Sigma-Aldrich™, Saint-Louis, Missouri, États-Unis), l'anticorps monoclonal de lapin anti-Cdt1 (Cell Signaling Technology™, Danvers, Massachusetts, États-Unis) et l'anticorps polyclonal de lapin anti-p21 (Santa Cruz Biotechnology™). L'anticorps monoclonal de souris anti-p125 (TEBU-BIO™, le perray en yvelines, France) et l'anticorps polyclonal de lapin anti-PARP1 (Enzo Life Sciences™, Lausanne, Suisse) ont été utilisés lors des analyses par Western Blot durant les tests de réplication de l'ADN et de PARylation de la protéine PCNA *in vitro*. La membrane de nitrocellulose est lavée à l'aide d'une solution de PBS-Tween 0,1%, puis cette dernière est incubée durant 1 heure à température ambiante à l'aide d'une solution de PBS-Tween 0,1% contenant l'anticorps secondaire. Deux types d'anticorps secondaires ont été utilisés en fonctions de l'espèce dont provient l'anticorps primaire: l'anticorps d'âne anti-IgG de souris IRDye 800CW (LI-COR™, Lincoln, Nebraska, États-Unis) et l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin IRDye 680LT (LI-COR™). Ces anticorps secondaires émettent une fluorescence infrarouge dans les longueurs d'ondes correspondantes à 800 nm et 680 nm. Nous détectons la fluorescence émise à l'aide d'un système d'imagerie Odyssey (LI-COR™).

Immunofluorescence:

En fonction des expériences et avant fixation, les cellules en culture sont soumises à un traitement de 5 minutes à l'aide d'un tampon CSK (cytoskeletal) (HEPES 10mM pH 7,4, 300 mM Sucrose, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 0,2% Triton-X100, 100 mM NaCl, inhibiteurs de protéase) qui permet de perméabiliser les cellules; ainsi les protéines dites solubles seront éliminées lors du deuxième lavage au PBS 1X. Ce traitement CSK a été employé afin de révéler la protéine PCNA sur la chromatine. Les cellules traitées ou non par le tampon CSK sont ensuite fixées à l'aide d'une solution PFA (Paraformaldehyde) 4% pendant 10 minutes. Après une étape de lavage au PBS 1X, on incube les cellules dans une solution de perméabilisation (PBS 1X, Triton x 100 0,2%) durant 20 minutes. S'en suit une incubation des cellules durant 1 heure à l'aide d'une solution PBS 1X-10% FCS contenant l'anticorps primaire. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants: l'anticorps monoclonal de souris anti-PCNA (PC10) (Santa Cruz Biotechnology™) ainsi que l'anticorps monoclonal de lapin anti-γ-H2ax (abcam™, Cambridge, Royaume-Uni). Suite au lavage avec du PBS 1X, les cellules sont

incubées 1 heure à l'aide d'une solution PBS 1X-10% FCS contenant l'anticorps secondaire. Les anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de souris (Alexa Fluor™ 488) et (Alexa Fluor™ 568) sont utilisés afin de cibler l'anticorps anti-PCNA (PC10) tandis que l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin (Alexa Fluor™ 488) est utilisé afin de cibler l'anticorps anti- γ -H2ax. Suite à une dernière étape de lavage avec du PBS 1X, on ajoute du DAPI Fluoromount-G™ (Southern Biotech™, Birmingham, Alabama, États-Unis), puis les échantillons sont montés entre lame et lamelle pour être analysés avec un microscope à épifluorescence Leica™ DM5500 B.

Traitement au MMS:

Les cellules ont subi un traitement de 1 heure à l'aide de l'agent génotoxique MMS. Les concentrations finales dans le milieu de culture étaient les suivantes : $1,8 \cdot 10^{-3}$ / $1,8 \cdot 10^{-2}$ / $1,8 \cdot 10^{-1}$ /1,8 et 18 mM de MMS. Après le changement du milieu de culture, les cellules ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ durant 24 heures. Après un lavage des cellules à l'aide d'une solution de PBS 1X, ces dernières ont été fixées à l'aide d'une solution PFA 4% durant 10 minutes. Une fois la solution de PFA retirée, les cellules sont incubées 30 minutes à l'aide d'une solution de marquage (0,5% de cristal violet, 99,5 % H₂O distillée). Puis on effectue plusieurs lavages des cellules à l'H₂O distillée avant de pouvoir observer les cellules colorées en violet.

Traitement aux UVC:

Le milieu de culture des cellules a été retiré, puis les cellules ont subi une irradiation équivalente à 5 Joules/m² d'UVC (254 nm). Après l'ajout du milieu de culture, les cellules ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ durant 72 heures. Après une étape de lavage des cellules à l'aide d'une solution de PBS 1X, ces dernières ont été fixées puis marquées à l'aide d'une solution de cristal violet.

Synthèse et purification des protéines:

Nous avons construit des plasmides d'expression bactériens de type pET codant pour les protéines PCNA WT, D120A, D122A et E124A fusionnées à une séquence peptidique poly-histidines (6 histidines). Des bactéries E. coli BL21 (DE3) pLys S ont été transformées à l'aide de ces plasmides puis cultivées à 30°C pendant 24 heures dans un milieu d'auto induction ZYM-5052 avec une concentration finale de 34 mg/ml de Chloramphénicol et de 100 mg/ml d'Ampicilline. La suspension bactérienne est

ensuite centrifugée, le surnageant éliminé et les bactéries sont reprises dans 5 mL de tampon de suspension (PBS, 0,1% Nonidet P-40), puis lysées par ultra-sonication (Vibra cell™ 72412). La sonde est utilisée à 60 % de son amplitude avec des « pulses » de 10 secondes espacés de 10 secondes pendant 6 minutes. Les suspensions sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes à 4°C à 36 000 rpm. Le surnageant constitue l'extrait cellulaire bactérien soluble. Les protéines histidinylées sont déposées sur une colonne 1 ml HiTrap™ HP chargée en Nickel et équilibrée à l'aide d'un tampon « d'équilibrage » (HEPES 20 mM pH 7,2, 0,3 M NaCl, 0,5 mM de TCEP). L'élution des protéines (PCNA WT-his, PCNA D120A-his, PCNA D122A-his et PCNA E124A-his) est réalisée à l'aide du tampon d'équilibrage ayant pour concentration finale, 300 mM d'imidazole. La fixation des protéines d'intérêt au support de la colonne est permise grâce à l'interaction de la séquence protéique poly-histidine avec le Nickel présenté par la colonne. Les protéines fixées sont alors éluées par compétition avec l'imidazole. Les fractions protéiques issues de la chromatographie d'affinité sont ensuite chargées sur une colonne HiLoad™ Superdex 200. Une chromatographie d'exclusion est réalisée à l'aide d'un tampon PBS 1X. Cette chromatographie d'exclusion provoque l'élimination d'impuretés et nous permet ainsi d'obtenir des solutions protéiques très pures.

Test de répllication *in vitro*:

Nous avons réalisé un extrait protéique à partir de cellules MRC-5 en culture. La moitié de cet extrait protéique a subi une déplétion de la protéine PCNA. Pour ce faire nous avons utilisé des billes « Dynabeads His-TAG Isolation and Pulldown Novex™ » (Thermo Fisher Scientific™) auxquelles nous avons fixé le peptide His-GST-Con1. Le peptide Con1 de 16 acides aminés SAVLQKKITDYFHPKK est dérivé de la séquence protéique de l'extrémité C-terminale de la protéine p21 et présente une forte affinité pour la protéine PCNA humaine permettant ainsi de dépléter nos extraits protéiques en PCNA. L'autre moitié de l'extrait protéique de cellules MRC-5 a subi les mêmes étapes de déplétion mais avec des billes présentant un peptide « Mock » n'ayant aucune affinité avec la protéine PCNA. Le peptide « Mock » possède la même composition en acides aminés que le peptide Con1 mais disposés de façon aléatoire. Le principe de répllication *in vitro* consiste en l'élongation d'une amorce radioactive couplé à un plasmide simple brin pUC118.ss. L'amorce de 24 bases complémentaires au plasmide pUC118.ss est radio-marquée à son extrémité 5'. Le phosphate en position gamma est radioactif (³²P). Le test de répllication de l'ADN consiste à visualiser

l'élongation de l'amorce hybridée sur le plasmide pUC118.ss. Cette élongation est réalisée dans un tampon de répllication (HEPES 50 mM pH 7,8, 7 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4 mM ATP, 500 µM dNTPs, 40 mM Créatine Phosphate et 100 µg/ml de Créatine Kinase) à 37°C pendant 10 minutes en présence de 70 ng d'extrait de protéines déplété pour la protéine PCNA, de 140 ng d'une des protéines PCNA purifiées (WT, D120A, D122A ou E124A) (voir protocole Synthèse et purification des protéines) et de 10 fmol de plasmide pUC118.ss hybridé avec l'amorce radioactive. Suite à l'élongation des amorces, des aliquots des réactions ont été analysés par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-PCNA (PC10) et d'un anticorps anti-p125. Les produits d'élongation ont subi une digestion par l'enzyme PvuII (New England Biolabs™) puis ont été déposés sur un gel de polyacrylamide-Urée dénaturant de 6 %. Après séchage du gel, celui-ci est mis en contact avec une plaque au phosphore photostimulable (Molecular Dynamics™) pendant 24 heures. La plaque est ensuite scannée à l'aide du dispositif Typhoon™ FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences™).

Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux:

Les cellules en culture sont récoltées, lavées avec du tampon PBS 1X puis fixées pendant 1 heure sur glace à l'aide d'une solution de PBS 1x contenant 70% d'Ethanol. Après centrifugation, le culot de cellules est repris dans du PBS 1X. Les cellules sont réhydratées durant la nuit à 4°C. Les cellules sont alors traitées à la RNase (100 µg/ml) durant 30 minutes à température ambiante. On ajoute à la solution cellulaire de l'iodure de Propidium (50 µg/ml) et on laisse incuber les cellules 30 minutes à l'obscurité. Les suspensions cellulaires sont analysées à l'aide d'un BD FACSCalibur™.

Test de PARylation *in vitro*:

Les protéines PCNA purifiées (WT, D120A, D122A ou E124A) (voir protocole Synthèse et purification des protéines) ont subi un test de PARylation *in vitro*. Ce test de PARylation est réalisé dans un tampon d'élongation (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, 2 mM de NAD⁺ froid, 2µg d'ADN de sperme de saumon partiellement digéré) à 30 °C pendant 30 minutes en présence d'1 µg de la protéine PCNA d'intérêt, de 0,5 µg de protéine PARP1 purifiée et de 5 µCi de NAD⁺ marqué radioactivement avec du ³²P (activité spécifique 800 Ci/mmol). Après incubation, des aliquots des solutions réactionnelles ont été déposés sur un gel de polyacrylamide gradient dénaturant (10 à 15 %) puis analysés par Western Blot à l'aide des anticorps anti-PCNA (PC10) et anti-

PARP1. Le reste des solutions réactionnelles est déposé sur un deuxième gel de polyacrylamide gradient dénaturant (10 à 15 %). Les protéines PARylées et donc radioactives sont révélées grâce à la mise en contact pendant 24 heures du gel de polyacrylamide avec une plaque au phosphore photostimulable (Molecular Dynamics™). La plaque au phosphore est alors scannée à l'aide du dispositif Typhoon™ FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences™).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abbas, T., Shibata, E., Park, J., Jha, S., Karnani, N., and Dutta, A. (2010). CRL4Cdt2 Regulates Cell Proliferation and Histone Gene Expression by Targeting PR-Set7/Set8 for Degradation. *Molecular Cell* 40, 9–21.

Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protić, M., Hübscher, U., Egly, J.M., and Wood, R.D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80, 859–868.

Actis, M., Inoue, A., Evison, B., Perry, S., Punchihewa, C., and Fujii, N. (2013). Small molecule inhibitors of PCNA/PIP-box interaction suppress translesion DNA synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21, 1972–1977.

Archambault, V., Ikui, A.E., Drapkin, B.J., and Cross, F.R. (2005). Disruption of Mechanisms That Prevent Rereplication Triggers a DNA Damage Response. *Molecular and Cellular Biology* 25, 6707–6721.

Ardley, H.C., Hung, C.-C., and Robinson, P.A. (2005). The aggravating role of the ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *FEBS Letters* 579, 571–576.

Arias, E.E., and Walter, J.C. (2006). PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nature Cell Biology* 8, 84–90.

Azam, N., Vairapandi, M., Zhang, W., Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2001). Interaction of CR6 (GADD45 γ) with Proliferating Cell Nuclear Antigen Impedes Negative Growth Control. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2766–2774.

Banks, D., Wu, M., Higa, L.A., Gavrilova, N., Quan, J., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). L2DTL/CDT2 and PCNA Interact with p53 and Regulate p53 Polyubiquitination and Protein Stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 Complexes. *Cell Cycle* 5, 1719–1729.

Baranovskiy, A.G., Zhang, Y., Suwa, Y., Gu, J., Babayeva, N.D., Pavlov, Y.I., and Tahirov, T.H. (2016). Insight into the Human DNA Primase Interaction with Template-Primer. *Journal of Biological Chemistry* 291, 4793–4802.

Barbour, L., and Xiao, W. (2003). Regulation of alternative replication bypass

pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutation Research* 532, 137–155.

Barrangou, R., and Marraffini, L.A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell* 54, 234–244.

Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry* 71, 333–374.

Berger, F., Ramírez-Hernández, M.H., and Ziegler, M. (2004). The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends in Biochemical Sciences* 29, 111–118.

Bhogaraju, S., and Dikic, I. (2016). Ubiquitination without E1 and E2 enzymes. *Nature* 533, 43–44.

Bloom, L.B. (2009). Loading clamps for DNA replication and repair. *DNA Repair* 8, 570–578.

Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* 326, 1509–1512.

Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., and Macdonald-Bravo, H. (1987a). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326, 515–517.

Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., and Macdonald-Bravo, H. (1987b). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326, 515–517.

Bruck, I., and O'Donnell, M. (2001). The ring-type polymerase sliding clamp family. *Genome Biology* 2, REVIEWS3001.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* 282, 1497–1501.

Burgers, P.M.J., Koonin, E. V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K.C., Christman, M.F., Copeland, W.C., Friedberg, E.C., Hanaoka, F., Hinkle, D.C., et al. (2001). Eukaryotic DNA Polymerases: Proposal for a Revised Nomenclature. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43487–43490.

- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology* 1, 193–199.
- Cha-Molstad, H., Kwon, Y.T., and Kim, B.Y. (2015). Amino-terminal arginylation as a degradation signal for selective autophagy. *BMB Reports* 48, 487–488.
- Champoux, J.J. (2001). DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 70, 369–413.
- Chapados, B.R., Hosfield, D.J., Han, S., Qiu, J., Yelent, B., Shen, B., and Tainer, J.A. (2004). Structural basis for FEN-1 substrate specificity and PCNA-mediated activation in DNA replication and repair. *Cell* 116, 39–50.
- Chen, Z.J., and Sun, L.J. (2009). Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Molecular Cell* 33, 275–286.
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., and Nicolas, J.F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 15, 1968–1973.
- Chuang, L.S., 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 p21WAF1. *Science (New York, N.Y.)* 277, 1996–2000.
- Ciechanover, A. (2015). The unravelling of the ubiquitin system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 322–324.
- Clague, M.J., Barsukov, I., Coulson, J.M., Liu, H., Rigden, D.J., and Urbé, S. (2013). Deubiquitylases From Genes to Organism. *Physiological Reviews* 93, 1289–1315.
- Clark, A.B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R.K., and Kunkel, T.A. (2000). Functional Interaction of Proliferating Cell Nuclear Antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36498–36501.
- Cordeiro, D., and Di Girolamo, M. (2003). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *The EMBO Journal* 22, 1953–1958.
- Das-Bradoo, S., Ricke, R.M., and Bielinsky, A.-K. (2006). Interaction between PCNA and Diubiquitinated Mcm10 Is Essential for Cell Growth in Budding Yeast. *Molecular and Cellular Biology* 26, 4806–4817.

- Davidson, I.F., Li, A., and Blow, J.J. (2006). Deregulated Replication Licensing Causes DNA Fragmentation Consistent with Head-to-Tail Fork Collision. *Molecular Cell* *24*, 433–443.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* *471*, 602–607.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.P. (2009). RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annual Review of Biochemistry* *78*, 399–434.
- Desplancq, D., Freund, G., Conic, S., Sibler, A.-P., Didier, P., Stoessel, A., Oulad-Abdelghani, M., Vigneron, M., Wagner, J., Mély, Y., et al. (2016). Targeting the replisome with transduced monoclonal antibodies triggers lethal DNA replication stress in cancer cells. *Experimental Cell Research* *342*, 145–158.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P., and Moineau, S. (2008). Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* *190*, 1390–1400.
- Dieckman, L.M., Freudenthal, B.D., and Washington, M.T. (2012). PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. *Sub-Cellular Biochemistry* *62*, 281–299.
- Dietsch, F., Donzeau, M., Cordonnier, A.M., Weiss, E., Chatton, B., and Vigneron, M. (2017). A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells. *BioTechniques* *62*, 80–82.
- Dionne, I., Nookala, R.K., Jackson, S.P., Doherty, A.J., and Bell, S.D. (2003). A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Cell* *11*, 275–282.
- Drag, M., Mikolajczyk, J., Krishnakumar, I.M., Huang, Z., and Salvesen, G.S. (2008). Activity profiling of human deSUMOylating enzymes (SENPs) with synthetic substrates suggests an unexpected specificity of two newly characterized members of the family. *Biochemical Journal* *409*, 461–469.
- Dworakowska, D., Gózdź, S., Jassem, E., Badzio, A., Kobierska, G., Urbaniak, A., Skokowski, J., Damps, I., and Jassem, J. (2002). Prognostic relevance of proliferating

cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* *35*, 35–41.

Fan, J., Otterlei, M., Wong, H.-K., Tomkinson, A.E., and Wilson, D.M. (2004). XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. *Nucleic Acids Research* *32*, 2193–2201.

Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. (1994). Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 8655–8659.

Flores-Rozas, H., Clark, D., and Kolodner, R.D. (2000). Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. *Nature Genetics* *26*, 375–378.

Flotho, A., and Melchior, F. (2013). Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annual Review of Biochemistry* *82*, 357–385.

Gali, H., Juhasz, S., Morocz, M., Hajdu, I., Fatyol, K., Szukacsov, V., Burkovics, P., and Haracska, L. (2012). Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Research* *40*, 6049–6059.

Garg, P., Stith, C.M., Sabouri, N., Johansson, E., and Burgers, P.M. (2004). Idling by DNA polymerase delta maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication. *Genes & Development* *18*, 2764–2773.

Gary, R., Ludwig, D.L., Cornelius, H.L., MacInnes, M.A., and Park, M.S. (1997). The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *The Journal of Biological Chemistry* *272*, 24522–24529.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, E2579–E2586.

Gibson, B.A., and Kraus, W.L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *13*,

411–424.

Gilljam, K.M., Feyzi, E., Aas, P.A., Sousa, M.M.L., Müller, R., Vågbø, C.B., Catterall, T.C., Liabakk, N.B., Slupphaug, G., Drabløs, F., et al. (2009). Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *The Journal of Cell Biology* 186, 645–654.

Gomes, X. V., and Burgers, P.M.J. (2001). ATP Utilization by Yeast Replication Factor C. *Journal of Biological Chemistry* 276, 34768–34775.

Green, B.M., Morreale, R.J., Ozaydin, B., Derisi, J.L., and Li, J.J. (2006). Genome-wide mapping of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* reveals that mechanisms preventing reinitiation of DNA replication are not redundant. *Molecular Biology of the Cell* 17, 2401–2414.

Green, M., Ishino, M., and Loewenstein, P.M. (1989). Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* 58, 215–223.

Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* 87, 297–306.

Han, Z.-J., Feng, Y.-H., Gu, B.-H., Li, Y.-M., and Chen, H. (2018). The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *International Journal of Oncology* 52, 1081–1094.

Haracska, L., Johnson, R.E., Unk, I., Phillips, B.B., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2001a). Targeting of human DNA polymerase δ to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 14256–14261.

Haracska, L., Johnson, R.E., Unk, I., Phillips, B., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2001b). Physical and Functional Interactions of Human DNA Polymerase δ with PCNA. *Molecular and Cellular Biology* 21, 7199–7206.

Haracska, L., Unk, I., Johnson, R.E., Phillips, B.B., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2002). Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase δ by PCNA. *Molecular and Cellular Biology* 22, 784–791.

- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., and Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Molecular Biology of the Cell* 6, 387–400.
- Hasan, S., Stucki, M., Hassa, P.O., Imhof, R., Gehrig, P., Hunziker, P., Hübscher, U., and Hottiger, M.O. (2001). Regulation of human flap endonuclease-1 activity by acetylation through the transcriptional coactivator p300. *Molecular Cell* 7, 1221–1231.
- Hatakeyama, K., Nemoto, Y., Ueda, K., and Hayaishi, O. (1986). Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose). *The Journal of Biological Chemistry* 261, 14902–14911.
- 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. *Molecular Cell* 35, 93–104.
- Havens, C.G., and Walter, J.C. (2011). Mechanism of CRL4Cdt2, a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase. *Genes & Development* 25, 1568–1582.
- Havens, C.G., Shobnam, N., Guarino, E., Centore, R.C., Zou, L., Kearsey, S.E., and Walter, J.C. (2012). Direct Role for Proliferating Cell Nuclear Antigen in Substrate Recognition by the E3 Ubiquitin Ligase CRL4^{Cdt2}. *Journal of Biological Chemistry* 287, 11410–11421.
- Hediger, F., and Gasser, S.M. (2006). Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Current Opinion in Genetics & Development* 16, 143–150.
- Heler, R., Samai, P., Modell, J.W., Weiner, C., Goldberg, G.W., Bikard, D., and Marraffini, L.A. (2015). Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation. *Nature* 519, 199–202.
- Hendel, A., Krijger, P.H.L., Diamant, N., Goren, Z., Langerak, P., Kim, J., Reißner, T., Lee, K., Geacintov, N.E., Carell, T., et al. (2011). PCNA Ubiquitination Is Important, But Not Essential for Translesion DNA Synthesis in Mammalian Cells. *PLoS Genetics* 7, e1002262.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425–479.

- Higa, L.A., Banks, D., Wu, M., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). L2DTL/CDT2 Interacts with the CUL4/DDB1 Complex and PCNA and Regulates CDT1 Proteolysis in Response to DNA Damage. *Cell Cycle* 5, 1675–1680.
- Hilton, I.B., D’Ippolito, A.M., Vockley, C.M., Thakore, P.I., Crawford, G.E., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 33, 510–517.
- Hingorani, M.M., and O’Donnell, M. (2000). Sliding clamps: a (tail)ored fit. *Current Biology : CB* 10, R25-9.
- 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.
- Hoelz, D.J., Arnold, R.J., Dobrolecki, L.E., Abdel-Aziz, W., Loehrer, A.P., Novotny, M. V., Schnaper, L., Hickey, R.J., and Malkas, L.H. (2006). The discovery of labile methyl esters on proliferating cell nuclear antigen by MS/MS. *PROTEOMICS* 6, 4808–4816.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Lüscher, B., Schüler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 208–219.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262–1278.
- Iida, T., Suetake, I., Tajima, S., Morioka, H., Ohta, S., Obuse, C., and Tsurimoto, T. (2002). PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 7, 997–1007.
- Jankevicius, G., Hassler, M., Golia, B., Rybin, V., Zacharias, M., Timinszky, G., and Ladurner, A.G. (2013). A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 508–514.
- Jin, J., Arias, E.E., Chen, J., Harper, J.W., and Walter, J.C. (2006). A Family of Diverse Cul4-Ddb1-Interacting Proteins Includes Cdt2, which Is Required for S Phase Destruction of the Replication Factor Cdt1. *Molecular Cell* 23, 709–721.

- Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. (2008). Mechanism of Ubiquitin-Chain Formation by the Human Anaphase-Promoting Complex. *Cell* *133*, 653–665.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* *337*, 816–821.
- Johnson, A., and O'Donnell, M. (2005). CELLULAR DNA REPLICASES: Components and Dynamics at the Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry* *74*, 283–315.
- Jónsson, Z.O., Podust, V.N., Podust, L.M., and Hübscher, U. (1995). Tyrosine 114 is essential for the trimeric structure and the functional activities of human proliferating cell nuclear antigen. *The EMBO Journal* *14*, 5745–5751.
- Jónsson, Z.O., Hindges, R., and Hübscher, U. (1998). Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *The EMBO Journal* *17*, 2412–2425.
- Jürgen Dohmen, R. (2004). SUMO protein modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1695*, 113–131.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* *113*, 127–137.
- Kannouche, P.L., Wing, J., and Lehmann, A.R. (2004). Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Molecular Cell* *14*, 491–500.
- Kim, J., and Kipreos, E.T. (2008a). Control of the Cdc6 replication licensing factor in metazoa: The role of nuclear export and the CUL4 ubiquitin ligase. *Cell Cycle* *7*, 146–150.
- Kim, S.-H., and Michael, W.M. (2008b). Regulated Proteolysis of DNA Polymerase η during the DNA-Damage Response in *C. elegans*. *Molecular Cell* *32*, 757–766.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., et al. (2011). Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Molecular Cell* *44*, 325–340.
- Kim, Y., Starostina, N.G., and Kipreos, E.T. (2008c). The CRL4Cdt2 ubiquitin ligase

targets the degradation of p21Cip1 to control replication licensing. *Genes & Development* *22*, 2507–2519.

Kleczkowska, H.E., Marra, G., Lettieri, T., and Jiricny, J. (2001). hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. *Genes & Development* *15*, 724–736.

Ko, R., and Bennett, S.E. (2005). Physical and functional interaction of human nuclear uracil-DNA glycosylase with proliferating cell nuclear antigen. *DNA Repair* *4*, 1421–1431.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry* *81*, 203–229.

Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *10*, 550–563.

Koonin, E. V, Makarova, K.S., and Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology* *37*, 67–78.

Kordek, R., Biernat, W., Alwasiak, J., and Liberski, P.P. (1996). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 immunopositivity in human astrocytic tumours. *Acta Neurochirurgica* *138*, 509–12; discussion 513.

Koundrioukoff, S., Jónsson, Z.O., Hasan, S., de Jong, R.N., van der Vliet, P.C., Hottiger, M.O., and Hübscher, U. (2000). A Direct Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Cdk2 Targets PCNA-interacting Proteins for Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 22882–22887.

Krawitz, D.C., Kama, T., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1/Hir proteins for silencing. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 614–625.

Kuo, L.J., and Yang, L.-X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Athens, Greece)* *22*, 305–309.

Kuriyan, J., and O'Donnell, M. (1993). Sliding Clamps of DNA Polymerases. *Journal of Molecular Biology* *234*, 915–925.

Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J., and Tan, E.M. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Experimental*

Cell Research 166, 209–219.

Lee, S.D., and Alani, E. (2006). Analysis of Interactions Between Mismatch Repair Initiation Factors and the Replication Processivity Factor PCNA. *Journal of Molecular Biology* 355, 175–184.

Leung, A.K.L. (2014). Poly(ADP-ribose): An organizer of cellular architecture. *The Journal of Cell Biology* 205, 613–619.

Levin, D.S., McKenna, A.E., Motycka, T.A., Matsumoto, Y., and Tomkinson, A.E. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Current Biology : CB* 10, 919–922.

Levit, M.N., Grebe, T.W., and Stock, J.B. (2002). Organization of the Receptor-Kinase Signaling Array That Regulates *Escherichia coli* Chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 36748–36754.

Li, M., Xu, X., Chang, C.-W., Zheng, L., Shen, B., and Liu, Y. (2018). SUMO2 conjugation of PCNA facilitates chromatin remodeling to resolve transcription-replication conflicts. *Nature Communications* 9, 2706.

Liu, C., Poitelea, M., Watson, A., Yoshida, S., Shimoda, C., Holmberg, C., Nielsen, O., and Carr, A.M. (2005). Transactivation of *Schizosaccharomyces pombe* cdt2+ stimulates a Pcu4-Ddb1-CSN ubiquitin ligase. *The EMBO Journal* 24, 3940–3951.

Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S.H., and Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 33, 3799–3811.

Maga, G., and Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 116, 3051–3060.

Maga, G., Stucki, M., Spadari, S., and Hübscher, U. (2000). DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase α prior to PCNA loading. *Journal of Molecular Biology* 295, 791–801.

Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Le Gac, N.T., Blanco, L., Blanca, G., Spadari, S., and Hübscher, U. (2002). Human DNA Polymerase λ Functionally and Physically Interacts with Proliferating Cell Nuclear Antigen in Normal and Translesion

DNA Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 48434–48440.

Majka, J., Chung, B.Y., and Burgers, P.M.J. (2004). Requirement for ATP by the DNA Damage Checkpoint Clamp Loader. *Journal of Biological Chemistry* 279, 20921–20926.

Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2013). The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems. *Biochemical Society Transactions* 41, 1392–1400.

Mali, P., Aach, J., Stranges, P.B., Esvelt, K.M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., and Church, G.M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology* 31, 833–838.

Malkas, L.H., Herbert, B.S., Abdel-Aziz, W., Dobrolecki, L.E., Liu, Y., Agarwal, B., Hoelz, D., Badve, S., Schnaper, L., Arnold, R.J., et al. (2006). A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19472–19477.

De March, M., Merino, N., Barrera-Vilarmau, S., Crehuet, R., Onesti, S., Blanco, F.J., and De Biasio, A. (2017). Structural basis of human PCNA sliding on DNA. *Nature Communications* 8, 13935.

Marti, U., and Hug, M. (1995). Acinar and cellular distribution and mRNA expression of the epidermal growth factor receptor are changed during liver regeneration. *Journal of Hepatology* 23, 318–327.

Marti, U., Ruchti, C., Kämpf, J., Thomas, G.A., Williams, E.D., Peter, H.J., Gerber, H., and Bürgi, U. (2001). Nuclear Localization of Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptors in Human Thyroid Tissues. *Thyroid* 11, 137–145.

Matsuda, K., Makise, M., Sueyasu, Y., Takehara, M., Asano, T., and Mizushima, T. (2007). Yeast two-hybrid analysis of the origin recognition complex of *Saccharomyces cerevisiae* : interaction between subunits and identification of binding proteins. *FEMS Yeast Research* 7, 1263–1269.

Matsumiya, S., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2001). Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 10, 17–23.

- Melixetian, M., Ballabeni, A., Masiero, L., Gasparini, P., Zamponi, R., Bartek, J., Lukas, J., and Helin, K. (2004). Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *The Journal of Cell Biology* 165, 473–482.
- Menck, C.F., and Munford, V. (2014). DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genetics and Molecular Biology* 37, 220–233.
- Méndez, J., and Stillman, B. (2003). Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *BioEssays* 25, 1158–1167.
- Mihaylov, I.S., Kondo, T., Jones, L., Ryzhikov, S., Tanaka, J., Zheng, J., Higa, L.A., Minamino, N., Cooley, L., and Zhang, H. (2002). Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A. *Molecular and Cellular Biology* 22, 1868–1880.
- Miller, J., McLachlan, A.D., and Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal* 4, 1609–1614.
- Milutinovic, S., Zhuang, Q., and Szyf, M. (2002). Proliferating Cell Nuclear Antigen Associates with Histone Deacetylase Activity, Integrating DNA Replication and Chromatin Modification. *Journal of Biological Chemistry* 277, 20974–20978.
- Miura, M., and Sasaki, T. (1996). Effect of XPA gene mutations on UV-induced immunostaining of PCNA in fibroblasts from xeroderma pigmentosum group A patients. *Mutation Research* 364, 51–56.
- Miwa, M., Saikawa, N., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Sugimura, T. (1979). Structure of poly(adenosine diphosphate ribose): identification of 2'-[1"-riboseyl-2"-(or 3"-(1"-riboseyl)]adenosine-5',5",5"-tris(phosphate) as a branch linkage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 595–599.
- Miwa, M., Ishihara, M., Takishima, S., Takasuka, N., Maeda, M., Yamaizumi, Z., Sugimura, T., Yokoyama, S., and Miyazawa, T. (1981). The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1 leads to 2) ribose-ribose linkage. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 2916–2921.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J., and Tan, E.M. (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 121, 2228–2234.

- Mohiuddin, M., Evans, T.J., Rahman, M.M., Keka, I.S., Tsuda, M., Sasanuma, H., and Takeda, S. (2018). SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promotes template switch in the chicken and human B cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *115*, 12793–12798.
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* *155*, 733–740.
- Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* *129*, 665–679.
- Montecucco, A., Rossi, R., Levin, D.S., Gary, R., Park, M.S., Motycka, T.A., Ciarrocchi, G., Villa, A., Biamonti, G., and Tomkinson, A.E. (1998). DNA ligase I is recruited to sites of DNA replication by an interaction with proliferating cell nuclear antigen: identification of a common targeting mechanism for the assembly of replication factories. *The EMBO Journal* *17*, 3786–3795.
- Motegi, A., Sood, R., Moinova, H., Markowitz, S.D., Liu, P.P., and Myung, K. (2006). Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *The Journal of Cell Biology* *175*, 703–708.
- Motegi, A., Liaw, H.-J., Lee, K.-Y., Roest, H.P., Maas, A., Wu, X., Moinova, H., Markowitz, S.D., Ding, H., Hoeijmakers, J.H.J., et al. (2008). Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 12411–12416.
- Müller, R., Misund, K., Holien, T., Bachke, S., Gilljam, K.M., Våtsveen, T.K., Rø, T.B., Bellacchio, E., Sundan, A., and Otterlei, M. (2013). Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Protein Interactions Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE* *8*, e70430.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Molecular Cell* *4*, 529–540.
- Nalepa, G., Rolfe, M., and Harper, J.W. (2006). Drug discovery in the ubiquitin–proteasome system. *Nature Reviews Drug Discovery* *5*, 596–613.

- Naryzhny, S.N., and Lee, H. (2004). The Post-translational Modifications of Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Journal of Biological Chemistry* 279, 20194–20199.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF SMC AND KLEISIN COMPLEXES. *Annual Review of Biochemistry* 74, 595–648.
- Nasmyth, K.A., and Reed, S.I. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 2119–2123.
- Nguyen, V.Q., Co, C., and Li, J.J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* 411, 1068–1073.
- Niculescu, A.B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and Cellular Biology* 18, 629–643.
- Niimi, A., Suka, N., Harata, M., Kikuchi, A., and Mizuno, S. (2001). Co-localization of chicken DNA topoisomerase IIalpha, but not beta, with sites of DNA replication and possible involvement of a C-terminal region of alpha through its binding to PCNA. *Chromosoma* 110, 102–114.
- Niimi, A., Brown, S., Sabbioneda, S., Kannouche, P.L., Scott, A., Yasui, A., Green, C.M., and Lehmann, A.R. (2008). Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16125–16130.
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., and Sugino, A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 59, 598–605.
- Olsen, S.K., Capili, A.D., Lu, X., Tan, D.S., and Lima, C.D. (2010). Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1. *Nature* 463, 906–912.
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T.A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P.A., Steinsbekk, K., Bakke, O., and Krokan, H.E. (1999). Post-replicative base excision repair in replication foci. *The EMBO Journal* 18, 3834–3844.

- Oyama, M., Wakasugi, M., Hama, T., Hashidume, H., Iwakami, Y., Imai, R., Hoshino, S., Morioka, H., Ishigaki, Y., Nikaido, O., et al. (2004). Human NTH1 physically interacts with p53 and proliferating cell nuclear antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321, 183–191.
- Pan, Z.Q., Reardon, J.T., Li, L., Flores-Rozas, H., Legerski, R., Sancar, A., and Hurwitz, J. (1995). Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 22008–22016.
- Papouli, E., Chen, S., Davies, A.A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., and Ulrich, H.D. (2005). Crosstalk between SUMO and Ubiquitin on PCNA Is Mediated by Recruitment of the Helicase Srs2p. *Molecular Cell* 19, 123–133.
- Park, J.M., Yang, S.W., Yu, K.R., Ka, S.H., Lee, S.W., Seol, J.H., Jeon, Y.J., and Chung, C.H. (2014). Modification of PCNA by ISG15 Plays a Crucial Role in Termination of Error-Prone Translesion DNA Synthesis. *Molecular Cell* 54, 626–638.
- Parker, J.L., Bucceri, A., Davies, A.A., Heidrich, K., Windecker, H., and Ulrich, H.D. (2008). SUMO modification of PCNA is controlled by DNA. *The EMBO Journal* 27, 2422–2431.
- Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoegge, C., and Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428–433.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109–120.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* 70, 503–533.
- Plessis, A., Perrin, A., Haber, J.E., and Dujon, B. (1992). Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics* 130, 451–460.
- Polo, S.E., Roche, D., and Almouzni, G. (2006). New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 127, 481–493.
- Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L.C., Steffensen, S., Ferreira, F., Grimaldi, M., Gilbert, N., Ferreira, J., and Varga-Weisz, P.D. (2004). The Williams syndrome

transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nature Cell Biology* 6, 1236–1244.

Prakash, S., Johnson, R.E., and Prakash, L. (2005). EUKARYOTIC TRANSLATION SYNTHESIS DNA POLYMERASES: Specificity of Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry* 74, 317–353.

Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M., and Stillman, B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326, 517–520.

Psyrrri, A., Yu, Z., Weinberger, P.M., Sasaki, C., Haffty, B., Camp, R., Rimm, D., and Burtness, B.A. (2005). Quantitative Determination of Nuclear and Cytoplasmic Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Cancer by Using Automated Quantitative Analysis. *Clinical Cancer Research* 11, 5856–5862.

Punchihewa, C., Inoue, A., Hishiki, A., Fujikawa, Y., Connelly, M., Evison, B., Shao, Y., Heath, R., Kuraoka, I., Rodrigues, P., et al. (2012). Identification of Small Molecule Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Inhibitor That Disrupts Interactions with PIP-box Proteins and Inhibits DNA Replication. *Journal of Biological Chemistry* 287, 14289–14300.

Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie* 16, 1–10.

Ravid, T., and Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin–proteasome system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 679–689.

Rosenthal, F., Feijs, K.L.H., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A.H., Imhof, R., Winkler, H.C., Fischer, D., Caflisch, A., Hassa, P.O., et al. (2013). Macrodomain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 502–507.

Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 398–409.

Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M. (1994a). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 6064–6068.
- Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M. (1994b). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 8096–8106.
- Rudin, N., Sugarman, E., and Haber, J.E. (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *122*, 519–534.
- Sakabe, K., and Okazaki, R. (1966). A unique property of the replicating region of chromosomal DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* *129*, 651–654.
- Sakaguchi, K., Ishibashi, T., Uchiyama, Y., and Iwabata, K. (2009). The multi-replication protein A (RPA) system - a new perspective. *FEBS Journal* *276*, 943–963.
- Salic, A., and Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 2415–2420.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* *73*, 39–85.
- Sansam, C.L., Shepard, J.L., Lai, K., Ianari, A., Danielian, P.S., Amsterdam, A., Hopkins, N., and Lees, J.A. (2006). DTL/CDT2 is essential for both CDT1 regulation and the early G2/M checkpoint. *Genes & Development* *20*, 3117–3129.
- Sarraf, S.A., and Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Couples Histone H3 Methylation at Lysine 9 by SETDB1 to DNA Replication and Chromatin Assembly. *Molecular Cell* *15*, 595–605.
- Schulman, B.A., and Wade Harper, J. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 319–331.
- Scott, M., Bonnefin, P., Vieyra, D., Boisvert, F.M., Young, D., Bazett-Jones, D.P., and Riabowol, K. (2001). UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *Journal of Cell Science* *114*, 3455–3462.
- Shah, S.A., Erdmann, S., Mojica, F.J.M., and Garrett, R.A. (2013). Protospacer

recognition motifs: mixed identities and functional diversity. *RNA Biology* 10, 891–899.

Sharifi, R., Morra, R., Appel, C.D., Tallis, M., Chioza, B., Jankevicius, G., Simpson, M.A., Matic, I., Ozkan, E., Golia, B., et al. (2013). Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *The EMBO Journal* 32, 1225–1237.

Shinoura, N., Muramatsu, Y., Nishimura, M., Yoshida, Y., Saito, A., Yokoyama, T., Furukawa, T., Horii, A., Hashimoto, M., Asai, A., et al. (1999). Adenovirus-mediated transfer of p33ING1 with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Research* 59, 5521–5528.

Smith, M.M., and Andrésson, O.S. (1983). DNA sequences of yeast H3 and H4 histone genes from two non-allelic gene sets encode identical H3 and H4 proteins. *Journal of Molecular Biology* 169, 663–690.

Stillman, B. (2008). DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Molecular Cell* 30, 259–260.

Stoimenov, I., and Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society Transactions* 37, 605–613.

Stoimenov, I., and Helleday, T. (2012). Gene Section Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology OPEN ACCESS JOURNAL AT INIST-CNRS PCNA (proliferating cell nuclear antigen). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 16.

Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research* 26, 399–422.

Symington, L.S., Rothstein, R., and Lisby, M. (2014). Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 198, 795–835.

Takahashi, S., Sakamoto, A., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Tanaka, A. (2005). Roles of *Arabidopsis* AtREV1 and AtREV7 in Translesion Synthesis. *PLANT PHYSIOLOGY* 138, 870–881.

Takisawa, H., Mimura, S., and Kubota, Y. (2000). Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 690–696.

- Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G., and Downey, K.M. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *The Journal of Biological Chemistry* *261*, 12310–12316.
- Tan, Z., Wortman, M., Dillehay, K.L., Seibel, W.L., Evelyn, C.R., Smith, S.J., Malkas, L.H., Zheng, Y., Lu, S., and Dong, Z. (2012). Small-Molecule Targeting of Proliferating Cell Nuclear Antigen Chromatin Association Inhibits Tumor Cell Growth. *Molecular Pharmacology* *81*, 811–819.
- Tao, Y., Song, X., Deng, X., Xie, D., Lee, L.M., Liu, Y., Li, W., Li, L., Deng, L., Wu, Q., et al. (2005). Nuclear accumulation of epidermal growth factor receptor and acceleration of G1/S stage by Epstein–Barr-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *Experimental Cell Research* *303*, 240–251.
- Tom, S., Henricksen, L.A., Park, M.S., and Bambara, R.A. (2001). DNA Ligase I and Proliferating Cell Nuclear Antigen Form a Functional Complex. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 24817–24825.
- Tsuchimoto, D., Sakai, Y., Sakumi, K., Nishioka, K., Sasaki, M., Fujiwara, T., and Nakabeppu, Y. (2001). Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Research* *29*, 2349–2360.
- Tsurimoto, T. (1999). PCNA binding proteins. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* *4*, D849-58.
- Unk, I., Haracska, L., Gomes, X. V, Burgers, P.M.J., Prakash, L., and Prakash, S. (2002). Stimulation of 3'→5' exonuclease and 3'-phosphodiesterase activities of yeast apn2 by proliferating cell nuclear antigen. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 6480–6486.
- Unk, I., Hajdú, I., Fátyol, K., Hurwitz, J., Yoon, J.-H., Prakash, L., Prakash, S., and Haracska, L. (2008). Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 3768–3773.
- Vairapandi, M., Balliet, A.G., Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *Journal of Cellular Physiology* *192*, 327–338.

Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D.S., and Dutta, A. (2003). A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Molecular Cell* *11*, 997–1008.

Visakorpi, T. (1992). Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *The Journal of Pathology* *168*, 7–13.

Vivès, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of Biological Chemistry* *272*, 16010–16017.

Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* *369*, 574–578.

Wang, S.-C. (2014). PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends in Pharmacological Sciences* *35*, 178–186.

Wang, H., La Russa, M., and Qi, L.S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry* *85*, 227–264.

Wang, S.-C., Nakajima, Y., Yu, Y.-L., Xia, W., Chen, C.-T., Yang, C.-C., McIntush, E.W., Li, L.-Y., Hawke, D.H., Kobayashi, R., et al. (2006). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nature Cell Biology* *8*, 1359–1368.

Wang, Y., Pennock, S., Chen, X., and Wang, Z. (2002). Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 7279–7290.

Warbrick, E., Lane, D.P., Glover, D.M., and Cox, L.S. (1995). A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Current Biology : CB* *5*, 275–282.

Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H., and Yamaizumi, M. (2004). Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *The EMBO Journal* *23*, 3886–3896.

Watanabe, T.K., Fujiwara, T., Kawai, A., Shimizu, F., Takami, S., Hirano, H., Okuno,

S., Ozaki, K., Takeda, S., Shimada, Y., et al. (1996). Cloning, expression, and mapping of UBE2I, a novel gene encoding a human homologue of yeast ubiquitin-conjugating enzymes which are critical for regulating the cell cycle. *Cytogenetic and Genome Research* 72, 86–89.

Weinreich, M., Liang, C., Chen, H.-H., and Stillman, B. (2001). Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 11211–11217.

Wieduwilt, M.J., and Moasser, M.M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 1566–1584.

Winter, J.A., and Bunting, K.A. (2012). Rings in the extreme: PCNA interactions and adaptations in the archaea. *Archaea (Vancouver, B.C.)* 2012, 951010.

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.

Woo, R.A., and Poon, R.Y.C. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 2, 316–324.

Xia, L., Zheng, L., Lee, H.-W., Bates, S.E., Federico, L., Shen, B., and O'Connor, T.R. (2005). Human 3-Methyladenine-DNA Glycosylase: Effect of Sequence Context on Excision, Association with PCNA, and Stimulation by AP Endonuclease. *Journal of Molecular Biology* 346, 1259–1274.

Xu, H., Zhang, P., Liu, L., and Lee, M.Y. (2001). A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry* 40, 4512–4520.

Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 755–764.

Yu, Y.-L., Chou, R.-H., Liang, J.-H., Chang, W.-J., Su, K.-J., Tseng, Y.-J., Huang, W.-C., Wang, S.-C., and Hung, M.-C. (2013). Targeting the EGFR/PCNA Signaling Suppresses Tumor Growth of Triple-Negative Breast Cancer Cells with Cell-Penetrating PCNA Peptides. *PLoS ONE* 8, e61362.

Yu, Y., Cai, J.-P., Tu, B., Wu, L., Zhao, Y., Liu, X., Li, L., McNutt, M.A., Feng, J., He, Q.,

et al. (2009). Proliferating Cell Nuclear Antigen Is Protected from Degradation by Forming a Complex with MutT Homolog2. *Journal of Biological Chemistry* 284, 19310–19320.

Yunus, A.A., and Lima, C.D. (2009). Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Molecular Cell* 35, 669–682.

Zhang, S., Chea, J., Meng, X., Zhou, Y., Lee, E.Y.C., and Lee, M.Y.W.T. (2008). PCNA is ubiquitinated by RNF8. *Cell Cycle* 7, 3399–3404.

Zhang, W., Qin, Z., Zhang, X., and Xiao, W. (2011). Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS Letters* 585, 2786–2794.

Zhang, Y., Wang, J., Ding, M., and Yu, Y. (2013). Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome. *Nature Methods* 10, 981–984.

Zhang, Z., Shibahara, K., and Stillman, B. (2000). PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 408, 221–225.

Zhao, H., Lo, Y.-H., Ma, L., Waltz, S.E., Gray, J.K., Hung, M.-C., and Wang, S.-C. (2011). Targeting Tyrosine Phosphorylation of PCNA Inhibits Prostate Cancer Growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 10, 29–36.

Zhao, H., Chen, M.-S., Lo, Y.-H., Waltz, S.E., Wang, J., Ho, P.-C., Vasilias, J., Plattner, R., Wang, Y.-L., and Wang, S.-C. (2014). The Ron receptor tyrosine kinase activates c-Abl to promote cell proliferation through tyrosine phosphorylation of PCNA in breast cancer. *Oncogene* 33, 1429–1437.

Zheleva, D.I., Zhelev, N.Z., Fischer, P.M., Duff, S. V, Warbrick, E., Blake, D.G., and Lane, D.P. (2000). A quantitative study of the in vitro binding of the C-terminal domain of p21 to PCNA: affinity, stoichiometry, and thermodynamics. *Biochemistry* 39, 7388–7397.

Zhu, W., Chen, Y., and Dutta, A. (2004). Rereplication by Depletion of Geminin Is Seen Regardless of p53 Status and Activates a G2/M Checkpoint. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7140–7150.

Zielke, N., Kim, K.J., Tran, V., Shibutani, S.T., Bravo, M.-J., Nagarajan, S., van Straaten, M., Woods, B., von Dassow, G., Rottig, C., et al. (2011). Control of *Drosophila*

endocycles by E2F and CRL4CDT2. *Nature* 480, 123–127.

Caractérisation des fonctions des modifications post-traductionnelles de PCNA à l'aide d'un nouvel outil génétique

Résumé

PCNA est une protéine essentielle qui intervient dans de nombreux mécanismes cellulaires et qui possède de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs) dont les fonctions de certaines, restent encore inconnues. Afin d'étudier la fonction de ces MPTs, nous avons développé un nouvel outil génétique permettant *in cellulo*, de substituer la protéine endogène PCNA par une version mutée de la protéine appelée version de complémentation. La technique consiste à cotransfecter des cellules en culture avec deux types de plasmides. Un premier plasmide permet l'invalidation du gène de PCNA endogène dans les cellules transfectées par le système CRISPR-Cas9. Le deuxième plasmide dit de complémentation permet l'expression d'une forme mutée de PCNA. Sur l'ensemble d'une banque de mutants testés, deux mutants de PCNA se sont avérés être létaux (D122A et E124A). Nous avons démontré que ces deux sites sont impliqués dans l'initiation d'une voie de dégradation ubiquitine dépendante CRL4^{Cdt2} essentielle pour la mise en place de la protéolyse d'un cocktail de protéines (cdt1, p21, set8) durant la phase S. Nous avons démontré que les cellules mutantes pour PCNA (D122A et E124A) accumulent la protéine p21. Ce défaut de dégradation de p21 provoque alors des événements de re-réplication menant à terme à la mort des cellules mutantes.

Mots clés: PCNA, modifications post-traductionnelles, nouvel outil génétique, CRISPR-Cas9, plasmide de complémentation, mutants PCNA D122A et E124A, voie de dégradation ubiquitine-dépendante, CRL4^{Cdt2}, p21, re-réplication, mort cellulaire.

Résumé en anglais

PCNA is an essential protein that is involved in many cellular mechanisms and has many post-translational modifications (PTMs). The functions of some PTMs, still remain unknown. In order to study the function of these PTMs, we have developed a new genetic tool allowing, *in cellulo*, the substitution of endogenous PCNA protein with a mutated version of the protein named complementation version. The technique involves cotransfection of the cells in culture with two types of plasmids. A first plasmid allows invalidation of the endogenous PCNA gene in transfected cells by the CRISPR-Cas9 system. The second plasmid, named complementation plasmid allows the expression of a mutated form of PCNA. In the whole bank of tested mutants, two PCNA mutants were found to be lethal (D122A and E124A). We have demonstrated that these two sites are involved in the initiation of an ubiquitin-dependent protein degradation CRL4^{Cdt2} pathway essential for the proteolysis of a protein cocktail (cdt1, p21, set8) during the S phase. We demonstrated that PCNA mutant cells (D122A and E124A) accumulate p21 protein. This lack of degradation of p21 then causes re-replication events leading ultimately to the mutant cells death.

Keywords: PCNA, post-translational modifications, new genetic tool, CRISPR-Cas9, complementation plasmid, mutants PCNA D122A and E124A, ubiquitin-dependent protein degradation, CRL4^{Cdt2}, p21, re-replication, cell death.