



**HAL**  
open science

# Silencing transcriptionnel et méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana*

Amy Hesketh

► **To cite this version:**

Amy Hesketh. Silencing transcriptionnel et méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences agricoles. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC064 . tel-03685548

**HAL Id: tel-03685548**

**<https://theses.hal.science/tel-03685548>**

Submitted on 2 Jun 2022

**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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE  
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,  
ENVIRONNEMENT

# Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité : Épigénétique et Génétique Moléculaire

---

## **Silencing transcriptionnel et méthylation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana***

---

Présentée par **Amy Hesketh**

Soutenue publiquement le 2 Juillet 2021

Membres du jury :

Rapporteurs : Cécile Raynaud, Directrice de recherche, IPS2 de Paris-Saclay  
Jean Molinier, Directeur de recherche, IBMP de Strasbourg  
Thierry Lagrange, Directeur de recherche, LGDP de Perpignan  
Examinatrice : Emilie Brassat, Maître de conférence, GReD de Clermont-Ferrand  
Présidente : Maria-Eugenia Gallego, Professeur, GReD de Clermont-Ferrand  
Directeur de thèse : Olivier Mathieu, Directeur de recherche, GReD de Clermont-Ferrand

Laboratoire GReD – UMR 6293 INSERM U1103 – Université Clermont Auvergne  
Équipe « SILENT - SILENCING ENVIRONNEMENT ET TRANSPOSONS »



## Remerciements

---

Il était une fois, une étudiante soit disant anglaise, aux cheveux tantôt châtain, tantôt prune, tantôt roux, qui arpentait les couloirs de l'UCA et du GReD. Cette histoire c'est la mienne, une aventure universitaire longue de 9 années. Le 2 juillet 2021, un manuscrit, une soutenance, un pot, voilà le point d'orgue de cette histoire. Un périple, qui m'a valu le grade de Docteur, durant lequel j'ai été accompagnée par mes fidèles acolytes, mon mentor et une multitude de personnes dont j'ai croisé le chemin. Avant de clore cette histoire, je souhaite remercier toutes ces personnes à travers ces quelques lignes qui, je l'espère, réussiront à refléter ma gratitude.

Pour commencer, un immense merci à Olivier pour sa confiance, l'opportunité qu'il m'a donnée et tout le savoir qu'il m'a transmis. Ce fut un plaisir, un honneur et une chance d'apprendre à tes côtés. Je n'imaginai pas apprendre autant de choses en si peu de temps, autant scientifiquement qu'humainement.

Et aussi un grand merci à toute l'équipe SiLENT, membres passés et présents pour leur accueil à bras ouverts, leur aide et bons conseils. Merci Pierre pour un super stage de M2, pour ta bonne humeur, pour les soirées, le weekend à la montagne et tous les bons moments dans le labo, sans oublier mon premier FISH & pizza-bière. Merci aussi pour ton aide précieuse au moment de la rédaction et de la préparation de ma soutenance. Merci Thierry pour tes bons conseils, je ne serais pas arrivée à bout de mon CHIP sans toi. Et merci de t'être occupé de mes plantes pendant le confinement. Marie-Noëlle, merci pour tout le travail que tu as fait en amont de ma thèse et de poursuivre maintenant que je ne suis plus là. Je remercie également mes collègues de bureaux, Margaux, Charles, Maxime et tous les stagiaires qui sont passés par là pour les discussions plus ou moins sérieuses qui ont animées notre petit bureau.

Merci à tout l'étage plante, alias petitefleurduprintemps (merci Sébastien pour cet alias), pour votre soutien et votre bienveillance. Merci aux professeurs et maîtres de conf<sup>o</sup> que j'ai d'abord rencontrés assise à mon bureau d'étudiante puis que j'ai rejoint dans les labos et parfois même au-devant de l'amphi. Merci Jérémy pour les pauses mots fléchés, les discussions, les apéros et d'avoir surveillé mes petites plantes. Merci Sylviane pour ta gentillesse et pour les balades à cheval. Merci Seb pour ta bonne humeur, ton petit grain de folie et tes « jolies » petits dessins. Merci à Manu, Sam, Sylvie, Christophe, Sophie, Aurélia pour les pauses déjeuner animées, quelque peu bruyantes et parfois odorantes. Merci à Maria pour les discussions sur RTEL1 entre deux gels. Merci ODI pour ton aide



et tes conseils spécial clonage. Merci Simon pour ta gentillesse (hum hum...) et les échanges au milieu du couloir, tes vanes vont me manquer.

Je remercie également toute la bande de doctorants ancienne et nouvelle génération qui a tellement apporté à cette aventure. A huge thanks to Gunjita my Partner in crime for all the unforgettable moments, the nights drinking and dancing, the getaways. Thank you so much for all the love and craziness, the last few years would not have been the same without you. Merci Emeline, ma ptite Chouquette, tu as quitté le GReD mais tu as toujours été là. Merci à Tristan pour les soirées déjantées et les sessions de grimpe, après la quiche bien sûr ! Merci à Sarah, Max et Miguel qui ont participé à la bonne humeur et la bonne ambiance du labo. Merci à l'équipe GReD Pictures pour les longues nuits de tournage, les perruques, les délires... Je ne pensais pas qu'à la fin de ma thèse j'aurais pu ajouter les compétences cinéastes, scénariste et actrice à mon CV. Merci aussi aux GReDuates pour leur dévouement, les apéros doc/post-doc, les jeux des Journées du GReD et Fort Boyard.

A mes parents, à mes frères et sœurs, à mes grands-parents, merci pour tout votre soutien et votre amour. Merci aussi à toute ma belle-famille pour toutes les attentions. Et surtout, un immense merci à Simon pour avoir été présent dans les bons moments mais aussi dans les moments difficiles où la motivation et le courage venaient à manquer. Merci pour ta patience et ta confiance, tu as été un réel pilier pour moi.

Pour finir, je tiens à remercier les membres de mon jury, Cécile Raynaud, Emilie Brassat, Maria-Eugenia Gallego, Jean Molinier et Thierry Lagrange pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aussi pour la discussion intéressante et stimulante sur mes travaux le jour de ma soutenance. Je remercie Jean Molinier et Thierry Lagrange qui ont également accepté de prendre le temps de suivre le bon déroulement de ma thèse et qui m'ont guidée dans mes travaux.

Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui ont participé à l'organisation du Jour J et toutes celles présentes pour me soutenir.

Il est temps pour moi d'imprimer ce point final qui clôture ce chapitre. La page se tourne mais l'encre de ma vie sera à jamais teintée des belles couleurs du GReD.



## Résumé

---

Le silencing transcriptionnel est un mécanisme essentiel pour moduler l'expression des gènes, par exemple en fonction du stade développemental, et également pour bloquer la transcription des éléments transposables (ETs) dont l'expression peut être délétère. Ce mécanisme est dépendant de diverses modifications de la chromatine, telles que la méthylation ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Le silencing transcriptionnel est souvent associé à des niveaux élevés de méthylation ADN et on observe fréquemment une perte de silencing dans des mutants de gènes impliqués dans la maintenance de cette marque. Toutefois, les gènes et ETs méthylés peuvent cumuler d'autres couches de silencing qui interviennent, pour certaines, indépendamment de la méthylation ADN. Par deux études et approches distinctes nous avons cherché à identifier et comprendre ces voies de silencing indépendante de la méthylation ADN dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Par une première approche de génétique directe à l'aide d'un transgène soumis au silencing nous montrons que l'hélicase REGULATOR OF TELOMERE ELONGATION 1 (RTEL1), impliquée dans la réplication de l'ADN, participe au silencing d'un ensemble de gènes et éléments transposables. La perte de silencing dans le mutant *rtell* n'est pas corrélée à une baisse du niveau de la méthylation ADN ni à une désorganisation de l'hétérochromatine. Cependant, de nombreux loci hétérochromatiques présentent une augmentation des niveaux de méthylations ADN associée à une augmentation de l'accessibilité de la chromatine. La perte de silencing et l'hyperméthylation ADN semblent être des conséquences du stress réplcatif induit par la mutation *rtell*. Nos résultats mettent donc en évidence le rôle de RTEL1 dans le silencing transcriptionnel et la prévention de l'hyperméthylation ADN de l'hétérochromatine, fonctions qui pourraient être liées à la réplication de l'ADN.

D'autre part, nous nous sommes intéressés aux couches de silencing qui contrôlent l'élément transposable *Evadé*. En absence de méthylation CG, le silencing de cet élément est maintenu par une autre voie dans les tissus jeunes mais pas dans les tissus adultes. Nos données suggèrent que cette voie serait médiée par la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), marque présente dans les tissus jeunes mais qui serait perdue dans les tissus adultes. Ce contrôle tissu-spécifique pourrait être un mécanisme global et concerné d'autres ETs du génome d'*Arabidopsis*.





## Abstract

---

Transcriptional silencing is an essential mechanism for controlling the expression of genes, for instance, depending on the developmental stage, and for blocking transcription of transposable elements (TEs), the expression of which can be deleterious. This mechanism is dependent of various chromatin modifications such as DNA methylation and histone post-translational modifications. Transcriptional silencing is commonly associated with high levels of DNA methylation and release of silencing is frequently observed in mutants for genes involved in DNA methylation maintenance. However, methylated genes and TEs can accumulate other silencing layers some of which may operate independently of DNA methylation. Through two distinct studies and approaches we sought to identify and understand these DNA methylation-independent pathways in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Using a forward genetic approach with a silenced transgene we show that the DNA helicase REGULATOR OF TELOMERE ELONGATION 1 (RTEL1), implicated in DNA replication, is involved in the silencing of a set of genes and TEs. Loss of silencing in the *rtell* mutant is not correlated with a decrease in DNA methylation levels nor with heterochromatin organization defects. Yet, many heterochromatic loci show an increase in DNA methylation levels associated with an increase in chromatin accessibility. Loss of silencing and DNA hypermethylation seem to be consequences of the *rtell*-induced replicative stress. Thus, our findings reveal a function for RTEL1, which might be linked to DNA replication, in maintaining silencing and in preventing heterochromatin DNA hypermethylation.

We also investigated the different silencing layers which control the expression of the TE *Evadé*. In absence of CG methylation, silencing of this element is maintained by another pathway in young tissues but not in adult tissues. Our data suggest that this pathway may be mediated by the trimethylation of histone H3 lysine 27 (H3K27me3) present in young tissues and likely lost in adult tissues. This tissue-specific control could be a global mechanism which targets other TEs of the *Arabidopsis* genome.



## Abréviations

---

ACT2	ACTIN2
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
AGD	Agenet
AGDP1	AGD-CONTAINING PROTEIN 1
AGO	ARGONAUTE
amiRNA	<i>artificial micro-RNA</i>
<i>anx</i>	<i>anxious</i>
ATAC-seq	<i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing</i>
ATM	ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED
ATR	<i>Attrapé</i>
ATR	ATAXIA TELANGIECTASIA AND RAD3 RELATED
ATRX	ALPHA THALASSEMIA-MENTAL RETARDATION X-LINKED
ATXR	ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED PROTEIN
BAH	<i>bromo adjacent homology</i>
BRU1	BRUSHY 1
BS-seq	<i>Bisulfite sequencing</i>
CAF-1	CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
ChIP-seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation sequencing</i>
CLF	CURLY LEAF
CMM	Conserved MOM1 Motif
CMT	CHROMOMETHYLASE
Col-0	Columbia
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCL3	DICER-LIKE 3
DDM1	DECREASE IN DNA METHYLATION 1
DEG	<i>Differentially Expressed Genes</i>
DME	DEMETER
DML	DEMETER-LIKE
DMS3	DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3



DRD1	DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1
DRM2	DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASES 2
DSB	<i>Double Strand Break</i>
EMF2	EMBRYONIC FLOWER 2
EMS	Ethyl Méthanesulfonate
epiRIL	<i>epigenetic Recombinant Inbred Lines</i>
ET	Elément Transposable
EtBr	Bromure d'éthidium
EVD	<i>Evadé</i>
FAS	FASCIATA
FEN1	FLAP ENDONUCLEASE 1
FIE1	FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM 1
FIS2	FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GO	<i>Gene Ontology</i>
H3K27me1	Monométhylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K27me3	Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K9me2	Diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3
HIRA	HISTONE REGULATOR A
HU	Hydroxyurée
IBM1	INCREASE IN BONSAI METHYLATION 1
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
LUC	LUCIFERASE
KYP	KRYPTONITE
MAIL	MAINTENANCE OF MERISTEMS-LIKE
MAIN	MAINTENANCE OF MERISTEMS
MEA	MEDEA
MED14	MEDIATOR 14
MET1	METHYLTRANSFERASE 1
MMS	Méthanesulfonate de Méthyle
MOM1	MORPHEUS' MOLECULE 1



MORC	MICRORCHIDIA
MPT	Modification Post-Traductionnelle
MSI1	MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
PCG	<i>Protein Coding Gene</i>
PcG	Polycomb Group
PCNA	PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN
PIAL	PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT LIKE
PMD	<i>Plant Mobile Domain</i>
Pol	Polymérase
PP7L	PROTEIN PHOSPHATASE 7 LIKE
PRC	Polycomb Repressive Complex
PTGS	<i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i>
RdDM	<i>RNA-directed DNA methylation</i>
RDR2	RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2
RFC1	REPLICATION FACTOR C1
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i>
ROS1	REPRESSOR OF SILENCING 1
RPA	REPLICATION PROTEIN
RPGC	<i>Reads Per Genome Coverage</i>
RPKM	<i>Reads Per Kilobase per Million mapped reads</i>
RTEL1	REGULATOR OF TELOMERE LENGTH 1
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
RT-qPCR	<i>reverse transcription quantitative PCR</i>
s.e.m.	<i>standard error of the mean</i>
SEP3	SEPALLATA 3
SDC	SUPPRESSOR OF DRM2 CMT3
SHH1	SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOGUE 1
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC4	STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 4
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SRA	<i>SET- or RING-associated</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
SUVH	SU(VAR)3–9 HOMOLOG





SWN	SWINGER
TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
TIR	<i>Terminal Inverted Repeats</i>
TSI	<i>TRANSCRIPTIONAL SILENT INFORMATION</i>
TSL	TOUSLED
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
UBQ	UBIQUITIN
VAL	VIVIPAROUS1/ABI3-LIKE
VIM	VARIANT IN METHYLATION
VRN2	VERNALIZATION 2



# Table des matières

---

<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>3</b>
INTRODUCTION.....	4
I.    LES VARIANTS D’HISTONES .....	5
1. <i>Les variants H2A</i> .....	5
2. <i>Les variants H3</i> .....	7
II.   MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES .....	8
1. <i>Les marques histones permissives</i> .....	9
2. <i>Les marques histones répressives</i> .....	9
III.  LA METHYLATION ADN .....	12
1. <i>La voie RNA-directed DNA methylation</i> .....	13
2. <i>Méthylation en contexte CG</i> .....	13
3. <i>Maintien de la méthylation CHG</i> .....	15
4. <i>Maintien de la méthylation CHH</i> .....	17
5. <i>DDM1 et méthylation de l’ADN</i> .....	18
6. <i>La déméthylation de l’ADN</i> .....	19
IV.   LES VOIES DE SILENCING INDEPENDANTES DE LA METHYLATION ADN .....	20
1. <i>ATXR5/6 et H3K27me1</i> .....	20
2. <i>La voie MORPHEUS’ MOLECULE 1</i> .....	20
3. <i>La voie MICRORCHIDIA</i> .....	22
4. <i>La voie MAIN/MAIL</i> .....	23
5. <i>La voie de TGS associée à la réplication/réparation de l’ADN</i> .....	24
V.    LES ELEMENTS TRANSPOSABLES .....	27
VI.   OBJECTIFS DE LA THESE.....	31
<b>RESULTATS</b> .....	<b>32</b>
L’ADN POLYMERASE $\epsilon$ EST REQUISE POUR LE MAINTIEN DE L’HETEROCHROMATINE CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (ARTICLE) .....	33
1. <i>Contexte</i> .....	33
2. <i>Principaux résultats</i> .....	33
3. <i>Discussion</i> .....	34
4. <i>Contributions</i> .....	35
RTEL1 INTERVIENT DANS LE SILENCING TRANSCRIPTIONNEL ET LIMITE LA METHYLATION ADN HETEROCHROMATIQUE (ARTICLE EN PREPARATION) .....	54
1. <i>Contexte</i> .....	54
2. <i>Principaux résultats</i> .....	54



3. Discussion .....	55
4. Contributions .....	57
DISSECTION DES COUCHES DE SILENCING DE L'ÉLÉMENT TRANSPOSABLE <i>EVADE</i> .....	101
1. La méthylation CG n'est pas suffisante dans certains tissus pour maintenir le silencing d'EVD .....	101
2. H3K27me3 semble constituer une couche de silencing supplémentaire tissu-spécifique.....	101
3. Transposition d'EVD et choc épigénomique .....	103
4. <i>Copia27</i> et <i>Copia48</i> sont également soumis à un TGS tissu-dépendant.....	104
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>106</b>
I. LA VOIE DE TGS MEDIATEE PAR LA REPLICATION ET LA REPARATION DE L'ADN.....	107
II. STRESS REPLICATIF ET HYPERMETHYLATION ADN .....	111
III. LES COUCHES DE SILENCING DE L'ÉLÉMENT <i>EVADE</i> .....	112
CONCLUSION .....	115
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>116</b>
Matériel végétal et conditions de cultures .....	117
Coloration histochimique.....	117
Analyse du niveau de méthylation ADN par digestion <i>MspI</i> et <i>CfoI</i> .....	117
Etude qualitative et quantitative des transcrits par RT-PCR et RT-qPCR.....	118
Mutagenèse et mapping par séquençage .....	118
Mesure de la fraction hétérochromatique .....	119
Étude du transcriptome par séquençage ARN (RNA-seq).....	119
Etude du méthylome par séquençage ADN après traitement au bisulfite (BS-seq) .....	120
Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et quantification par qPCR .....	120
Analyse de l'accessibilité de la chromatine par ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin).....	121
Transformation des plantes <i>clf-29</i> avec l'amiRNA dirigé contre <i>MET1</i> .....	121
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>122</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>135</b>



# **Synthèse bibliographique**

---





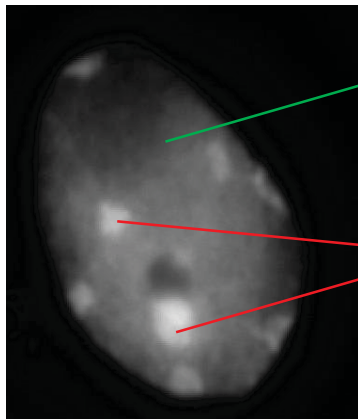
## Introduction

---

L'organisation du génome est un élément essentiel à son expression et au bon développement d'un organisme. Chez les eucaryotes, l'ADN est compacté dans une structure nucléoprotéique que l'on appelle chromatine et dont l'unité de base est le nucléosome. Ce dernier est constitué d'un octamère d'histone, comprenant un tetramère [H3-H4]<sub>2</sub> associé à deux dimères H2A-H2B, autour duquel est enroulé environ 147 bp d'ADN. Les nucléosomes sont connectés entre eux par l'ADN de liaison de longueur variable qui peut être associé à l'histone de liaison H1. L'ensemble de cette structure permet de compacter l'ADN pour former des régions plus ou moins denses que l'on appelle hétérochromatine et euchromatine respectivement. Un marquage au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) permet de visualiser ces deux états chromatiniens. L'hétérochromatine, formant chez de nombreux organismes des structures denses appelées chromocentres, présente une forte intensité de marquage, tandis que l'euchromatine génère un signal plus diffus (Figure 1A). Ces variations de niveau de compaction permettent, entre autre, de contrôler l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription et, de ce fait, de réguler l'expression des gènes sous-jacents (Yadav et al., 2018). Ainsi l'hétérochromatine est principalement constituée de séquences répétées globalement non transcrites, tandis que l'euchromatine comporte majoritairement des gènes codant des protéines (PCG ; *Protein Coding Gene*) transcriptionnellement actifs.

La structure de la chromatine est dynamique et peut évoluer selon le stade développemental, le type cellulaire ou encore, les conditions environnementales (Lai and Pugh, 2017; Yadav et al., 2018). Toutefois, il existe des régions du génome, appelées hétérochromatine constitutive, maintenues sous silence par diverses voies moléculaires tout au long de la vie de l'organisme et dans la quasi-totalité des cellules. Ces loci correspondent principalement aux régions centromériques et péri-centromériques dans lesquelles on retrouve des séquences répétées et des éléments transposables (ET), éléments mobiles de l'ADN ayant un fort potentiel mutagène (Figure 1B). La régulation de l'état chromatiniens et de l'expression des éléments de l'ADN représente donc un enjeu majeur pour le maintien de l'intégrité du génome et le bon développement de l'organisme. Ces régulations peuvent cibler les transcrits pour une dégradation rapide, il s'agit du PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) mais ici nous nous intéresserons plus particulièrement aux mécanismes de type TGS (*Transcriptional Gene Silencing*) qui permettent de réguler l'expression des gènes au niveau transcriptionnel.

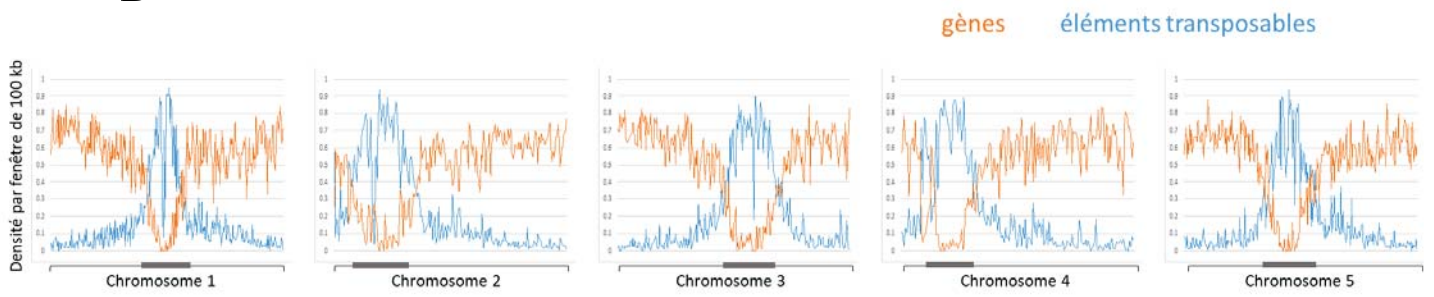
A



Euchromatine  
transcriptionnellement active

Hétérochromatine  
transcriptionnellement inactive

B



**Figure 1 : La chromatine existe sous deux formes, relâchée riche en gènes, et condensée riche en éléments transposables, appelées euchromatine et hétérochromatine respectivement.**

**A.** Noyau d'une plante sauvage *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) marqué au DAPI.

**B.** Densité en gènes (orange) et en éléments transposables (bleu) par fenêtre de 100 kb le long des cinq chromosomes d'*Arabidopsis*. Les régions représentées par un rectangle gris correspondent aux régions centromériques et péricentromériques.

Ces mécanismes sont de nature épigénétique et créent un environnement chromatinien permissif ou restrictif à la transcription. Cet épigénome est héritable et peut être modulé de manière développementale ou en réponse à des stimuli environnementaux (Rigal and Mathieu, 2011). Le premier niveau de régulation réside dans la nature même des nucléosomes et plus particulièrement des protéines histones qui les composent. Ces protéines, évolutivement anciennes, ce sont d'abord différenciées pour donner les quatre familles d'histones puis ce sont différenciées davantage en variants. C'est cette diversité en protéines histones qui permet de modifier et adapter l'environnement chromatinien (Talbert and Henikoff, 2017).

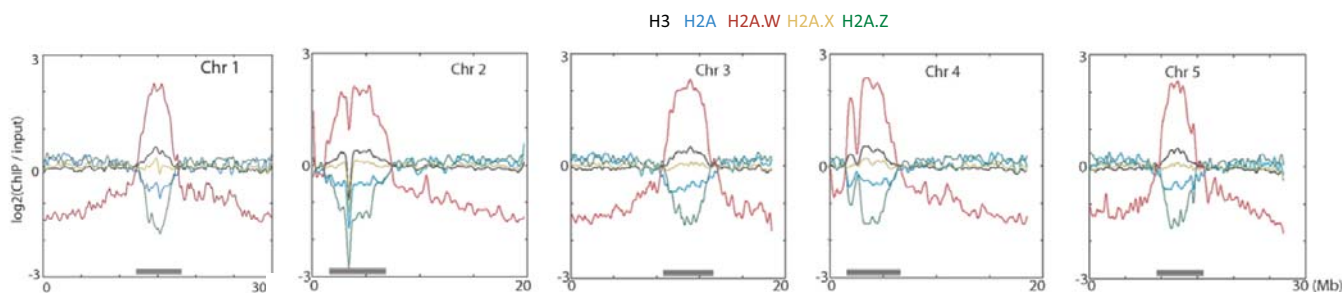
## I. Les variants d'histones

---

Il existe, dans la plupart des organismes, plusieurs gènes codant les histones H2A, H2B, H3 et H4. Pour les histones dites canoniques, la transcription et l'incorporation se fait lors de la réplication de l'ADN. Ceux-ci se différencient des variants d'histones dont l'incorporation peut se faire tout au long du cycle cellulaire de manière indépendante de la réplication de l'ADN. Les variants d'histones diffèrent de leurs paralogues canoniques par leurs séquences protéiques et leurs propriétés physiques modifiant alors les interactions avec l'ADN et d'autres protéines. En conséquence, leur incorporation peut entraîner une modification de l'environnement chromatinien et affecter différents processus biologiques tels que la transcription, la réparation de l'ADN et la formation de l'hétérochromatine (Talbert and Henikoff, 2017). Les variants d'histones les mieux décrits à ce jour sont ceux des histones H2A et H3.

### 1. Les variants H2A

Chez *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), les variants de l'histone H2A peuvent être regroupés, en fonction de leur motif en C-terminal, en trois groupes : H2A.W, H2A.X et H2A.Z. La classe du variant H2A.W comporte trois protéines H2A.W.6, H2A.W.7 et H2A.W.12, respectivement codées par les gènes *HTA6*, *HTA7* et *HTA12*. Cette classe de H2A se retrouve principalement au niveau des régions péri-centromériques et des éléments transposables (Figure 2). Le variant H2A.W est spécifiquement associé à l'hétérochromatine et aux ETs. Ces régions génomiques sont enrichies en méthylation de l'ADN et diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2), deux marques épigénétiques répressives de la



**Figure 2 : Le variant H2A.W est enrichi dans les régions péracentromériques tandis que H2A.Z est exclu de ces régions.**

Distribution génomique des lectures de séquençage ADN après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) pour les variants d'histone H2A et les histones H3 totaux par rapport à l'*input* sur des fenêtres de 100 kb le long des cinq chromosomes d'*Arabidopsis*. Les barres grises représentent les régions péracentromériques. Adapté de Yelagandula *et al.* (2014).

transcription décrites ultérieurement (Yelagandula et al., 2014). Cependant la déposition de H2A.W est indépendante de ces marques (Yelagandula et al., 2014). Un triple mutant pour les gènes codant les trois protéines H2A.W, *h2a.w-1*, a été publié en 2014 par Yelagandula *et al.* Ces mutants sont caractérisés par des défauts développementaux importants et une absence de floraison, indiquant que H2A.W est essentiel pour la plante. Toutefois, des données récentes obtenues dans l'équipe démontrent que la lignée mutante *hta6* utilisée pour générer *h2a.w-1* est porteuse d'un réarrangement chromosomique important correspondant à la translocation d'une partie du chromosome 1 sur le chromosome 5. L'analyse d'un nouveau mutant *h2a.w*, *h2a.w-2*, généré à partir d'un nouvel allèle mutant *hta6* produit par mutagenèse ciblée par CRISPR/Cas9 a permis de démontrer que le réarrangement chromosomique est à l'origine des phénotypes précédemment observés dans le triple mutant *h2a.w-1* (Yelagandula et al., 2014). De plus, le mutant *h2a.w-2*, totalement dépourvu de protéine H2A.W, ne présente aucun phénotype développemental, indiquant que H2A.W n'est pas essentiel au développement de la plante. Ces résultats, en cours de publication, suggèrent que H2A.W entre en compétition avec l'histone H1 pour l'ADN de liaison et rend l'hétérochromatine accessible aux méthyltransférases pour maintenir la méthylation ADN.

Tandis que le variant H2A.W joue un rôle d'indexation de l'hétérochromatine, le variant H2A.Z est, quant à lui, exclu des loci hétérochromatiques et se trouve préférentiellement au niveau des sites d'initiation de la transcription (TSS, *Transcription Start Site*) où il aurait un rôle d'activateur de la transcription (Figure 2) (Yelagandula et al., 2014; Zilberman et al., 2008). H2A.Z joue également le rôle de répresseur lorsqu'il est déposé dans le corps de gènes dont l'expression est fortement variable tels que les gènes de réponse aux signaux environnementaux (Coleman-Derr and Zilberman, 2012; Gómez-Zambrano et al., 2019). De plus, l'absence du variant H2A.Z induit une dérégulation transcriptionnelle principalement de gènes impliqués dans la réponse à divers signaux environnementaux suggérant un rôle important pour ce variant dans la régulation de la réponse aux stimuli (Coleman-Derr and Zilberman, 2012; Talbert and Henikoff, 2014). Une analyse récente de la stabilité thermique des nucléosomes en fonction du variant H2A qu'ils contiennent montre que les nucléosomes contenant le variant H2A.Z sont les plus instables. Cette propriété particulière faciliterait le déplacement des nucléosomes pour permettre le passage de la machinerie transcriptionnelle et ainsi permettre une modulation rapide de l'expression des gènes de réponse aux stimuli (Osakabe et al., 2018; Talbert and Henikoff, 2014). A l'échelle du génome, la densité en H2A.Z est largement anti-corrélée à la méthylation ADN et la perte de cette dernière entraîne une redistribution globale de H2A.Z dans les loci normalement méthylés. Au contraire, l'absence d'incorporation de H2A.Z ne



provoque qu'une légère hyperméthylation suggérant que l'anti-corrélation est due à l'exclusion de H2A.Z par la méthylation ADN (Coleman-Derr and Zilberman, 2012; Zilberman et al., 2008).

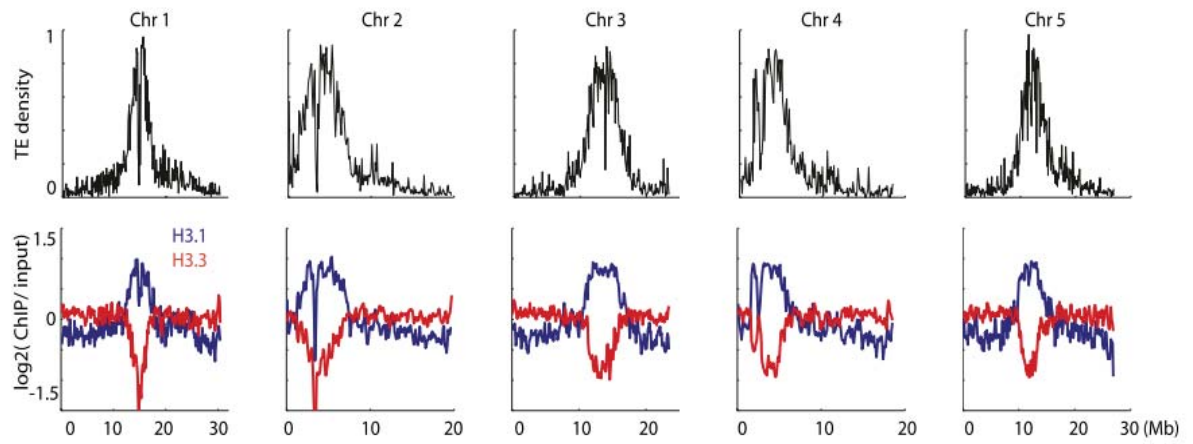
Le variant H2A.X est un acteur de la réponse aux dommages de l'ADN et intervient dans la première étape de ce processus. H2A.X comporte en C-terminal un motif SQEF ciblé par la kinase ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) qui est capable de phosphoryler la sérine du motif. Cette forme phosphorylée de H2A.X, appelée  $\gamma$ H2A.X, forme des foci aux sites de cassures de l'ADN permettant le recrutement de protéines initiant ainsi la réparation des cassures (Talbert and Henikoff, 2014).

## 2. Les variants H3

Il existe trois variants principaux de l'histone H3, H3.1, H3.3 et CENH3. Ce dernier est spécifique des centromères et constitue un élément clé pour définir cette structure qui assure la ségrégation des chromosomes (McKinley and Cheeseman, 2016). L'histone H3.1 est enrichie dans les régions péri-centromériques et au niveau des éléments transposables et elle est fortement associée aux marques répressives de la transcription (Figure 3). De plus, l'enrichissement en H3.1 est inversement corrélé au niveau d'expression des gènes, suggérant que H3.1 est associée à l'hétérochromatine et au silencing transcriptionnel. A l'inverse, l'enrichissement en H3.3 est positivement corrélé à l'expression des gènes et semble définir les régions euchromatiques (Figure 3). En effet, H3.3 est retrouvée dans les régions transcriptionnellement actives et plus particulièrement à l'extrémité 3' des gènes actifs (Stroud et al., 2012; Wollmann et al., 2012).

L'accompagnement des histones de leur synthèse à leur incorporation est assuré par les chaperonnes d'histones. L'histone H3.1 est incorporée spécifiquement pendant la réplication grâce à la chaperonne d'histone CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1 (CAF-1), un complexe formé des trois sous-unités FASCIATA 1 (FAS1), FAS2 et MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 (MSI1). Le couplage à la réplication se fait *via* l'interaction du complexe CAF-1 avec PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA), un composant clé de la fourche de réplication. De plus, les 5 gènes codant H3.1 sont exprimés spécifiquement pendant la phase S du cycle cellulaire. En revanche, le variant H3.3 est incorporé indépendamment du cycle cellulaire et principalement pendant la transcription pour remplacer H3.1 et ainsi former des régions distinctes enrichies en l'une ou l'autre des histones H3 (Probst et al., 2020; Wollmann et al., 2012). La prise en charge de H3.3 se fait par le





**Figure 3 : Le variant H3.1 est enrichi dans l'hétérochromatine péricentromérique contrairement au variant H3.3 qui est déplété de ces régions.**

Densité en ETs (graphiques du haut) et distribution génomique des variants H3.1 et H3.3 (graphiques du bas) sur des fenêtres de 100 kb le long des cinq chromosomes d'*Arabidopsis*. Adapté de Stroud *et al* (2012).

complexe chaperonne d'histones HISTONE REGULATOR A (HIRA) et par ALPHA THALASSEMIA-MENTAL RETARDATION X-LINKED (ATRX).

Les variants H3.1 et H3.3 diffèrent entre eux de seulement quatre acides aminés en positions 31, 41, 87 et 90. Toutefois, ces acides aminés jouent un rôle essentiel. En effet, ce sont les résidus 87 et 90 qui permettent l'incorporation spécifique de H3.3 dans la chromatine active tandis que les résidus 31 et 41 assurent son expulsion lorsque la transcription est inactive. Une mutation à l'une de ces positions induit alors une mauvaise localisation de l'histone H3.3 (Shi et al., 2011).

Il existe donc, au sein d'une même famille d'histone, des variants dont les propriétés divergent et leurs confèrent des fonctions distinctes. Même si la localisation des différents variants commence à être bien connue, les mécanismes par lesquels ils permettent une régulation de l'expression des gènes sont encore en cours d'investigation. De plus, un même variant, tel que H2A.Z, a des effets différents sur la transcription selon sa localisation au sein d'un gène (TSS *vs.* corps du gène). Le simple ajout du variant ne semble donc pas être la seule cause de modulation de l'expression des gènes. Une étude récente propose un modèle dans lequel la monoubiquitination de H2A.Z est responsable de son effet répresseur. De même, l'acétylation de H2A.Z apporterai la fonction d'activateur (Gómez-Zambrano et al., 2019). Ces modifications, appelées Modifications Post-Traductionnelles (MPT, ou en anglais PTM pour *Post-Translational Modifications*) des histones constituent un volet important du TGS. Grâce à des affinités variables pour les histones, les protéines responsables de ces modifications cibleraient des régions spécifiques et permettraient l'expression ou le silencing de leurs cibles.

## II. Modifications post-traductionnelles des histones

---

Les MPT des histones consistent en l'ajout de groupements chimiques divers, tels que les groupements méthyle, acétyle, phosphate, principalement au niveau d'acides aminés situés sur la queue N-terminale saillante des histones. Ces modifications peuvent affecter les interactions entre les histones et l'ADN, entre les différentes histones, et entre les histones et d'autres protéines. Par conséquent, la nature ainsi que la combinaison de ces modifications influencent la structure de la chromatine et l'état transcriptionnel des gènes sous-jacents. Les MPT des histones peuvent être classées en deux catégories, d'une part, les marques permissives associées aux régions transcriptionnellement actives, et, d'autre part, les marques dites répressives



enrichies au niveau des éléments soumis au silencing transcriptionnel (Deal and Henikoff, 2011).

### 1. Les marques histones permissives

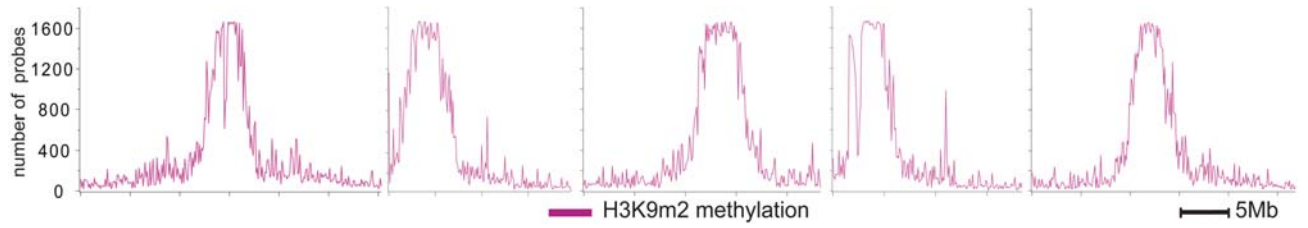
Parmi les marques permissives les plus étudiées, on retrouve la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me). Comme toutes les lysines, H3K4 peut potentiellement subir plusieurs niveaux de méthylation, et on retrouve dans les génomes eucaryotes des H3K4 mono- (H3K4me1), di- (H3K4me2) ou triméthylées (H3K4me3). Présente le long des bras chromosomiques riches en gènes actifs et largement exclue des régions hétérochromatiques, la méthylation H3K4 semble avoir un rôle dans la transcription (Roudier et al., 2011). Toutefois, seule H3K4me3, enrichie sur les régions promotrices et au niveau de l'extrémité 5' des gènes, a été associée à une transcription active (Zhang et al., 2009).

Les histones H3 peuvent également être méthylées aux trois niveaux sur leur lysine en position 36. Cette marque semble être impliquée dans le contrôle de l'expression de gènes, notamment de gènes de floraison tels que *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. La di- et triméthylation sont associées à la transcription de ces gènes tandis que la monométhylation est plutôt associée à leur suppression (Roudier et al., 2011; Xu et al., 2008). La triméthylation H3K36 est principalement enrichie sur les gènes transcrits avec un pic vers l'extrémité 5' tandis que H3K36me2 présente un pic à l'extrémité 3' (Oh et al., 2008; Roudier et al., 2011). Les formes triméthylées de H3K4 et H3K36 se retrouvent généralement dans les mêmes régions génomiques et définissent une chromatine transcriptionnellement active (Roudier et al., 2011).

### 2. Les marques histones répressives

Chez *Arabidopsis*, l'hétérochromatine est marquée par des MPT spécifiques qui sont principalement la diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2) et la monométhylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me1).

La lysine 9 de l'histone H3 peut être mono-, di- ou triméthylée. Cependant, c'est la marque H3K9me2 qui est la plus abondante et la plus étudiée chez *Arabidopsis*. La diméthylation de H3K9 est localisée dans les régions centromériques et péri-centromériques et elle est requise pour le TGS des ETs et autres séquences répétées (Figure 4) (Bernatavichute et al., 2008). Elle est déposée par les histones méthyltransférases KRYPTONITE (KYP)/SU(VAR)3-9 HOMOLOG 4 (SUVH4), SUVH5 et SUVH6, KYP étant l'enzyme



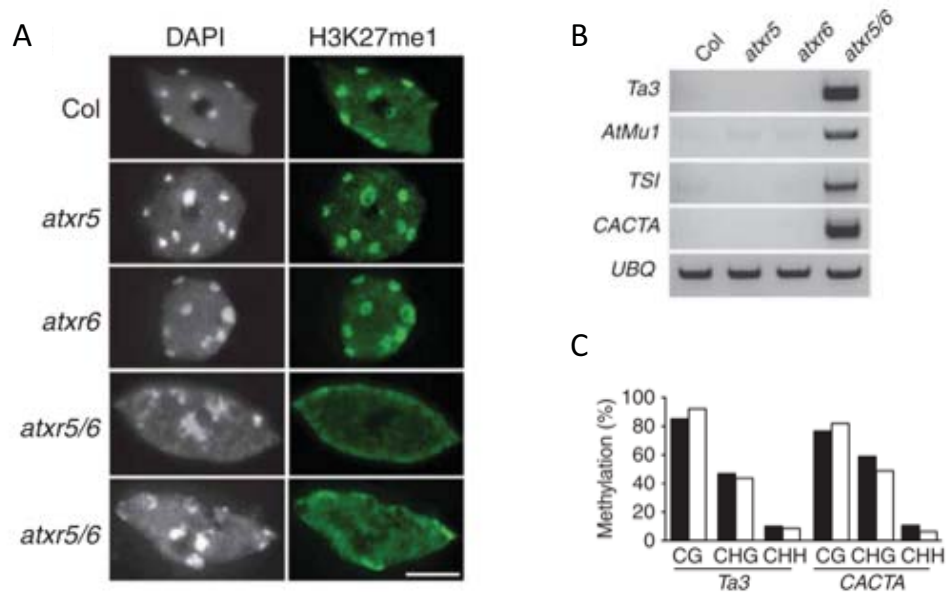
**Figure 4 : La marque H3K9me2 est principalement localisée dans les régions centromériques et péricentromériques.**

Nombre de sondes H3K9me2 positives sur des fenêtres glissantes de 100 kb le long des cinq chromosomes d'*Arabidopsis*. Adapté de Bernatavichute *et al.* (2008).

prédominante (Du et al., 2015; Jackson et al., 2004). L'activité de ces histones méthyltransférases est liée à la méthylation ADN non-CG formant ainsi une boucle de contrôle entre ces deux marques qui sera décrite ultérieurement (Du et al., 2012; Ebbs and Bender, 2006; Jackson et al., 2002; Johnson et al., 2007). D'autre part, H3K9me2 est régulée par INCREASE IN BONSAI METHYLATION 1 (IBM1) qui déméthyle spécifiquement les lysines 9 des histones H3 afin de limiter la propagation de l'hétérochromatine aux régions géniques (Saze et al., 2008).

La monométhylation H3K27 est médiée par les protéines ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED PROTEIN 5 (ATXR5) et ATXR6. Les simples mutants *atxr5* et *atxr6* ne présentent pas de phénotype particulier contrairement au double mutant *atxr5 atxr6* (*atxr5/6*) qui présente une baisse importante du niveau de H3K27me1 suggérant des fonctions redondantes entre ces deux histones méthyltransférases (Figure 5A) (Jacob et al., 2009). H3K27me1 apparaît spécifiquement sur l'histone H3.1 (Jacob et al., 2014). Cette spécificité dépend du résidu en position 31, l'un des résidus différenciant les deux histones H3.1 et H3.3. L'encombrement stérique de la thréonine 31 de H3.3 empêcherait l'insertion de sa queue N-terminale dans la poche de sélectivité de ATXR5/6 tandis que l'alanine 31 de H3.1 est propice à l'interaction (Jacob et al., 2014). L'incorporation réplication-dépendante de H3.1 et l'interaction de ATXR5/6 avec PCNA suggèrent un rôle important de cette voie au cours de la réplication (Raynaud et al., 2006). En effet, la défaillance de ces deux histones méthyltransférases provoque un défaut de réplication caractérisé par une production excessive d'ADN péricentromérique couplée à une perte de silencing de séquences répétées et d'ETs (Hale et al., 2016; Jacob et al., 2009, 2014) (Figure 5A, 5B). Contrairement à H3K9me2, H3K27me1 est indépendante de la méthylation ADN (Figure 5C) (Hale et al., 2016; Jacob et al., 2009; Mathieu et al., 2005).

Également associée au silencing transcriptionnel, il y a la marque H3K27me3 qui cible spécifiquement les bras chromosomiques (Figure 6A) (Roudier et al., 2011; Zhang et al., 2007). H3K27me3 joue un rôle important dans la différenciation cellulaire et les transitions développementales de la plante en régulant l'expression de gènes impliqués dans ces processus de manière tissu spécifique (Figure 6B) (Bemer and Grossniklaus, 2012). Cette marque est maintenue par les protéines du groupe Polycomb (PcG) dont les fonctions sont conservées de la drosophile jusqu'aux mammifères, en passant par les plantes. Ces protéines forment les complexes protéiques Polycomb Repressive Complex (PRC) 1 et PRC2 (Yang et al., 2017). Cette voie implique la triméthylation de H3K27 par PRC2, permettant le recrutement de PRC1 qui va alors monoubiquitiner la lysine 121 de H2A (H2AK121ub). Toutefois, l'ordre de



**Figure 5 : La combinaison des mutations *atxr5* et *atxr6* induit une perte de H3K27me1 et une réactivation d'ETs et séquences répétées mais n'affecte pas la méthylation ADN.**

**A.** Photos de noyaux de feuilles d'*Arabidopsis* marqués au DAPI et analysés en immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre H3K27me1 dans les génotypes indiqués.

**B.** RT-PCR semi-quantitative d'éléments hétérochromatiques dans les génotypes indiqués. *UBIQUITIN (UBQ)* est utilisé comme contrôle de charge.

**C.** Pourcentages de méthylation ADN aux loci hétérochromatiques *Ta3* et *CACTA* déterminés par séquençage ADN après traitement au bisulphite (BS-seq). Les barres noires et blanches correspondent aux plantes sauvages et aux double mutants *atxr5/6* respectivement.

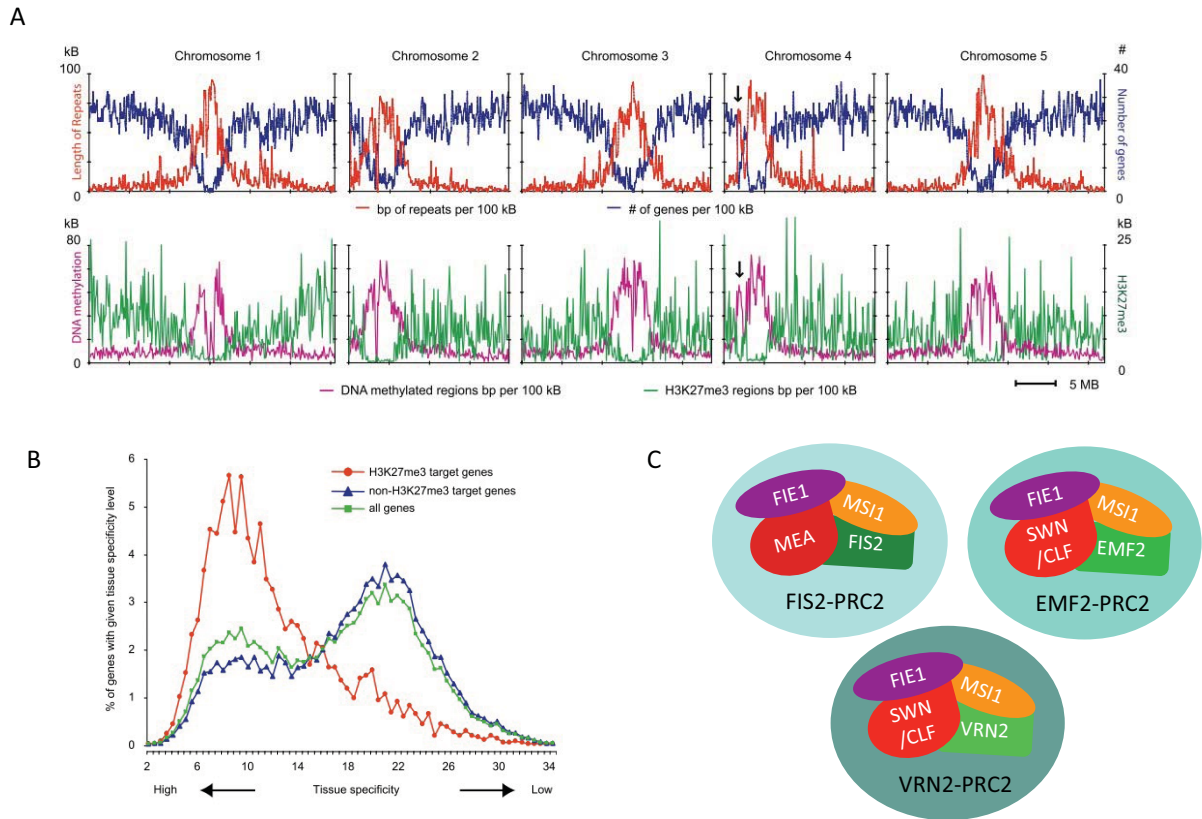
Adapté de Jacob *et al.* (2009).

recrutement des deux complexes est controversé. Des données montrent que, à certains loci, PRC1 intervient en amont de PRC2 et que la présence de H2AK121ub est nécessaire au recrutement de PRC2. Pour d'autres gènes cibles, l'ajout de H3K27me3 n'est pas suivi par le recrutement de PRC1 et, inversement, PRC1 cible des loci indépendamment de PRC2. L'ensemble de ces données suggère donc que PRC1 et PRC2 peuvent intervenir seuls ou en association pour réprimer de manière stable les gènes cibles (Yang et al., 2017). D'autres mécanismes de recrutement de PRC2 ont été mis en évidence. Pour près de la moitié des cibles, le recrutement de PRC2 se ferait grâce à la protéine VIVIPAROUS1/ABI3-LIKE 1 (VAL1) et son homologue VAL2 et un motif particulier de l'ADN, l'élément RY (Yuan et al., 2021).

Le complexe PRC2 comporte quatre sous-unités et il existe trois complexes PRC2 en fonction de l'identité des protéines qui le composent (Figure 6C). Les protéines FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM 1 (FIE1) et MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 (MSI1) sont communes aux trois complexes qui se différencient par leurs sous-unités histone méthyltransférase et leurs sous-unités d'interaction à l'ADN. Le premier complexe identifié est FIS2-PRC2 composé de l'histone méthyltransférase MEDEA (MEA), FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2), FIE1 et MSI1 (Yang et al., 2017). FIS2-PRC2 est spécifiquement exprimé dans le gamétophyte femelle et dans les graines où il joue un rôle important dans le développement. Les deux autres complexes sont (i) EMF2-PRC2, composé des méthyltransférases SWINGER (SWN) ou CURLY LEAF (CLF), EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2), FIE1 et MSI1, et (ii) le complexe VRN2-PRC2, composé de SWN ou CLF, VERNALIZATION 2 (VRN2), FIE1 et MSI1 (Bemer and Grossniklaus, 2012). EMF2-PRC2 et VRN2-PRC2 interviennent dans le développement sporophytique et portent des fonctions en partie redondantes. Contrairement à SWN, CLF semble également jouer un rôle dans la propagation de H3K27me3 aux régions adjacentes (Bemer and Grossniklaus, 2012; Shu et al., 2019).

Les MPT présentées ici constituent une liste non exhaustive des modifications que peuvent subir les histones. Il existe un grand nombre de MPT et un nombre encore plus grand de combinaisons de MPT qui influent sur la structure de la chromatine et sur les processus de l'ADN. Mais la compréhension de l'articulation et de l'étendue de ce « code histone » reste encore relativement sommaire.





**Figure 6 : H3K27me3 est localisé dans les bras chromosomiques et cible principalement les gènes exprimés de manière tissu spécifique.**

**A.** Les graphiques du haut représentent le nombre de gènes (bleu) et la longueur des séquences répétées (orange) par fenêtre de 100 kb. Les graphiques du bas montrent la distribution génomique de la méthylation ADN et de H3K27me3 sur des fenêtres de 100 kb. Les flèches noires indiquent le « nœud » (*knob*) du chromosome 4.

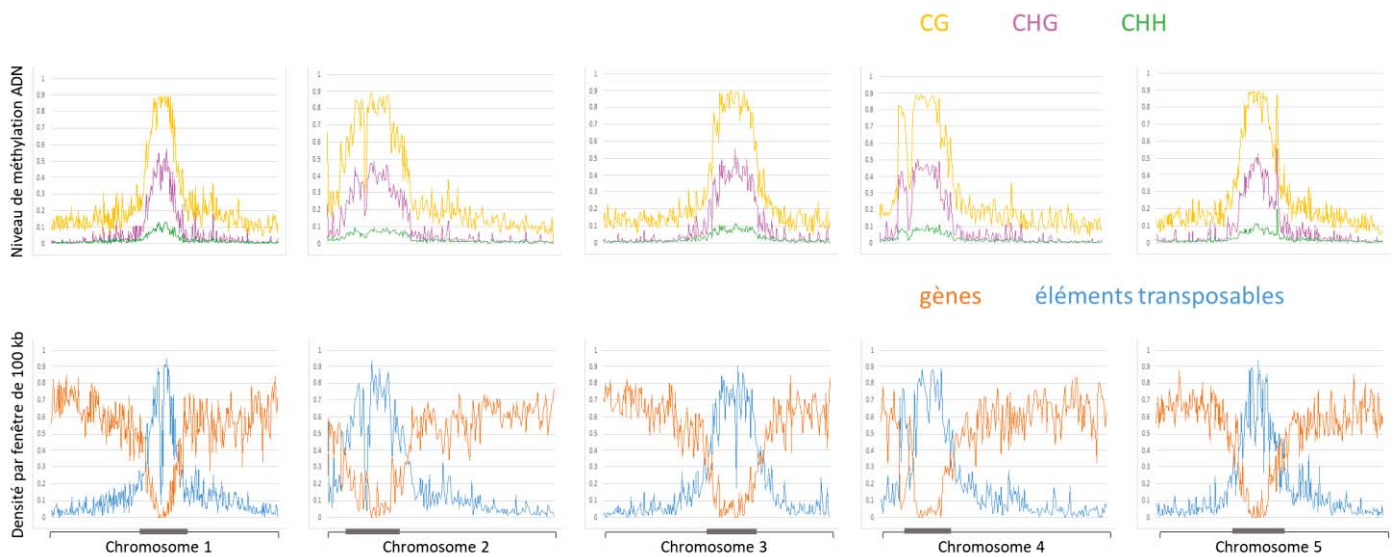
**B.** Pourcentage de gènes avec un niveau donné de spécificité tissulaire parmi les gènes cibles de H3K27me3 (rouge), les gènes non ciblés par H3K27me3 (bleu) et tous les gènes confondus (vert). Adapté de Zhang *et al.* (2007).

**C.** Schéma représentatif des trois complexes PRC2.

### III. La méthylation ADN

---

Au-delà des histones, l'ADN peut également être le siège de modifications épigénétiques. Chez la plupart des organismes eucaryotes, la modification la plus fréquente est l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone en position 5 des résidus cytosines de l'ADN. Cette modification, communément appelée « méthylation de l'ADN » et dont la distribution génomique constitue le méthylome, est généralement considérée comme une marque épigénétique répressive. En accord avec cela, les régions centromériques et péri-centromériques, peu propices à la transcription, présentent les niveaux de méthylation les plus élevés dans le génome d'*Arabidopsis* (Figure 7) (Cokus et al., 2008; Gouil and Baulcombe, 2016; Stroud et al., 2013a). Les ETs et les séquences répétées sont fortement méthylés dans un grand nombre d'espèces et la perte de méthylation de l'ADN entraîne la transcription de ces éléments, et parfois leur transposition. Ainsi, la méthylation de l'ADN est considérée comme un mécanisme de défense de l'hôte contre les éléments mobiles de l'ADN qui présentent un danger pour l'intégrité du génome (Law and Jacobsen, 2010; Zhang et al., 2018b). Les cytosines méthylées peuvent être présentes dans trois contextes de séquence différents : les contextes CG et CHG, dits symétriques (car présents sur les deux brins de la molécule d'ADN) et le contexte asymétrique CHH, où H correspond à n'importe quelle base sauf une guanine. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a lieu majoritairement en contexte CG, tandis que dans de nombreuses espèces de plantes supérieures, dont *Arabidopsis*, la méthylation des sites non-CG est également abondante (Law and Jacobsen, 2010). Chez *Arabidopsis*, les contextes CG, CHG et CHH sont respectivement méthylés à des niveaux moyens de 24%, 6,7% et 1,7% (Cokus et al., 2008; Law and Jacobsen, 2010). La complexité du méthylome va au-delà de ces trois contextes de séquences. En effet, les sous-contextes définis en fonction du nucléotide représenté par H influencent également les niveaux de méthylation. L'analyse trinuécléotidique de la méthylation ADN est donc importante pour la compréhension de cette marque épigénétique (Gouil and Baulcombe, 2016; Lister et al., 2008). En contexte CG, le troisième nucléotide n'a que peu d'effet sur les niveaux de méthylation, mais pour les contextes CHG et CHH les différents sous-contextes peuvent présenter des niveaux de méthylation qui diffèrent de presque 30% (Gouil and Baulcombe, 2016). D'autre part, le contexte chromatinien a aussi son importance puisque des voies moléculaires différentes peuvent être mobilisées en fonction de la région génomique ciblée. Ces différences de méthylation suggèrent une affinité variable des ADN méthyltransférases pour les différentes cytosines du génome (Law and Jacobsen,



**Figure 7 : La méthylation ADN est une marque principalement répressive.**

Les graphiques du haut représentent les niveaux de méthylation ADN moyen dans les trois contextes de séquence sur des fenêtres de 100 kb le long des cinq chromosomes. Voir figure 1B pour la légende détaillée des graphiques du bas.

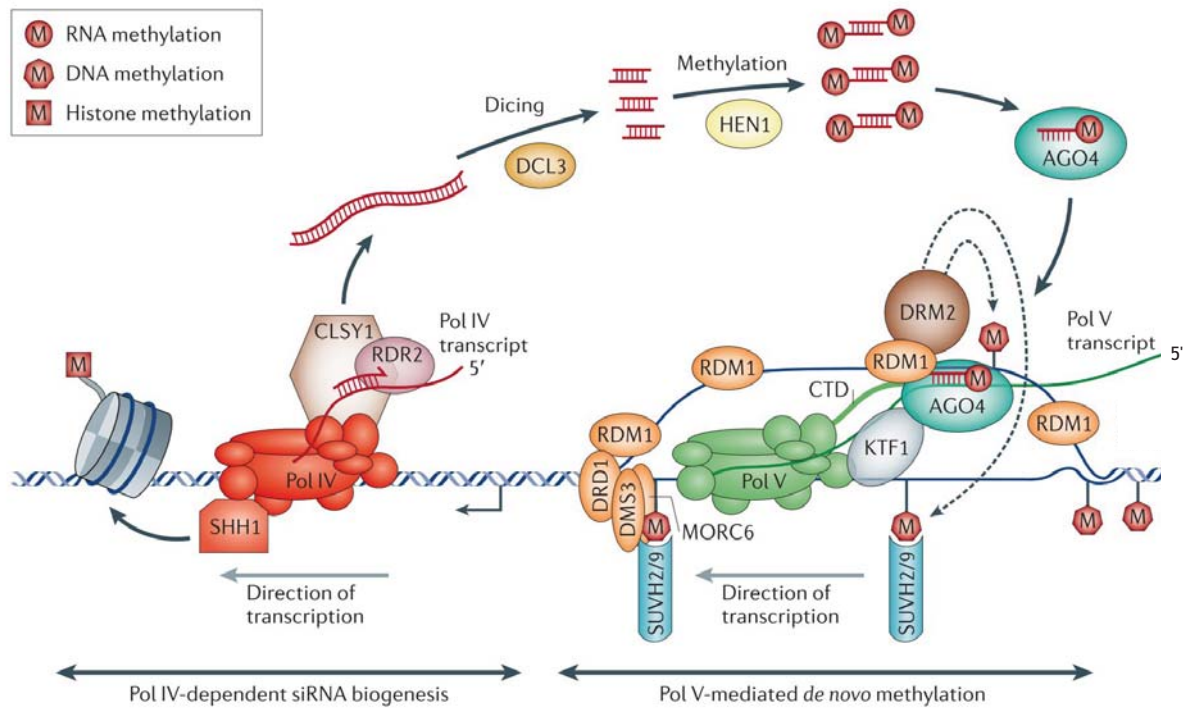
2010). Ainsi, les ADN méthyltransférases et les voies moléculaires mises en jeu peuvent être classées en fonction de leurs sites d'action.

### 1. La voie RNA-directed DNA methylation

La méthylation *de novo* dans les trois contextes de séquences est assurée par une voie médiée par des petits ARNs interférents de 24 nucléotides (siRNA) appelé *RNA-directed DNA methylation* (RdDM) (Figure 8). Cette voie fait intervenir un nombre important d'acteurs qui permettent la méthylation de l'ADN par l'ADN méthyltransférase DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASES 2 (DRM2). Dans la voie RdDM, des ARNs simple brin sont produits par l'ARN polymérase Polymérase (Pol) IV, spécifique des plantes, et utilisés comme matrice par RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2) pour générer des ARNs double brins qui sont ensuite clivés en siRNAs de 24 nucléotides par DICER-LIKE 3 (DCL3). Les siRNAs ainsi produits sont chargés sur des protéines ARGONAUTE (AGO) (principalement AGO4 et AGO6). Ces complexes ciblent les transcrits naissants Pol V complémentaires permettant le recrutement de DRM2 et la méthylation des sites génomiques homologues. Le recrutement de Pol V est initié par SUVH2 et SUVH9 qui, par leur domaine *SET- or RING-associated* (SRA), se lient à des régions d'ADN partiellement méthylées. La Pol IV est, quant à elle, recrutée à certains loci grâce à SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOGUE 1 (SHH1) qui se lie au H3K9me et H3K4 non modifiées. La voie RdDM permet, non seulement de méthyler *de novo* des copies d'ETs nouvellement insérées (Marí-Ordóñez et al., 2013) mais également de maintenir la méthylation CHH et, dans une moindre mesure, CHG. La voie RdDM apparaît donc importante pour la mise en place et contribue au maintien du TGS (Baubec et al., 2014; Cao and Jacobsen, 2002a, 2002b; Cokus et al., 2008; Law and Jacobsen, 2010; Matzke and Mosher, 2014; Stroud et al., 2013b).

### 2. Méthylation en contexte CG

La méthylation CG est la méthylation la plus abondante et se retrouve principalement dans les régions hétérochromatiques au niveau des ETs (Cokus et al., 2008; Lister et al., 2008). La méthylation CG est également détectée sur certains PCGs au niveau de leurs promoteurs, où elle joue un rôle répresseur sur la transcription. La méthylation CG est également présente dans le corps de plus d'un tiers des gènes d'*Arabidopsis* (Bewick and Schmitz, 2017; Cokus et al., 2008; Lister et al., 2008; Zhang et al., 2018b, 2006; Zilberman et al., 2007). La ou les fonctions

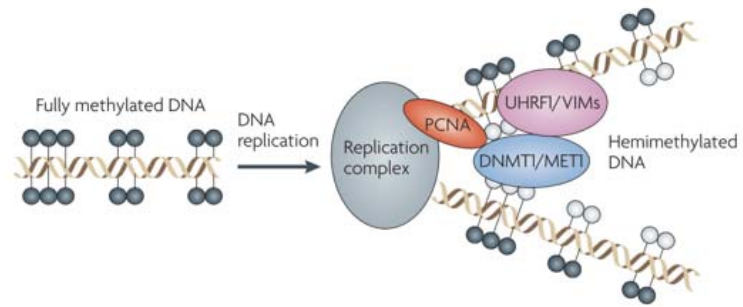


**Figure 8 : Représentation schématique de la voie RdDM**

La voie est décrite dans le texte paragraphe III.1. Adapté de Matzke et Mosher (2014)

de la méthylation ADN dans le corps de gènes reste(nt) encore l'objet de débats. Il a été initialement proposé que la méthylation CG maintiendrait un niveau d'expression stable des gènes, notamment des gènes de « ménage », en empêchant l'incorporation de H2A.Z, dont la présence est associée à une sensibilité de l'expression à différents stimuli (Bewick and Schmitz, 2017; Zilberman et al., 2007, 2008). Récemment, il a été montré que la méthylation génique CG joue un rôle dans la suppression de la production de transcrits intragéniques aberrants (Choi et al., 2020). La méthylation génique CG est associée à la présence du variant H3.3 qui, en maintenant une densité nucléosomale optimale en bloquant la fixation de l'histone H1, favoriserait l'accessibilité de la chromatine aux ADN méthyltransférases (Wollmann et al., 2017). L'établissement initial de la méthylation CG dans le corps des gènes pourrait être causé par une déméthylation incomplète de H3K9me2 par IBM1. H3K9me2 recruterait alors la CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) qui méthyle l'ADN en contexte CHG (voie détaillée dans le paragraphe III.3.). Le mécanisme par lequel l'ADN est ensuite méthylé en contexte CG à partir de H3K9me2 et la méthylation CHG reste à définir (Bewick and Schmitz, 2017). La méthylation CG en dehors des corps des gènes est, quant à elle, vraisemblablement initiée par la voie RdDM (Matzke and Mosher, 2014).

Une fois établie, la méthylation en contexte CG est maintenue par l'ADN METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) au cours de la réplication de l'ADN. Les molécules d'ADN néo-synthétisées hémiméthylées sont reconnues et fixées par les protéines VARIANT IN METHYLATION 1 (VIM1), VIM2 et VIM3 qui permettent le recrutement de MET1 (Figure 9) (Law and Jacobsen, 2010). Un défaut dans cette voie moléculaire conduit à une déméthylation passive de l'ADN au fil des divisions cellulaires. Une fois que la méthylation CG est totalement perdue, elle ne peut plus être rétablie par MET1 (Saze et al., 2003; Stroud et al., 2013b). La perte de la fonction MET1 élimine la majorité de la méthylation CG du génome et conduit à la production de transcrits pour 47% des transposons du génome (contre seulement 15% dans les plantes sauvages) montrant l'importance de MET1 et de la méthylation CG dans le TGS des ETs (Cokus et al., 2008; Lister et al., 2008; Stroud et al., 2013b; Zhang et al., 2006). Le triple mutant *vim1 vim2 vim3* (*vim1/2/3*) présente un transcriptome et un méthylome similaire à celui d'un mutant *met1* suggérant que les protéines VIM et MET1 interviennent dans une seule et même voie pour maintenir la méthylation CG et le silencing transcriptionnel (Shook and Richards, 2014; Stroud et al., 2013b). Les individus *met1* homozygotes pour une mutation nulle de *MET1* sont sous-représentés dans la descendance d'hétérozygotes *met1/MET1*, et ils présentent des défauts développementaux variables tels qu'une stature réduite, une floraison tardive et une baisse de fertilité, qui tendent à s'aggraver au cours des



**Figure 9 : Représentation schématique de la voie de maintenance de la méthylation CG.** UHRF1 et DNMT1 sont les homologues des protéines VIM et de MET1, respectivement, chez les mammifères. Adapté de Stroud *et al.* (2010)

générations. Ces observations témoignent de l'importance de MET1 et de la méthylation CG dans le développement de la plante (Mathieu et al., 2007; Saze et al., 2003).

La perte de méthylation CG, que ce soit dans un mutant *met1* ou un triple mutant *vim1/2/3*, perturbe également les profils de méthylation en contexte non-CG. Ces mutants présentent une hyperméthylation stochastique CHG et l'apparition de patrons de méthylation CHH anormaux (Mathieu et al., 2007; Stroud et al., 2013b), en parallèle d'une baisse de méthylation non-CG à ~20 000 loci démontrant que MET1 et la méthylation CG sont requises pour la stabilité de la méthylation non-CG (Stroud et al., 2013b). Au niveau d'autres régions génomiques moins nombreuses, la méthylation CG dépendrait de la méthylation non-CG (Stroud et al., 2013b). L'ensemble de ces résultats témoigne donc d'une interdépendance des méthylation CG et non-CG (Mathieu et al., 2007; Stroud et al., 2013b). Il a aussi été mis en évidence un lien entre la méthylation CG et les MPT d'histones, notamment H3K9me2. L'expression du gène *IBM1*, qui code une histone H3K9 déméthylase, est dépendante de la méthylation CG et non-CG présente dans l'intron du gène. La perte de méthylation ADN au niveau de cet intron, survenant par exemple dans un mutant *met1*, empêche la transcription pleine-longueur d'*IBM1*, et donc l'accumulation d'IBM1, conduisant à une accumulation ectopique de H3K9me2 au niveau des gènes ciblés par IBM1 (Rigal et al., 2012; Tariq et al., 2003). D'autre part, la perte de la méthylation CG entraîne une redistribution de H3K27me3 dans les régions hétérochromatiques, qui, malgré le caractère répressif de cette marque, ne suffit pas à empêcher la réactivation transcriptionnelle (Deleris et al., 2012; Johnson et al., 2007; Mathieu et al., 2005).

### 3. Maintien de la méthylation CHG

La méthylation CHG est maintenue majoritairement par CMT3, une méthyltransférase à chromodomaine spécifique aux plantes, et se concentre principalement dans les régions hétérochromatiques péri-centromériques (Cokus et al., 2008; Du et al., 2012; Lister et al., 2008; Stroud et al., 2013a). Les mutants *cmt3* présentent une perte de 80-90% de la méthylation CHG. Le maintien de la méthylation CHG dépend également partiellement d'une autre méthyltransférase, CHROMOMETHYLASE 2 (CMT2), qui, bien que ciblant préférentiellement les sites CHH, est également capable de méthyler les cytosines en contexte CHG (Gouil and Baulcombe, 2016; Stroud et al., 2013a). Environ 25% de la méthylation CHG est perdue dans les mutants *cmt2* et la combinaison des mutations *cmt3* et *cmt2* conduit à une perte quasi totale de la méthylation CHG (Stroud et al., 2013a). A l'image de la perte de la



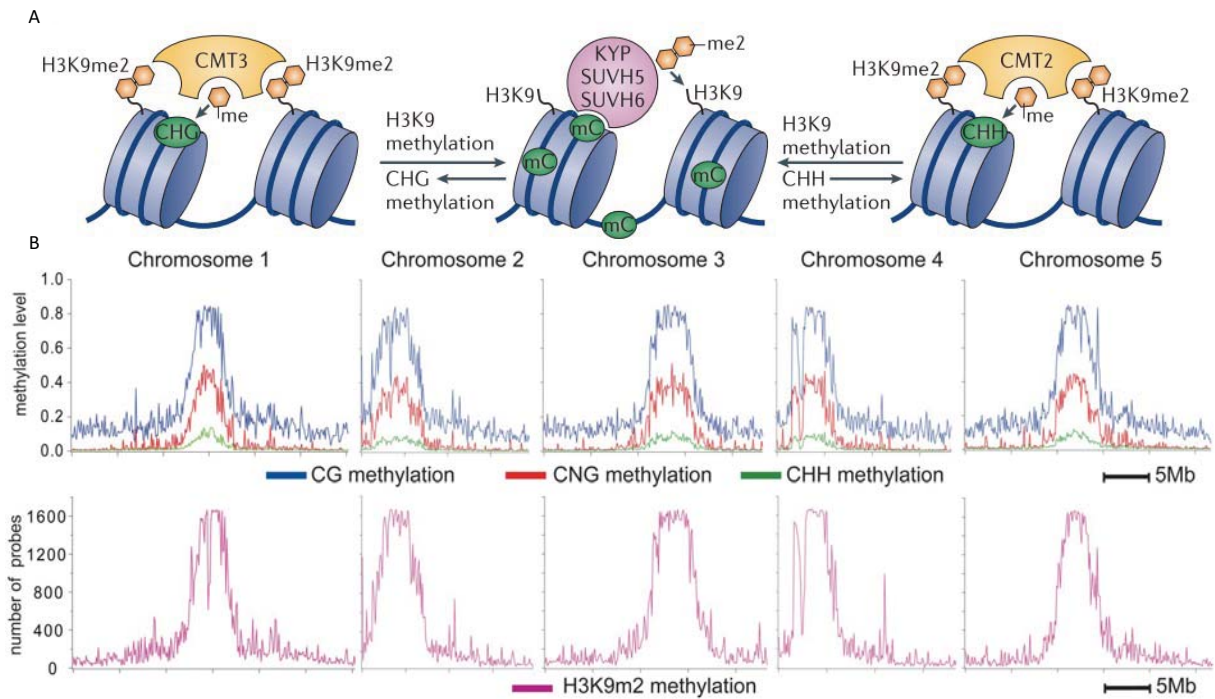


méthylation, on observe une faible réactivation d'ETs dans le mutant *cmt2* et une réactivation importante en fond mutant *cmt3* (Stroud et al., 2013a).

De même que la méthylation CG, différentes observations suggèrent que la maintenance de la méthylation CHG serait couplée à la réplication de l'ADN. CMT3 présente une préférence pour les sites CHG hémiméthylés, co-purifie avec le variant H3 réplicatif H3.1, et s'accumule principalement dans les cellules qui se répliquent (Du et al., 2012).

Comme mentionné précédemment, la méthylation CHG est maintenue au travers d'une boucle de contrôle faisant intervenir H3K9me2 et les histones méthyltransférases KYP, SUVH5 et SUVH6 (Figure 10A). CMT3 (et également CMT2) est recruté au niveau de la chromatine par l'intermédiaire de son chromodomaine et de son domaine BAH (*bromo adjacent homology*) qui permettent de lier H3K9me2. A l'inverse, la méthylation ADN non-CG est liée par le domaine SRA des histones méthyltransférases KYP, SUVH5 et SUVH6, permettant le recrutement de ces dernières à la chromatine (Bernatavichute et al., 2008; Du et al., 2012, 2015; Jackson et al., 2002; Johnson et al., 2007). Cette boucle de contrôle explique la corrélation quasi parfaite entre les distribution génomique de H3K9me2 et celle de la méthylation ADN non-CG (Figure 10B) et assure la stabilité de l'environnement chromatinien répressif induit par la présence simultanée de ces marques (Bernatavichute et al., 2008; Du et al., 2015; Roudier et al., 2011). Ainsi les mutations de CMT3, KYP, SUVH5 ou SUVH6 affectent simultanément H3K9me2 et la méthylation CHG. De même, la perte de l'histone déméthylase IBM1 induit une augmentation des niveaux de H3K9me2 associée à une hyperméthylation CHG dans les gènes normalement dépourvus de ces deux marques répressives (Miura et al., 2009; Saze et al., 2008; Stroud et al., 2013b). La perte de la méthylation non-CG induit une réactivation de près de 200 ETs parmi lesquels sont surreprésentés les transposons de type Mariner/DNA et les rétrotransposons LINE-1, Copia et Gypsy (Stroud et al., 2013a).

Un lien entre cette voie et AGD-CONTAINING PROTEIN 1 (AGDP1) a récemment été mis en lumière. Cette protéine comporte trois domaines Agenet (AGD), des domaines lecteurs d'histones reconnaissant spécifiquement la marque H3K9me2 (Zhang et al., 2018a; Zhao et al., 2019). AGDP1 se localise préférentiellement dans les régions hétérochromatiques. L'absence de AGDP1 provoque une perte de méthylation ADN non-CG et de H3K9me2 mais aucune interaction directe n'a été détectée entre AGDP1 et KYP/SUVH5/SUVH6 ou CMT2/CMT3 (Zhang et al., 2018a; Zhao et al., 2019). Les données actuelles ne suffisent donc pas pour déterminer si AGDP1 est un acteur de la boucle de rétrocontrôle ou si ces effets sont indirects. Une troisième hypothèse intéressante est que AGDP1, par sa capacité à fixer trois H3K9me2,



**Figure 10 : Maintien de la méthylation non-CG et de H3K9me2**

**A.** Représentation schématique des boucles de contrôle impliquant la méthylation ADN CHG et CHH et la méthylation H3K9.

**B.** Niveau de méthylation ADN moyen (graphiques du haut) et nombre de sondes H3K9me2 positives (graphiques du bas) sur des fenêtres glissantes de 100 kb le long des cinq chromosomes d'*Arabidopsis*. Adapté de Bernatavichute *et al.* (2008).

permettrait une restructuration de la chromatine créant un environnement chromatinien favorable aux méthyltransférases (Harris and Jacobsen, 2019; Zhang et al., 2018a).

Cette boucle d'amplification provoque également l'accumulation des siRNAs grâce à l'interaction de SHH1 avec H3K9me2, comme vu dans le paragraphe III.1. (Matzke and Mosher, 2014; Stroud et al., 2013b, 2013a). Ce dialogue entre la méthylation CHG et la méthylation H3K9 contribue donc au maintien d'un silencing stable des transposons et autres séquences hétérochromatiques.

Au niveau des sites CHG, une cytosine suivie d'une adénine ou d'une thymine (CAG/CTG) a une plus forte tendance à être méthylée qu'une cytosine directement suivie d'une autre cytosine (CCG) (Gouil and Baulcombe, 2016; Lister et al., 2008). La perte de méthylation provoquée par les mutations *cmt2* ou *cmt3* affecte toutes les cytosines en contexte CHG sans distinction de sous-contexte. Ce ne sont donc pas les chromométhylases qui sont à l'origine des différences de méthylation entre les sous-contextes. Gouil et Baulcombe proposent que cette différence s'explique plutôt par des spécificités de liaison des histones méthyltransférases KYP, SUVH5 ou SUVH6 et des différences d'efficacité de la boucle de contrôle de la méthylation CHG-H3K9me2 en fonction des histones méthyltransférases impliquées. L'histone méthyltransférase prédominante KYP se lie préférentiellement aux cytosines en contexte CAG et CTG ce qui expliquerait le plus fort niveau de méthylation de ces sites (Gouil and Baulcombe, 2016; Li et al., 2018).

#### 4. Maintien de la méthylation CHH

La méthylation en contexte asymétrique CHH est maintenue par deux voies moléculaires agissant au niveau de régions génomiques distinctes. Au niveau des bras chromosomiques, elle dépend principalement de l'action constante de la voie RdDM. En revanche, la méthylation CHH au niveau des régions hétérochromatiques est maintenue en grande partie par CMT2 (Law and Jacobsen, 2010; Stroud et al., 2013a; Zemach et al., 2013). La perte de la voie RdDM ou de CMT2 a un effet moindre sur le silencing des ETs que la perte de la méthylation CG ou CHG. Cependant, la perte combinée de la méthylation CHH et CHG provoque une réactivation d'un nombre plus important d'ETs et à des niveaux plus importants que la perte de CHG seule. Ces données suggèrent que la méthylation CHH n'a pas un rôle majeur dans le maintien du TGS des ETs mais son rôle est redondant avec celui de la CHG (Stroud et al., 2013a).

La méthylation CHH sur les bras chromosomiques reste faible (2%) sans distinction entre les sous-contextes. Au contraire, dans les régions péri-centromériques, les cytosines en contexte



CAA ou CTA atteignent 35-40% de méthylation tandis que les sous-contextes les moins méthylés, tels que CCC et CCT ont des niveaux inférieurs à 8% (Gouil and Baulcombe, 2016; Lister et al., 2008). Ces spécificités de séquences sont perdues dans le mutant *cmt2* mais pas dans les mutants de la voie RdDM suggérant que CMT2 est à l'origine de ces variations de méthylation dépendantes du sous-contexte CHH (Gouil and Baulcombe, 2016)

Comme mentionné précédemment, CMT2, bien qu'ayant une préférence pour les cytosines en contexte CHH, est également capable de méthyler les sites CHG dans une boucle de contrôle impliquant la méthylation H3K9 (Figure 10). Le recrutement de l'une ou l'autre des chromométhylases (CMT2 ou CMT3) semble reposer sur le type/niveau de méthylation de H3K9. CMT3 se lie indifféremment à H3K9me1 et H3K9me2 tandis que CMT2 se lie préférentiellement à H3K9me2 (Du et al., 2012; Stroud et al., 2013a). Le quadruple mutant *drm1 drm2 cmt2 cmt3* présente une perte totale de la méthylation non-CG associée à une réactivation transcriptionnelle d'un grand nombre d'ETs. La voie RdDM et CMT2 assurent donc, au côté de CMT3, la méthylation non-CG et le silencing d'un ensemble d'ETs (Stroud et al., 2013a).

## 5. DDM1 et méthylation de l'ADN

En plus des méthyltransférases, des facteurs appelés remodeleurs de la chromatine sont essentiels pour assurer l'établissement et le maintien de la méthylation ADN. DECREASE IN DNA METHYLATION 1 (DDM1) et DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (DRD1) sont deux remodeleurs de la famille SWI2/SNF2. DRD1 intervient spécifiquement dans la méthylation dépendante de la voie RdDM tandis que DDM1 est requis pour la méthylation par MET1, CMT2 et CMT3 (Kanno et al., 2004; Matzke and Mosher, 2014; Zemach et al., 2013). En accord avec les sites d'action des ADN méthyltransférases, on observe une baisse de la méthylation ADN dans les bras chromosomiques dans le mutant *drd1* tandis que dans le mutant *ddm1* la baisse de méthylation touche principalement les régions péri-centromériques (Zemach et al., 2013). L'analyse de ces mutants a également permis de montrer que la RdDM cible préférentiellement les ETs courts et les extrémités des ETs longs tandis que la méthylation dépendante de DDM1 se localise dans le corps des longs ETs (Zemach et al., 2013).

Les mutations *ddm1* provoquent une baisse importante des méthylation CG, CHG, et dans une moindre mesure, CHH (Stroud et al., 2013b; Vongs et al., 1993; Zemach et al., 2013). Cette perte de méthylation provoque la réactivation transcriptionnelle de plus de 2000



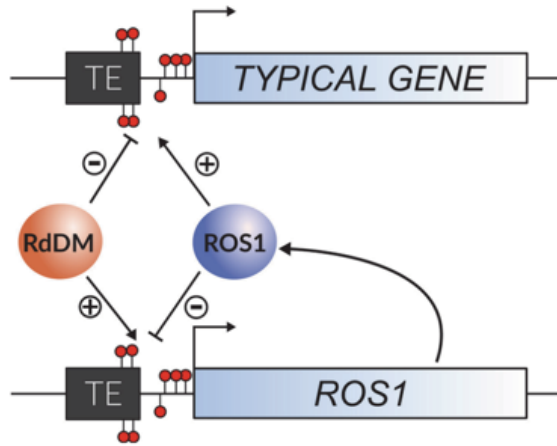
ETs (Zemach et al., 2013). DDM1 permettrait aux méthyltransférases MET1, CMT2 et CMT3 d'accéder à l'ADN en contournant la barrière créée par l'histone de liaison H1. Ainsi, on observe dans le mutant *h1 ddm1* une baisse de méthylation moins importante que dans le simple mutant *ddm1* (Zemach et al., 2013). Comme dans les mutants *met1* et *ibm1*, on observe une hyperméthylation CHG dans le mutant *ddm1*. Contrairement à *ibm1* et *met1*, dans *ddm1* ce sont les gènes méthylés CG qui sont hyperméthylés avec un biais vers leurs extrémités 3' (Stroud et al., 2013b; Zemach et al., 2013). L'hyperméthylation dans ces trois mutants serait donc causée par des mécanismes différents, qui restent encore à définir (Zemach et al., 2013). Le mutant *ddm1* est également caractérisé par une baisse importante de H3K9me2 et H3K27me1 (Ikeda et al., 2017; Soppe et al., 2002). D'autre part, l'absence de DDM1 provoque une forte décondensation de l'hétérochromatine (Probst et al., 2003; Soppe et al., 2002).

## 6. La déméthylation de l'ADN

La déméthylation de l'ADN est également un processus important notamment dans le développement. Celle-ci peut se faire de manière passive, par une perte progressive à travers la réplication de l'ADN en absence de mécanisme de maintien, ou alors, de manière active grâce à des enzymes spécifiques. Ces enzymes font partie de la famille des 5-méthylcytosine glycosylases dont les membres fondateurs sont DEMETER (DME) et REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1). Cette famille comporte également les glycosylases DEMETER-LIKE 2 (DML2) et DML3. Tandis que DME est exprimée pendant la gamétogenèse, ROS1, DML2 et DML3 sont exprimées dans les tissus végétatifs (Law and Jacobsen, 2010). DML2/3 sont exprimées à un niveau plus faible que ROS1 et fonctionnent en partie de manière redondante avec cette dernière (Law and Jacobsen, 2010; Williams et al., 2015).

La déméthylation ADN pourrait être importante pour bloquer la propagation de l'hétérochromatine qui inactiverait les gènes proches d'ETs (Lister et al., 2008; Tang et al., 2016). Tout comme pour la méthylation ADN, les MPT d'histones jouent un rôle dans la déméthylation. En effet, les cibles de ROS1 sont enrichies en H3K27me3 et H3K18ac, une marque permissive, et déplétées en H3K9me2 et H3K27me1 (Tang et al., 2016). La région 5' en amont du site d'initiation de la transcription de *ROS1* chevauche partiellement un ET et le niveau de méthylation de cette région permet de contrôler l'expression de *ROS1*. La méthylation ADN est médiée par la voie RdDM et MET1 et la déméthylation est dépendante de ROS1 (Figure 11). Au vu de ces observations, il a été proposé un modèle dans lequel *ROS1* jouerait le rôle de senseur du niveau de méthylation ADN du génome permettant à la cellule de





**Figure 11 : Représentation schématique de la régulation de l'expression de *ROS1*.**

*ROS1* exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre transcription pour contrebalancer l'action de la RdDM. Les effets de *ROS1* et RdDM aux autres loci cibles sont inversés. D'après Williams *et al.* (2015).

conserver un équilibre entre la méthylation et la déméthylation et, par extension, entre transcription et répression d'un ensemble de loci (Gong et al., 2002; Lei et al., 2015; Lister et al., 2008; Mathieu et al., 2007; Tang et al., 2016; Williams et al., 2015).

Finalement, le méthylome des plantes, et des eucaryotes de manière générale, constitue une information cruciale pour la régulation des PCGs et des ETs. Plusieurs voies moléculaires sont mises en place pour établir, maintenir et également éliminer la méthylation ADN et ces voies collaborent étroitement avec les modifications post-traductionnelles des histones et participent à la régulation complexe des PCGs et ETs. Il existe toutefois des voies qui ne font pas intervenir la méthylation ADN et qui, lorsqu'elles sont défectueuses, entraînent une réactivation transcriptionnelle sans diminution de la méthylation ADN.

## IV. Les voies de silencing indépendantes de la méthylation ADN

---

### 1. ATXR5/6 et H3K27me1

La voie de TGS médiée par ATXR5 et ATXR6 et H3K27me1 a été décrite précédemment (paragraphe II.2.). Cette voie contribue au silencing des régions hétérochromatiques de manière indépendante de la méthylation de l'ADN (Figure 5B, 5C) (Hale et al., 2016; Jacob et al., 2009; Mathieu et al., 2005). L'interaction entre les protéines ATXR5/ATXR6 et PCNA (Raynaud et al., 2006) ainsi que les défauts réplcatifs observés dans le double mutant *atxr5/6* indiquent que ces protéines jouent également un rôle dans la réplication de l'ADN (Hale et al., 2016; Jacob et al., 2009, 2014). Les fonctions de silencing et de réplication de ces protéines pourraient être liées, comme nous le verrons pour d'autres facteurs par la suite.

### 2. La voie MORPHEUS' MOLECULE 1

*MORPHEUS' MOLECULE 1 (MOMI)* a été le premier gène identifié nécessaire au TGS d'un transgène par une voie indépendante de la méthylation ADN. Il a été identifié lors d'un crible d'une population mutante de la lignée A, une lignée d'*Arabidopsis* portant un transgène de résistance à l'hygromycine hyperméthylé et transcriptionnellement inactif (Amedeo et al., 2000). D'autres études ont montré que *MOMI* est également impliqué dans le silencing de certains loci endogènes et notamment d'ETs et de séquences hautement répétées des régions



péricentromériques. Parmi les séquences ciblées par MOM1 on retrouve des loci dont la réactivation est souvent utilisée comme marqueur de perte de TGS tels que *TRANSCRIPTIONAL SILENT INFORMATION (TSI)*, des répétitions péricentromériques dérivées d'éléments transposables *Athila*, et les séquences satellites centromériques *180-bp* (Steimer et al., 2000; Vaillant et al., 2006; Yokthongwattana et al., 2010). Des études ont montré que le silencing médié par MOM1 est globalement indépendant de la méthylation ADN, des marques histones communément analysées et des siRNAs (Amedeo et al., 2000; Habu et al., 2006; Mittelsten Scheid et al., 2002; Numa et al., 2010; Steimer et al., 2000; Vaillant et al., 2006; Yokthongwattana et al., 2010). Certaines cibles de la voie MOM1 sont également contrôlées par la voie RdDM (Han et al., 2016; Yokthongwattana et al., 2010). Des interactions génétiques complexes ont été mises en évidence entre ces deux voies. A certains loci, cette interaction est synergique tandis qu'à d'autres, la mutation *mom1* supprime la réactivation transcriptionnelle causée par la mutation de la voie RdDM (Yokthongwattana et al., 2010). Les noyaux de plantes *mom1* ne présentent pas de défaut de condensation de l'hétérochromatine suggérant que MOM1 n'est pas requis pour l'organisation de l'hétérochromatine (Mittelsten Scheid et al., 2002; Probst et al., 2003). Il semblerait que MOM1 cible préférentiellement la chromatine intermédiaire c'est-à-dire la chromatine portant des propriétés hétérochromatiques (H3K9me2, méthylation ADN et siRNAs) et euchromatiques (H3K4me2) (Habu et al., 2006; Yokthongwattana et al., 2010).

*MOM1* possède une région homologue à la région hélicase des ATPases de la famille SWI2/SNF2 (Amedeo et al., 2000). Cependant, cette région ne semble pas essentielle à la fonction de MOM1 dans le TGS. L'analyse de la séquence protéique de MOM1 et de celle de ses homologues a mis en évidence trois nouvelles régions conservées appelées « Conserved MOM1 Motif » 1-3 (CMM1-3). Des études de délétions ont montré que l'activité de MOM1 dans le TGS repose principalement sur le domaine CMM2 et le signal de localisation nucléaire (NLS ; *Nuclear Localization Signal*) (Čaikovski et al., 2008; Han et al., 2016; Nishimura et al., 2012). Le domaine CMM2 est également nécessaire à l'homodimérisation de MOM1 et à son interaction avec les protéines PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT LIKE 1 (PIAL1) et PIAL2. *PIAL1* et *PIAL2* codent des SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier*) E3 ligases qui permettent, à l'aide d'autres enzymes, l'ajout d'une protéine SUMO à d'autres protéines. PIAL1 et PIAL2 assurent, de manière partiellement redondante, le silencing de transgènes et de cibles endogènes indépendamment de la méthylation ADN et semblent intervenir dans la même voie que MOM1. L'implication de la sumoylation ne peut être totalement exclue, cependant l'activité E3 ligase de PIAL1/2 ne semble pas essentiel au TGS,



et MOM1 ne constitue pas un substrat de sumoylation (Han et al., 2016). MOM1 et PIAL1/2 interviendraient sous forme de complexe pour maintenir le silencing par un mécanisme encore inconnu (Han et al., 2016). Une étude réalisée dans l'équipe montre que la réactivation transcriptionnelle dans le mutant *mom1* dépend en grande partie de MED14, la principale sous-unité du complexe MEDIATOR requis pour l'initiation de la transcription (Bourguet et al., 2018).

### 3. La voie MICRORCHIDIA

Les protéines MICRORCHIDIA (MORC) sont des ATPases et sont au nombre de sept chez *Arabidopsis*, MORC1 à MORC7. Le rôle des gènes *MORC1* et *MORC6* dans le TGS a été mis en évidence par un crible génétique pour la réactivation d'un transgène codant la GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) et contrôlé par le promoteur du gène *SUPPRESSOR OF DRM2 CMT3 (SDC)*. Ce promoteur comporte sept répétitions en tandem qui sont ciblées par CMT3 et la voie RdDM. Cette étude a montré que MORC1 et MORC6 interviennent dans une même voie pour assurer le silencing d'un ensemble de loci principalement hétérochromatiques. Cette voie agirait indépendamment de la méthylation ADN, H3K9me2 et de l'accumulation des siRNAs (Moissiard et al., 2012). La voie MORC intervient en parallèle de la voie MOM1 pour maintenir le TGS d'un ensemble de loci communs aux deux voies (Moissiard et al., 2014).

D'autres cribles pour la réactivation de transgènes ont également permis d'isoler des allèles mutants *morc6*. Cependant, ces études ont mis en évidence une perte de méthylation CHH à un ensemble de loci cibles de la RdDM suggérant un rôle de MORC6 dans cette voie (Brabbs et al., 2013; Lorković et al., 2012). D'autre part, une interaction a été montrée entre MORC6 et DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (DMS3), un facteur de la RdDM favorisant la transcription par Pol V (Lorković et al., 2012; Matzke and Mosher, 2014). MORC1 et MORC6 interagissent également avec SUVH2 et SUVH9, deux autres acteurs de la RdDM (Jing et al., 2016).

Une autre étude de 2016 s'est intéressée aux autres membres de la famille MORC afin d'essayer de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans le TGS. Ces travaux ont montré que les protéines MORC4 et MORC7 assurent le silencing de manière partiellement redondante à un ensemble de loci, principalement des PCGs, avec MORC7 ayant un rôle plus important (Harris et al., 2016). Les protéines MORC1 et MORC2 sont également fonctionnellement redondantes (Moissiard et al., 2014). La perte totale des protéines MORC n'entraîne pas de



changement significatif des niveaux de méthylation à l'échelle génomique. Cependant, parmi les cibles réactivées on retrouve des cibles de la RdDM qui présentent une perte de méthylation CHH comme observé dans les études précédentes (Brabbs et al., 2013; Harris et al., 2016; Lorković et al., 2012).

Même si d'autres études sont nécessaires pour trancher quant à l'implication des protéines MORC dans la voie RdDM, il est probable que ces protéines maintiennent le TGS d'au moins certains loci indépendamment de la méthylation ADN. Des analyses cytologiques ont montré que les mutants *morc1* et *morc6* présentent une décompaction de l'hétérochromatine (Jing et al., 2016; Moissiard et al., 2012), suggérant que le rôle de MORC1/6 dans le TGS pourrait dépendre de leur implication dans l'organisation et l'accessibilité de la chromatine.

#### 4. La voie MAIN/MAIL

Une troisième voie de TGS, découverte au laboratoire et largement indépendante des voies MOM1 et MORC, implique les protéines MAINTENANCE OF MERISTEMS (MAIN) et MAINTENANCE OF MERISTEMS-LIKE 1 (MAIL1) (Ikeda et al., 2017). MAIL1 a été initialement décrit pour son rôle dans la division et la différenciation cellulaire au niveau du méristème racinaire et son absence provoque de fortes altérations développementales comprenant une stature réduite, un arrêt précoce du développement de la racine primaire, un retard de développement et un défaut de fertilité (Ühlken et al., 2014). Les protéines MAIN et MAIL1 contiennent un domaine PMD (*Plant Mobile Domain*) de fonction encore inconnue et probablement dérivé d'un rétrotransposon. Elles font partie d'une petite famille protéique comprenant également MAIL2, qui est très similaire à MAIL1 et MAIN, et MAIL3, qui comporte un domaine phosphatase supplémentaire. *MAIN* et *MAIL1* interviennent dans la même voie génétique et les protéines MAIN et MAIL1 interagissent physiquement (Ikeda et al., 2017; de Luxán-Hernández et al., 2019; Nicolau et al., 2020). Si le rôle de MAIL2 dans le silencing fait l'objet d'investigation, il semble que MAIL3 ne joue pas de rôle majeur dans le TGS (Ikeda et al., 2017; résultats non publiés).

*MAIN* et *MAIL1* sont requis pour le silencing d'un ensemble de PCGs et d'ETs, avec, en ce qui concerne les transposons, une préférence pour ceux localisés dans l'hétérochromatine péricentromérique. Cette voie de silencing est largement indépendante de la méthylation ADN et de l'accumulation de siRNAs (Ikeda et al., 2017; Nicolau et al., 2020). *MAIN/MAIL1* interagissent également avec PROTEIN PHOSPHATASE 7 LIKE (PP7L), une protéine appartenant à la famille des phosphatases de type PP7 spécifique des plantes (de Luxán-





Hernández et al., 2019; Nicolau et al., 2020). La formation du complexe MAIL1-MAIN-PP7L ne semble toutefois pas nécessaire au TGS de certains loci où MAIL1 et PP7L agissent de manière redondante (de Luxán-Hernández et al., 2019; Nicolau et al., 2020).

Des analyses cytologiques et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP ; *Chromatin Immunoprecipitation*) suggèrent que l'altération de la voie MAIN/MAIL1 n'affecte pas la distribution et les niveaux de H3K9me2, et que la baisse de H3K27me1 observée dans le mutant *mail1* n'est pas à l'origine de la perte de TGS (Ikeda et al., 2017). L'hétérochromatine péricentromérique apparaît légèrement décondensée dans les noyaux des mutants *main*, *mail1* et *pp7l*, suggérant que *MAIN/MAIL1/PP7L* pourraient influencer sur le silencing en assurant la condensation de la chromatine (Ikeda et al., 2017; de Luxán-Hernández et al., 2019).

## 5. La voie de TGS associée à la réplication/réparation de l'ADN

Un ensemble d'autres facteurs nécessaire au TGS indépendamment de la méthylation ADN a été identifié dans différents cribles génétiques. Parmi ces acteurs, on retrouve la Polymérase  $\alpha$  (Pol $\alpha$ ) responsable de l'initiation de la réplication de l'ADN (Liu et al., 2010a), les Polymérases  $\epsilon$  (Pol $\epsilon$ ) et  $\delta$  (Pol $\delta$ ) responsables respectivement de l'élongation des brins direct et indirect lors de la réplication (Iglesias et al., 2015; Yin et al., 2009; Zhang et al., 2016a), la protéine de liaison à l'ADN simple brin REPLICATION PROTEIN A2 (RPA2) qui joue un rôle majeur dans la réplication de l'ADN (Elmayan et al., 2005; Kapoor et al., 2005; Xia et al., 2006), REPLICATION FACTOR C1 (RFC1) impliqué dans le recrutement de PCNA (Liu et al., 2010b) et la 5' endonucléase FLAP ENDONUCLEASE 1 (FEN1) (Zhang et al., 2016b). Nous pouvons également citer le complexe CAF-1 comme facteur du TGS non requis pour le maintien de la méthylation ADN, ainsi que TOUSLED (TSL) qui participerait à la formation du complexe CAF-1 (Ono et al., 2006; Ramirez-Parra and Gutierrez, 2007; Schönrock et al., 2006; Wang et al., 2007). Le gène *BRUSHY 1* (*BRUI*), qui code une protéine nucléaire dont la fonction n'est pas encore clairement établie mais qui semble être liée à la réparation de l'ADN, joue également un rôle dans le TGS de certains loci (Takeda et al., 2003). Le mutant *bru1* partage un certain nombre de phénotypes avec les mutants des sous-unités de CAF-1, *fas1* et *fas2* (Takeda et al., 2003). Enfin, plus récemment, le facteur de la condensine STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 4 (SMC4), essentiel pour la condensation des chromosomes nouvellement répliqués, a été impliqué dans le TGS d'ETs et de PCGs en parallèle de la méthylation ADN et des siRNAs (Wang et al., 2017).



Les mutants *polα*, *polε*, *polδ*, *rpa2*, *rfc1*, *fen1* et *tsl* ont été identifiés grâce à un crible réalisé sur des populations mutantes portant un transgène codant la luciférase sous contrôle du promoteur RD29A (*RD29A-LUC*), et un gène de résistance à la kanamycine sous contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (*35S-NPTII*). *RD29A-LUC* et *35S-NPTII* sont tous les deux soumis au TGS, mais leur silencing implique des voies moléculaires différentes. En effet, *RD29A-LUC* est ciblé par la voie RdDM et permet donc d'identifier des acteurs de cette voie, tandis que le silencing de *35S-NPTII* ne dépend pas de la RdDM. Les mutants cités précédemment présentent une réactivation de *35S-NPTII* mais n'affectent pas le silencing de *RD29A-LUC*, suggérant que ces facteurs contrôlent le silencing de loci non ciblés par la RdDM. En plus de *35S-NPTII*, des défauts de silencing ont également été observés au niveau de loci endogènes, notamment *TSI*, où ils se produisent également sans diminution de la méthylation ADN (Kapoor et al., 2005; Liu et al., 2010b; Wang et al., 2007; Xia et al., 2006; Yin et al., 2009; Zhang et al., 2016b, 2016a).

En plus des défauts de silencing, la plupart de ces mutants présentent des défauts liés aux fonctions de réplication et réparation de l'ADN tels qu'une hypersensibilité au méthanesulfonate de méthyle (MMS), un agent chimique provoquant des cassures d'ADN double brins (DSB ; *Double Strand Break*). Cette hypersensibilité ne semble pas provenir d'un dysfonctionnement des voies de réparation mais plutôt d'une surcharge de ces dernières suggérant qu'il y a une accumulation importante de dommages ADN dans ces mutants. Cette hypothèse est cohérente avec l'activation constitutive des voies de réparation comme en témoigne la surexpression de gènes marqueurs tels que *RAD51*, *PARP2* et *BRCAL*, associée à un niveau élevé de cassures (Elmayan et al., 2005; Iglesias et al., 2015; Kapoor et al., 2005; Liu et al., 2010a, 2010b; Ramirez-Parra and Gutierrez, 2007; Schönrock et al., 2006; Takeda et al., 2003; Varas et al., 2017; Wang et al., 2007; Xia et al., 2006; Yin et al., 2009; Zhang et al., 2016b, 2016a). Le traitement au MMS permet également de lever le silencing de *35S-NPTII* suggérant que les DSBs entraînent la réactivation transcriptionnelle de ce locus. L'accumulation de dommages ADN pourrait donc être à l'origine de la perte de TGS de certains loci observée dans ces mutants (Liu et al., 2010b).

La plupart de ces facteurs ont été identifiés comme acteurs de la réplication et un lien avec la fourche de réplication a été établi. Au passage de la fourche de réplication, les nucléosomes sont dissociés pour permettre la synthèse des nouveaux brins d'ADN, puis rassemblés pour reformer la chromatine. Afin de maintenir l'état transcriptionnel des gènes sous-jacents, l'environnement chromatinien doit également être reproduit à l'identique lors de la réplication. Pour la méthylation de l'ADN, la transmission à l'ADN fille est assurée par



MET1 et probablement CMT3 qui, grâce à des interactions spécifiques décrites précédemment, ciblent les régions en cours de réplication (Du et al., 2012; Law and Jacobsen, 2010). Concernant les MPT des histones, il semble que la transmission de l'information épigénétique se fasse grâce au recyclage et intégration aux molécules filles des histones parentales, servant de modèle pour copier l'information aux histones nouvellement intégrées (Sarkies and Sale, 2012). Il a été montré que des modificateurs d'histones interagissent avec des facteurs du réplisome permettant la transmission de marques épigénétiques. C'est le cas de ATXR5/6 qui interagit avec PCNA, ou encore du complexe PRC2 qui interagit avec POL $\epsilon$  et POL $\alpha$  (Barrero et al., 2007; Jiang and Berger, 2017; Del Olmo et al., 2016; Raynaud et al., 2006). Dans les mutants *pola*, *pol $\delta$* , *pol $\epsilon$*  et *fen1*, des gènes cibles du complexe PRC2, tels que *FLC*, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SEPALLATA 3 (SEP3)* impliqués dans le contrôle de la floraison, montrent une baisse du niveau de H3K27me3. BRU1 réprime également un ensemble de gènes ciblés par PRC2 (Ohno et al., 2011). L'altération de la fonction de ces facteurs pourrait induire un défaut de recrutement du complexe PRC2 lors des processus de synthèse et de réparation de l'ADN. La marque H3K27me3 serait alors diluée au cours des divisions cellulaires et les cibles PRC2 réactivées (Hyun et al., 2013; Ohno et al., 2011; Del Olmo et al., 2016; Yin et al., 2009; Zhang et al., 2016b, 2016a). Pour le silencing des PCGs, un lien a été montré avec PRC2 et H3K27me3 mais pour les ETs et autres éléments répétés, le mécanisme reste mal compris. Une hypothèse intéressante serait que la désorganisation de l'hétérochromatine participerait à la perte de silencing de ces séquences, comme cela a été proposé pour la voie MAIN/MAIL et MORC (Ikeda et al., 2017; Moissiard et al., 2012). Les mutants *bru1* et *fas2*, présentent un défaut de condensation de l'hétérochromatine mais le lien avec la perte de TGS n'a pas été formellement établi (Schönrock et al., 2006; Takeda et al., 2003).

Il existe donc plusieurs facteurs impliqués dans la réplication et/ou la réparation de l'ADN qui jouent également un rôle dans le TGS. Le lien entre ces processus reste encore à déterminer et l'existence de voies propres ou communes aux différents facteurs est une question encore ouverte.

Les eucaryotes ont mis en place un système complet et complexe pour assurer son bon développement. Les voies de TGS connues à ce jour sont multiples et parfois redondantes, et permettent probablement de compenser une éventuelle perte de silencing et éviter ainsi la réactivation d'ETs. Même si la réponse première à l'invasion d'un génome par un ET est certainement le TGS, les eucaryotes ont su s'adapter à ces éléments et les « apprivoiser » pour



en faire des éléments de régulation, comme nous avons pu le voir par exemple pour la régulation de l'expression du gène *ROSI* ou l'apparition évolutive des gènes *MAIL1/MAIN*.

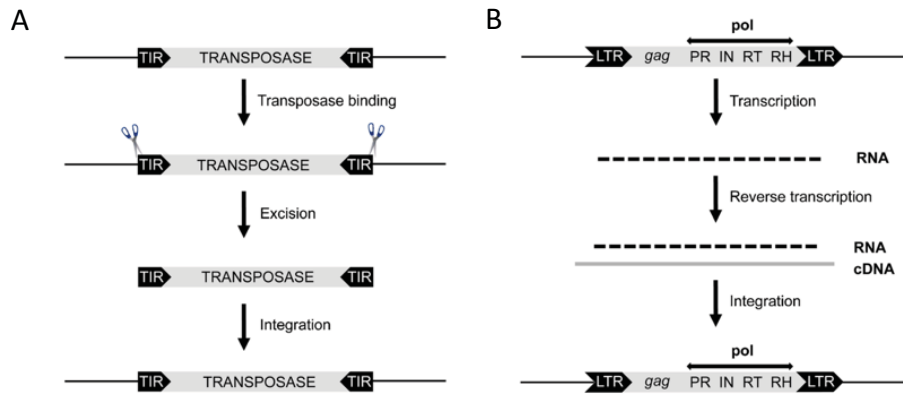
## V. Les éléments transposables

---

Les éléments transposables sont, comme nous avons pu le constater précédemment, des cibles majeures des voies de silencing épigénétiques. Ils sont présents, en proportions variables, chez tous les eucaryotes et sont capables de se déplacer et de se multiplier dans le génome de l'organisme hôte. Ils représentent environ 20% du génome d'*Arabidopsis*, 40% du génome humain et près de 75% du génome du maïs (Underwood et al., 2017). Au cours de l'évolution, l'incorporation et la multiplication des ETs au sein des génomes se sont fait indépendamment, ce qui a généré une grande variabilité de la taille des génomes, indépendamment du nombre de gènes (Joly-Lopez and Bureau, 2014). De par leur mode de propagation, les ETs peuvent être considérés comme des éléments parasites et « égoïstes » ayant des effets potentiellement délétères sur l'organisme hôte, notamment en générant des mutations dans les régions codantes ou des cassures chromosomiques (McClintock, 1950; Mirouze et al., 2009). Cependant, les ETs jouent également un rôle majeur dans l'évolution des espèces. En effet, de nombreux cas (avérés ou suspectés) de domestication d'éléments transposables ont été rapportés (Chuong et al., 2017) et leur mobilisation pourrait jouer un rôle majeur dans la création de variabilité génétique nécessaire à l'évolution. Grâce à l'exploitation de propriétés particulières de certains ETs les hôtes ont pu développer, au cours de l'évolution, de nouveaux mécanismes de régulation de l'expression des gènes (Ikeda et al., 2017; Williams et al., 2015; Zervudacki et al., 2018).

Les ETs peuvent être classés dans deux grandes classes, les rétrotransposons et les transposons ADN (Figure 12). Les ETs de classe I, ou rétrotransposons, suivent un modèle de « copier – coller » qui repose sur la production d'un ARN intermédiaire qui sera ensuite rétrotranscrit et intégré dans une nouvelle région du génome. Dans cette classe on distingue deux groupes, les rétrotransposons à LTR (*Long Terminal Repeat*) et les rétrotransposons non-LTR. Les rétrotransposons à LTR ont une structure qui ressemble à celle d'un virus. Ils comportent les gènes *GAG*, qui code la protéine de la capsid, et *POL*, qui code une polyprotéine possédant des domaines protéase, intégrase, reverse transcriptase et ribonucléase H. Les ETs de classe II, quant à eux, transposent selon un modèle de « couper – coller » grâce à une transposase qui permet le clivage de l'élément au niveau de motifs spécifiques dans les régions TIR (*Terminal*





**Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes de transposition des deux classes d'éléments transposables**

**A.** Les transposons à ADN codent pour une transposase qui reconnaît et clive l'élément au niveau d'un motif spécifique des TIR (*Terminal Inverted Repeats*). Après excision l'élément est réintégré dans une autre région génomique.

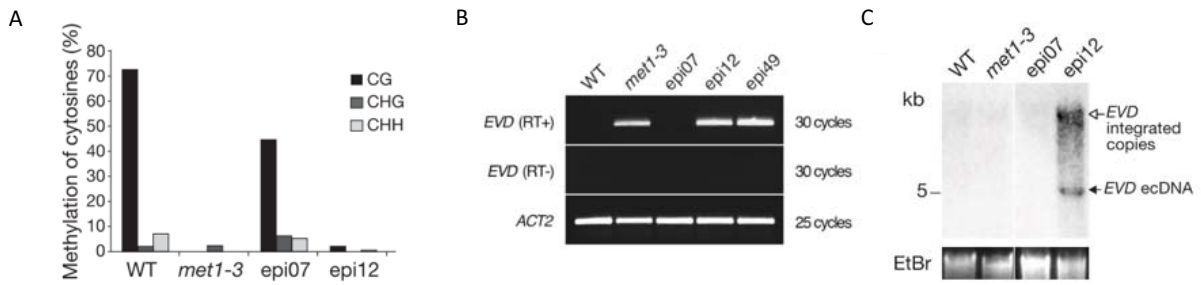
**B.** Les rétrotransposons sont constitués de LTR (*Long Terminal Repeats*) et des gènes *gag* et *pol*. Ce dernier code pour une polyprotéine comportant les domaines protéase (PR), intégrase (IN), reverse transcriptase (RT) et ribonucléase H (RH). L'ET est d'abord transcrit pour obtenir un intermédiaire ARN qui sera ensuite rétrotranscrit pour obtenir un ADN complémentaire qui pourra être intégré dans un nouveau locus du génome. L'ARN intermédiaire est protégé de la dégradation grâce à la protéine GAG qui forme une enveloppe de protection.

Adapté de Joly-Lopez *et al.* (2014).

*Inverted Repeats*) et sa réinsertion à un nouveau locus. D'autre part, il existe des ETs autonomes qui possèdent les séquences nécessaires à leur transposition et des ETs non autonomes qui détournent la machinerie de transposition d'autres éléments (Joly-Lopez and Bureau, 2014).

Chez *Arabidopsis*, ce sont les rétrotransposons à LTR, et plus particulièrement les familles Gypsy et Copia qui sont les plus abondantes. Tandis que les éléments Copia sont évolutivement jeunes et autonomes, les éléments Gypsy sont plus anciens et dégénérés, perdant, par conséquence, de leur autonomie. Ces deux familles présentent une distribution génomique spécifique avec les éléments Gypsy enrichis dans les régions proche des centromères et les éléments Copia qui s'accumulent plutôt dans les régions péri-centromériques (Underwood et al., 2017). Toutefois, il existe des exceptions, telle que l'élément *Evadé* (*EVD* ; *AT5G17125*), qui se trouve sur un bras chromosomique (Mirouze et al., 2009; Tsukahara et al., 2009). Cet élément, qui appartient à la famille ATCOPIA93, est présent en seulement deux copies dans le génome d'*Arabidopsis*, *EVD* et une copie hétérochromatique appelée *Attrapé* (*ATR* ; *AT1G34967*) dont la séquence ressemble à 99,5% à celle d'*EVD* mais qui ne semble pas être contrôlée par les mêmes mécanismes (Marí-Ordóñez et al., 2013; Mirouze et al., 2009). *EVD* est l'un des quelques rétroéléments réactivés et mobilisés dans des plantes mutantes pour *MET1* ou *DDMI* (Mirouze et al., 2009; Tsukahara et al., 2009). *EVD* est en effet contrôlé majoritairement par la méthylation CG (Figure 13A). De la méthylation CHH est également détectable dans la région 5' LTR mais à très faible niveau et son absence n'induit pas de réactivation d'*EVD*. Cependant, l'absence de CHH couplée à la perte de CG provoque un effet synergique suggérant que la CHH permet de compenser la perte de CG (Mirouze et al., 2009; Rigal and Mathieu, 2011).

Ce rétroélément a été identifié dans une population de recombinant épigénétique (epiRIL ; *epigenetic Recombinant Inbred Lines*). Pour obtenir cette population, une plante sauvage Col-0 a été croisée à une plante homozygote *met1-3*. La recombinaison des épi-allèles sauvages et *met1-3* au cours de la méiose en F1 a permis d'obtenir une population F2 ségrégeante présentant divers profils épigénétiques. Afin de stabiliser la propagation trans-générationnelle des polymorphismes de méthylation ADN, seules les plantes F2 sauvages pour *MET1* ont été suivies sur les générations suivantes (Reinders et al., 2009). Quelques rares individus de cette population d'epiRILs présentent des phénotypes développementaux étonnants (Mirouze et al., 2009; Reinders et al., 2009). L'insertion de l'élément *EVD* dans les séquences codantes de gènes a été identifiée comme étant la cause de certains de ces phénotypes témoignant de l'activation et de la transposition de cet ET (Mirouze et al., 2009). L'analyse des niveaux de méthylation montre que ces epiRILs ont hérité majoritairement des épi-allèles



**Figure 13 : *EVD* est réactivé et transpose dans certaines populations de recombinants épigénétique.**

**A.** Pourcentage de méthylation ADN CG, CHG et CHH dans les populations indiquées. Epi07 et epi12 sont deux populations de recombinants épigénétique.

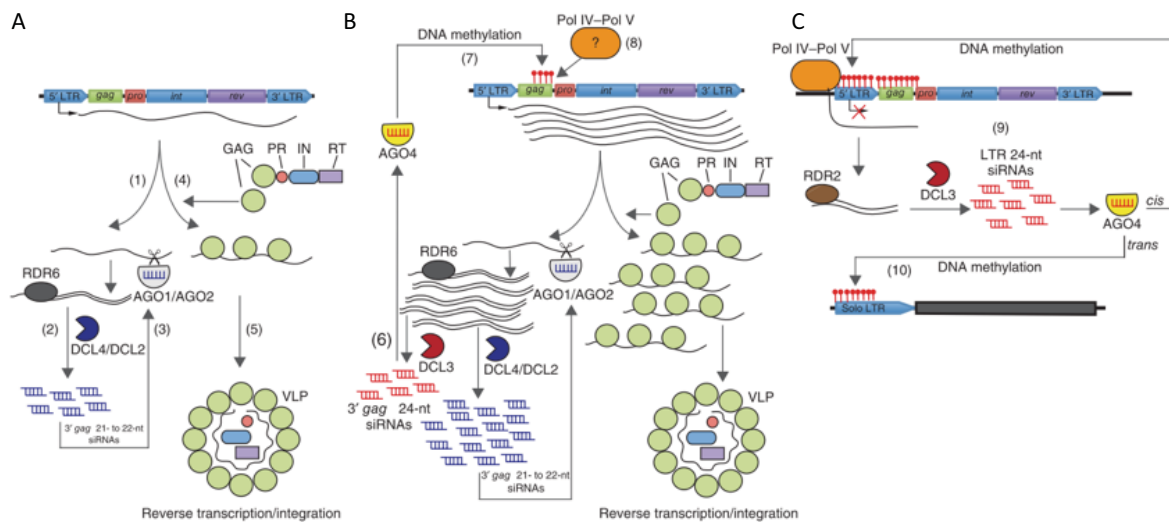
**B.** Analyse des transcrits *EVD* par RT-PCR semi-quantitative dans les tissus floraux des différentes populations. *ACTIN2* (*ACT2*) est utilisé comme contrôle de charge. RT- correspond au contrôle négatif sans reverse transcriptase.

**C.** Analyse par *Southern blot* avec une sonde dirigée contre *EVD*. *EVD* ecDNA correspond aux copies extra-chromosomales d'*EVD*. Le gel marqué au bromure d'éthidium (EtBr) est un témoin de charge.

Adapté de Mirouze *et al.* (2009).

provenant du parent sauvage et les épi-allèles issus du parent *met1* sont moins nombreux (Reinders et al., 2009). De manière surprenante, d'autres épi-allèles ne correspondant à aucun des parents ont été détectés. Ces épi-allèles sont de type intermédiaire, avec des niveaux compris entre les niveaux parentaux, ou transgressif lorsque les niveaux sont significativement supérieurs ou inférieurs aux niveaux parentaux (Reinders et al., 2009). Ces épi-allèles transgressifs apparaissent dès la génération F1 hybride et sont le résultat de la combinaison de deux génomes identiques avec des profils de méthylation ADN drastiquement différents (Rigal et al., 2016). Ce phénomène est appelé choc épigénomique et l'apparition de ces épi-allèles non parentaux apporte à ces lignées un transcriptome unique caractérisé notamment par la réactivation et la mobilisation d'*EVD* (Figure 13B, 13C) (Mirouze et al., 2009; Rigal et al., 2016). Cette caractéristique particulière des epiRILs en font des modèles intéressants pour étudier la prolifération, détection et silencing *de novo* d'ETs à travers les générations en s'affranchissant des contraintes liées aux défauts développementaux des mutants *met1* (Marí-Ordóñez et al., 2013).

La production des protéines nécessaire à la transposition des Copia dépend de l'épissage alternatif de l'intron présent entre les gènes *GAG* et *POL* (Oberlin et al., 2017) (Figure 14). L'épissage de cet intron génère un codon stop alternatif qui permet la production d'un petit ARN messenger (ARNm) appelé *shGAG* puis la formation en excès de la protéine GAG qui protégera l'ARN pendant la transposition. Lorsque l'intron est conservé, un long ARNm *GAG-POL* est produit pour apporter les composés catalytiques nécessaires à la transposition du rétroélément. Ce mécanisme est le seul connu chez *Arabidopsis* et a été adopté par la majorité des éléments Copia, y compris *EVD*. Cependant, un autre phénomène apparaît au cours de ce processus et ne semble concerner que ce dernier (Oberlin et al., 2017). Il s'agit d'une activation de la réponse de défense de l'hôte et de la machinerie de silencing. Le transcrit *shGAG* généré par la polymérase II (POL II) stimule la production de petits ARNs de 21 à 22 nucléotides qui permet le PTGS d'*EVD*. La synthèse de ces siRNAs commence par la transformation du transcrit *shGAG* en ARN double brins par l'ARN polymérase RDR6. Ces ARNs sont ensuite clivés par DCL2 et DCL4 pour produire des siRNAs de 22 et 21 nucléotides respectivement et pris en charge par les protéines AGO1 et AGO2 pour dégrader les transcrits *EVD*. Les transcrits *EVD* étant protégés par la nucléocapside, ce mécanisme n'est pas suffisant pour empêcher la propagation de l'ET. Ce n'est qu'une fois ce premier mécanisme de PTGS saturé par un grand nombre de copies d'*EVD*, environ quarante, qu'un mécanisme de TGS efficace est mis en place. Le relais PTGS-TGS est précédé par la méthylation *de novo* de la région 3' *GAG* grâce à des siRNAs 24-nt produits par DCL3 à partir du précurseur généré par RDR6. Cette méthylation se



**Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme de resiliencing d'EVD**

**A.** Dans les premiers stades de réactivation d'EVD, un faible nombre de copie permet la production de transcrits *GAG-POL* et *shGAG* pour obtenir les composés catalytiques et les protéines capsidique et former la VLP (*Virus-Like Particle*) (4) (5). En parallèle, les transcrits *shGAG* sont détournés pour synthétiser des ARNs double brin grâce à RDR6 (1). Ces ARN sont traités par DCL4/DCL2 pour générer des siARNs de 21- 22-nt dirigés contre la région 3' *gag* (2) qui sont ensuite chargés sur AGO1/AGO2 (3) et dégrade partiellement les transcrits *EVD*.

**B.** Lorsque le nombre de copies d'EVD atteint un seuil d'environ 40 copies, DCL4/DCL2 saturent et DCL3 intervient et produit des siARNs 24-nt 3' *gag* chargés sur AGO4 qui permettront la méthylation ADN de cette région (6) (7) (8).

**C.** Après resiliencing, le TGS d'EVD est activement maintenu au 5' LTR par la voie RdDM en *cis* ou en *trans* (9) (10).

propage alors vers l'extrémité 5' pour ensuite permettre un TGS rapide et performant médié par une méthylation ADN *de novo* de la région 5' LTR de toutes les copies d'*EVD* (Figure 14) (Marí-Ordóñez et al., 2013).

En plus du silencing *de novo*, il est important de comprendre comment ce TGS est maintenu. Plusieurs mécanismes semblent être impliqués, dont la méthylation ADN, mais ils ne sont pas encore totalement connus. Une étude récente montre que *EVD* est localisé dans un cluster de gènes à régulation développementale médiée par H3K27me3 et que l'élément lui-même serait marqué par H3K27me3 en plus de la méthylation ADN et de H3K9me2 dans les plantes sauvages, apportant une couche supplémentaire de silencing (Zervudacki et al., 2018). La perte simultanée de la méthylation ADN et de H3K27me3 provoque une réactivation et une mobilisation d'*EVD* (Rougée et al., 2020; Zervudacki et al., 2018). *EVD* est le premier ET identifié présentant ce double marquage. En effet, les autres études montrent que le marquage des ETs par H3K27me3 a lieu suite à la perte de la méthylation ADN (Deleris et al., 2012; Mathieu et al., 2005). Une autre particularité d'*EVD* est sa capacité à détourner la machinerie transcriptionnelle de la cellule lors d'un stress biotique pour sa mobilisation en absence de méthylation ADN (Zervudacki et al., 2018). Cette particularité a été détournée par *Arabidopsis* pour permettre l'expression de *RPP4*, un gène de réponse aux maladies, en réponse à un stress biotique. En effet, une séquence de la forme soloLTR, résultant de la recombinaison entre les régions LTR d'*EVD*, s'est insérée dans la région promotrice de ce gène (Zervudacki et al., 2018).

L'étude de l'allèle nulle *met1-3* a montré une réactivation et une mobilisation d'*EVD* dans tous les tissus de la plante (Mirouze et al., 2009). Selon une autre étude, la réactivation d'*EVD* nécessite un signal moléculaire associé aux pathogènes en fond mutant *met1-3* (Zervudacki et al., 2018). On observe donc, pour un même mutant, des comportements différents de l'élément *EVD*. Dans le laboratoire, une différence de comportement a même été observée entre des individus homozygotes *met1-3* descendants d'un même parent hétérozygote *MET1/met1-3*. Moins d'un dixième de ces plantes présente une réactivation ubiquiste et une mobilisation de l'élément. Au contraire, pour la majorité, les transcrits *EVD* sont détectables uniquement dans les tissus apparaissant après la transition au stade reproductif. De plus, l'élément ne transpose pas dans ces plantes. Les premières analyses faites dans le laboratoire d'un autre allèle mutant, *met1-7* montre que la réactivation d'*EVD* est restreinte aux tissus adultes et que la perte de méthylation CG ne permet pas sa transposition.



## VI. Objectifs de la thèse

---

Le développement des techniques de séquençage nouvelle génération et des approches génomique a permis, ces dernières années, d'élargir notre connaissance du contrôle de la transcription et notamment de la répression des ETs et autres séquences répétées. Un grand nombre de marques épigénétiques ainsi que des facteurs impliqués dans cette répression ont été identifiés et ont permis de décrire plusieurs voies de silencing. Les voies de TGS indépendantes de la méthylation ADN sont moins bien comprises que celles faisant intervenir cette marque épigénétique. Pour tenter de mieux les comprendre, nous avons utilisé une approche de génétique directe pour identifier spécifiquement des acteurs de ces voies. Nous avons utilisé la lignée 6b5/L5 d'*Arabidopsis* (écotype Columbia ; Col-0) qui a été utilisée dans d'autres études pour l'identification d'acteurs moléculaires de voies de silencing (Bourguet et al., 2018; Elmayer et al., 2005; Ikeda et al., 2017; Morel et al., 2000). Cette lignée comporte un locus fortement méthylé sur le chromosome 3, contenant environ six copies d'un ADN de transfert contenant un gène de résistance à la kanamycine sous contrôle du promoteur NOS, et un gène rapporteur *GUS* contrôlé par un promoteur 35S bipartite (Elmayer et al., 2005). Une population mutante de la lignée L5, générée par traitement à l'EMS, a été criblée par Marie-Noëlle Pélissier (IR dans l'équipe) et moi. Nous avons isolé 39 candidats mutants qui suppriment le TGS du transgène *GUS* sans induire de baisse du niveau de méthylation ADN. Je me suis intéressée à l'un de ces mutants en particulier, et j'ai mis en évidence un nouveau rôle de *RTEL1* dans le TGS. J'ai également contribué à la caractérisation du mutant *pol2a-12*, précédemment isolé lors du crible de cette même population mutante L5.

D'autres part, je me suis intéressée au silencing du rétrotransposon *EVD*. L'ensemble des données collectées sur *EVD* ainsi que les observations faites dans l'équipe suggèrent l'existence de plusieurs mécanismes permettant de contrôler la transcription et la transposition d'*EVD*. D'autre part, ces mécanismes semblent dépendre du type tissulaire et/ou du stade développemental, aspect qui n'a pas été abordé jusqu'à présent. L'objectif de ce projet sera donc de poursuivre la dissection des différentes couches de silencing et de déterminer la cause des différences de profils de réactivation de l'élément *EVD* dans les individus d'une même population.





# Résultats

---



## L'ADN polymérase $\epsilon$ est requise pour le maintien de l'hétérochromatine chez *Arabidopsis thaliana* (article)

---

### 1. Contexte

Afin de mieux comprendre les mécanismes de silencing transcriptionnel chez *Arabidopsis*, l'équipe a cherché à identifier de nouveaux acteurs de ces mécanismes par une approche de génétique directe. Le transgène de la lignée L5 (présentée précédemment) est réactivé par les mutations de facteurs de TGS et également en réponse à un stress thermique (37°C) (Elmayan et al., 2005; Tittel-Elmer et al., 2010). Le crible de la population mutante L5 a permis d'identifier des mutants candidats baptisés *anxious* (*anx*) présentant une réactivation du transgène GUS après stress thermique amplifiée par rapport à celle survenant dans la lignée parentale L5. L'un de ces mutants, *anxious2* (*anx2*), présente également un défaut de silencing en condition normale de croissance, affectant le transgène 35S-GUS et un ensemble de loci euchromatiques et hétérochromatiques. Le mutant *anx2* porte une mutation sur le gène codant la sous-unité catalytique POL2A de la polymérase  $\epsilon$ , nous l'avons donc renommé *pol2a-12*. Les résultats obtenus au cours de l'étude de cet allèle hypomorphe ont fait l'objet d'un article publié en 2020.

### 2. Principaux résultats

Grâce à des approches génomiques nous montrons que POL2A joue un rôle important dans le maintien du silencing de PCGs et d'ETs. Ces derniers se localisent principalement dans l'hétérochromatine péricentromérique mais leur silencing se fait indépendamment de la marque H3K27me1 médiée par ATXR5 et ATXR6. De manière contre-intuitive, le niveau de méthylation moyen du génome en contexte CHG dans le mutant *pol2a-12* est significativement augmenté. Cette hyperméthylation affecte les ETs péricentromériques ainsi que les ETs des bras chromosomiques et s'accompagne d'une augmentation des niveaux de H3K9me2. La méthylation CG n'est, quant à elle, pas affectée par la perte de POL2A. Nous montrons donc que la voie de silencing médiée par POL2A est indépendante de la méthylation ADN mais que POL2A joue également un rôle d'inhibiteur de la méthylation non-CG et de la méthylation H3K9. D'autres mutants connus pour affecter la réplication et la réponse aux dommages à



l'ADN présentent également une perte de silencing et une hyperméthylation CHG. C'est le cas, entre autres, de *rpa2a*, *pold1* et *fas2*. Des plantes sauvages traitées à l'hydroxyurée (HU), un agent chimique provoquant un stress réplcatif en réduisant le pool de dNTPs, présentent ces mêmes phénotypes. Un stress réplcatif constitutif serait donc à l'origine d'une partie des défauts de silencing et de l'hyperméthylation non-CG observés dans les mutants *pol2a*. Une perturbation du silencing médié par H3K27me3 est également impliquée dans les défauts de silencing de ce mutant. Nous montrons, d'autre part, que POL2A est impliqué dans l'organisation de l'hétérochromatine comme le suggère la fragmentation des chromocentres observée dans le mutant.

### 3. Discussion

L'ensemble des résultats obtenu au cours de ce projet montre que les mutants de réplication ainsi que les plantes sauvages traitées au HU présentent un défaut de silencing et une hyperméthylation CHG. D'autre part, nous n'avons pas détecté d'aggravation de ces phénotypes dans le mutant *pol2a* traité au HU indiquant que le stress réplcatif contribue à la levée de silencing et à l'augmentation de la méthylation CHG. Dans le mutant *fas2-4*, le remplacement du variant H3.1 par H3.3 et/ou la perte de H1 est corrélé à une augmentation globale de la méthylation ADN et ce, dans les trois contextes (Mozgova et al., 2018; Stroud et al., 2013b). Les mutations dans le réplisome ainsi que le traitement HU n'induisent pas d'hyperméthylation CG suggérant que la perturbation de la distribution génomique de H3.1, H3.3 ou H1 n'est pas à l'origine de l'augmentation de la méthylation CHG. Des données suggèrent que le maintien de la méthylation CHG par CMT3 se fait au cours de la réplication (Du et al., 2012). De manière intéressante, le traitement au HU active un point de contrôle en phase S qui est constitutivement activé dans le mutant *pol2a* (García et al., 2017; Iyer and Rhind, 2017). L'activation d'un tel point de contrôle provoque un arrêt de la fourche de réplication jusqu'à ce que les voies adaptées restaurent les conditions favorables à la poursuite de la réplication. Nous proposons que cet arrêt du cycle cellulaire fournit une fenêtre d'action plus importante pour CMT3 et/ou SUVH4/5/6 résultant en une augmentation des niveaux de méthylation CHG et H3K9. Notre étude montre également un défaut d'organisation de l'hétérochromatine qui pourrait contribuer aux défauts de TGS comme cela pourrait être le cas pour d'autres mutants tels que *mail1* et *main* (Ikeda et al., 2017).



#### 4. Contributions

J'ai contribué à cette étude par la réalisation des colorations histochimiques, les RT-PCR et RT-qPCR des allèles mutants *pol2a-8*, *pol2a-10* et *pol2a-12*. J'ai participé aux analyses cytologiques par marquage au DAPI et hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*) qui ont permis de montrer la fragmentation des chromocentres. J'ai également contribué aux analyses moléculaires et cytologiques du mutant *pold1*. Enfin, le crible que j'ai réalisé a permis d'isoler deux nouveaux allèles mutants *pol2a-13* et *pol2a-14*.




RESEARCH

Open Access



# DNA polymerase epsilon is required for heterochromatin maintenance in *Arabidopsis*

Pierre Bourguet<sup>1</sup>, Leticia López-González<sup>1</sup>, Ángeles Gómez-Zambrano<sup>1,2</sup>, Thierry Pélissier<sup>1</sup>, Amy Hesketh<sup>1</sup>, Magdalena E. Potok<sup>3</sup>, Marie-Noëlle Pouch-Pélissier<sup>1</sup>, Magali Perez<sup>4</sup>, Olivier Da Ines<sup>1</sup>, David Latrasse<sup>4</sup>, Charles I. White<sup>1</sup>, Steven E. Jacobsen<sup>3,5</sup>, Moussa Benhamed<sup>4</sup> and Olivier Mathieu<sup>1\*</sup> 

\* Correspondence: [olivier.mathieu@uca.fr](mailto:olivier.mathieu@uca.fr)

<sup>1</sup>Institute of Genetics Reproduction and Development (iGReD), Université Clermont Auvergne, CNRS, Inserm, F-63000 Clermont-Ferrand, France  
Full list of author information is available at the end of the article

## Abstract

**Background:** Chromatin organizes DNA and regulates its transcriptional activity through epigenetic modifications. Heterochromatic regions of the genome are generally transcriptionally silent, while euchromatin is more prone to transcription. During DNA replication, both genetic information and chromatin modifications must be faithfully passed on to daughter strands. There is evidence that DNA polymerases play a role in transcriptional silencing, but the extent of their contribution and how it relates to heterochromatin maintenance is unclear.

**Results:** We isolate a strong hypomorphic *Arabidopsis thaliana* mutant of the POL2A catalytic subunit of DNA polymerase epsilon and show that POL2A is required to stabilize heterochromatin silencing genome-wide, likely by preventing replicative stress. We reveal that POL2A inhibits DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. Hence, the release of heterochromatin silencing in POL2A-deficient mutants paradoxically occurs in a chromatin context of increased levels of these two repressive epigenetic marks. At the nuclear level, the POL2A defect is associated with fragmentation of heterochromatin.

**Conclusion:** These results indicate that POL2A is critical to heterochromatin structure and function, and that unhindered replisome progression is required for the faithful propagation of DNA methylation throughout the cell cycle.

**Keywords:** DNA polymerase epsilon, Replication stress, DNA methylation, Heterochromatin, Silencing

## Background

In nearly all eukaryotes, DNA is wrapped around histone proteins to form nucleosomes that allow extensive compaction of the genome while allowing access for important processes such as DNA replication, DNA repair, and transcription. Each nucleosome consists of about 147 bp of DNA wrapped around two molecules of each of four histones H2A, H2B, H3, and H4. Two main states of chromatin organization



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

can be distinguished in cell nuclei: euchromatin, which contains most genes and is loosely compacted, and heterochromatin, which is enriched in repetitive DNA, gene-poor, and highly compacted. These two main chromatin states associate with distinct patterns of so-called epigenetic marks, namely DNA cytosine methylation and post-translational modification of histone proteins, which influence gene activity in a DNA sequence-independent manner.

In *Arabidopsis thaliana*, pericentromeric heterochromatin contains most of the transposable elements (TEs) of the genome and is associated with high levels of DNA methylation in the three cytosine sequence contexts CG, CHG, and CHH (where H is any base but G). The METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) DNA methyltransferase propagates methylation at CG sites upon de novo DNA synthesis during DNA replication, while CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) presumably ensures a similar function at CHG sites. CMT3 is recruited by histone H3 methylation at lysine 9 (H3K9me) deposited by the SU (VAR)3-9 HOMOLOG 4/KRYPTONITE (SUVH4/KYP), SUVH5 and SUVH6 histone methyltransferases, and CHG methylation is in turn needed to recruit SUVH4/5/6 [1]. Whether newly synthesized chromatin during DNA replication is firstly methylated at the DNA level by CMT3 or at the histone H3 level by SUVH4/5/6 is unknown. H3K9me also recruits CHROMOMETHYLASE 2 (CMT2), which is responsible for the maintenance of most genomic asymmetric CHH methylation, and also function partially redundantly with CMT3 to methylate CHG sites [2, 3]. It is currently unknown whether CMT2 activity is linked to DNA replication. The remaining fraction of genomic CHH methylation depends on the RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway involving 24-nt small interfering RNAs (siRNAs) and DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2), which is responsible for most of de novo DNA methylation. Besides dense DNA methylation, *Arabidopsis* heterochromatin is additionally enriched in mono-methylation of H3K27 (H3K27me1) deposited by ARABIDOPSIS TRITHORAX RELATED PROTEIN 5 and 6 (ATXR5 and ATXR6), which, like MET1, directly interact with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and therefore likely function during DNA replication [4, 5]. Finally, the histone H2A variant H2A.W specifically incorporates into *Arabidopsis* heterochromatin, independently of DNA and H3K9 methylation [6].

Analyses of *Arabidopsis* DNA and histone methyltransferases mutants have demonstrated that epigenetic patterns are instrumental to both heterochromatin organization and function. Among other biological functions, heterochromatin ensures transcriptional repression of TEs and defects in maintaining heterochromatin epigenetic marks lead to the release of TE silencing [7]. Mutants depleted in these marks also exhibit mis-organization of heterochromatin [8]. At the nuclear level, *Arabidopsis* heterochromatin typically organizes in structures called chromocenters, which appear smaller in *met1* mutant nuclei due to dispersion of pericentromeric sequences away from chromocenters [9]. Decreased H3K27me1 levels in *atxr5 atxr6* mutant nuclei result in extensive remodeling of chromocenters, which then form unique structures of hollow appearance in association with overreplication of heterochromatin [5, 10]. Current data are consistent with a model wherein TE silencing release in *atxr5 atxr6* may conflict with normal heterochromatin replication leading to the production of extra DNA in heterochromatin [11]. However, this effect is unique to H3K27me1 and loss of other heterochromatin silencing marks does not entail DNA overreplication [12].

Both genetic and epigenetic information must be faithfully transmitted to daughter cells during cell divisions. DNA replication involves a large number of proteins required for chromatin disruption, DNA biosynthesis, and chromatin reassembly. Mutations in several DNA replication-related genes have been reported to destabilize silencing of transgenes and selected endogenous loci in *Arabidopsis*. These mutations include mutations in the replication protein A2A (RPA2A), the DNA replication factor C1 (RFC1), the flap endonuclease 1 (FEN1), the topoisomerase VI subunit MIDGET, the FASCIATA1 (FAS1), and FAS2 components of the Chromatin assembly factor 1 (CAF-1), as well as mutations in subunits of the three replicative DNA polymerases (Pol), Pol alpha ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), and epsilon ( $\epsilon$ ) [13–21]. Interfering with DNA replication would be expected to lead to improper propagation of epigenetic patterns; however, evidence for components linking DNA replication with epigenetic inheritance is scarce. None of the corresponding mutants harbor reduced DNA methylation levels [13, 14, 16–20, 22], and although decreased levels of H3K9me2 at desilenced loci were reported in Pol  $\alpha$  mutants, the depletion in this mark was surprisingly not associated with detectable changes in DNA methylation [14]. Many of these mutants show a reduced level of H3K27me3 at upregulated genes [16, 17, 23–25], but this cannot explain the release of heterochromatic TE silencing since H3K27me3 is largely excluded from constitutive heterochromatin [26]. Similar to plants, mutations in replisome components provoke silencing defects in fission yeast [27–29]. Yet, replication hindrance has emerged as a mechanism of heterochromatin establishment in yeast and human [30, 31]. Therefore, how replisome mutations interfere with the maintenance of epigenetic marks and TE silencing is unclear.

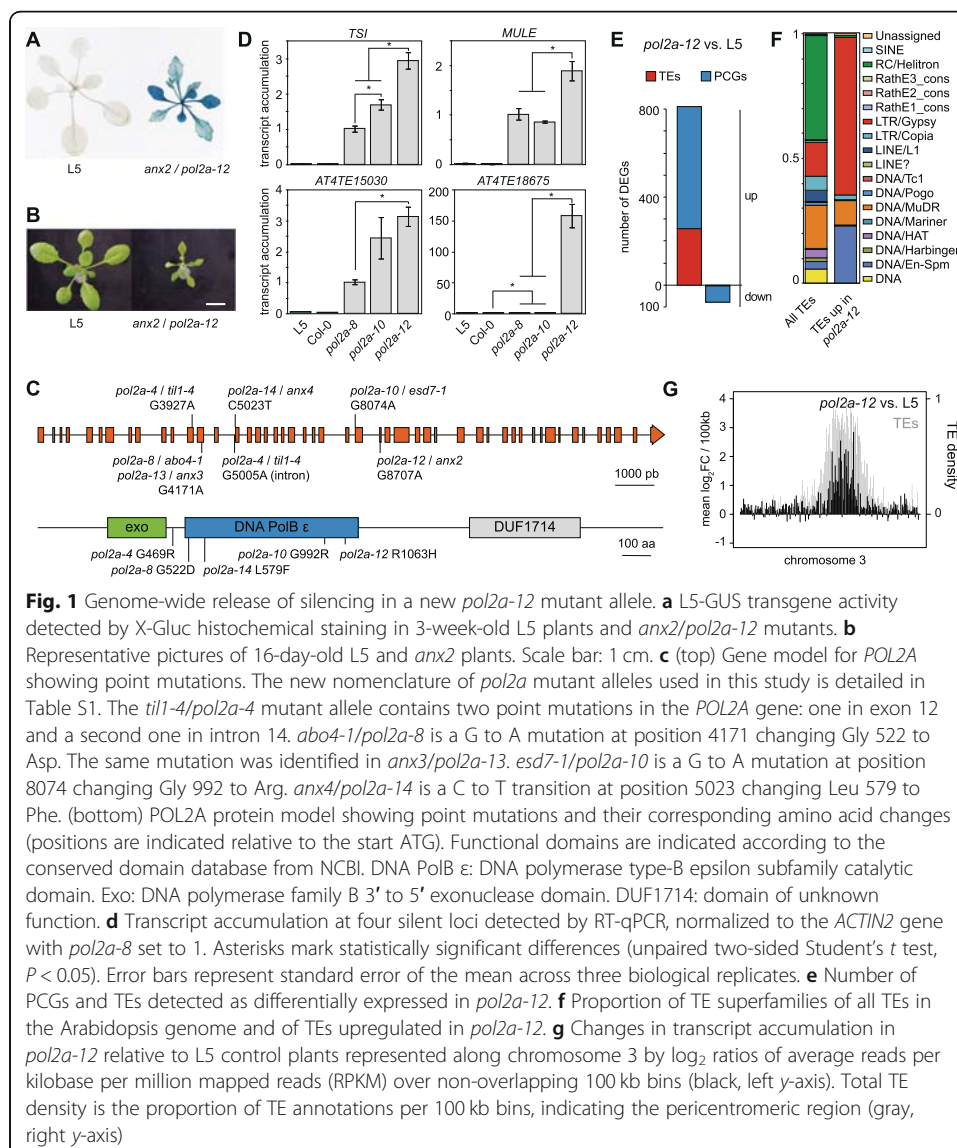
Here, we identified a strong mutant allele of *POL2A* encoding the catalytic subunit of the DNA Pol  $\epsilon$  in a screen for mutants defective in transcriptional silencing. We find that *POL2A* does not promote the accumulation of heterochromatic marks such as H3K27me1, H3K9me2, or H2A.W, but is required for proper aggregation of heterochromatic domains into chromocenters. We show that *POL2A* both prevents CHG DNA hypermethylation of TEs and controls their silencing genome-wide. Our data reveal a link between DNA replication and CHG methylation as we find that CHG hypermethylation is a feature common to many mutants for replisome factors. Our data highlight the important role of Pol  $\epsilon$  in controlling both heterochromatin organization and function.

## Results

### *POL2A* maintains gene silencing genome-wide

Certain transgenes can spontaneously undergo silencing, which is subsequently maintained by mechanisms identical to those controlling silencing of endogenous TEs and genes. As such, these transgenes represent unique useful tools to genetically dissect silencing pathways. The L5 transgenic locus, which consists of several repeats of the  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) gene under control of the CaMV 35S promoter, has spontaneously undergone transcriptional gene silencing in the L5 line, and mutations in many silencing regulators, or various stresses, can reactivate *GUS* expression [19, 32–35]. In a genetic screen for mutants defective in L5 transgene silencing, we isolated a mutant named *anxious2* (*anx2*) displaying both *GUS* reactivation and severe developmental

defects (Fig. 1a b). The *anx2* plant phenotype closely resembled that of mutants of the *POL2A* gene, which encodes the catalytic subunit of the DNA Pol  $\epsilon$  responsible for most of the leading strand elongation during eukaryotic DNA replication (Additional file 1: Figure S1A) [15, 36, 37]. We found that L5-GUS expression was also reactivated by the previously published *esd7-1* mutation of *POL2A* [36], here renamed *pol2a-10* (see Additional file 2: Table S1 for allele numbers), and allelic tests demonstrated that release of silencing in *anx2* was caused by a mutation in *POL2A* (Additional file 1: Figure S1B-C). We identified a G to A substitution at the nucleotide position 8707 of *POL2A* in *anx2*, causing an arginine to histidine substitution at amino acid 1063 (Fig. 1c). Consequently, *anx2* was renamed *pol2a-12*. While analyzing *pol2a-12*, we continued screening of the L5 mutant population for L5 silencing suppressors and isolated two additional mutant alleles of *POL2A*: *anx3* (renamed *pol2a-13*) that has a mutation identical to *pol2a-8*, and *anx4* that we renamed *pol2a-14* (Additional file 1: Figure S1D-E, 1C). Interestingly, *pol2a* mutations associated with silencing defects,



namely *pol2a-8*, *pol2a-10*, *pol2a-12*, *pol2a-13*, and *pol2a-14*, all lie in the N-terminal part of the POL2A protein carrying the exonuclease and replicative domains (Fig. 1c).

A previous report showed that silencing of a (*35S-NPTII*) transgene and of the endogenous *TRANSCRIPTIONALLY SILENT INFORMATION (TSI)* repeats was released in *pol2a-8* seedlings, and this was shown to occur without changes in DNA methylation [15]. *TSI* transcription was also activated in *pol2a-12*, and of the three *pol2a* mutant alleles analyzed, *pol2a-12* displayed the highest degree of both silencing release and developmental alterations (Fig. 1d, S1A). Analysis of transcript accumulation at other various selected endogenous silent loci confirmed this conclusion and indicated that *POL2A* may play a broader role in controlling silencing genome-wide (Fig. 1d, S1F). To test this, we compared the transcriptomes of *pol2a-12* and WT seedlings generated by RNA sequencing (RNA-seq) and found that almost all (783/860, 90%) differentially expressed loci in *pol2a-12* were upregulated (Fig. 1e). We identified 555 protein-coding genes (PCGs) and 256 TEs upregulated in *pol2a-12*, with upregulated TEs being significantly enriched in LTR/Gypsy retroelements located in pericentromeric heterochromatin (Fig. 1f, g, S1G). Collectively, these data reveal a pivotal role for *POL2A* in maintaining epigenetic silencing.

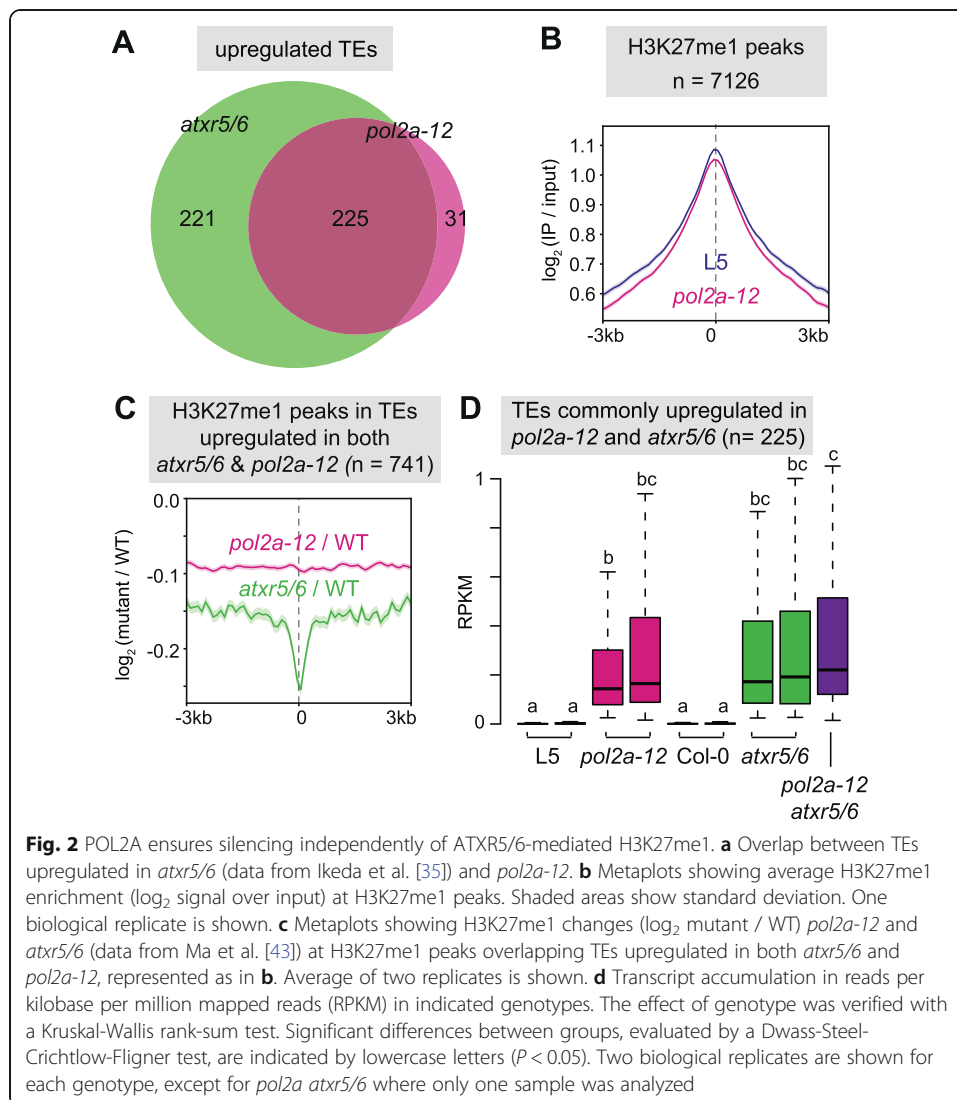
#### Transcriptional upregulation at genes in *pol2a*

Earlier work indicated that *POL2A* is involved in transcriptional repression of the *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) and *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) floral integrator genes by promoting H3K27me3 deposition through a direct interaction with some components of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) [24, 36, 38]. To assess the importance of H3K27me3 in *POL2A*-mediated silencing at the genome-wide scale, we compared H3K27me3 profiles in *pol2a-12* and WT seedlings using chromatin-immunoprecipitation followed by deep sequencing (ChIP-seq). Consistent with previous observations in the *pol2a-8* and *pol2a-10* alleles [36, 38], we found that several flowering genes were transcriptionally upregulated and showed slightly reduced levels of H3K27me3 in *pol2a-12* compared with the WT (Additional file 1: Figure S2A). Noticeably, we found that 249 out of the 555 PCGs upregulated in *pol2a-12* were associated with H3K27me3 in the WT, and these PCGs showed slightly decreased levels of H3K27me3 in *pol2a-12* (Additional file 1: Figure S2B-C). Transcript accumulation from this set of genes was significantly upregulated in a double mutant for the *CURLY LEAF* and *SWINGER* H3K27me3 methyltransferases (Additional file 1: Figure S2D) [39], suggesting that H3K27me3 represses their expression. This extends previous observations at the *SOC1* and *FT* genes [24] and suggests that impaired PRC2-mediated H3K27me3 deposition might contribute to about half of PCG upregulation in *pol2a-12*. PCGs upregulated in *pol2a-12* were mostly depleted in H3K4me3 (Additional file 1: Figure S2E) indicating that *POL2A* does not repress genes associated with H3K27me3/H3K4me3 bivalent chromatin [40]. The *pol2a-8* mutants show increased expression of DNA repair genes, which results from a state of constitutive replication stress [15, 38, 41]. We found that DNA repair genes are also upregulated in *pol2a-12*, and noticeably, they are not marked by H3K27me3 in the WT (Additional file 1: Figure S2F). This suggests that these genes are not controlled by H3K27me3 and that their upregulation in *pol2a-12* is likely triggered by constitutive replicative stress. Supporting

this notion, 35% of *pol2a-12* upregulated PCGs were similarly upregulated in *atxr5/6* mutants (Additional file 1: Figure S2G), which undergo DNA overreplication and DNA damage [10–12, 42], and most of these genes (69%) were not associated with H3K27me3 (Additional file 1: Figure S2G). A last class of *pol2a-12* upregulated PCGs (174), neither marked by H3K27me3 nor upregulated in *atxr5/6*, was enriched for genes involved in biological processes related to cell proliferation, cell cycle, and homologous recombination (24.7% of 174 PCGs) (Additional file 2: Table S2). Elevated rates of homologous recombination and increased S-phase length were reported in *pol2a-8* mutants [15, 41]. Together, our findings suggest that decreased H3K27me3 levels at some loci, constitutive replicative stress, and disturbed cell cycle progression each likely contribute to PCG upregulation in *pol2a-12*.

#### **POL2A is required for *atxr5/6*-induced heterochromatin overreplication but likely regulates TE silencing independently of H3K27me1**

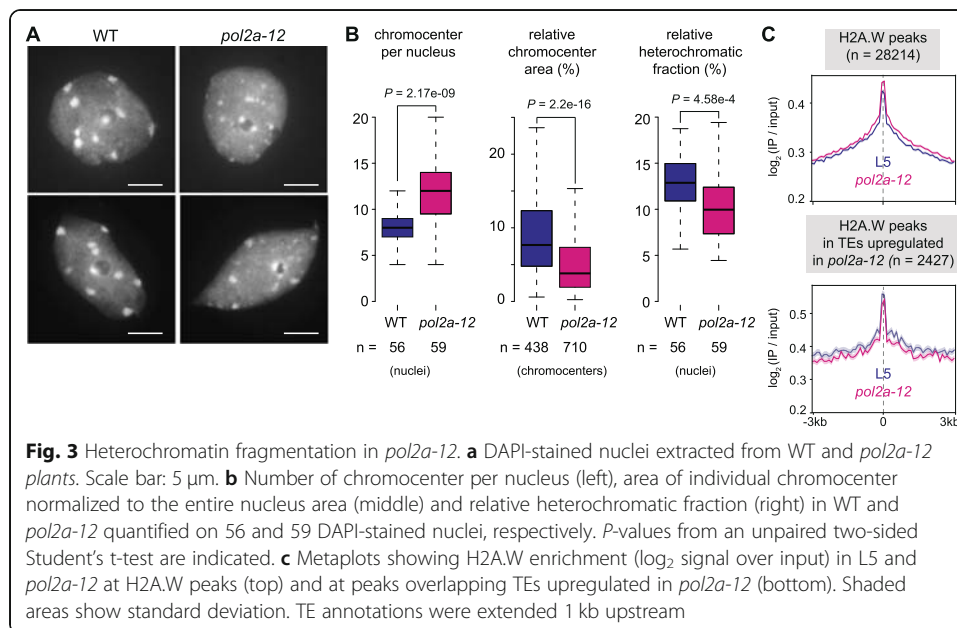
Out of the 256 TEs upregulated in *pol2a-12*, only 15 were associated with H3K27me3 in the WT (Additional file 1: Figure S3A). TEs derepressed in *pol2a-12* were mostly located in pericentromeric heterochromatin (Fig. 1f), which is largely depleted in H3K27me3 but enriched in H3K27me1, a repressive histone modification mediated by ATXR5 and ATXR6 [5, 26, 42]. Similar to *pol2a-12*, transcriptome analysis of *atxr5/6* revealed that up-regulated TEs were strongly enriched for elements belonging to the LTR/Gypsy superfamily (Additional file 1: Figure S3B, [12]). Although *atxr5/6* activated a higher number of TEs than *pol2a-12*, most (87.9%) *pol2a-12* upregulated TEs were also activated in *atxr5/6* (Fig. 2a). This prompted us to investigate whether *pol2a-12* affects H3K27me1 levels. We determined genome-wide H3K27me1 profiles in *pol2a-12* and WT control seedlings using ChIP-seq and compared these with available data for *atxr5/6* mutants [43]. Changes in H3K27me1 in *pol2a-12* were very modest compared with the marked reduction in *atxr5/6* (Fig. 2b, c, S3C), although TEs reactivated in both mutants accumulated similar transcript levels (Fig. 2d). Decreased H3K27me1 level in *atxr5/6* mutants is associated with over-replication of heterochromatic DNA [42] and flow cytometry analyses did not reveal such genome instability in *pol2a-12* mutants (Additional file 1: Figure S3D). Interestingly, combining *pol2a-12* and *atxr5/6* by crossing, we found that the *pol2a-12* mutation strongly suppressed the production of *atxr5/6*-induced extra DNA (Additional file 1: Figure S3D). Heterochromatin over-replication in *atxr5/6* correlates with the appearance of hollow chromocenters [10] and we found that these were also suppressed in *pol2a atxr5/6* (Additional file 1: Figure S3E). Mutations in several genes have been shown to suppress the production of extra DNA in *atxr5/6*. In these mutants, *atxr5/6*-induced TE transcription and overexpression of DNA damage-induced HR genes were also reduced or suppressed [11]. Transcriptome analysis indicated that suppression of heterochromatic DNA over-replication in *pol2a atxr5/6* triple mutants was not accompanied by significant changes in transcript accumulation from *atxr5/6*-reactivated TEs nor by suppression of HR gene overexpression (Fig. 2d, S3F-G). This suggests that *atxr5/6* mutations may affect transcription and replication independently. In support of this interpretation, mutations in the MET1 or CMT3 DNA methyltransferases suppress DNA over-replication but enhance TE derepression in *atxr5/6* mutants [12]. Altogether, our data indicate that POL2A is



required for *atxr5/6*-induced heterochromatin overreplication but regulates TE silencing largely independently of ATXR5/6-mediated H3K27me1.

### POL2A is required for proper heterochromatin organization independently of H2A.W

In DAPI-stained WT Arabidopsis nuclei, heterochromatin is visualized as large densely stained foci called chromocenters. Nuclei of *pol2a-12* mutants showed visibly reduced heterochromatin content, associated with DAPI-stained foci that were typically smaller and more numerous than WT chromocenters (Fig. 3a, b). WT chromocenters contain highly repeated DNA sequences, including 180-bp satellite repeats and 45S rDNA, which were transcriptionally derepressed in *pol2a-12* (Additional file 1: Figure S1F, S4A). Fluorescence in-situ hybridization using probes corresponding to 180-bp and 45S rDNA repeats revealed that these repeats were included in the small DAPI-stained foci and were not dispersed throughout *pol2a-12* nuclei (Additional file 1: Figure S4B-C). Immunocytology analyses further indicated that DAPI-stained foci in *pol2a-12* were



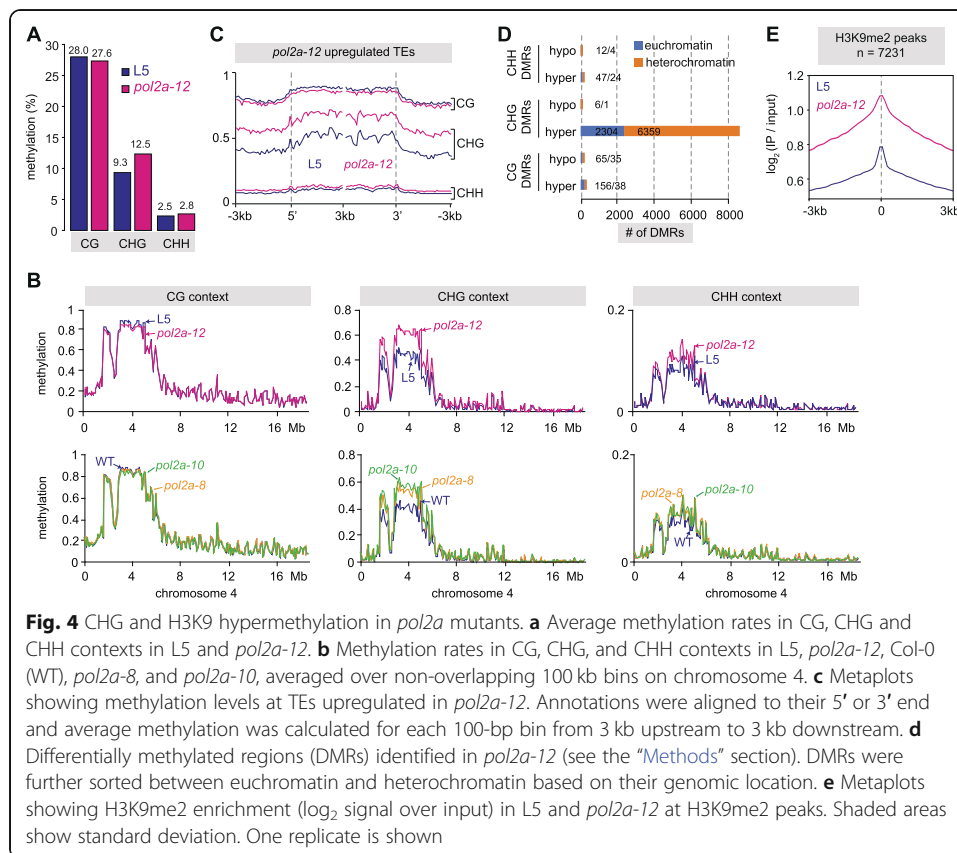
associated with H3K27me1 and H3K9me2 like WT chromocenters, suggesting that they still retain heterochromatin features (Additional file 1: Figure S4D). Therefore, we conclude that the small DAPI-stained foci in *pol2a-12* nuclei likely represent dispersed fragments of normally larger WT chromocenters, indicating that POL2A is required for proper higher-order, heterochromatin organization.

The H2A.W histone H2A variant is specifically enriched in Arabidopsis heterochromatin and promotes long-range interactions of chromatin fibers [6, 44]. We quantitatively profiled H2A.W in *pol2a-12* and WT seedlings using ChIP-seq and found that H2A.W levels were largely preserved in *pol2a-12* (Fig. 3c), indicating that defective chromocenter organization in *pol2a-12* is independent of H2A.W incorporation into heterochromatin.

### POL2A prevents DNA hypermethylation of heterochromatin

DNA methylation plays a crucial role in maintaining both heterochromatin structure and silencing. Despite a previous study reporting no change in DNA methylation in *pol2a-8* using methylation-sensitive restriction enzyme assays [15], we used whole genome bisulfite sequencing (BS-seq) to determine genome-wide cytosine methylation profiles in *pol2a-8*, *pol2a-10*, and *pol2a-12*. Surprisingly, average genomic methylation rates were markedly increased at CHG sites in *pol2a* mutants in comparison to the WT (Fig. 4a, S5A). CHG sites consist of three different subcontexts (CAG, CTG, and CCG) [45], which were all hypermethylated in *pol2a-12* (Additional file 1: Figure S5B). Gain in CHG methylation was most prominent at pericentromeric heterochromatin, where we also detected a modest increase in methylation at CHH sites (Fig. 4b). Accordingly, average CHG and CHH methylation rates were increased at TEs in *pol2a* mutants, while CG methylation was largely unaltered at TEs and PCGs (Additional file 1: Figure S5C). Separating TEs based on their chromosomal location further revealed that pericentromeric TEs were strongly hypermethylated at CHG sites and to a lesser extent





**Fig. 4** CHG and H3K9 hypermethylation in *pol2a* mutants. **a** Average methylation rates in CG, CHG and CHH contexts in L5 and *pol2a-12*. **b** Methylation rates in CG, CHG, and CHH contexts in L5, *pol2a-12*, Col-0 (WT), *pol2a-8*, and *pol2a-10*, averaged over non-overlapping 100 kb bins on chromosome 4. **c** Metaplots showing methylation levels at TEs upregulated in *pol2a-12*. Annotations were aligned to their 5' or 3' end and average methylation was calculated for each 100-bp bin from 3 kb upstream to 3 kb downstream. **d** Differentially methylated regions (DMRs) identified in *pol2a-12* (see the "Methods" section). DMRs were further sorted between euchromatin and heterochromatin based on their genomic location. **e** Metaplots showing H3K9me2 enrichment (log<sub>2</sub> signal over input) in L5 and *pol2a-12* at H3K9me2 peaks. Shaded areas show standard deviation. One replicate is shown

at CHH positions in *pol2a* mutants, while TEs located on chromosome arms only gained methylation at CHG sites (Additional file 1: Figure S5D). TEs upregulated in *pol2a-12*, which are predominantly located in pericentromeric heterochromatin, gain methylation at both CHG and CHH sites (Fig. 4c, S5E). To further characterize methylation changes in *pol2a*, we determined positions (DMPs) and regions (DMRs) differentially methylated in *pol2a-12* relative to WT. We mostly detected CHG-hypermethylated (CHG-hyper) DMPs and DMRs, which were largely clustered in heterochromatin (Fig. 4d, S5F-G). Only a few CHH hypermethylated positions were detected under the threshold conditions we applied, indicating the most prominent impact of *pol2a* on DNA methylation is increased methylation at CHG sites. TE annotations overlapping CHG-hyper DMRs were strongly skewed for TEs belonging to the LTR/Gypsy superfamily (Additional file 1: Figure S5H), as were those of *pol2a-12* upregulated TEs (Additional file 1: Figure S1G). Analyzing WT methylation rates at *pol2a-12* CHG-hyper DMPs showed that CHG hypermethylation in *pol2a-12* does not occur de novo, but rather targets cytosines already methylated in the WT (median WT methylation rate of 0.32) (Additional file 1: Figure S5I).

Given that pathways maintaining CHG methylation and H3K9 methylation are tightly interwoven [1], increased CHG methylation in *pol2a-12* prompted us to examine H3K9me2 patterns. Using ChIP-seq we found a stark increase in H3K9me2 level in *pol2a-12* at regions already associated with H3K9me2 in the WT, located either in pericentromeres or along chromosome arms (Fig. 4e, S5J). Regions with increased CHG methylation and TEs upregulated in *pol2a-12* also showed H3K9me2 enrichment

(Additional file 1: Figure S5J). Therefore, *pol2a-12* shows genome-wide overaccumulation of H3K9me2 that closely follows CHG hypermethylation. Collectively, these findings demonstrate that POL2A is required for maintaining proper patterns of non-CG methylation and/or H3K9me2. They also reveal that transcriptional derepression of TEs and disruption of heterochromatin organization can, somewhat counterintuitively, occur in a context of increased levels of these two repressive epigenetic marks.

#### **POL2A and FAS2 influence heterochromatin silencing, organization, and DNA methylation through at least partly distinct pathways**

FAS2, together with FAS1 and MSI1 form the CAF-1 complex that incorporates H3.1-associated nucleosomes during DNA replication [46]. In addition to resemblances in their developmental phenotypes (Additional file 1: Figure S6A), *fas2* and *pol2a* mutants exhibit notable similarities in their molecular phenotype. Heterochromatic DNA, in particular LTR/Gypsy TEs, show CHG hypermethylation in *fas2* mutants [22, 47], resembling *pol2a* (Additional file 1: Figure S5H). Furthermore, *fas2* mutants show silencing defects at some genomic loci and FAS2 is required for *atxr5/6*-induced heterochromatin over-replication [18, 42, 48]. We sought to analyze epistasis between *pol2a* and *fas2* mutations; however, we were unable to recover *pol2a-12 fas2-4* double mutants in the progeny of *pol2a-12/+ fas2-4/+* double heterozygotes or either sesqui-mutant, suggesting a lethal genetic interaction between *pol2a-12* and *fas2-4*. We compared DNA methylation patterns in *pol2a-12* and *fas2-4* and found that in stark contrast with *pol2a*, heterochromatic DNA is hypermethylated not only at CHG sites but also at CG sequence contexts in *fas2-4* (Fig. 4, S5C, S6B), supporting earlier observations [22, 47]. Moreover, CHG hypermethylation in *fas2* was much less pronounced at CCG trinucleotides than at CAG and CTG, while CHG hypermethylation in *pol2a* equally affects all three CHG subcontexts (Additional file 1: Figure S6C). Transcriptome analyses using RNA-seq also highlighted differences between *pol2a* and *fas2* mutants. We identified 109 TEs upregulated in *fas2-4*, of which more than half (51.4%) remain efficiently silenced in *pol2a-12* (Additional file 1: Figure S6D). In addition, only 25.6% of the 843 PCGs upregulated in *fas2* accumulated more transcripts in *pol2a* mutants (Additional file 1: Figure S6D). Thus, POL2A and FAS2 regulate transcriptional activity of both common and distinct sets of TEs and PCGs. Finally, *pol2a-12* and *fas2-4* appear to differentially impact nuclear phenotypes. Indeed, although heterochromatin fraction and chromocenter size decreased in *fas2-4* (Additional file 1: Figure S6E-F), there was no significant increase in the number of chromocenters per nucleus, differing from *pol2a* (Fig. 3a-b, Additional file 1: Figure S6E). Additionally, while *fas2* mutants show an increased proportion of endoreduplicated nuclei [49], we did not detect endoreduplication defects in *pol2a-12* (Additional file 1: Figure S3D). Altogether, these differences between *pol2a* and *fas2* molecular phenotypes suggest that POL2A and FAS2 stabilize heterochromatin silencing, heterochromatin organization and prevent DNA hypermethylation through, at least partly, separate pathways.

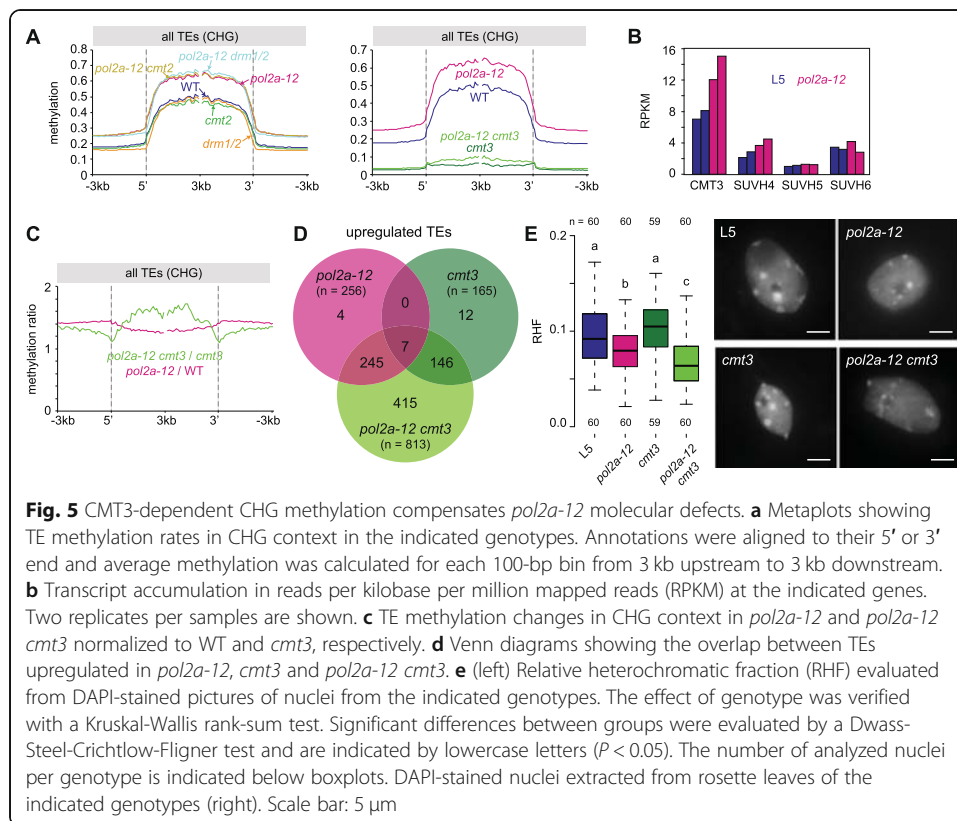
#### **DNA methylation changes in *pol2a* are independent of 24-nt siRNA hyper-accumulation**

In plants, small interfering RNAs (siRNAs) contribute to the establishment of DNA methylation and part of its maintenance, and are mostly produced from highly DNA-

methylated genomic regions. In light of the DNA methylation changes occurring in *pol2a* mutants, we determined siRNAs accumulation in *pol2a-10* and *pol2a-12* by RNA sequencing of small RNAs (sRNA-seq). Overall relative proportions of 21-nt and 24-nt siRNAs in *pol2a* mutants were similar to those in the WT (Additional file 1: Figure S7A). Determining regions of differential siRNA accumulation identified more regions of decreased 24-nt siRNA abundance (5375) than regions of 24-nt siRNA over-accumulation (4923) in *pol2a-12*. However, the magnitude of increase, on average 6.92-fold, was higher than the magnitude of loss (3.71-fold) (Additional file 1: Figure S7B). Comparatively, changes in 21-nt siRNA accumulation were neglectable with only 75 regions of over-accumulation and 175 regions of 21-nt siRNA loss. Regions of 24-nt siRNAs over-accumulation in *pol2a* were largely clustered in pericentromeric heterochromatin (Additional file 1: Figure S7C), where we detected increased levels of DNA methylation and H3K9me2 and most silencing defects in *pol2a*. To further investigate the correlation between DNA hypermethylation and changes in 24-nt siRNA abundance in *pol2a* mutants, we determined DNA methylation changes at regions of differential 24-nt siRNA accumulation. Decreased 24-nt siRNA accumulation correlated with a slight reduction in CHH methylation (Additional file 1: Figure S7D). Hypermethylation of CHH sites was not restricted to regions of increased 24-nt siRNAs abundance, but likewise occurred at their flanking sequences, suggesting that at least part of the modest increase in CHH methylation in *pol2a-12* heterochromatin is caused by a mechanism independent of 24-nt siRNA. Importantly, gain in CHG methylation was not restricted to regions of increased 24-nt siRNA accumulation and also occurred at regions of decreased 24-nt siRNA abundance and in their respective flanking regions (Additional file 1: Figure S7D), indicating that CHG hypermethylation in *pol2a* mutants is unlinked to differential 24-siRNA accumulation. Given the extensive dependency of 24-nt siRNA biogenesis on non-CG methylation and H3K9me2 [3], CHG and H3K9me2 hypermethylation most likely explains increased 24-nt siRNA levels in *pol2a*.

#### **POL2A represses TEs in synergy with CMT3-mediated methylation**

To investigate the contribution of the different Arabidopsis non-CG DNA methyltransferases to hypermethylation of heterochromatic CHG sites in *pol2a* mutants, we generated mutant combinations of *pol2a-12* with *drm1 drm2* (*drm1/2*), *cmt2*, or *cmt3* and determined their methylome together with that of *drm1/2*, *cmt2*, *cmt3*, and WT siblings. We found that CHG methylation profiles of TEs in *pol2a* single mutants and in *pol2a drm1/2* and *pol2a cmt2* mutant combinations were virtually identical (Fig. 5a), indicating marginal or no contribution of DRM1/2 and CMT2 to CHG hypermethylation in *pol2a*. Maintenance of CHG methylation is almost exclusively ensured by CMT3, with a minor contribution of CMT2 [2, 3]. We found that accumulation of CMT3 transcripts, and to a lesser extent SUVH4 transcripts, was increased in *pol2a* mutants (Fig. 5b), and that CHG methylation levels were extensively reduced in *pol2a cmt3* compared with their *pol2a* siblings (Fig. 5a). Thus, increased expression of CMT3 and/or SUVH4 likely accounts for the increase in CHG methylation triggered by POL2A deficiency. Interestingly, the CHG methylation level in *pol2a cmt3* was still higher than in *cmt3*, particularly in the internal regions of heterochromatic TEs (Fig. 5a, c), the preferred genomic targets of CMT2 [2, 3]. Additionally, hypermethylation at

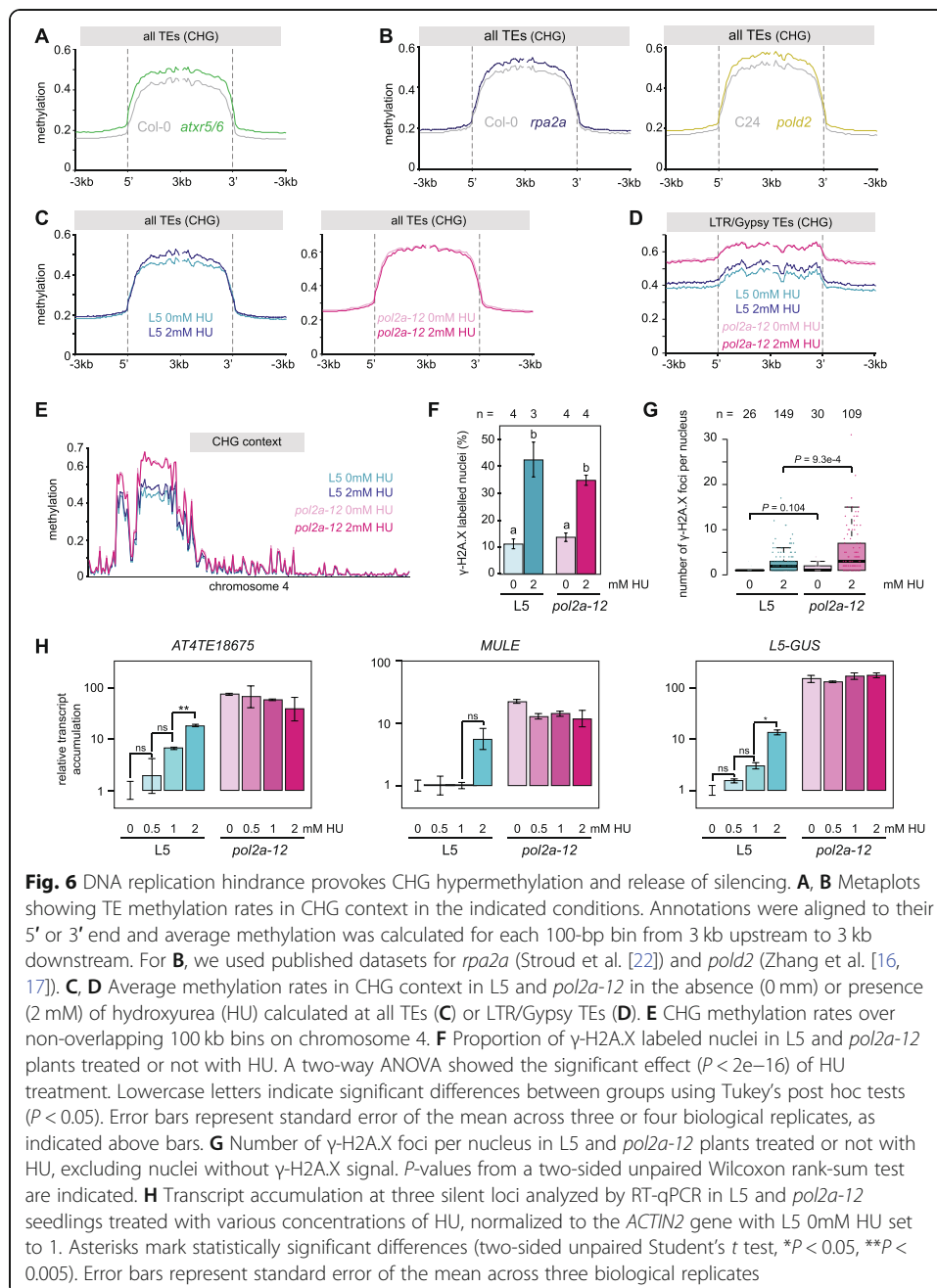


CHH sites, the context favored by CMT2, was more pronounced in *pol2a cmt3* vs. *cmt3* than in *pol2a* vs. WT (Additional file 1: Figure S8A). These findings suggest that CMT2 may take over CMT3 and mediate CHG hypermethylation in the *pol2a cmt3* background.

We used RNA-seq to compare transcriptional changes in *pol2a cmt3* double mutants relative to either single mutants and found that *pol2a* and *cmt3* largely impact TE silencing synergistically (Fig. 5d, S8B-C). Moreover, although *pol2a* and *pol2a cmt3* plants display comparable developmental phenotypes (Additional file 1: Figure S8D), disorganization of heterochromatin was enhanced in *pol2a cmt3* compared with *pol2a* (Fig. 5e). These data suggest the possibility that increased CHG methylation in *pol2a* mutants acts as a compensatory mechanism that counterbalances the release of TE silencing and loss of heterochromatin organization.

### Impairing DNA replication generally triggers CHG DNA hypermethylation and destabilizes silencing

Both ATXR5/6 and POL2A function at DNA replication, and their mutations are associated with constitutive activation of the DNA damage response [10, 15, 41, 42]. We determined the *atxr5/6* methylome in young (13-day-old) seedlings as we did for *pol2a* and found that *atxr5/6* mutants also exhibited increased methylation at CHG sites, although to a lesser extent than in *pol2a* (Fig. 6a), a conclusion that was supported by re-analyzing previously published *atxr5/6* methylome data generated from different tissues (3-week-old rosette leaves) (Additional file 1: Figure S9A). Resembling *pol2a* mutants



(Additional file 1: Figure S5B), DNA hypermethylation in *atxr5/6* was not biased towards a specific CHG subcontext and did not affect CG sites (Additional file 1: Figure S9A-C). Gain in CHG methylation in *atxr5/6* was also associated with increased levels of H3K9me2 (Additional file 1: Figure S9D). We found that *rpa2a* and *pold2*, two other mutants known to affect DNA replication and the DNA damage response [17, 19], also exhibit increased CHG methylation levels (Fig. 6b), while not affecting CG methylation (Additional file 1: Figure S9E). Similarly, we found that TEs gain CHG but not CG methylation in mutants of *MAIL1* (*MAIN-LIKE 1*) (Additional file 1: Figure S9F), which in addition to silencing defects, show constitutive activation of the DNA damage

response and accumulate DNA damage [35, 50, 51]. Interestingly, *pol2a* point mutations associated with CHG hypermethylation all reside in the catalytic replicative domain of POL2A (Fig. 1c). Noticeably, transcription of *CMT3* and *SUVH4/KYP* was unchanged in *atxr5/6*, *pold2*, *mail1*, and *fas2* mutants (Additional file 1: Figure S9G). These findings suggest that DNA replication defects and/or DNA damage generally trigger CHG hypermethylation, independently of *CMT3* overexpression.

To test this possibility further, we determined possible DNA methylation changes induced by exposure to hydroxyurea (HU), a drug that causes replication stress by depleting deoxynucleotide triphosphate (dNTP) pools. HU exposure did not alter CG methylation but led to slightly increased methylation levels in all three CHG subcontexts (Fig. 6c, d, S9H-I), preferentially over pericentromeric heterochromatin (Fig. 6e, S9J). HU treatment did not further enhance CHG methylation in *pol2a-12* (Fig. 6c–e, S9H-J), and regions with increased CHG methylation in *pol2a-12* also tended to gain CHG methylation in HU-treated WT plants (Fig. 6d, S9K). Like in *atxr5/6*, *pold2*, and *mail1* mutants, HU-induced CHG hypermethylation was not associated with upregulated *CMT3* transcript levels (Additional file 1: Figure S9L). These data suggest that replicative stress and/or DNA damage induce CHG hypermethylation without altering *CMT3* expression levels. This mechanism is likely at play in *pol2a* mutants, which exhibit exacerbated CHG hypermethylation as a result of concomitant *CMT3* overexpression.

High concentrations of HU lead to DNA damage and *atxr5/6*, *pold2*, and *mail1* also accumulate DNA damage [10, 50–53]. To try and discriminate whether CHG hypermethylation results from replicative stress or from accumulation of DNA damage, we used immunocytology to detect phosphorylated H2A.X ( $\gamma$ -H2A.X). In response to DNA damage, the histone variant H2A.X becomes rapidly phosphorylated at sites of DNA breaks and detection of discrete  $\gamma$ -H2A.X foci can be used as a proxy to monitor double-strand break formation [54]. We found that *pol2a-12* mutant nuclei did not detectably accumulate more  $\gamma$ -H2A.X foci than WT nuclei under normal growth conditions (Fig. 6f, g). Our HU treatment conditions induced DNA damage in both WT and *pol2a-12* (Fig. 6f, g), and this effect was more pronounced in *pol2a-12* (Fig. 6g). Importantly, HU-induced DNA damage in *pol2a* mutants did not correlate with an increase in CHG methylation in the treated mutant (Fig. 6c–e). These data suggest that CHG hypermethylation in *pol2a-12* may primarily be triggered by replicative stress and not by DNA damage.

We also tested whether HU treatment may destabilize silencing and found that transcript accumulation at selected silent loci was increased upon exposure of WT plants to HU (Fig. 6h). Additionally, HU treatment did not significantly modify silencing release at these loci in *pol2a-12* (Fig. 6h). These findings suggest that HU exposure and POL2A mutations disturb silencing through a common pathway, supporting that constitutive replication stress contributes to silencing defects in *pol2a* mutants.

## Discussion

Contrasting with earlier conclusions [15], our genome-wide methylation analyses showed that mutations of *POL2A* impact DNA methylation profiles and lead to a sharp increase in CHG methylation. This hypermethylation is not associated with significant changes in genomic profiles of H2A.W and H3K27me1, two hallmarks of Arabidopsis

heterochromatin. Consistent with the fact that the mechanisms maintaining CHG methylation and H3K9 methylation are tightly linked, CHG hypermethylation is associated with increased levels of H3K9me2 in *pol2a* mutants. We found that mutations in other DNA replication-related genes, including *RPA2A*, *POLD2*, and *ATXR5/6*, previously thought not to alter DNA methylation [5, 17, 22], are also associated with increased CHG methylation to various degrees, and at least in *atxr5/6*, with increased H3K9me2 levels. The gain in CHG methylation is stronger in *pol2a-12*, very likely because *CMT3* expression is enhanced in this mutant, although what causes *CMT3* overexpression in *pol2a-12* remains to be elucidated. *RPA2A*, *ATXR5/6*, *POLD2* (Pol  $\delta$ ), and *POL2A* (Pol  $\epsilon$ ) function in coordination with, or at the core of, the replisome and *pol2a* mutations associated with CHG hypermethylation reside in the replicative domain of POL2A. We also detected hypermethylation of CHG sites in plants treated with HU, which causes replication stress by depleting cellular dNTP pools. HU-induced replication stress activates the S-phase checkpoint, resembling *pol2a* mutants where it is constitutively activated [41, 55]. Interestingly, exposing *pol2a* plants to HU did not dramatize CHG hypermethylation, suggesting that *pol2a* mutations and HU provoke hypermethylation through a common pathway. Furthermore, we found no evidence of increased DSB accumulation in *pol2a-12*. Altogether this suggests that replication stress is a trigger for increased CHG and/or H3K9 methylation.

FAS2 is a subunit of the CAF-1 complex, which incorporates H3.1 during DNA replication. H3.1 mostly occupies pericentromeric heterochromatin in differentiated cells, while it is replaced by the H3.3 variant at genes in a transcription-dependent manner [56–58]. H3.3 favors gene body methylation, likely by preventing recruitment of H1 that inhibits DNA methylation by restricting the access of the DNA methyltransferases MET1, CMT2, and CMT3 to DNA [2, 59, 60]. In *fas2* mutants, replacement of H3.1 by H3.3 and/or decrease in H1, correlate with a global increase of heterochromatic DNA methylation in all cytosine sequence contexts [22, 47, 61, 62]. Because CG methylation remains largely unaltered in *pol2a*, *atxr5/6*, *rpa2a*, *pold2*, and *mail1* mutants or after HU exposure (Fig. 4, S5, S9), DNA hypermethylation unlikely results from perturbed genomic distribution of H3.1, H3.3, or H1 in these backgrounds. Recruitment of CMT3 at CAG and CTG sites predominantly relies on H3K9 methylation mediated by SUVH4/KYP, whereas the redundant activities of SUVH5 and SUVH6 are required to target CMT3 at CCG sites [45]. Interestingly, we found that CHG hypermethylation is biased towards CAG and CTG contexts in *fas2* mutants, suggesting that SUVH4 might have a preference for H3.3 over H3.1 and/or might be antagonized by H1.

CHG methylation is likely maintained shortly after the passage of the replication fork as CMT3 is exclusively associated with H3.1 in vivo and is highly expressed in replicating cells [63]. Increased CHG methylation in *pol2a* mutants and HU-treated plants correlates with S-phase checkpoint activation [15, 41, 64], upon which DNA replication is halted until checkpoint-dependent pathways restore cellular conditions suitable for replisome progression [55]. We propose that replication arrest provides CMT3 and/or SUVH4/5/6 with a wider time-window to accomplish their enzymatic activities, resulting in more efficient maintenance and thus increased levels of CHG and H3K9 methylation. Interestingly, replication arrest in human cells leads to an accumulation of chaperone-bound histones marked with H3K9 methylation, which are rapidly incorporated upon resumption of DNA replication [65]. Given the tight link between CHG and

H3K9 methylation in plants, a similar mechanism may explain the prevalence of CHG hypermethylation in the context of constitutive replication stress in Arabidopsis.

DNA transposons are mobilized during DNA replication, and LTR retrotransposons are preferentially inserted at sites of replication fork arrest [66]. In that regard, fork arrest and slower S-phase completion caused by replication stress and checkpoint activation are likely to favor TE mobilization. Increased CHG and H3K9 methylation, by limiting the release of TE silencing and maintaining heterochromatin organization (Fig. 5), may have evolved as a mechanism safeguarding genome integrity in cells undergoing replication stress.

Several studies reported TE silencing defects in replisome-related mutants and in plants treated with DNA-damaging agents, where replication is expectedly disturbed [5, 13–20]. We show that HU can alleviate TE silencing but does not enhance *pol2a*-induced release of silencing (Fig. 6h), which points to replicative stress as a cause of loss of TE silencing in *pol2a* mutants. Chromocenter organization is drastically altered in *pol2a*, which also displays the release of silencing albeit increased levels of CHG and H3K9 methylation. Analyses of *pol2a cmt3* double mutants indicate that DNA hypermethylation compensates silencing release and loss of chromocenter organization. Mutants showing impaired heterochromatin organization, including *met1*, *ddm1*, *atxr5/6*, and *mail1*, exhibit silencing defects [5, 9, 35, 67, 68]. Chromocenter disruption in mutants lacking histone H1 is associated with only weak derepression of few TEs [69]; however, loss of H1 induces increased heterochromatin methylation at CG and CHG sites [2, 69], which likely counterbalances silencing release. Therefore, although the extent of its contribution remains difficult to evaluate, it is tempting to speculate that loss of higher-order heterochromatin organization participates in destabilizing silencing in *pol2a* mutants.

## Conclusions

Our study demonstrates that Pol  $\epsilon$  is essential for preserving both heterochromatin structure and function by enforcing chromocenter formation and TE silencing. Furthermore, it reveals that proper DNA replication generally prevents the appearance of aberrant DNA methylation patterns.

## Methods

### Plant material

Plants were grown in soil in long-day conditions (16 h light, 8 h dark) at 23 °C with 60% relative humidity. The *atxr5 atxr6* (SALK\_130607, SAIL\_240\_H01), *cmt3-11* (SALK\_148381), *cmt2-3* (SALK\_012874C), *drm1-2 drm2-2* (SALK\_031705, SALK\_150863), *fas2-4* (SALK\_033228), and *pold1* (also named *gis5*) [25] mutant lines used in this study were all in a Col-0 genetic background. The *esd7-1* mutant allele, originally isolated in Ler-0, was repeatedly backcrossed in Col-0 [36] while *abo4-1* was generated in a Col-0 background carrying a *glabra1* mutation [15]. The *anx2 (pol2a-12)*, *anx3 (pol2a-13)*, and *anx4 (pol2a-14)* mutant alleles reported in this study were isolated from a population of mutagenized L5 plants that we previously described [35]. The *pol2a-12* mutant was backcrossed once to the L5 line before analysis. Its developmental phenotype was stable through six backcrosses.



For genome-wide profiling of *pol2a-12 cmt3-11* double mutants and controls, all plants were derived from a F1 parent obtained by crossing *pol2a-12* (3rd backcross) and *cmt3-11*. Siblings were genotyped for *pol2a-12* and *cmt3-11* mutations. For methylome studies, pools consisted of 17 WT plants, 58 *pol2a-12* single mutants, 17 *cmt3-11* single mutants, and 43 *pol2a-12 cmt3-11* double mutants. The same procedure was followed to generate methylomes of *pol2a-12 cmt2-3* double mutants, from a cross of *pol2a-12* (1st backcross) with *cmt2-3*. Sixteen plants were pooled for *cmt2-3*, 19 for *pol2a-12 cmt2*. For *pol2a-12 drm1/2* methylome, two F2 *pol2a-12/+ drm1/2* plants were isolated from a cross between *pol2a-12* (1st backcross) and *drm1/2*. Their F3 progeny was genotyped to pool 15 plants for *drm1/2* and 27 plants for *pol2a-12 drm1/2*.

### Histochemical staining

Whole seedlings or rosette leaves were vacuum infiltrated twice 5 min with 3 ml of X-Gluc staining solution (50 mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$  pH 7; 10 mM EDTA; 0.2% Triton-X-100; 0.04% X-Gluc) and incubated 24 h at 37 °C in the dark. Chlorophyll was subsequently cleared with repeated washes in ethanol at room temperature.

### Transcript analysis

About 30–40 mg of fresh tissues were used for total RNA extraction with TRI Reagent (Sigma), following the manufacturer's instructions. RNA (8 µg) was treated with 12 units of RQ1 DNase (Promega) for 1 h at 37 °C and further purified by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. One-step reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was performed starting from 50 ng of RNA using the SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step kit (Bioline) on an Eco™ Real-Time PCR System (Illumina), following a program of 10 min at 45 °C, 5 min at 95 °C, 40 cycles of 20 s at 95 °C, and 30 s at 60 °C. Amplification specificity was evaluated by analyzing a melting curve generated at the end of the reaction. Amplification of the *ACTIN2* gene transcripts was used as a reference for normalization and data were analyzed according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. End-point RT-PCR was performed using the one-step RT-PCR kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions, in a final volume of 10 µl starting from 50 ng of RNA. Primers used in this study are described in Additional file 2: Table S3.

### mRNA sequencing

Total RNA was extracted from 13-day-old seedlings and treated as indicated above. Two biological replicates were collected for each genotype, except the *pol2a atxr5/6* triple mutant for which we collected one sample (Additional file 2: Table S4 and Additional file 1: Figure S10A). Libraries were prepared using the TruSeq Stranded RNA stranded protocol (Illumina) and sequenced on a HiSeq 2500 instrument (Illumina) at FASTERIS S.A. (Geneva, Switzerland) to generate ~28–52 M 50-bp single-end reads (see Additional file 2: Table S4 and Additional file 1: Figure S10A). To detect differential expression at protein coding genes (PCGs), we used a pipeline previously described in Bourguet et al. [34]. Only PCGs detected as differentially expressed in both replicates were retained. Gene ontology analysis was performed with PANTHER14.1 Overrepresentation Test (12/03/2019 release) [70]. To detect differentially expressed TEs, reads were aligned to the Arabidopsis TAIR10 genome using STAR version 2.5.3a [71]

retaining multi-mapped reads mapping up to 10 positions. Subsequent read counting was performed with featureCounts version 1.6.0 [72] on the TAIR10 TE annotations. Normalization and differential analyses were done using DESeq2 version 1.14.1 [73] with default parameters. Only loci with Benjamini-Hochberg adjusted  $P$  values  $< 0.05$  and with a  $\log_2$ -fold change  $\geq 1$  or  $\leq -1$  were considered differentially expressed. TEs with at least 10% of their length overlapping a PCG annotation were excluded from the analysis. RPKM calculation at TEs annotations, in contrast with PCGs, included reads from both strands. We also re-analyzed publicly available data for *atxr5/6*, *mail1* (ERR1593751-ERR1593754, ERR1593761, ERR1593762 [35]) and *pold2* (GSM2090066-GSM2090071 [16, 17]).

In mRNA-seq and BS-seq (see below) analyses, allocation of genomic features to genomic compartments was based on the chromosomal pericentromeric heterochromatin coordinates previously defined by Bernatavichute et al. [74] based on the distributions of TEs, PCGs, and DNA methylation. Annotations lying within these coordinates were deemed pericentromeric, while annotations overlapping with or located outside these coordinates were assigned to chromosome arms.

#### Chromatin-immunoprecipitation followed by sequencing

Histone H3 methylation ChIP-seq was performed on 13-day-old seedlings grown in vitro following a previously described procedure [75] with minor modifications [76]. Two biological replicates were collected for each genotype (see Additional file 2: Table S4 and Additional file 1: Figure S10B). Briefly, tissues were fixed in 1% (v/v) formaldehyde and homogenized in liquid nitrogen. After nuclei isolation and lysis, chromatin was sonicated in a Covaris S220 following the manufacturer's instructions, and shearing efficiency was verified on a gel. Immunoprecipitation was performed with antibodies for H3K27me3 (Millipore 07-448), H3K27me1 (Millipore 07-449), and H3K9me2 (Millipore 07-441). After reverse-crosslink and phenol-chloroform DNA purification, libraries were constructed with the NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB), following the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out on a NextSeq 500 instrument to generate ~30–106 M 76-bp single-end reads. For H2A.W ChIP-seq, we used a previously described antibody [6]. Libraries were prepared using the NuGEN Ovation Ultra Low System V2 kit from 10-day-old seedlings, according to the manufacturer's instructions, and were sequenced on an Illumina HiSeq 2500 instrument to generate ~28–55 M 77-bp single-end reads. Reads were mapped to the Arabidopsis TAIR10 reference genome using STAR version 2.5.3a [71], allowing for two mismatches, and retaining only uniquely mapped reads. Read count was normalized to library size (RPM) and further normalized to the input signal. Peaks were called with MACS2 v2.1.1 [77] using the WT sample with an effective genome size of 9.6E7 and default mfold bounds [5–50] except for H3K27me1 where mfold bounds were broadened [3–50] to allow model building. Narrow peaks were further filtered to retain only peaks with at least two-times more coverage relative to control input DNA or H3. Average metaplots and file manipulations were performed with deepTools v3.1.2 [78] and bedtools v2.26.0 [79].

Publicly available ChIP-seq data for H3, H3K27me1 and H3K9me2 in *atxr5/6* mutants (GSM3040049- GSM3040052, GSM3040059, GSM3040060, GSM3040062, GSM3040063,

GSM3040069-GSM3040072 [43]) were re-analyzed similarly except that read count was normalized to the H3 signal. In Fig. 2c, normalization was restricted to library size to allow comparison of *pol2a-12* and *atxr5/6* data. Replicates were averaged for data representation.

#### Nuclei isolation and microscopy

Rosette leaves were fixed in 4% (v/v) formaldehyde 10 mM Tris-HCl for a minimum of 1 h at room temperature, then rinsed in water, and dried and chopped with a razor blade in 150  $\mu$ l of extraction buffer from the CyStain UV Precise P kit (Partec) in a petri dish. Tissues were passed through a 30- $\mu$ m filter to isolate nuclei and kept on ice. The procedure was repeated by adding 250  $\mu$ l of extraction buffer to the petri dish. After 2 min on ice, 10–15  $\mu$ l of nucleus extract were supplemented with an equal volume of 60% acetic acid on a slide and stirred continuously with fine forceps on a 45 °C metal plate for 3 min, 60% acetic acid was added again and stirred for 3 min. The plate was cleared with an excess of an ethanol/acetic acid solution (3:1), air-dried and mounted with DAPI in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Nuclei were visualized on a Zeiss Axio Imager Z1 epifluorescence microscope equipped with a PL Apochromat 100X/1.40 oil objective and images were captured with a Zeiss AxioCam MRm camera using the Zeiss ZEN software. The number of DAPI-stained foci and their area relative to that of the entire nucleus was calculated with the ImageJ software to evaluate the number of chromocenters per nucleus and the relative chromocenter area, respectively. The relative heterochromatin fraction was computed for each nucleus by calculating the ratio of the signal intensity at chromocenters over that of the entire nucleus. Immunocytology and fluorescent in situ hybridization were performed as previously described [35].

Immunolocalization of  $\gamma$ -H2A.X was performed as described previously [80].  $\gamma$ -H2A.X foci were counted by using IMARIS 7.6 software and spot detection method.

#### Bisulfite sequencing (BS-seq)

Genomic DNA was extracted from 13-day-old seedlings with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), following the manufacturer's instructions. Sodium bisulfite conversion, library preparation, and sequencing on a HiSeq 2000 or a HiSeq4000 were performed at the Beijing Genomics Institute (Hong Kong) from one microgram of DNA, producing ~27–69 M 101-bp paired-end reads (see Additional file 2: Table S4). Our analysis also included publicly available BS-seq datasets for the following mutants: 1st generation *fas2-4* (GSM2800760, GSM2800761 [47]), *pold2* (GSM2090064, GSM2090065 [16, 17]), *atxr5/6* (GSM3038964, GSM3038965, GSM2060541, GSM2060542 [11, 43]), *ddb2-3* (GSM2031992, GSM2031993 [81]), *mail1* (ERR1593765-ERR1593768, [35]), and *rpa2a* and *bru1* (GSM981048, GSM980999, GSM980986 [22]).

Reads were filtered to remove PCR duplicates, using a custom program that considered a read pair duplicated if both reads from a pair were identical to both reads of another read pair. Libraries were mapped to TAIR10 with BS-Seeker2 v2.1.5 [82] using Bowtie2 with 4% mismatches and methylation values were called from uniquely mapped reads. Only cytosines with a minimum coverage of 6 reads were retained. We used a previously described method to detect DMPs and DMRs [35], with minimum

methylation differences after smoothing of 0.4, 0.2, and 0.1 respectively for the CG, CHG, and CHH contexts. To calculate average methylation levels at specific regions, we first determined the methylation rate of individual cytosines and extracted the average methylation rate of all cytosines in the region.

#### Flow cytometry

Nuclei extraction and flow cytometry profiling were performed as described in [35].

#### sRNA sequencing

Total RNA purified from immature inflorescences was used to generate small RNA libraries (TruSeq small RNA; Illumina), which were sequenced on an Illumina HiSeq 2500 instrument at Fasteris S.A. (Geneva, Switzerland) generating 22–30 M 50-bp single end reads. Reads were post-filtered for 18–26-nt insert size, leaving ~12–15 M reads per library (see Additional file 2: Table S4). Reads were mapped to the Arabidopsis TAIR10 genome using TopHat without allowing mismatches. We retained both uniquely mapping reads and multi-mapping reads, the latter being randomly distributed across mapping positions. Read count was normalized to the total amount of 18–26 nucleotide mapping reads within each library.

#### Hydroxyurea treatment

Seeds were sterilized 10 min in calcium hypochlorite (0.4%) with 80% ethanol, washed in 100% ethanol, and dried and sowed on solid Murashige and Skoog medium containing 1% sucrose (w/v). After 3 days of stratification, plants were grown 4 days to allow full germination, and subsequently transferred with sterile forceps onto fresh medium supplemented or not with various concentrations of water-dissolved hydroxyurea (Sigma). Seedlings were then grown for 9 days before collection for molecular analysis.

#### Statistical analysis

Means and standard errors of the mean were calculated from independent biological samples. All analyses were conducted with R version 3.6.1 [83]. All boxplots had whiskers extend to the furthest data point that is less than 1.5-fold interquartile range from the box (Tukey's definition). Differences in mean for RT-qPCR data were tested using a two-sided unpaired Student's *t* test with Welch's correction with the `t.test` function. Kruskal-Wallis rank-sum test was performed with the native `kruskal.test` R function, and Dwass-Steel-Critchlow-Fligner post hoc tests were made using the `pSDCFlig` function with the asymptotic method from the NSM3 package [84].

#### Supplementary Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02190-1>.

**Additional file 1: Figure S1.** Release of transcriptional silencing in three new *pol2a* mutants. **Figure S2.** Contribution of H3K27me3 in POL2A-dependent gene silencing. **Figure S3.** POL2A is required for heterochromatin over-replication in *atr5/6*. **Figure S4.** DNA repeats, H3K27me1 and H3K9me2 at *pol2a-12* chromocenters. **Figure S5.** DNA methylation and H3K9me2 profiles in *pol2a* mutants. **Figure S6.** Comparison of *pol2a* and *fas2* molecular phenotypes. **Figure S7.** Changes in small RNA accumulation in *pol2a* mutants. **Figure S8.** Characterization of *pol2a cmt3* double mutants. **Figure S9.** DNA methylation profiles in mutant and drug contexts of replicative stress. **Figure S10.** Comparison of sequencing replicates.

**Additional file 2: Table S1.** *POL2A* mutant alleles. **Table S2.** Protein-coding genes upregulated in *pol2a-12*, not upregulated in *atxr5/6* and not marked by H3K27me3 ( $n = 174$ ). **Table S3.** List of primers used in this study. **Table S4.** Total read counts and mapping statistics for the sequencing data generated in this study.

**Additional file 3.** Review history.

### Acknowledgements

We thank Yoko Ikeda for help in the initial characterization of *pol2a-12* and Cécile Raynaud (IPS2, Saclay, France) for conceptual input and critical reading of the manuscript.

### Peer review information

Yixin Yao and Kevin Pang were the primary editors of this article and managed its editorial process and peer review in collaboration with the rest of the editorial team.

### Review history

The review history is available as Additional file 3.

### Authors' contributions

Conceptualization: PB TP OM. Data curation: PB TP MEP OM. Formal analysis: PB TP MEP ODI OM. Funding acquisition: CW SEJ MB OM. Investigation: PB TP MNPP AH AGZ LLG MEP MP DL ODI OM. Methodology: PB TP MNPP OM. Project administration: PB OM. Resources: PB TP SEJ MB CW OM. Supervision: OM. Validation: PB TP MNPP MEP OM. Visualization: PB OM. Writing – original draft: PB OM. Writing – review and editing: PB OM. The authors read and approved the final manuscript.

### Funding

This work was supported by CNRS, Inserm, Université Clermont Auvergne, Young Researcher grants from the Auvergne Regional Council (to O.M.), an EMBO Young Investigator award (to O.M.), and a grant from the European Research Council (ERC, I2ST 260742 to O.M.). P.B. was supported by a PhD studentship from the Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche. Work in the Jacobsen lab was supported by NIH grant R35 GM130272. S.E.J. is an investigator of the Howard Hughes Medical Institute. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the European Nucleotide Archive (ENA; <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) repository, under accession numbers E-MTAB-8938-40 and E-MTAB-9046 [85].

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Institute of Genetics Reproduction and Development (iGReD), Université Clermont Auvergne, CNRS, Inserm, F-63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>Present Address: Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Cartuja, Avda, Américo Vespucio, 49, 41092 Sevilla, Spain. <sup>3</sup>Department of Molecular, Cell and Developmental Biology, University of California, Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA. <sup>4</sup>Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, University Paris-Sud, University of Evry, University Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cite, University of Paris-Saclay, Batiment, 630, 91405 Orsay, France. <sup>5</sup>Howard Hughes Medical Institute, University of California, Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA.

Received: 27 May 2020 Accepted: 27 October 2020

Published online: 25 November 2020

### References

- Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(9):519–32.
- Zemach A, Kim MY, Hsieh P-H, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, et al. The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell.* 2013;153(1):193–205.
- Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, et al. Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(1):64–72.
- Raynaud C, Sozzani R, Glab N, Domenichini S, Perennes C, Cella R, et al. Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in Arabidopsis. *Plant J.* 2006;47(3):395–407.
- Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, et al. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(7):763–8.
- Yelagandula R, Stroud H, Holec S, Zhou K, Feng S, Zhong X, et al. The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in Arabidopsis. *Cell.* 2014;158(1):98–109.

7. Rigal M, Mathieu O. A "mille-feuille" of silencing: epigenetic control of transposable elements. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2011 Aug;1809(8):452–8.
8. Fransz P, ten Hoopen R, Tessoro F. Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosom Res.* 2006 Feb 3;14(1):71–82.
9. Soppe WJJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Huang MS, et al. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 2002;21(23):6549–59.
10. Feng W, Hale CJ, Over RS, Cokus SJ, Jacobsen SE, Michaels SD. Large-scale heterochromatin remodeling linked to overreplication-associated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(2):406–11.
11. Hale CJ, Potok ME, Lopez J, Do T, Liu A, Gallego-Bartolome J, et al. Identification of multiple proteins coupling transcriptional gene silencing to genome stability in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genet.* 2016;12(6):e1006092.
12. Stroud H, Hale CJ, Feng S, Caro E, Jacob Y, Michaels SD, et al. DNA methyltransferases are required to induce heterochromatic re-replication in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002808.
13. Kapoor A, Agarwal M, Andreucci A, Zheng X, Gong Z, Hasegawa PM, et al. Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA- methylation-independent manner in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 2005; 15(21):1912–8.
14. Liu J, Ren X, Yin H, Wang Y, Xia R, Wang Y, et al. Mutation in the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$  influences transcriptional gene silencing and homologous recombination in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2009;61(1):36–45.
15. Yin H, Zhang X, Liu J, Wang Y, He J, Yang T, et al. Epigenetic regulation, somatic homologous recombination, and abscisic acid signaling are influenced by DNA polymerase epsilon mutation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2009;21(2):386–402.
16. Zhang J, Xie S, Zhu J-K, Gong Z. Requirement for flap endonuclease 1 ( FEN1) to maintain genomic stability and transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2016;87(6):629–40.
17. Zhang J, Xie S, Cheng J, Lai J, Zhu J-K, Gong Z. The second subunit of DNA polymerase delta is required for genomic stability and epigenetic regulation. *Plant Physiol.* 2016;171(2):1192–208.
18. Takeda S, Tadele Z, Hofmann I, Probst AV, Angelis KJ, Kaya H, et al. BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2004;18(7):782–93.
19. Elmayan T, Proux F, Vaucheret H. *Arabidopsis* RPA2: a genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr Biol.* 2005;15(21):1919–25.
20. Liu Q, Wang J, Miki D, Xia R, Yu W, He J, et al. DNA replication factor C1 mediates genomic stability and transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2010 Jul;22(7):2336–52.
21. Kirik V, Schrader A, Uhrig JF, Hulskamp M. MIDGET unravels functions of the *Arabidopsis* topoisomerase VI complex in DNA endoreduplication, chromatin condensation, and transcriptional silencing. *Plant Cell.* 2007 Oct;19(10):3100–10.
22. Stroud H, Greenberg MVC, Feng S, Bernatavichute YV, Jacobsen SE. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell.* 2013;152(1–2):352–64.
23. Hyun Y, Yun H, Park K, Ohr H, Lee O, Kim D-H, et al. The catalytic subunit of *Arabidopsis* DNA polymerase  $\alpha$  ensures stable maintenance of histone modification. *Development.* 2013;140(1):156–66.
24. del Olmo I, López JA, Vázquez J, Raynaud C, Piñeiro M, Jarillo JA. *Arabidopsis* DNA polymerase  $\alpha$  recruits components of Polycomb repressor complex to mediate epigenetic gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(12):5597–614.
25. Iglesias FM, Bruera NA, Dergan-Dylon S, Marino-Buslje C, Lorenzi H, Mateos JL, et al. The *Arabidopsis* DNA polymerase  $\delta$  has a role in the deposition of transcriptionally active epigenetic marks, development and flowering. *PLoS Genet.* 2015;11(2):e1004975.
26. Roudier F, Ahmed I, Bérard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, et al. Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 2011;30(10):1928–38.
27. Jahn LJ, Mason B, Brøgger P, Toteva T, Nielsen DK, Thon G. Dependency of heterochromatin domains on replication factors. *G3.* 2018;8(2):477–89.
28. Toteva T, Mason B, Kanoh Y, Brøgger P, Green D, Verhein-Hansen J, et al. Establishment of expression-state boundaries by Rif1 and Taz1 in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(5):1093–8.
29. Natsume T, Tsutsui Y, Sutani T, Dunleavy EM, Pidoux AL, Iwasaki H, et al. A DNA polymerase  $\alpha$  accessory protein, Mcl1, is required for propagation of centromere structures in fission yeast. Aramayo R, editor. *Plos One.* 2008;3(5):e2221.
30. Nikolov I, Taddet A. Linking replication stress with heterochromatin formation. *Chromosoma.* 2016;125(3):523–33.
31. Santos-Pereira JM, Aguilera A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat Rev Genet.* 2015;16(10): 583–97.
32. Morel JB, Mourrain P, Béclin C, Vaucheret H. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 2000;10(24):1591–4.
33. Tittel-Elmer M, Bucher E, Broger L, Mathieu O, Paszkowski J, Vaillant I. Stress-induced activation of heterochromatic transcription. Barsh GS, editor. *Plos Genet.* 2010;6(10):e1001175.
34. Bourguet P, de Bossoreille S, López-González L, Pouch-Péllissier M-N, Gómez-Zambrano Á, Devert A, et al. A role for MED14 and UVH6 in heterochromatin transcription upon destabilization of silencing. *Life Sci Alliance.* 2018;1(6): e201800197.
35. Ikeda Y, Péllissier T, Bourguet P, Becker C, Pouch-Péllissier M-N, Pogorelcnik R, et al. *Arabidopsis* proteins with a transposon-related domain act in gene silencing. *Nat Commun.* 2017;8:15122.
36. del Olmo I, López-González L, Martín-Trillo MM, Martínez-Zapater JM, Piñeiro M, Jarillo JA. EARLY IN SHORT DAYS 7 (ESD7) encodes the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon and is required for flowering repression through a mechanism involving epigenetic gene silencing. *Plant J.* 2010;61(4):623–36.
37. Burgers PMJ, Kunkel TA. Eukaryotic DNA replication fork. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20;86(1):417–38.
38. Han Y-F, Huang H-W, Li L, Cai T, Chen S, He X-J. The cytosolic iron-sulfur cluster assembly protein MMS19 regulates transcriptional gene silencing, DNA repair, and flowering time in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129137.
39. Wang H, Liu C, Cheng J, Liu J, Zhang L, He C, et al. *Arabidopsis* flower and embryo developmental genes are repressed in seedlings by different combinations of polycomb group proteins in association with distinct sets of cis-regulatory elements. Colot V, editor. *Plos Genet.* 2016 12(1):e1005771.
40. Yang Z, Qian S, Scheid RN, Lu L, Chen X, Liu R, Du X, Lv X, Boersma MD, Scalf M, Smith LM, Denu JM, Du J, Zhong X. EBS is a bivalent histone reader that regulates floral phase transition in *Arabidopsis*. *Nat Genet.* 2018;50(9):1247–53.

41. Pedroza-García J-A, Mazubert C, del Olmo I, Bourge M, Domenichini S, Bounon R, et al. Function of the plant DNA polymerase epsilon in replicative stress sensing, a genetic analysis. *Plant Physiol.* 2017;173(3):1735–49.
42. Jacob Y, Stroud H, LeBlanc C, Feng S, Zhuo L, Caro E, et al. Regulation of heterochromatic DNA replication by histone H3 lysine 27 methyltransferases. *Nature.* 2010;466(7309):987–91.
43. Ma Z, Castillo-González C, Wang Z, Sun D, Hu X, Shen X, et al. *Arabidopsis* serrate coordinates histone methyltransferases ATXR5/6 and RNA processing factor RDR6 to regulate transposon expression. *Dev Cell.* 2018;45(6):769–784.e6.
44. Osakabe A, Lorković ZJ, Kobayashi W, Tachiwana H, Yelagandula R, Kurumizaka H, et al. Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(15):7675–85.
45. Gouil Q, Baulcombe DC. DNA methylation signatures of the plant chromomethyltransferases. Mittelsten Scheid O, editor. *Plos Genet.* 2016 12(12):e1006526.
46. Kaya H, Shibahara K, Taoka K, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell.* 2001;104(1):131–42.
47. Mozgová I, Wildhaber T, Trejo-Arellano MS, Fajkus J, Roszak P, Köhler C, et al. Transgenerational phenotype aggravation in CAF-1 mutants reveals parent-of-origin specific epigenetic inheritance. *New Phytol.* 2018;220(3):908–21.
48. Schönrock N, Exner V, Probst A, Gruissem W, Hennig L. Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2006;281(14):9560–8.
49. Exner V, Taranto P, Schonrock N, Gruissem W, Hennig L. Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Development.* 2006 Oct 4;133(21):4163–72.
50. Ühlken C, Horvath B, Stadler R, Sauer N, Weingartner M. MAIN-LIKE1 is a crucial factor for correct cell division and differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2014;78(1):107–20.
51. Wenig U, Meyer S, Stadler R, Fischer S, Werner D, Lauter A, et al. Identification of MAIN, a factor involved in genome stability in the meristems of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2013 Aug;75(3):469–83.
52. Singh A, Xu Y-J. The cell killing mechanisms of Hydroxyurea. *Genes (Basel).* 2016 Nov 17;7(11):99.
53. Técher H, Koundrioukoff S, Nicolas A, Debatisse M. The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat Rev Genet.* 2017. Rev Genet. 2017;18(9):535–50.
54. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(12):957–67.
55. Iyer D, Rhind N. The intra-S checkpoint responses to DNA damage. *Genes (Basel).* 2017;8(2):74.
56. Talbert PB, Henikoff S. Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(4):264–75.
57. Stroud H, Otero S, Desvoyes B, Ramirez-Parra E, Jacobsen SE, Gutierrez C. Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(14):5370–5375.
58. Wollmann H, Holec S, Alden K, Clarke ND, Jacques P-É, Berger F. Dynamic deposition of histone variant H3.3 accompanies developmental remodeling of the *Arabidopsis* transcriptome. Kakutani T, editor. *Plos Genet.* 2012 8(5):e1002658.
59. Wollmann H, Stroud H, Yelagandula R, Tarutani Y, Jiang D, Jing L, et al. The histone H3 variant H3.3 regulates gene body DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* 2017;18(1):94.
60. Lyons DB, Zilberman D. DDM1 and Lsh remodelers allow methylation of DNA wrapped in nucleosomes. *Elife.* 2017;6:e30674.
61. Otero S, Desvoyes B, Peiro R, Gutierrez C. Histone H3 dynamics reveal domains with distinct proliferation potential in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell.* 2016;28(6):1361–71.
62. Benoit M, Simon L, Desset S, Duc C, Cotterell S, Poulet A, et al. Replication-coupled histone H3.1 deposition determines nucleosome composition and heterochromatin dynamics during *Arabidopsis* seedling development. *New Phytol.* 2019; 221(1):385–98.
63. Du J, Zhong X, Bernatavichute YV, Stroud H, Feng S, Caro E, et al. Dual Binding of Chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell.* 2012;151(1):167–80.
64. Jenik PD, Jurkuta REJ, Barton MK. Interactions between the cell cycle and embryonic patterning in *Arabidopsis* uncovered by a mutation in DNA polymerase epsilon. *Plant Cell.* 2005;17(12):3362–77.
65. Jasencakova Z, Scharf AND, Ask K, Corpet A, Imhof A, Almouzni G, et al. Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Mol Cell.* 2010 Mar;37(5):736–43.
66. Zaratiegui M. Cross-regulation between transposable elements and host DNA replication. *Viruses.* 2017;9(3):57.
67. Lippman Z, Gendrel A-V, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, Richard McCombie W, et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature.* 2004 Jul 22;430(6998):471–6.
68. Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen H, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell.* 2006;126(6):1189–201.
69. Choi J, Lyons DB, Kim MY, Moore JD, Zilberman D. DNA Methylation and Histone H1 Jointly Repress Transposable Elements and Aberrant Intragenic Transcripts. *Mol Cell.* 2020;77(2):310–323.e7.
70. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D419–26.
71. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21.
72. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923–30.
73. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
74. Bernatavichute YV, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE. Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One.* 2008;3(9):e3156.
75. Gendrel AV, Lippman Z, Martienssen R, Colot V. Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat Methods.* 2005;2(3):213–8.
76. Jégu T, Veluchamy A, Ramirez-Prado JS, Rizzi-Paillet C, Perez M, Lhomme A, et al. The *Arabidopsis* SWI/SNF protein BAF60 mediates seedling growth control by modulating DNA accessibility. *Genome Biol.* 2017;18(1):114.

77. Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS. Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat Protoc.* 2012;7(9):1728–40.
78. Ramírez F, Dündar F, Diehl S, Grüning BA, Manke T. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(W1):W187–91.
79. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841–2.
80. Charbonnel C, Gallego ME, White CI. Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in Arabidopsis plants. *Plant J.* 2010;64(2):280–90.
81. Schalk C, Drevensek S, Kramdi A, Kassam M, Ahmed I, Cognat V, Graindorge S, Bergdoll M, Baumberger N, Heintz D, Bowler C, Genschik P, Barneche F, Colot V, Molinier J. DNA DAMAGE BINDING PROTEIN2 Shapes the DNA Methylation Landscape. *Plant Cell.* 2016;28(9):2043–59.
82. Guo W, Fizev P, Yan W, Cokus S, Sun X, Zhang MQ, Chen PY, Pellegrini M. BS-Seeker2: a versatile aligning pipeline for bisulfite sequencing data. *BMC Genomics.* 2013;14:774.
83. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna URL <http://www.R-project.org/>; R Found Stat Comput; 2019.
84. Schneider G, Chicken E, Becvarik R. NSM3: functions and datasets to accompany Hollander, Wolfe, and Chicken - nonparametric statistical methods, Third Edition. R package version 1.12; 2018.
85. Bourguet P, Mathieu O. DNA polymerase epsilon is required for heterochromatin maintenance in Arabidopsis. E-MTAB-8938, E-MTAB-8939, E-MTAB-8940, E-MTAB-9046. *ArrayExpress.* 2020. <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>. Accessed 18 Oct 2020.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





## **Additional file 1**

### **Table of contents**

**Figure S1.** Release of transcriptional silencing in three new *pol2a* mutants.

**Figure S2.** Contribution of H3K27me3 in POL2A-dependent gene silencing.

**Figure S3.** POL2A is required for heterochromatin over-replication in *atxr5/6*.

**Figure S4.** DNA repeats, H3K27me1 and H3K9me2 at *pol2a-12* chromocenters.

**Figure S5.** DNA methylation and H3K9me2 profiles in *pol2a* mutants.

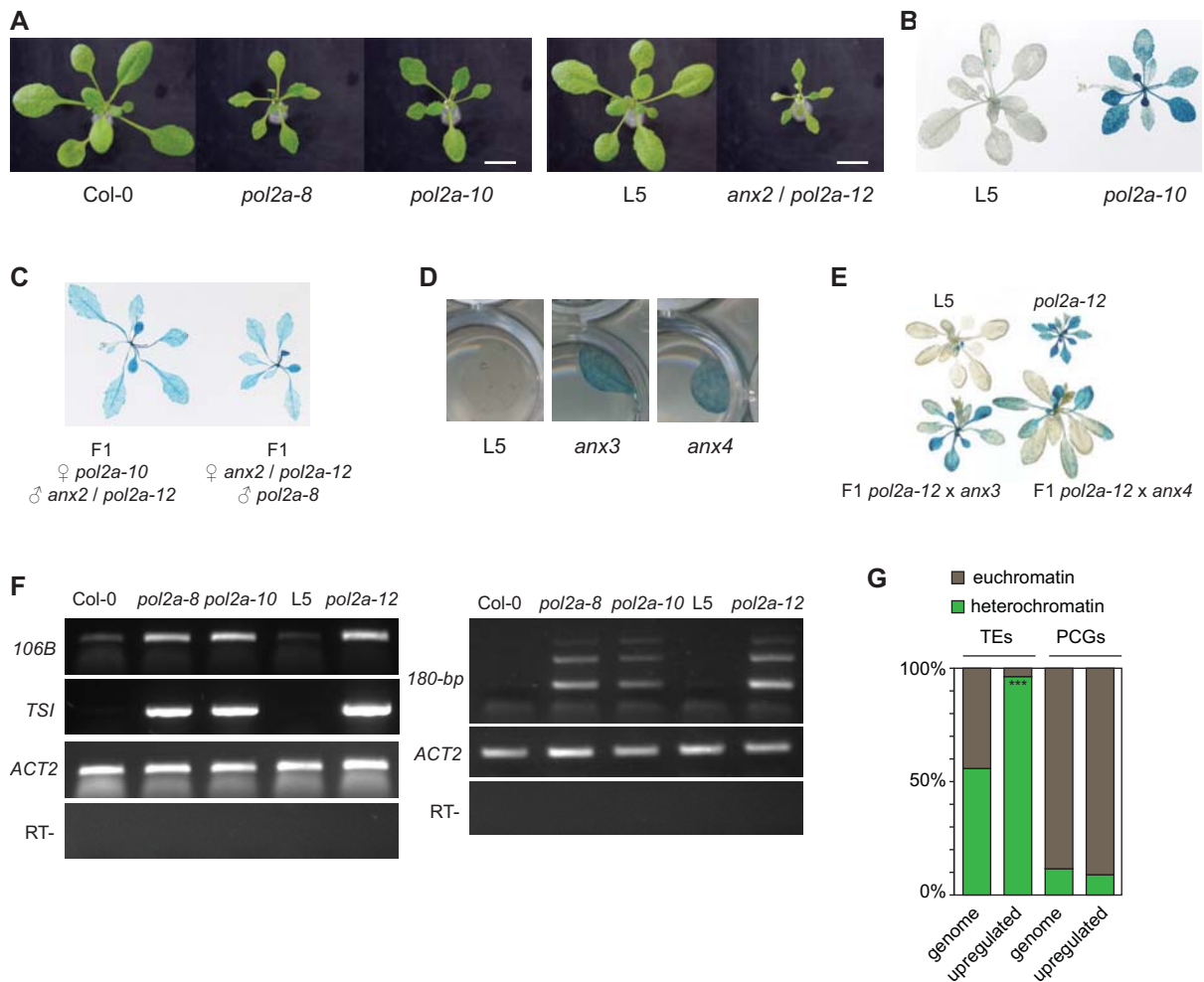
**Figure S6.** Comparison of *pol2a* and *fas2* molecular phenotypes.

**Figure S7.** Changes in small RNA accumulation in *pol2a* mutants.

**Figure S8.** Characterization of *pol2a cmt3* double mutants.

**Figure S9.** DNA methylation profiles in mutant and drug contexts of replicative stress.

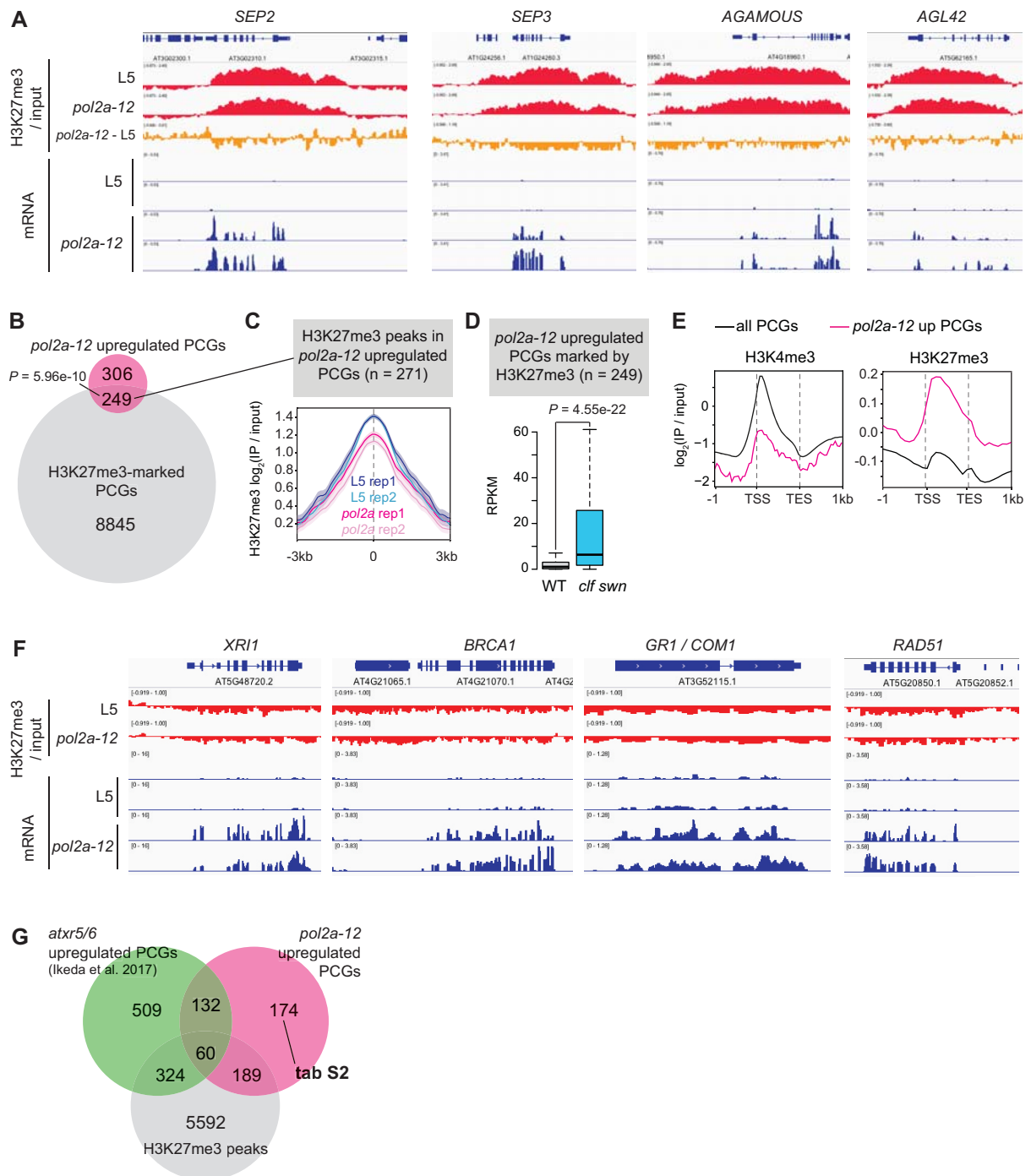
**Figure S10.** Comparison of sequencing replicates.



**Figure 1. Release of transcriptional silencing in three new *pol2a* mutants**

**A** Photos of 16-d-old L5 and *pol2a* mutant plants. Scale bar: 1cm. **B** L5-GUS transgene activity detected by X-Gluc histochemical staining in 3-week-old L5 and *pol2a-10* plants. **C-E** L5-GUS transgene activity detected by X-Gluc histochemical staining in crosses between *anx2* (*pol2a-12*) and *pol2a* mutant alleles (**C**), in *anx3* and *anx4* mutants (**D**) and in crosses between *pol2a-12*, *anx3* and *anx4* mutant alleles (**E**). The positions of punctual mutations are shown in figure 1C. **F** Transcript accumulation at endogenous repeats detected by RT-PCR. *ACTIN2* amplification is shown as a loading control. For each target, amplification in the absence of reverse transcription (RT-) was performed to control for genomic DNA contamination and one representative picture is shown. 180-bp repeats were amplified from RNAs that went through an extra round of DNase treatment, to ensure proper transcript quantification. The images are

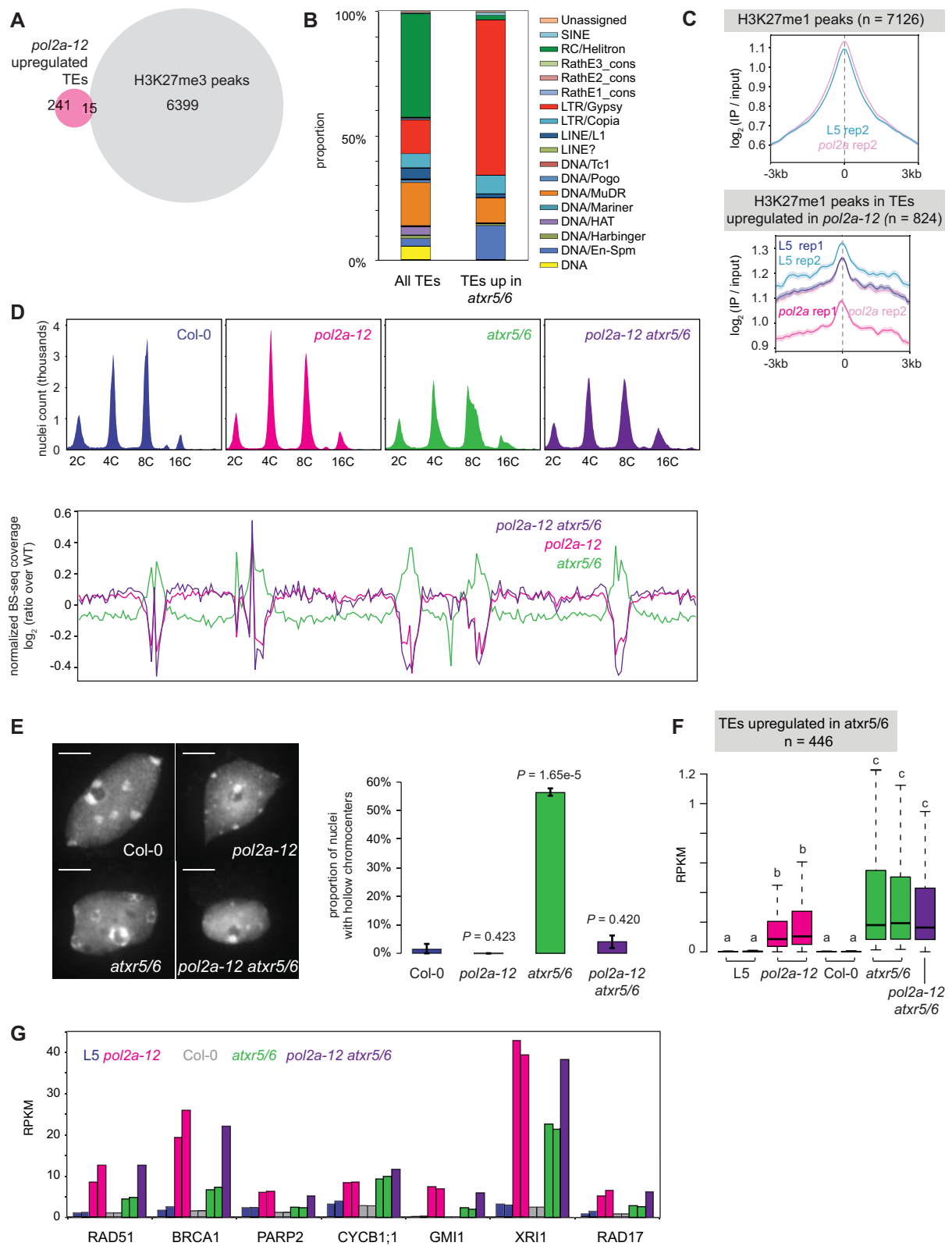
representatives of three biological replicates. **G** Distribution of PCGs and TEs upregulated in *pol2a-12* between euchromatin and constitutive heterochromatin. Heterochromatin comprises pericentromeres and chromosome 4 heterochromatic knob according to Bernatavichute et al. (2008). Asterisks mark statistically significant deviations from the genomic distribution (\*\*\*) :  $Z = -6.86$ ,  $P < 10^{-5}$ ; ns : not significant ( $P > 0.05$ )).



**Figure S2. Contribution of H3K27me3 in POL2A-dependent gene silencing**

**A** H3K27me3 enrichment (red,  $\log_2$  signal over input) and mRNA profiles (blue, RPM) at *SEP2*, *SEP3*, *AGAMOUS* and *AGL42* in L5 and *pol2a-12*. Two replicates are shown for mRNA-seq data. **B** Venn diagrams showing the proportion of PCGs upregulated in *pol2a-12* that are marked by at least one H3K27me3 peak. PCG coordinates were extended one kilobase upstream. The proportion of genes marked by H3K27me3 among *pol2a-12* upregulated PCGs

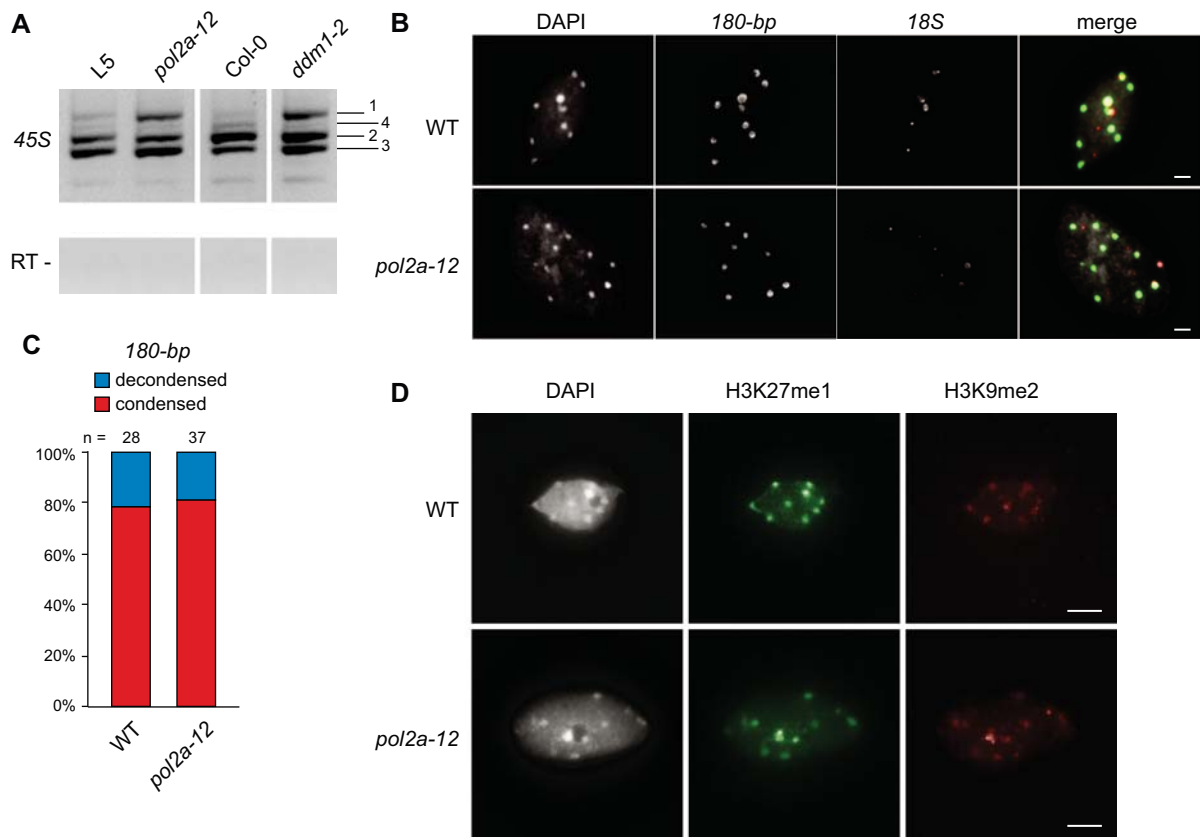
is significantly higher than the proportion expected by chance (hypergeometric test,  $P = 5.96 \times 10^{-10}$ ). **C** Metaplots showing average H3K27me3 enrichment ( $\log_2$  signal over input) in L5 and *pol2a-12* at H3K27me3 peaks found in *pol2a-12* upregulated PCGs that are overlapped by at least one H3K27me3 peak. Shaded areas show standard deviation. Two replicates are shown. **D** Transcript accumulation in reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) at H3K27me3-marked PCGs that are upregulated in *pol2a-12*, in WT plants and *curly leaf swinger* (*clf swn*) double mutants (raw data from 39). The  $P$ -value from a two-sided unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test is indicated. **E** Metaplots of normalized CHIP-seq signal ( $\log_2$  signal over input) for H3K27me3 (this study) and H3K4me3 (GSM4275144) in WT plants over *pol2a-12* upregulated PCGs and all PCGs. **F** H3K27me3 enrichment and mRNA profiles at *RAD51*, *BRCA1*, *GR1/COM1* and *XRI1* in L5 and *pol2a-12* shown as in A. **G** Venn diagrams showing the overlap between PCGs upregulated in *pol2a-12* and *atxr5/6* (data from Ikeda et al. 2017), also showing the proportion of these genes that are overlapped by at least one H3K27me3 peak. PCG coordinates were extended one kilobase upstream.



**Figure S3. POL2A is required for heterochromatin over-replication in *atxr5/6***

**A** Venn diagrams showing the proportion of TEs upregulated in *pol2a-12* that are overlapped by at least one H3K27me3 peak. TE annotation coordinates were extended one kilobase

upstream. **B** Proportion of TE superfamilies among TEs upregulated in *atxr5/6* (data from Ikeda et al. 2017), with proportion from all TEs shown for comparison. **C** Metaplots showing H3K27me1 enrichment ( $\log_2$  signal over input) in L5 and *pol2a-12* at all H3K27me1 peaks (top) or at peaks found in *pol2a-12* upregulated TEs (bottom). Up to two replicates are shown. Shaded areas show standard deviation. TE coordinates were extended one kilobase upstream. **D** (top) Flow cytometry profiles generated with DAPI-stained nuclei extracted from rosette leaves of the indicated genotypes. Ploidy levels are indicated below peaks. (bottom)  $\log_2$  ratios of BS-seq coverage in reads per million (RPM) in the indicated mutants normalized to their corresponding WT sample. Mean coverage was computed over non-overlapping 500 kb bins along the five *Arabidopsis* chromosomes. **E** (left) Representative DAPI-stained nuclei extracted from rosette leaves of the indicated genotypes. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (right) Average proportion of nuclei with hollow chromocenters. Error bars represent standard error of the mean across three biological replicates. The *P*-value from an unpaired two-sided Student's *t*-test comparing each mutant with the WT is indicated. Heighty four to heighty height nuclei were analyzed for each replicate. **F** Transcript accumulation in reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) at TEs upregulated in *atxr5/6* in indicated genotypes. The effect of genotype was verified with a Kruskal-Wallis rank sum test. Significant differences between groups were evaluated by a Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner test and are indicated by lowercase letters ( $P < 0.05$ ). Two biological replicates are shown for each genotype, except for *pol2a atxr5/6* where one sample was analyzed. **G** Transcript accumulation in reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) at genes involved in the DNA damage response.



**Figure S4. DNA repeats, H3K27me1 and H3K9me2 at *pol2a-12* chromocenters**

**A** RT-PCR analysis of the 3' transcribed region of 45S rDNA repeats on flowers of the indicated genotypes. Variants are indicated next to the gel. A PCR amplification without reverse transcription (RT-) was performed to control for genomic DNA contamination. Data is representative of three biological replicates. **B** Representative images showing DAPI-stained interphase nuclei from WT and *pol2a-12* hybridized with a probe for 180-bp and 18S rDNA repeats. Scale bar: 5  $\mu$ m. **C** Proportion of nuclei identified as condensed or decondensed in WT and *pol2a-12*. No significant difference between the two genotypes was detected using a two-proportions Z-test ( $P > 0.05$ ). **D** Distribution of H3K27me1 and H3K9me2 detected by immunofluorescence in interphase nuclei from WT and *pol2a-12* rosette leaves. Scale bar: 5  $\mu$ m.



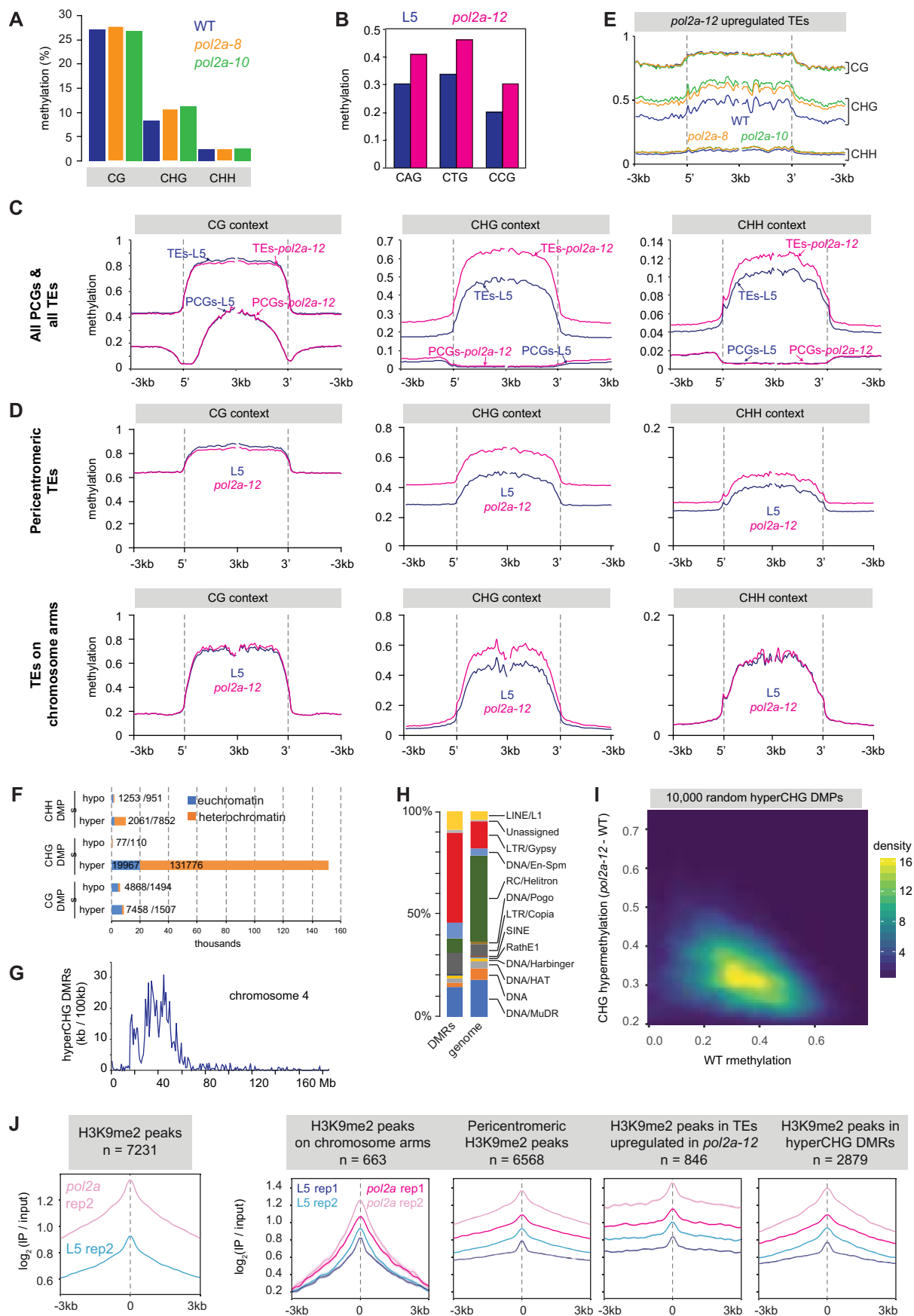
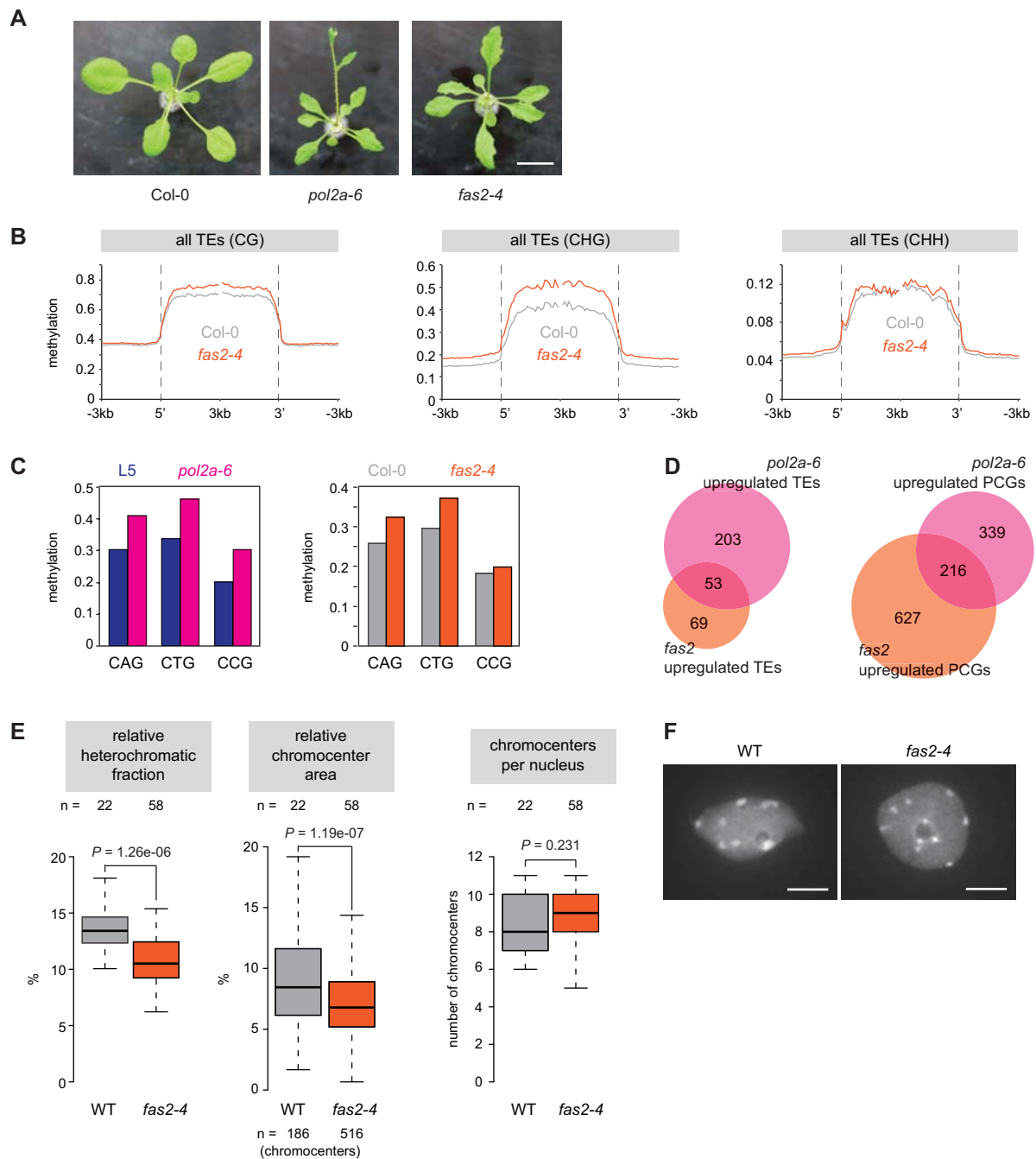


Figure S5. DNA methylation and H3K9me2 profiles in *pol2a* mutants

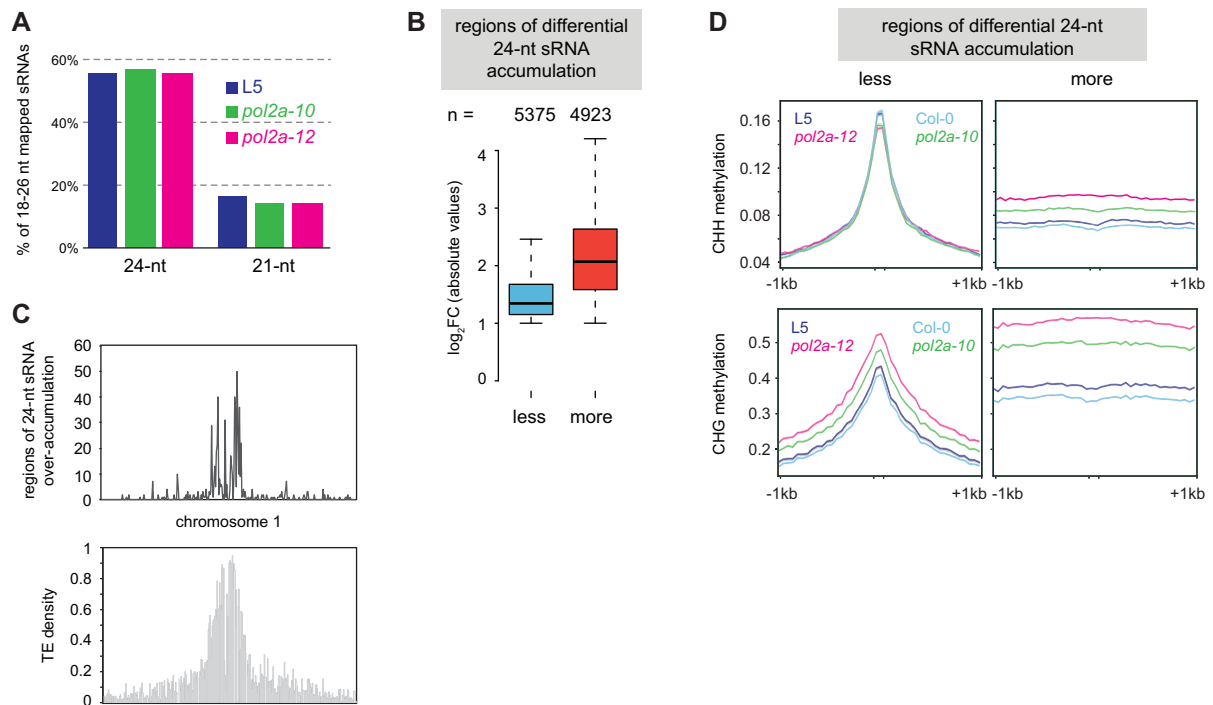
**A** Average methylation rates in CG, CHG and CHH contexts in Col-0 and *pol2a* mutants. **B** Average methylation levels in CHG subcontexts in L5 and *pol2a-12*. For each subcontext, positions unmethylated in both the WT and mutant samples were excluded. **C-D** Metaplots showing methylation rates in CG, CHG and CHH contexts in L5 and *pol2a-12* at TEs and PCGs. Annotations were aligned to their 5' or 3' end and average methylation was calculated for each 100-bp bin from 3 kb upstream to 3 kb downstream. In D, heterochromatic and euchromatic TEs were separated based on their genomic location (see methods). **E** Metaplots showing methylation levels at TEs upregulated in *pol2a-12*. **F** Differentially methylated positions (DMPs) identified in *pol2a-12* (see methods). DMPs were further sorted between euchromatin and heterochromatin based on their genomic location. **G** Distribution of *pol2a-12* hyper-CHG DMRs per consecutive non-overlapping 100 kb bins of chromosome 4, showing high proportion in heterochromatic regions. **H** Proportion of TE superfamilies among TEs intersected by *pol2a-12* hyper-CHG DMRs, with proportion for all TEs shown for comparison. **I** CHG hypermethylation in *pol2a-12* plotted against WT methylation levels shown for 10,000 random hyper-CHG DMPs. **J** Metaplots showing average H3K9me2 enrichment ( $\log_2$  signal over input) in L5 and *pol2a-12* at all H3K9me2 peaks (left) or at peaks located either in euchromatin, heterochromatin, intersecting *pol2a-12* upregulated TEs or *pol2a-12* hyper-CHG DMRs. Shaded areas show standard deviation.



**Figure S6. Comparison of *pol2a* and *fas2* molecular phenotypes**

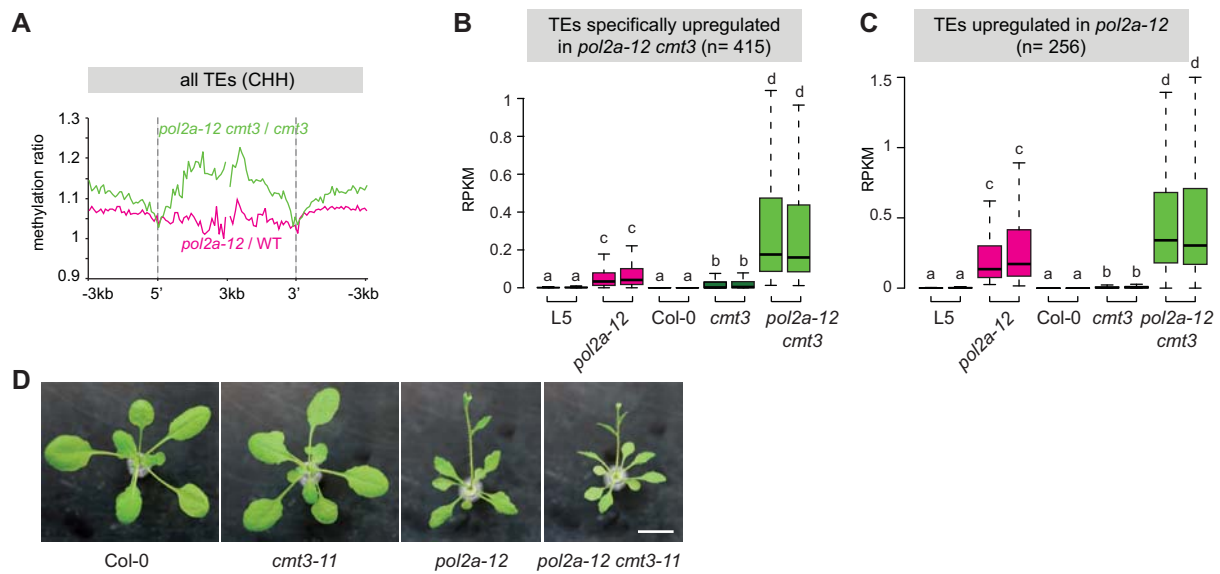
**A** Photos of 21-d-old plants. Scale bar: 1cm. **B** Metaplots showing methylation rates in CG, CHG and CHH contexts in *fas2-4* mutants at all TEs (data from Mozgova et al. 2018). Annotations were aligned to their 5' or 3' end and average methylation was calculated for each 100-bp bin from 3 kb upstream to 3 kb downstream. **C** Average methylation levels in CHG subcontexts in the indicated samples, excluding positions unmethylated in both the WT and mutant samples in each comparison. **D** Venn diagrams showing the overlap between TEs and

PCGs upregulated in *pol2a-12* and *fas2-4*. **E** Relative heterochromatic fraction (left), area of chromocenters normalized to the entire nucleus area (middle) and number of chromocenters per nucleus (right) quantified on DAPI-stained nuclei in WT and *fas2-4*. The number of nuclei analyzed is indicated on top. P-values from an unpaired two-sided Student's t-test are indicated. **F** DAPI-stained nuclei extracted from WT and *fas2-4* plants. Scale bar: 5  $\mu$ m.



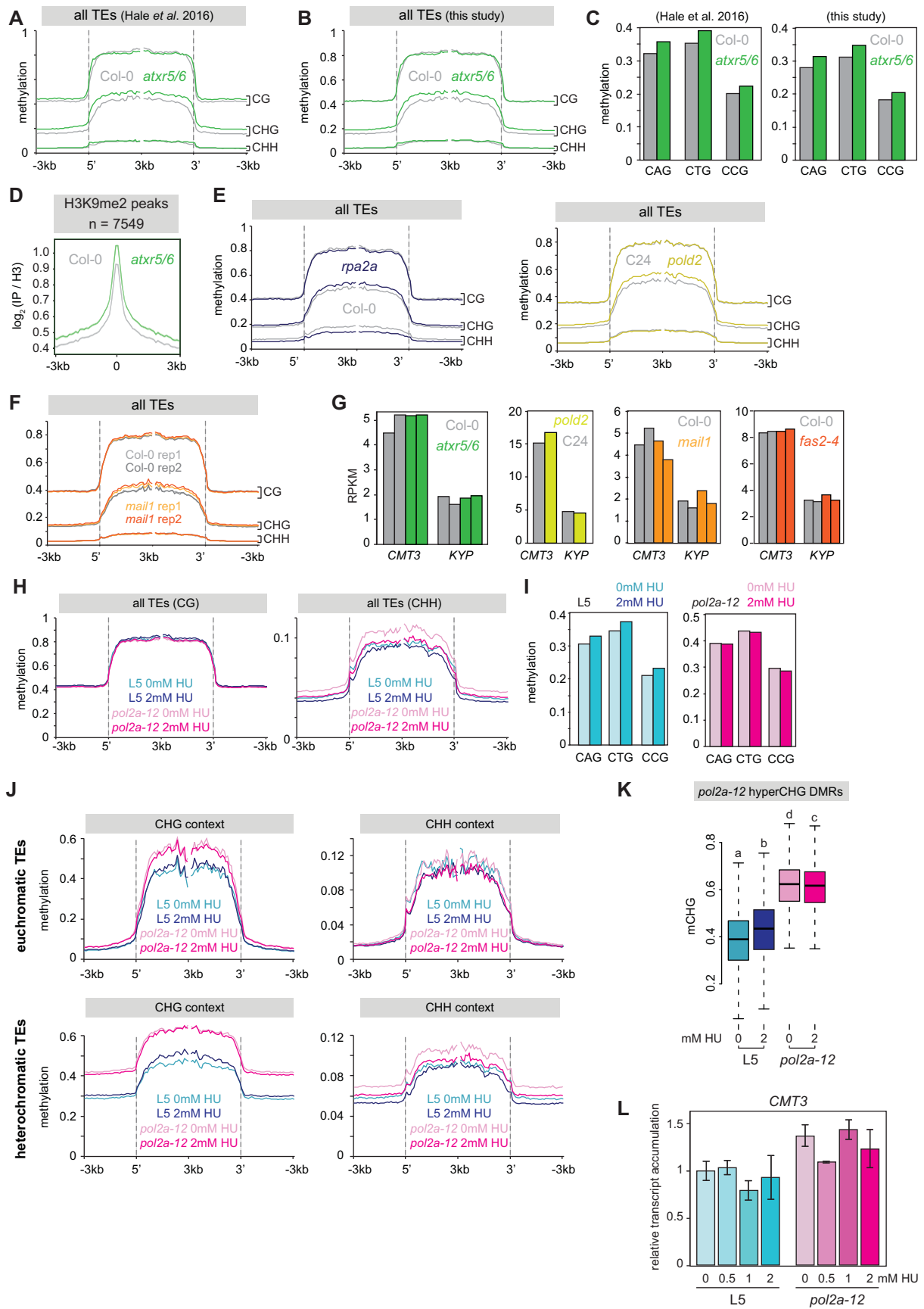
**Figure S7. Changes in small RNA accumulation in *pol2a* mutants**

**A** Overall proportion of 24-nt and 21-nt small RNAs (sRNAs) in L5, *pol2a-10* and *pol2a-12* flowers relative to the total number of mapped 18-26-nt sRNAs for each genotype. **B** Changes in 24-nt sRNA at 100-bp bins with significantly more or less 24-nt sRNAs represented as  $\log_2$  fold change ( $\log_2FC$ ) absolute values relative to L5. The number of regions is shown (top). **C** Number of 100-bp bins associated with 24-nt sRNA over-accumulation in *pol2a-12*, calculated per consecutive non-overlapping 100 kb bins of chromosome 1. TE density (bottom) is the proportion of TE annotations per 100 kb bins, showing the pericentromeric region. **D** Metaplots showing average DNA methylation rates in CHH (top) and CHG (bottom) contexts at 100-bp bins that gain or lose 24-nt sRNAs in *pol2a-12*, calculated for each bin from 1 kb upstream to 1 kb downstream.



**Figure S8. Characterization of *pol2a cmt3* double mutants**

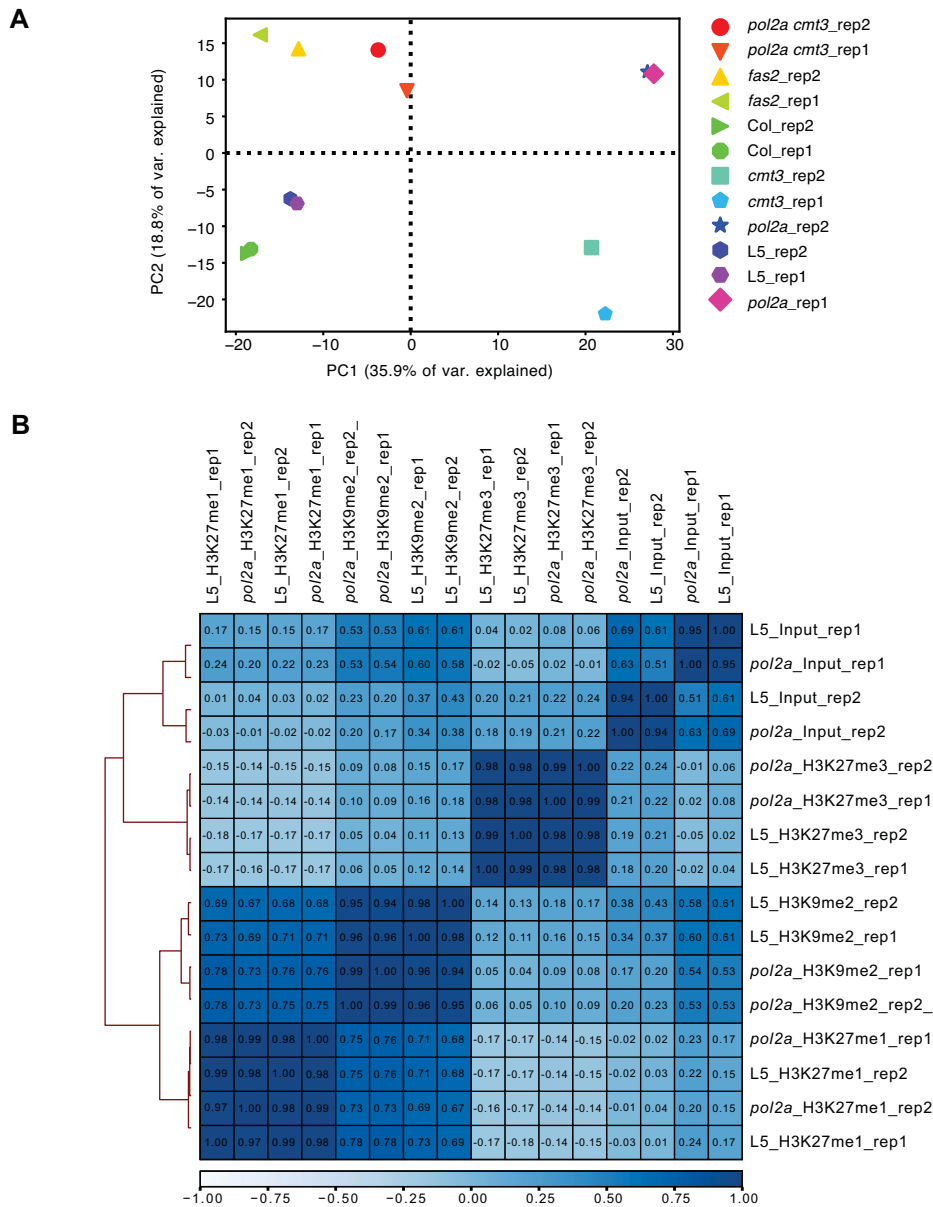
**A** TE methylation changes in CHH context in *pol2a-12* and *pol2a cmt3* normalized to WT and *cmt3*, respectively. Annotations were aligned to their 5' or 3' end and average methylation was calculated for each 100-bp bin from 3 kb upstream to 3 kb downstream. **B-C** Transcript accumulation in reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) in indicated genotypes. The effect of genotype was verified with a Kruskal-Wallis rank sum test. Significant differences between groups were evaluated by a Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner test and are indicated by lowercase letters ( $P < 5e-10$  in B,  $P < 5e-2$  in C). **D** Representative pictures showing 21-day-old plantlets of the indicated genotypes. Scale bar: 1cm.



**Figure S9. DNA methylation profiles in mutant and drug contexts of replicative stress**

**A-B** Metaplots showing methylation rates in different contexts in *atxr5/6* at all TEs. Annotations were aligned to their 5' or 3' end and average methylation was calculated for each 100-bp bin from 3 kb upstream to 3 kb downstream. **C** Average methylation levels in CHG subcontexts in the indicated samples, excluding positions unmethylated in both the WT and mutant samples in each comparison. **D** Metaplots showing H3K9me2 enrichment ( $\log_2$  signal over H3) in WT and *atxr5/6* at H3K9me2 peaks. Shaded areas show standard deviation. Data from Ma et al. (2018). **E-F** Metaplots showing TE methylation in (**E**) *rpa2a* (Stroud et al. 2013), *pold2* (Zhang et al. 2016) and (**F**) *mail1* (Ikeda et al. 2017), represented as in A. **G** Transcript accumulation in reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) for *CMT3* and *KYP* in *atxr5/6* and *mail1* (Ikeda et al. 2017), *pold2* (Zhang et al. 2016) and *fas2-4* (this study). **H** Metaplots showing TE methylation in L5 and *pol2a-12* treated or not with hydroxyurea (HU), represented as in A. **I** Average methylation levels in CHG subcontexts in the indicated samples, as in C. **J** Metaplots showing CHG and CHH methylation in the indicated samples at heterochromatic or euchromatic TEs (based on chromosomal location). **K** CHG methylation rates at *pol2a-12* hyperCHG DMRs in the indicated samples. We used a Kruskal-Wallis rank sum test followed by a Dwass-Steel-Crichtlow-Fligner test. Differences between groups are indicated by lowercase letters ( $P < 4e-06$ ). **L** Transcript accumulation at *CMT3* analyzed by RT-qPCR in L5 and *pol2a-12* seedlings treated with various concentrations of HU, normalized to the *ACTIN2* gene with L5 0mM HU set to 1. No statistically significant differences were detected (two-sided unpaired Student's t-test,  $P > 0.05$ ). Error bars represent standard error of the mean across three biological replicates.





**Figure S10. Comparison of sequencing replicates**

**A.** Principal component analysis of normalized gene read counts in RNA-seq replicates used in this study. **B.** Hierarchical heatmap of ChIP-seq replicates based on Pearson correlation coefficients. Colors represent the correlation coefficients that are also indicated in each box. Clusters were constructed using complete linkage.





## RTEL1 intervient dans le silencing transcriptionnel et limite la méthylation ADN hétérochromatique (article en préparation)

---

### 1. Contexte

L'équipe ainsi que d'autres laboratoires ont identifiés plusieurs facteurs de TGS qui assurent leurs fonctions indépendamment de la méthylation ADN (Amedeo et al., 2000; Bourguet et al., 2020; Elmayan et al., 2005; Ikeda et al., 2017; Kapoor et al., 2005; Moissiard et al., 2012; Takeda et al., 2003; Vaillant et al., 2006; Zhang et al., 2016a). Ces voies étant moins bien comprises que celles faisant intervenir la méthylation ADN, nous avons cherché à identifier de nouveaux acteurs du silencing indépendant de cette marque par une approche de génétique directe. Nous avons donc élaboré un crible sur la population mutante L5, précédemment utilisée, comprenant trois étapes, marquage histochimique, estimation des niveaux de méthylation et analyse de transcrits endogènes. Nous avons isolé de ce crible de nouveaux allèles mutants de *RPA2*, *MOM1*, *POL $\alpha$ 2* et *POL2A* validant ainsi notre approche de criblage. Nous avons également isolé de ce crible cinq mutants présentant une réactivation du transgène GUS sans perte de méthylation ADN et dont les mutations causales sont mono-locus récessives. Les tests alléliques n'ont pas encore permis de confirmer les mutations causales des mutants *p14 15-3*, *p17 11-1*, *p18 14-8* et *p18 14-14* qui ne seront donc pas détaillés dans cette thèse. Je me suis particulièrement intéressée au cinquième mutant issu de ce crible : *p14 12-1*. Ce mutant est caractérisé par une stature réduite et des feuilles pointues rappelant les phénotypes développementaux des mutants *pol2a*. Ce mutant contient une mutation sur le gène codant l'hélicase ADN REGULATOR OF TELOMERE LENGTH 1 (RTEL1), nous l'avons donc renommé *rtel1-3*. Les résultats obtenus au cours de l'étude de cet allèle font l'objet d'un article en cours de préparation.

### 2. Principaux résultats

Par des approches génomiques, nous montrons que RTEL1 joue un rôle dans le silencing transcriptionnel d'un ensemble de gènes et de quelques ETs sans provoquer de perte de méthylation ADN. Au contraire, nous avons détecté une augmentation des niveaux de méthylation ADN en CHG, CHH et dans une moindre mesure, en CG spécifiquement dans les



régions hétérochromatiques. Nous montrons donc que RTEL1 intervient dans le silencing d'un ensemble de cibles à travers un mécanisme encore inconnu qui ne semble pas lié à la méthylation ADN mais RTEL1 joue également un rôle d'inhibiteur de la méthylation ADN. Nos données suggèrent qu'un stress répliatif constitutif ainsi qu'une perturbation du TGS médié par H3K27me3 contribuent aux défauts transcriptionnels dans les mutants *rtell* à travers deux voies au moins partiellement distinctes. Nous avons détecté une baisse de la fraction hétérochromatique dans le mutant *rtell*. Toutefois, les loci dérégulés conservent, dans le mutant *rtell*, une accessibilité proche de celle des plantes sauvages. L'accumulation de transcrits *rtell*-dépendante ne semble donc pas être liée aux défauts de l'organisation de l'hétérochromatine. Des similitudes avec le mutant *fas2-4* ont été observées, notamment une augmentation des niveaux de méthylation CG et un chevauchement significatif des cibles surexprimées dans les deux mutants. Nous montrons également que RTEL1 agit probablement indépendamment de POL2A, MOM1 et de la voie impliquant MAIL1 et MAIN.

### 3. Discussion

Lors de ce projet nous avons isolé et caractérisé un nouvel allèle mutant de *RTEL1* et nous avons montré que RTEL1 est requis pour le silencing d'un ensemble de loci. Plusieurs études réalisées sur des organismes ou cellules différentes montrent que RTEL1 joue un rôle important dans la réparation et la réplication de l'ADN et une déficience en RTEL1 provoque un stress répliatif (Barber et al., 2008; Dorn et al., 2019; Hu et al., 2015; Recker et al., 2014; Röhrig et al., 2016; Uringa et al., 2012; Vannier et al., 2013). Comme pour d'autres mutants du replisome (Bourguet et al., 2020), les défauts transcriptionnels induits par *rtell* pourraient être une conséquence du stress répliatif. Cependant, d'autres analyses seront nécessaires pour identifier le mécanisme par lequel le défaut de propagation de la fourche de réplication induit un défaut d'accumulation des transcrits. Le mutant *rtell-3* présente une hyperméthylation non-CG spécifique de l'hétérochromatine. Ceci ayant été observé dans des contextes de stress répliatif et *rtell* souffrant également de stress répliatif, ce stress pourrait contribuer à l'hyperméthylation non-CG (Bourguet et al., 2020). Dans le double mutant *pol2a cmt3*, le nombre d'ETs réactivé est plus important par rapport aux deux simples mutants (Bourguet et al., 2020). Le stress répliatif pourrait donc induire un signal permettant le recrutement de CMT3 pour méthyler l'ADN et ainsi limiter la transcription de l'hétérochromatine. La résolution d'un stress répliatif semble dépendre de la protéine de liaison à l'ADN simple brin RPA1A qui recrute le remodeleur de la chromatine CHR18 (Han et al., 2018). Les remodeleurs



de la chromatine peuvent jouer un rôle dans la méthylation ADN, c'est le cas de DDM1 et DRD1 (Kanno et al., 2004; Matzke and Mosher, 2014; Zemach et al., 2013). Le recrutement de remodeleurs spécifiques aux sites de stress répliatif pourrait donc rendre la chromatine accessible aux ADN méthyltransférases pour limiter la réactivation transcriptionnelle. L'hyperméthylation spécifiquement en contexte non-CG pourrait être liée à H3K9me2 dont les niveaux sont augmentés dans les mutants de réplication *pol2a*, *pold2* et *fen1* (Bourguet et al., 2020; Zhang et al., 2016b, 2016a). En effet, dans un contexte de stress répliatif, des cellules HeLa accumulent environ trois fois plus d'histones H3.1 marquées H3K9me1 (Jasencakova et al., 2010). Cette marque est déposée sur les nouvelles histones H3.1 avant leur incorporation dans la chromatine et sert de substrat pour la tri-méthylation H3K9me3 (Loyola et al., 2006). Le stress répliatif pourrait donc induire une incorporation plus importante de H3.1K9me1, servant de base pour H3K9me2. La méthylation CHG et H3K9me2, de par leur boucle de contrôle, pourraient alors constituer une réponse rapide et efficace au stress répliatif. L'hétérochromatine étant difficile à répliquer (Zeman and Cimprich, 2014) ce mécanisme pourrait avoir été développé pour maintenir le TGS des ETs dans ces régions où le ralentissement des fourches de réplication est fréquent. En contexte de stress répliatif important ce mécanisme apparaîtrait donc comme un mécanisme compensatoire, mais qui reste néanmoins insuffisant pour maintenir totalement le silencing. L'augmentation, bien que moindre, de la méthylation CG ne semble pas être liée au stress répliatif car celle-ci est absente de la plupart des mutants du réplisome et des plantes traitées au HU (Bourguet et al., 2020). Le mutant *fas2* présente une hyperméthylation CG associée à une perturbation de la distribution génomique des histones H3.1, H3.3 et H1 (Mozgova et al., 2018; Stroud et al., 2013b). Cette distribution pourrait également être impactée par l'altération de la fonction RTEL1 et provoquer une augmentation des niveaux de méthylation CG en rendant la chromatine plus accessible. FAS2 et RTEL1 contrôlent l'expression d'un nombre significatif de cibles communes et ont été tout deux impliqués dans le maintien du nombre de copies des répétitions télomériques et des copies 45S d'ADN ribosomique (ADNr) (Dorn et al., 2019; Mozgová et al., 2010; Röhrig et al., 2016; Vannier et al., 2013). De manière intéressante, chez *Drosophila melanogaster*, des délétions dans le locus ADNr affectent les niveaux d'expression de centaines de gènes dispersés dans le génome (Paredes et al., 2011). De même, la variation naturelle du nombre de copies ADNr est corrélée à une variation d'expression d'un ensemble de gènes euchromatiques (Paredes et al., 2011). Ces changements d'expression pourraient être causés par une modification de la balance euchromatine/hétérochromatine et/ou par un ajustement du pool de protéines du TGS et/ou de facteurs de transcription afin de maintenir le niveau d'expression des





ADNr malgré la diminution du nombre de copies (Paredes and Maggert, 2009; Paredes et al., 2011). Dans les mutants *rtell* et *fas2* d'*Arabidopsis*, la perte de copies d'ADNr pourrait induire un phénomène similaire, conduisant à la variation d'expression d'un certain nombre de gènes.

#### 4. Contributions

Le crible initial a été réalisé par Marie-Noëlle Pélissier. J'ai ensuite repris le projet et poursuivi le crible pour sélectionner les mutants d'intérêts. Les expériences d'ATAC-seq ont été réalisées à l'institut IPS2 Paris-Saclay par Moussa Benhamed, David Latrasse et Ying Huang. J'ai réalisé l'ensemble des autres expériences de ce projet. J'ai réalisé les analyses découlant de ces expériences ainsi que les analyses bioinformatiques des données de génomique (avec le support d'Olivier Mathieu).



## **RTEL1 is involved in transcriptional gene silencing and inhibition of heterochromatic DNA methylation**

Amy Hesketh<sup>1</sup>, Marie-Noëlle Pouch-Pélissier<sup>1</sup>, David Latrasse<sup>2</sup>, Ying Huang<sup>2</sup>, Moussa Benhamed<sup>2</sup>, Olivier Mathieu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics Reproduction and Development (iGReD), Université Clermont Auvergne, CNRS, Inserm, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup> Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, University Paris-Sud, University of Evry, University Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cite, University of Paris-Saclay, Batiment, 630, 91405 Orsay, France.

\* Corresponding author. Tel: 33 473 407 407, E-mail: [olivier.mathieu@uca.fr](mailto:olivier.mathieu@uca.fr)

### **Abstract**

Transcriptional gene silencing is an essential mechanism for controlling the expression of genes and transposable elements (TEs) and is commonly associated with high levels of DNA methylation. Thus, release of silencing is frequently observed in mutants for genes involved in DNA methylation maintenance. However, studies in *Arabidopsis thaliana* have revealed that transcriptional repression of some DNA-methylated genes and TEs also relies on repressors that operate through pathways largely independent of DNA methylation. One such pathway appears linked to DNA replication and DNA repair and mutations in factors involved in these processes such as the polymerases *alpha*, *delta* and *epsilon* destabilize silencing. Here, we isolate a new mutant allele of the helicase *REGULATOR OF TELOMERE ELONGATION 1* (*RTEL1*) gene from a genetic screen for TGS-deficient mutants. RTEL1 is highly conserved among eukaryotes and plays an important role in the resolution of DNA secondary structures during DNA replication. We show that *rtell* causes release of TGS without loss of DNA methylation or global changes in chromatin accessibility. However, many heterochromatic loci show increased levels of DNA methylation levels and chromatin accessibility in *rtell* mutants. Our findings reveal a function for RTEL1 in maintaining silencing and in preventing DNA hypermethylation of heterochromatin.

**Keywords:** RTEL1, silencing, replication stress, DNA methylation

## Introduction

In eukaryotes, DNA is associated to histone proteins to form a highly compacted and organised structure known as the chromatin. The core unit of the chromatin is the nucleosome formed by a histone octamer comprising two H2A-H2B dimers and a [H3-H4]<sub>2</sub> tetramer, around which is wrapped 146bp of DNA. The chromatin is present in two different states characterised by different levels of compaction. The euchromatin is a largely relaxed form mainly composed of protein coding genes and the heterochromatin, a condensed form which shows a high density in transposable elements and repetitive sequences. Chromatin structure influences expression of underlying sequences and requires to be dynamic and tightly regulated in order to control DNA accessibility to transcription factors and proteins necessary for other processes such as DNA replication and DNA repair. This regulation is mediated by epigenetic marks that affect the expression of the underlying genes in a DNA sequence-independent manner. These marks include DNA methylation and histone post-translational modifications, which are specific to each chromatin.

In *Arabidopsis thaliana*, DNA methylation of cytosine residues occurs in three sequence contexts: the symmetric CG and CHG contexts and the asymmetric CHH context (where H is any base but G) (Law and Jacobsen, 2010). The levels of DNA methylation along the chromosomes correlate with the density of transposable elements and repetitive sequences therefore is generally associated to heterochromatin and transcriptional gene silencing (Cokus et al., 2008; Zhang et al., 2006). However, DNA methylation is also found at euchromatic genes in the CG context and controls their expression level and tissue specificity. Gene body methylation is associated with highly and constitutively expressed genes whereas promoter methylation tends to reflect a tissue specific expression (Cokus et al., 2008; Zhang et al., 2006). DNA methylation is established *de novo* by the RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway and is then maintained by different pathways specific to each DNA sequence context. CG methylation, the most abundant methylation context, is maintained by METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) during DNA replication by recognition of the hemimethylated DNA molecules. CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) is the main methyltransferase responsible for CHG methylation, and CHH methylation is maintained by the RdDM pathway at euchromatic loci and by CHROMOMETHYLASE 2 (CMT2) in the pericentromeric heterochromatin (Du et al., 2015; Law and Jacobsen, 2010). Finally, the chromatin-remodelling factor DECREASED IN DNA METHYLATION 1 (DDM1) is involved in the maintenance of heterochromatin DNA methylation in all sequence contexts

(Stroud et al., 2013). Disruption of these DNA methylation pathways, especially CG methylation, results in the modification of the epigenetic landscape leading to profound changes in expression of protein coding genes and a general reactivation of transposable elements. However, DNA methylation is not the only mechanism which the cell relies on to secure transcriptional gene silencing.

There is growing evidence that DNA methylation independent pathways participate in robust silencing and actors involved in these pathways have been identified. The first of these actors to be identified is MORPHEUS' MOLECULE 1 (MOM1), a protein that has been shown to mediate silencing of highly repetitive pericentromeric sequences such as *TRANSCRIPTIONALLY SILENT INFORMATION (TSI)* or 180bp satellite repeats (Amedeo et al., 2000; Steimer et al., 2000; Vaillant et al., 2006; Yokthongwattana et al., 2010). Although the way MOM1 controls transcriptional silencing remains poorly understood, transcriptional reactivation in *mom1* mutants is not associated to a reduction in DNA and histone methylation (Amedeo et al., 2000; Probst et al., 2003; Steimer et al., 2000; Vaillant et al., 2006). Two members of the conserved *Microrchidia (MORC)* ATPase family, AtMORC1 and AtMORC6 also regulate silencing independently of DNA methylation (Moissiard et al., 2012). Although both AtMORC1/6 and MOM1 mostly target sequences located in pericentromeric regions (Moissiard et al., 2012; Yokthongwattana et al., 2010) data suggest that MOM1 and AtMORC6 act in distinct pathways (Moissiard et al., 2014). More recently, we found that the MAINTENANCE OF MERISTEMS (MAIN) and MAINTENANCE OF MERISTEMS-LIKE1 (MAIL1) proteins harbouring a transposon-related plant mobile domain (PMD) control silencing independently of DNA methylation through a molecular pathway distinct from those involving MOM1 and AtMORCs (Ikeda et al., 2017).

Chromatin structure is important for DNA replication and repair. The DNA molecule must be made accessible to factors involved in these processes but chromatin state must be rapidly restored in order to maintain the transcriptional activity of the underlying sequences. During replication, the stakes are even higher as the epigenetic environment must be faithfully copied to the daughter molecules. The propagation of histone marks following passage of the replication fork seems to be important for epigenetic memory (Sarkies and Sale, 2012). How histone marks are inherited through replication is still unclear. However, stalling of the replication fork leads to epigenetic instability and loss of silencing suggesting that DNA unwinding, replication and chromatin re-formation must be tightly coordinated (Sarkies and Sale, 2012). Consistent with this link between DNA replication and repair and transcriptional silencing, several silencing factors identified through forward genetic screens are involved in

DNA metabolism and their deficiency can cause replication stress and DNA damage. These factors include, among others, the DNA polymerases POL $\alpha$  (Liu et al., 2010), POL $\delta$  (Iglesias et al., 2015), POL $\epsilon$  (Bourguet et al., 2020; Yin et al., 2009), REPLICATION PROTEIN 2 (RPA2) (Elmayan et al., 2005), the nuclear protein BRUSHY1 (BRU1) (Takeda et al., 2003), the flap endonuclease FEN1 (Zhang et al., 2016a) and the chromatin assembly factor CAF-1 (Schönrock et al., 2006). The release of silencing observed in mutants impaired for these factors is not associated with a loss of DNA methylation. These mutants also exhibit hypersensitivity to DNA damaging agents suggesting an accumulation of DNA damage and/or constitutive replication stress.

Here, we identify a role in silencing for *REGULATOR OF TELOMERE ELONGATION 1* (*RTEL1*) encoding a protein linked to DNA repair and replication. The RTEL1 helicase was first identified in mice in a screen for factors involved in the maintenance of telomere length (Lansdorp and van Wietmarschen, 2019). Other studies identified RTEL1 as a replication-coupled helicase required for the resolution of DNA secondary structures such as G-quadruplex (Vannier et al., 2013). In *rtell*-deficient cells, accumulation of these structures creates a barrier to replication fork progression (Uringa et al., 2012; Vannier et al., 2013). Our results show that RTEL1 is required for the silencing of a set of loci through a pathway likely related to its replication function. Release of silencing in *rtell* is not associated with reduced DNA methylation but rather with increased levels of DNA methylation indicating that RTEL1 function prevents heterochromatin DNA hypermethylation. Finally, we show that RTEL1 acts independently of MOM1, MAIN, MAIL1 and POL2A, and at least partly independently of FAS2.

## Results

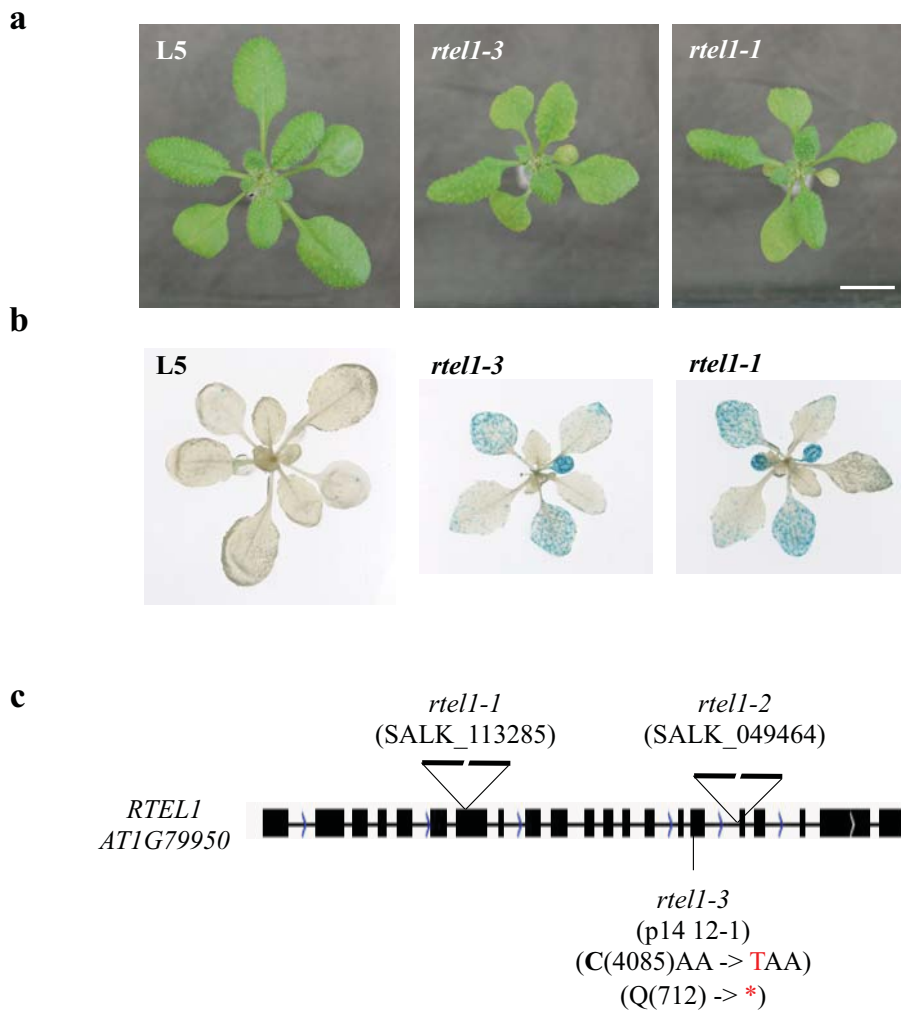
### Mutations in *RTEL1* release transcriptional silencing.

The *Arabidopsis* L5 line carries transcriptionally silent tandem repeats of a  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) transgene under control of the CaMV 35S promoter (Morel et al., 2000). We and others previously showed that silencing of the L5 locus is sensitive to mutations in a wide range of transcriptional silencing regulators (Amedeo et al., 2000; Bourguet et al., 2018, 2020; Elmayan et al., 2005; Ikeda et al., 2017; Morel et al., 2000; Takeda et al., 2003). We carried out a genetic screen on an ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenized L5 population for reactivation of the transgene independently of a loss of DNA methylation. The first step of this screen consisted in a histochemical staining assay to identify mutants with a reactivated *GUS* transgene. Eight

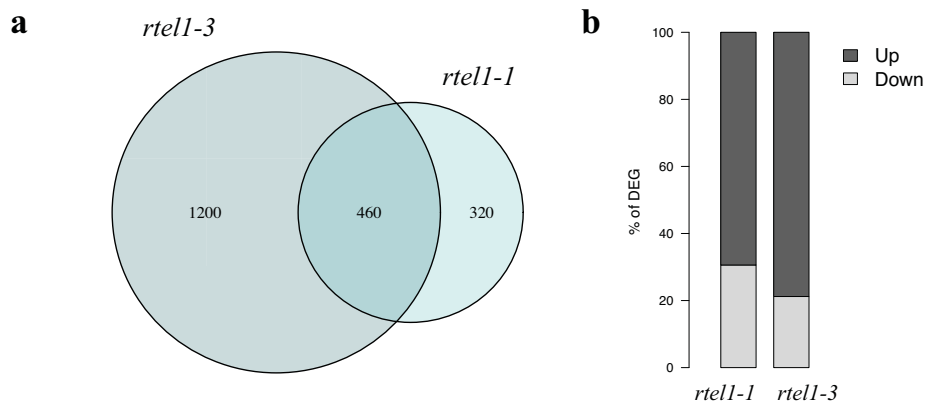
pools of 1600 seeds were tested and among them 39 M3 mutants showed clear L5 reactivation (Figure S1a). We then estimated DNA methylation levels of the GUS transgene by *CfoI* and *MspI* digestion followed by semi-quantitative PCR. *CfoI* recognizes the sequence 5'-GCGC-3' and is inhibited by CG methylation, whereas *MspI* recognizes 5'-CCGG-3' sites and is inhibited by CHG methylation. We amplified the 5' end of the GUS coding region which contains four *MspI* sites and three *CfoI* sites (Figure S1b). From the previously isolated mutants, we selected 29 candidates that did not exhibit a loss of DNA methylation and analyzed these for possible further silencing defects at selected endogenous loci (Figure S1c). We selected ten mutants based on their phenotypes and the degree of their silencing defects for further analysis. Segregation in backcrosses progeny confirmed that the causative mutations are single-locus nuclear recessive for all ten mutants. Finally, we used mapping-by-sequencing to identify the causative mutations. Among these ten mutants we identified new mutant alleles of *RPA2*, *MOM1*, *POLa2* and *POL2A* (Figure S2). This validated our screening strategy as mutations in these genes are known to affect silencing without associated loss of DNA methylation (Bourguet et al., 2020; Elmayer et al., 2005; Liu et al., 2010; Vaillant et al., 2006; Yin et al., 2009). Another mutant we isolated, *p14 12-1*, was characterized by slow growth phenotype and pointed leaves (Figure 15a, 15b). We identified a C to A substitution at the nucleotidic position 4085 of *REGULATOR OF TELOMERE LENGTH 1* (*RTEL1*; *AT1G79950*) in *p14 12-1*, causing a premature stop codon at the amino acid position 712 (Figure 15c), and complementation tests with independent *rtell* T-DNA insertion mutant lines confirmed that this mutation is responsible for the observed silencing defects (Figure S3). Moreover, silencing of the L5 transgene was released when introduced in the *rtell-1* mutant background by crossing (Figure 15b). Hence, *p14 12-1* was renamed *rtell-3*.

To define the genome-wide effects of *rtell* on gene expression, we compared the transcriptomes of *rtell-1* and *rtell-3* mutants with that of WT plants generated by RNA sequencing. We identified 781 and 1660 misregulated loci in *rtell-1* and *rtell-3* respectively and 460 were common to both alleles. Among these, 69% (542/781) were upregulated in *rtell-1* and 79% (1308/1660) in *rtell-3* ( $FC \geq 1.5$ ,  $p\text{-value} \leq 0.05$ ), indicating that loss of *RTEL1* predominantly induced upregulation of transcripts (Figure 2). Upregulated loci included mostly PCGs localized on all five chromosomes and some TEs belonging to both DNA transposon and retrotransposon classes (18 in *rtell-1*, 60 in *rtell-3*) (Figure S4). No bias in genomic localization was noted in *rtell-1* upregulated targets whereas *rtell-3* upregulated loci are





**Figure 1:** Mutations in *RTEL1* release silencing of L5 transgene. **(a)** Photos of 3-week-old plants of the indicated genotype. Scale bar, 1 cm. **(b)** Photos of the histochemical staining for GUS activity in 3-week-old plants of the indicated genotype. **(c)** Representation of *RTEL1* gene with the insertion and mutation positions of the three mutant alleles. The point mutation identified in *rtell-3* and the resulting amino acid change are indicated in red.



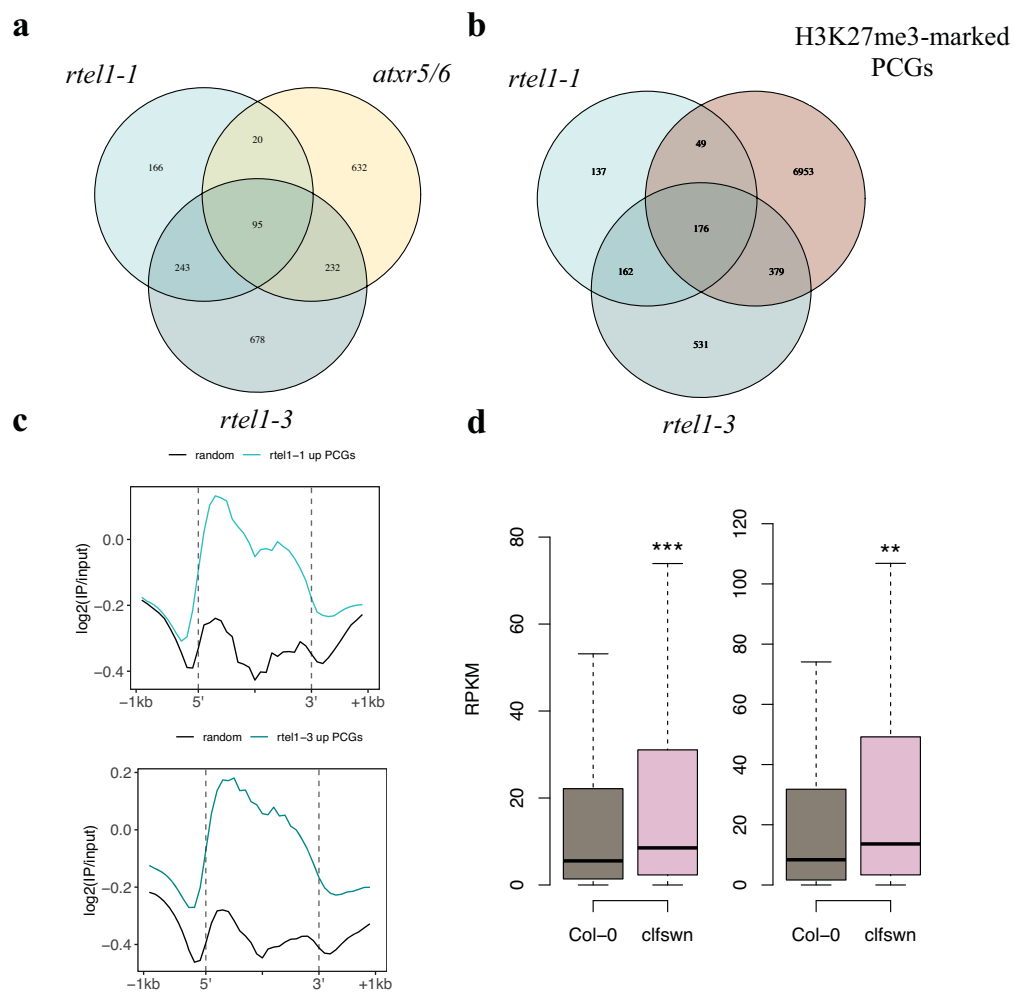
**Figure 2:** Mutations in *RTEL1* mainly induces upregulation of transcript levels. **(a)** Venn diagram of overlap between misregulated loci in *rtell-1* and *rtell-3*. **(b)** Fraction of loci significantly up- (Up) or downregulated (Down) in *rtell* mutants versus WT.

enriched in chromosome arms (Figure S4). Taken together these results show that RTEL1 is required for silencing of a subset of genomic loci.

### **PCG upregulation in *rtell* mutants could be caused by H3K27me3 loss and constitutive replicative stress**

Gene Ontology (GO) analysis indicated that up-regulated PCGs in *rtell* mutants were predominantly enriched in biotic and abiotic stress response genes (Tables 1-3). Previous studies have shown that RTEL1 is required for proper DNA replication and DNA repair and its loss causes an increase in DNA endoreplication, cell cycle progression inhibition and DNA repair gene overexpression (Dorn et al., 2019; Hu et al., 2015; Recker et al., 2014). Our RNA-seq data also show an overexpression of DNA repair genes such as *BRCA1*, *RAD51* and *PARP2* (Figure S5a), and GO analysis shows that genes related to DNA replication and DNA repair are overrepresented among upregulated PCGs in *rtell-1* but not in *rtell-3* (Tables 1-3). However, commonly upregulated PCGs are enriched in genes involved in these processes. Approximately 25% of upregulated PCGs in *rtell-1* and *rtell-3* are also upregulated in *atxr5 atxr6* double mutants (*atxr5/6*) (Ikeda et al., 2017) which suffer from heterochromatic DNA overreplication and DNA damage (Figure 3a). These results suggest that both *rtell* mutants undergo constitutive replicative stress, which likely contributes to the upregulation of a subset of PCGs.

We investigated the possible link between upregulated PCGs and the silencing epigenetic mark H3K27me3. A significant proportion (43-44%) of *rtell*-upregulated PCGs is associated with high levels of H3K27me3 in WT plants (Figure 3b, 3c). These H3K27me3-marked PCGs are significantly up-regulated upon loss of this mark in double mutants for CURLY LEAF and SWINGER H3K27me3 methyltransferases (Figure 3d). These observations indicate that almost half of RTEL1 targets is also regulated by H3K27me3 deposition, suggesting that *rtell* may destabilize H3K27me3-mediated silencing at a subset of PCGs. At least half (63% and 51% for *rtell-1* and *rtell-3* respectively) of the class of *rtell* targets upregulated due to replicative stress are not associated with H3K27me3 (Figure S5b, S5c). Together, these findings suggest that both constitutive replicative stress and perturbed H3K27me3-mediated silencing likely contribute to PCG upregulation in *rtell* in at least partly independent pathways. RNA-seq data show stronger effect of the *rtell-3* mutation compared to the *rtell-1* mutation, therefore, following analyses were done with the *rtell-3* allele.



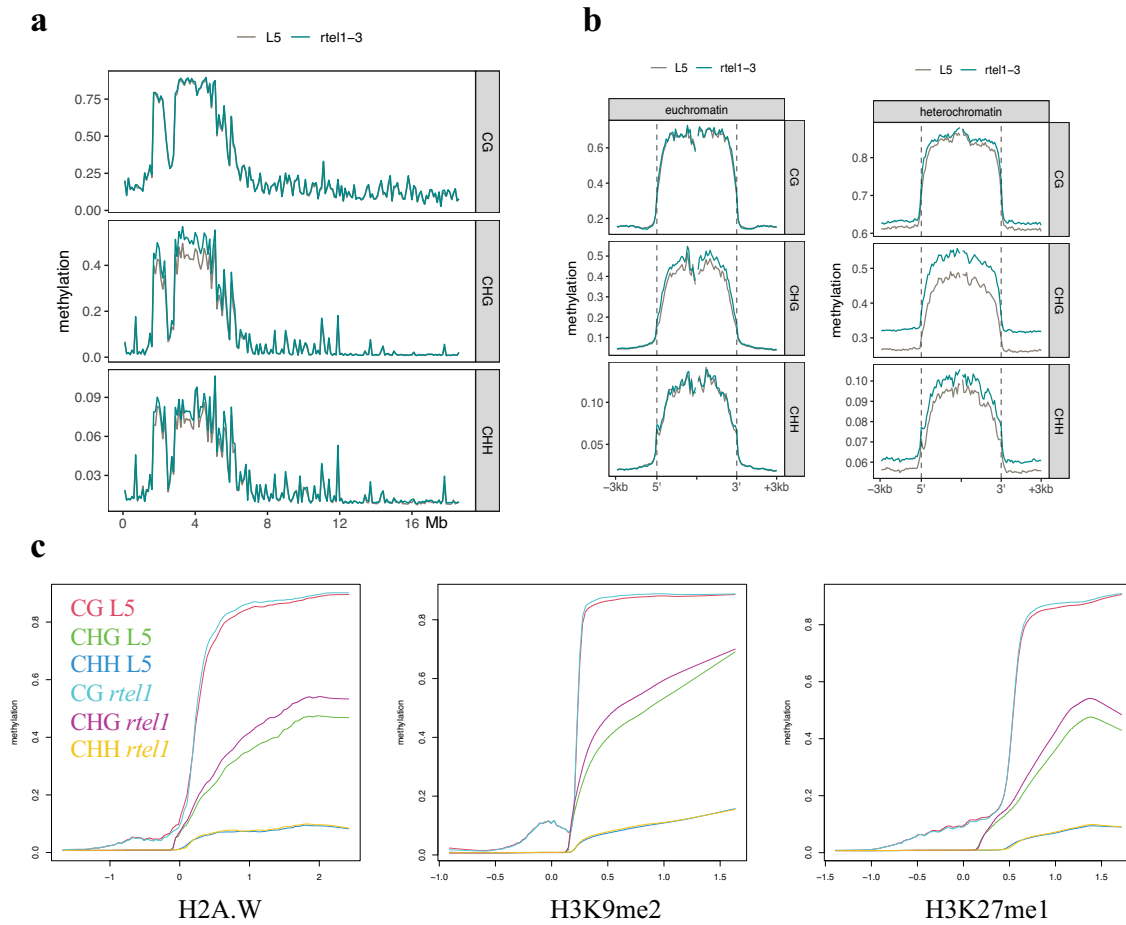
**Figure 3:** Constitutive replicative stress and perturbed H3K27me3-mediated silencing likely contribute to PCG upregulation in *rtell*. **(a)** Venn diagram of overlap between misregulated loci in *rtell-1*, *rtell-3* and *atxr5/6*. **(b)** Venn diagram of overlap between misregulated loci in *rtell-1*, *rtell-3* and H3K27me3-marked PCGs. The fraction of genes marked by H3K27me3 among *rtell* upregulated PCGs is significantly higher than the proportion expected by chance (hypergeometric test,  $p$ -value < 0.01). **(c)** Metaplots showing H3K27me3 enrichment ( $\log_2$  signal over input) in WT plants at *rtell-1* (top; blue line) and *rtell-3* (bottom; blue line) upregulated PCGs and at a random set of PCGs (black line). **(d)** Boxplot of normalized expression levels (RPKM) in WT and *curly leaf swinger* (*clfswn*) double mutants (raw data from Wang *et al.*) of H3K27me3-marked PCGs upregulated in *rtell-1* (left) or *rtell-3* (right) (Two-sided unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney; \*\*:  $p$ -value < 0.05; \*\*\*:  $p$ -value < 0.01).

### **Loss of RTEL1 causes heterochromatic DNA hypermethylation**

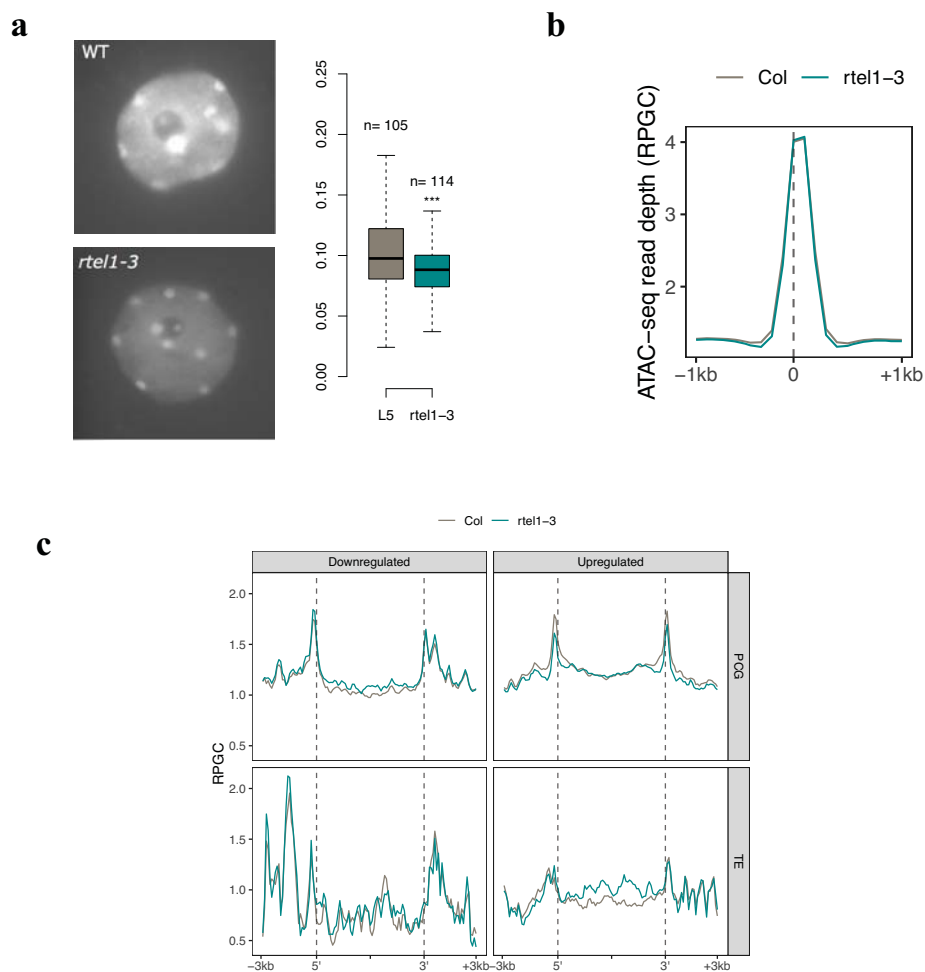
Our procedure indicated that release of L5 transgene silencing in *rtell-3* is not associated with a loss of DNA methylation at the transgene. Because we previously reported that release of L5 silencing can occur in a chromatin context of increased levels of DNA methylation (Bourguet et al., 2020), we profiled DNA methylation genome-wide in WT and *rtell-3* plants at the single nucleotide level using bisulfite sequencing (BS-seq). BS-seq data confirmed that DNA methylation levels were unchanged at the L5 transgene and no loss of DNA methylation was observed over misregulated PCGs and TEs in *rtell-3* suggesting that *rtell*-induced transcriptional changes do not rely on a decrease in DNA methylation levels (Figure S6a, S6b). Plotting average DNA methylation levels along chromosomes revealed no major change in CG DNA methylation in *rtell-3* mutants (Figure 4a). However, CHG and, to a lesser extent, CHH DNA methylation levels were notably increased at pericentromeric regions (Figure 4a). Accordingly, we found that average CHG and CHH methylation levels were increased over all TEs in *rtell-3* compared to WT (Figure S6c). CHG methylation consists of three subcontexts, CAG, CTG and CCG, which were all hypermethylated in *rtell-3* (Figure S6d). We analyzed DNA methylation separating TEs according to their genomic localization and noted that pericentromeric TEs were hypermethylated in all three cytosine contexts whereas TEs in chromosome arms were only hypermethylated in CHG context (Figure 4b). In addition, we found that CG DNA methylation was slightly increased in *rtell-3* over heterochromatic regions associated with H2A.W, H3K9me2 or H3K27me1 and that CHG DNA methylation increase in *rtell-3* correlates with enrichment in these heterochromatin specific features (Figure 4c). These results indicate that *rtell* induces hypermethylation of CHG, and to a lesser extent, CG sites specifically at heterochromatic sequences.

### **Impaired chromatin organization is not the cause of transcription misregulation in *rtell***

DNA hypermethylation in *rtell-3* is specific to the heterochromatin, which appears in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stained nuclei as brightly stained foci called chromocenters. Nuclei of *rtell-3* show reduced chromocenter size which translates into a significant decrease in heterochromatic fraction compared to WT nuclei (Figure 5a). This result is in line with previously published data showing that RTEL1 is required for the stability of DNA repetitive sequences (Dorn et al., 2019; Röhrig et al., 2016). To further characterize heterochromatic defects in *rtell*, we assessed nucleosome occupancy by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)



**Figure 4:** Loss of *RTEL1* causes heterochromatin DNA hypermethylation. **(a)** Average DNA methylation level per 100kb windows on chromosome 4 in CG, CHG and CHH context. **(b)** Metaplots showing average DNA methylation levels at euchromatic (left) and heterochromatic (right) TEs in all three cytosine contexts. TEs were aligned at their 5' and 3' ends (dashed lines) and average methylation levels per 100bp window was plotted 3kb upstream and 3kb downstream from the alignment points. **(c)** Average DNA methylation level per 1kb windows plotted against H2A.W (left), H3K9me2 (middle) and H3K27me1 (right) enrichment.



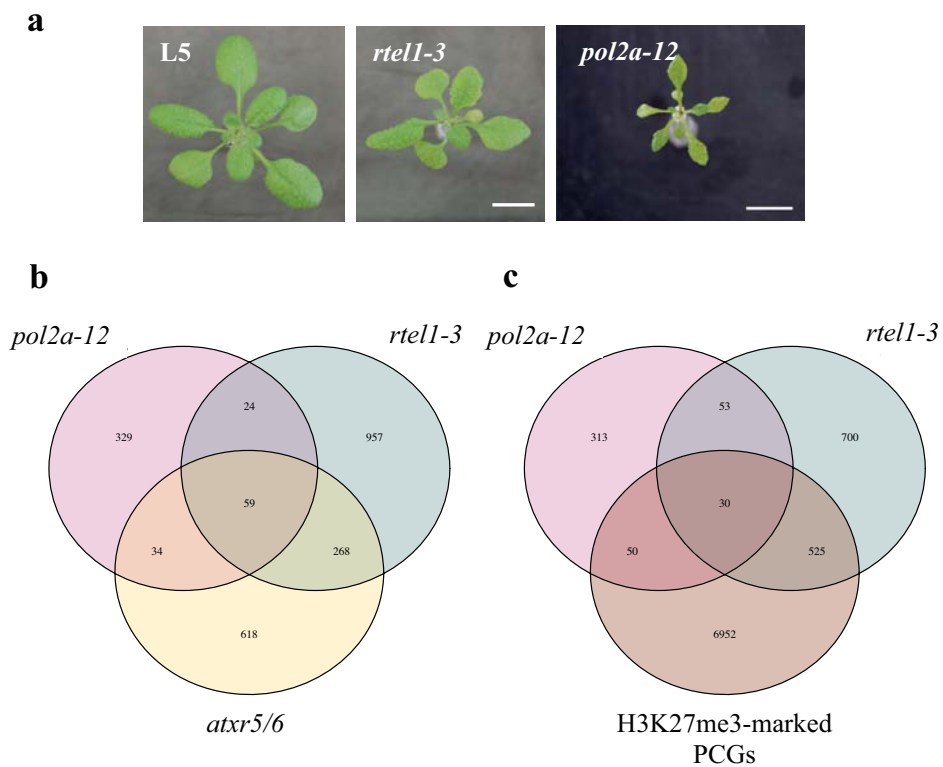
**Figure 5:** Transcriptional misregulation is not caused by impaired chromatin organization **(a)** Representative photos of DAPI-stained isolated nuclei and quantification of heterochromatic fraction (chromocenters density / total nuclei density) of *rtel1-3* and WT plants (\*\*\*:  $p$ -value < 0.01, Student t-test). **(b)** Average Reads Per Genome Coverage (RPGC) at WT peaks in the indicated genotypes. Peaks were aligned at their center and the average RPGC was plotted 1kb upstream and 1kb downstream from the alignment point. **(c)** Metaplots showing average RPGC in the indicated genotypes at *rtel1-3* misregulated loci. PCGs and TEs were aligned at their 5' and 3' ends (dashed lines) and average RPGC in each 100bp window was plotted 3kb upstream and 3kb downstream from the alignment points.

using histone H3 antibodies followed by qPCR and found no significant change at the four selected heterochromatic loci we analyzed (Figure S7). We also determined chromatin accessibility by Assay for Transposase-Accessible Chromatin followed by high-throughput sequencing (ATAC-seq). Overall, *rtell-3* showed similar chromatin accessibility as WT including at misregulated PCGs and TEs (Figure 5b, 5c). Taken together these results suggest that transcript accumulation defects in *rtell* mutants is not caused by chromatin organization defects.

### **RTEL1 acts through a pathway largely independent of POL2a**

POL2a is the catalytic subunit of the polymerase epsilon. The *pol2a-12* and *rtell-3* mutants, as well as their similar developmental phenotype (i.e., reduced stature and pointed leaves), although milder in *rtell* (Figure 6a), also share similar molecular phenotypes (Bourguet et al., 2020). We were unable to isolate *rtell pol2a* double mutants in the progeny of *rtell-3 pol2a-12* double heterozygotes or either sesquimutants suggesting a lethal genetic interaction between *rtell-3* and *pol2a-12*. Comparing the transcriptomes of both single mutants we identified only 83/1308 upregulated PCGs and TEs in *rtell-3* respectively also upregulated in *pol2a-12* (Figure 6b). However, commonly upregulated PCGs are significantly enriched in genes involved in DNA damage response and cell cycle regulation and over 70% of these are also upregulated in *atx5/6* (Figure 6b). In *pol2a-12* impaired PRC2-mediated H3K27me3 deposition seems to contribute to about half of PCG upregulation (Bourguet et al., 2020). Our data on *rtell* suggest a similar contribution of H3K27me3 to PCG upregulation. Nevertheless, we identified only 5% of H3K27me3-marked upregulated PCGs in *rtell* also upregulated and H3K27me3-marked in *pol2a-12* (Figure 6c). Another common phenotype between *rtell-3* and *pol2a-12* is heterochromatic DNA hypermethylation. In both backgrounds CHG hypermethylation affects equally all three CHG subcontexts. This phenotype was also observed in other mutants known to affect DNA replication and DNA damage response and also in WT plants treated with hydroxyurea (HU), a drug that causes replication stress by depleting the pool of deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Bourguet et al., 2020). Our study and others (Hu et al., 2015) show that *rtell* undergoes constitutive replicative stress which likely contributes to CHG hypermethylation. In contrast to *pol2a-12*, heterochromatin is also modestly hypermethylated in CG context in *rtell-3* (Figure 4b) (Bourguet et al., 2020). Taken together, our results indicate that RTEL1 and POL2a act at largely distinct loci. However, similar mechanisms, including perturbed H3K27me3-mediated silencing and constitutive replicative stress, could be involved in both mutants





**Figure 6:** (a) Photos of 2-3-week-old plants of the indicated genotype. *rtel1* and *pol2a* share a similar pointed leaves phenotype. Scale bar, 1 cm. (b) Venn diagram of overlap between misregulated loci in *pol2a-12* (raw data Bourguet *et al.*, 2020), *rtel1-3* and *atxr5/6*. (c) Venn diagram of overlap between misregulated loci in *pol2a-12*, *rtel1-3* and H3K27me3-marked PCGs.

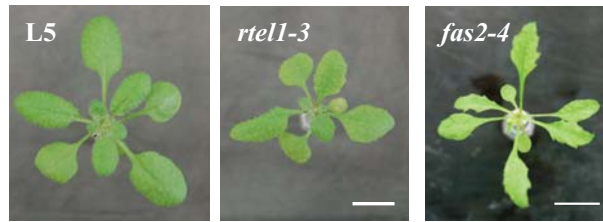
## **RTEL1 and FAS2 maintain TGS and prevent DNA hypermethylation through partly distinct pathways**

FAS2 is one of three subunits of the CAF-1 complex which incorporates H3.1-containing nucleosomes during DNA replication. As does *pol2a*, *fas2* mutants share similar developmental and molecular phenotypes with *rtell* mutants (Figure 7a) (Mozgova et al., 2018; Stroud et al., 2013). Transcriptome analysis of previously published *fas2-4* RNA-seq data (Bourguet et al., 2020) indicates that approximately 30% of *rtell* upregulated loci show increased transcript accumulation in *fas2-4* which is significantly higher than the proportion expected by chance (Figure 7b). The *fas2-4* mutant also shows DNA hypermethylation in all three cytosine contexts. Although CHG methylation is also increased in *fas2*, CCG is much less effected than the other subcontexts, as opposed to *rtell-3* (Bourguet et al., 2020). Taken together these results indicate that RTEL1 and FAS2 act through at least partly independent pathways to maintain TGS and prevent DNA hypermethylation.

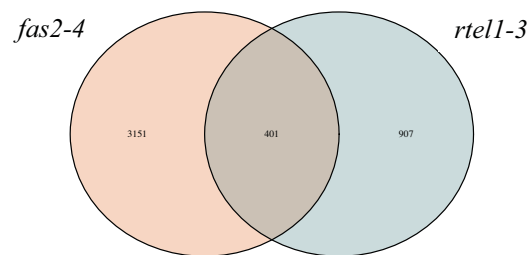
## **RTEL1 TGS function is independent of MOM1**

MOM1 was the first identified molecular component required for transcriptional silencing of pericentromeric sequences which, when mutated, does not affect DNA methylation patterns (Amedeo et al., 2000). To investigate epistasis between *rtell-3* and *mom1-2* mutations we obtained *rtell-3 mom1-2* double mutants. These plants displayed developmental phenotypes resembling those of *rtell-3* single mutant (Figure 8a). Comparing *mom1-2* (Moissiard et al., 2014) and *rtell-3* transcriptomes revealed only four loci (all being TEs) commonly upregulated in both mutants indicating that RTEL1 and MOM1 control the expression of largely distinct loci (Figure 8c). We used quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) to determine transcript accumulation at two endogenous loci upregulated in both *rtell* and *mom1* and at the L5-GUS transgene. Reactivation of the two endogenous loci was significantly stronger in *mom1-2* than *rtell-3* (figure 8b). At the L5-GUS transgene, histochemical staining suggested stronger reactivation in *mom1-2* (Figure 8a) but no significant difference was detected by RT-qPCR (Figure 8b). We observed a decrease in transcript levels of *Transcriptionally silent information (TSI)*, derivatives of *Athila* retrotransposons (Steimer et al., 2000) and *AT2TE19615* in *rtell-3 mom1-2* double mutants compared to *mom1-2*, whereas GUS transcript accumulation was significantly higher in *rtell-3 mom1-2* double mutants than in either single

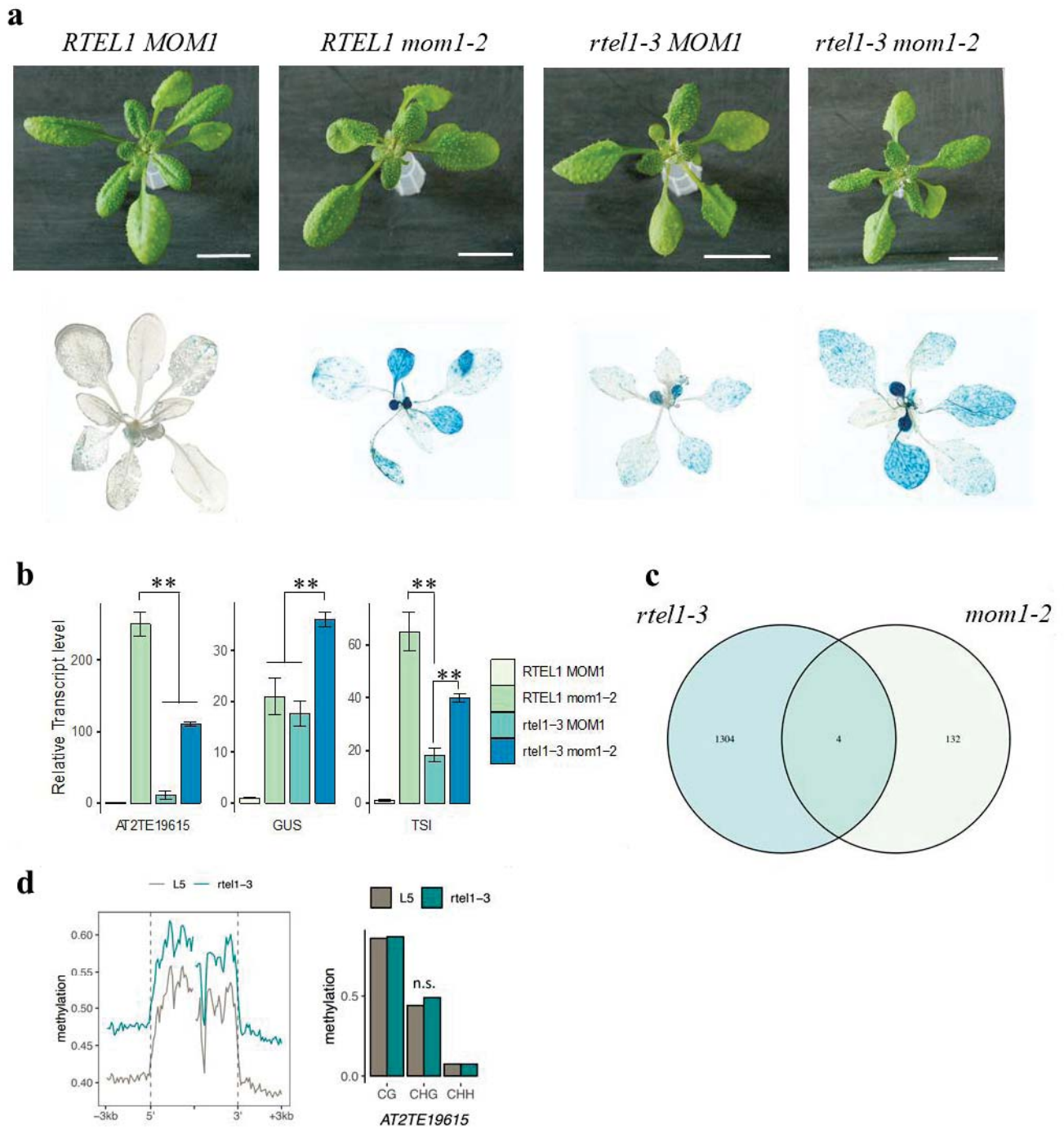
**a**



**b**



**Figure 7:** (a) Photos of 3-week-old plants of the indicated genotype. *rtell* and *fas2* share similar pointed leaves phenotype. Scale bar, 1 cm. (b) Venn diagram of overlap between misregulated loci in *fas2-4* (raw data Bourguet *et al.*, 2020) and *rtell-3*. The fraction of upregulated loci in *rtell-3* also upregulated in *fas2-4* is significantly higher than the proportion expected by chance (hypergeometric test, p-value < 0.01).



**Figure 8:** (a) Photos of 3-week-old plants of the indicated genotype with histochemical staining for GUS activity below. Scale bar, 1 cm. (b) RT-qPCR analysis of *AT2TE19615*, *TSI* and *GUS* using 3-week-old leaves of the indicated genotype from the same segregating population. Transcript levels are represented relative to WT levels set to 1. Values represent the mean of three biological replicates  $\pm$  s.e.m. Asterisks mark statistically significant differences (Student's *t*-test, *p*-value < 0.05). (c) Venn diagram of overlap between misregulated loci in *rtel1-3* and *mom1-2*. (d) Metaplot showing average CHG methylation at Athila TEs (left) and *AT2TE19615* methylation levels in all three contexts (right) (Student's *t*-test, N.s. : non-significant).

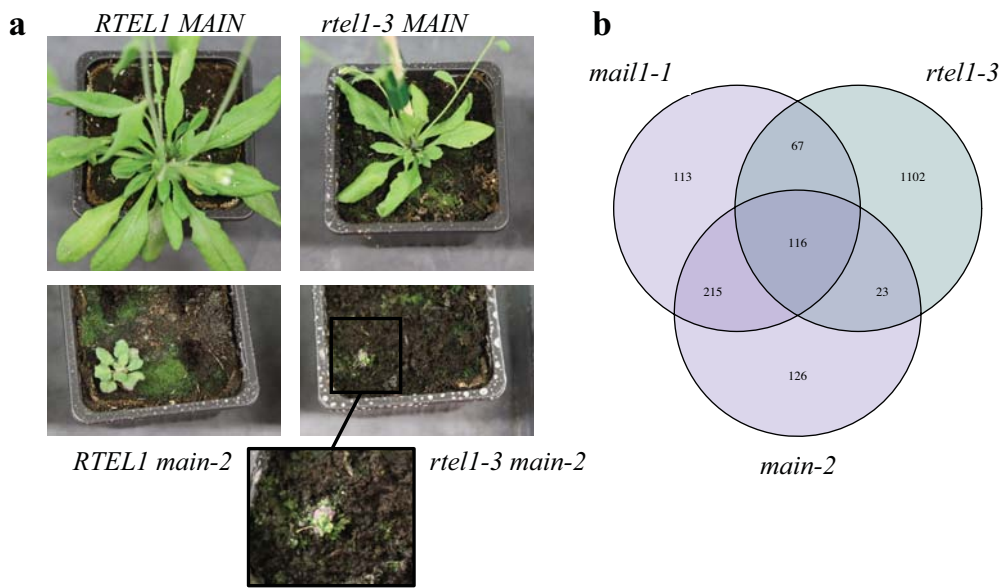
mutant (Figure 8b). Interestingly, unlike the GUS transgene, *AT2TE19615* and *Athila* sequences show slightly increased CHG methylation in *rtell* (Figure 8d), which may suppress *mom1*-induced activation of these loci in *rtell mom1* background. Altogether, these findings suggest that MOM1 and RTEL1 are involved in distinct silencing pathways.

### **RTEL1 is independent of the MAIL1/MAIN silencing pathway**

The PMD proteins MAIL1 and MAIN act in a silencing pathway distinct from that involving (Ikeda et al., 2017; Nicolau et al., 2020). The *mail1-1* and *main-2* single mutants suffer from severe developmental defects and do not resemble *rtell* mutant phenotypes (Figure 9a). Comparing transcriptomes of *mail1-1* or *main-2* and *rtell* showed no significant overlap between misregulated loci (Figure 9b). We were unable to isolate *rtell-3 mail1-1* (151 genotyped plants) double mutant plants in the progeny of double heterozygotes or in the progeny of *rtell-3 MAIL1/mail1-1* sesquimutant (144 genotyped plants). In the self-fertilized progeny of *rtell-3 MAIN/main-2* sesquimutants (48 genotyped plants after phenotypic selection), we were able to obtain a single *rtell-3 main-2* double mutant individual, which suffered from extremely severe developmental defects and did not produce flowers precluding further molecular characterization (Figure 9a). Together, these results indicate that RTEL1 and MAIL1/MAIN pathways are synergistically required for plant development and that RTEL1 acts through a silencing pathway independent of MAIL1/MAIN.

## **Discussion**

In this study we isolated a new mutant allele of the DNA helicase RTEL1 and show that RTEL1 is required for the silencing of L5-GUS and a set of endogenous genomic loci. In *Arabidopsis thaliana*, RTEL1 has been shown to be required for genome stability and cell cycle progression (Dorn et al., 2019; Hu et al., 2015; Recker et al., 2014; Röhrig et al., 2016). Studies on mouse cells further demonstrate that RTEL1 localizes at replication forks by interacting with PCNA and is required for preventing replication fork stalling and/or collapse (Uringa et al., 2012; Vannier et al., 2013). Loss of RTEL-1, the *Caenorhabditis elegans* RTEL1 homolog, leads to increased sensitivity to DNA damaging agents that specifically cause replication related lesions (Barber et al., 2008). This phenotype was also observed in RTEL1-depleted HeLa cells indicating that RTEL1 is required for the response to DNA damage that affect replication fork progression (Barber et al., 2008). Thus, RTEL1 has a conserved function in DNA replication and RTEL1-deficient cells suffer from constitutive replicative stress (Barber et al., 2008; Dorn et al., 2019; Hu et al., 2015; Uringa et al., 2012; Vannier et al., 2013). Furthermore, the PCNA



**Figure 9:** (a) Photos of plants of the indicated genotype. All plants are 5 weeks old except *rtell-3 main-2* double mutant which is 9 weeks old. (b) Venn diagram of overlap between misregulated loci in *mail1-1*, *rtell-3* and *main-2* (raw data Ikeda *et al.*, 2017).

interaction domain PIP-box of RTEL1 is conserved in human, mouse and *Arabidopsis* which suggest that, in these organisms, RTEL1 could target replication forks by interacting with PCNA and facilitate replication fork progression by resolving DNA secondary structures (Hu et al., 2015; Vannier et al., 2013). Previous studies have shown the implication of several replication factors in maintaining transcriptional gene silencing (Bourguet et al., 2020; Elmayan et al., 2005; Iglesias et al., 2015; Liu et al., 2010; Schönrock et al., 2006; Takeda et al., 2003; Yin et al., 2009; Zhang et al., 2016b). This study and our previous data suggest that replicative stress leads to PCG upregulation (Bourguet et al., 2020). This hypothesis is in line with a recently published report showing evidence that DNA secondary structure unwinding by RTEL1, prevents both replicative stress and global transcriptional misregulation in mouse embryonic fibroblast (Kotsantis et al., 2020). Maintenance of epigenetic marks such as DNA methylation and some histone post-translational modifications such as H3K27me1 and H3K27me3 are linked to DNA replication (Du et al., 2012; Law and Jacobsen, 2010; Raynaud et al., 2006). This link is made by the interaction between the histone methyltransferases and replication factors and maintenance of these marks seems to rely on the recycling of parental histones (Du et al., 2012; Law and Jacobsen, 2010; Raynaud et al., 2006; Reverón-Gómez et al., 2018). In yeast and animal cells, parental histone recycling is facilitated by the tethering of parental histones to the polymerases  $\alpha$  and  $\epsilon$  (Bellelli et al., 2020; Evrin et al., 2018; Li et al., 2020) and disruption of this interaction leads to transcriptional defects (Evrin et al., 2018). Almost half of upregulated PCGs in *rtell* are associated with high levels of H3K27me3 in the WT (Figure 3b, 3c). In *rtell* mutants, stalled and/or collapsed replication forks could disrupt interactions between polymerases and parental histones and lead to disturbed recycling of H3K27me3-marked parental histones and changed chromatin landscape causing PCGs misregulation. Recycling of other histone variants and/or histone post-translational modifications could also lead to PCG and TE misregulation. In HeLa cells, HU-induced replicative stress causes disturbed parental histone recycling characterized by the incorporation of parental histones at loci distant from the initial replication site (Clément et al., 2018). Regions replicating in mid/late S phase (i.e., heterochromatic regions) are only mildly affected by such recycling defect (Clément et al., 2018). Therefore, impaired parental histone recycling might be the cause of PCG misregulation but likely not the cause of heterochromatic loci misregulation.

Our data indicates that *rtell*-induced transcription is independent of loss of DNA methylation. On the contrary, we observed a gain in non-CG and mild CG hypermethylation which specifically affected heterochromatic loci in *rtell*. We previously showed that mutations

in other DNA replication-related genes, such as *POL2A* and *RPA2A*, are also associated with increased CHG methylation levels (Bourguet et al., 2020). CHG hypermethylation was also detected in plants treated with HU, a drug which depletes cellular dNTP pool causing replicative stress (Bourguet et al., 2020). We previously showed that loss of CMT3 in a *pol2a* background further increased TE reactivation suggesting a compensatory role for non-CG methylation (Bourguet et al., 2020). Non-CG hypermethylation is restricted to heterochromatic regions which are difficult to replicate regularly causing replication fork stalling (Zeman and Cimprich, 2014). It is of particular importance to maintain TGS during replication stress to avoid transcriptional activation in these TE-rich regions. In *Arabidopsis*, the single stranded DNA binding protein RPA1A is recruited to replication stress sites where it recruits the chromatin remodeler CHR18 (Han et al., 2018). By analogy with DDM1 that allows DNA methyltransferases to access DNA (Zemach et al., 2013), CHR18 activity might promote DNA methylation at replication stress sites, thereby dampening TE reactivation until resolution of the stalled replication fork. In RTEL1-deficient plants which suffer from constitutive replicative stress, a similar mechanism may explain increased methylation of non-CG sites in heterochromatin. As we previously showed by analyzing the transcriptome of *pol2a cmt3* mutants, this non-CG hypermethylation of heterochromatin dampens TE reactivation likely until resolution of the stalled replication fork (Bourguet et al., 2020). Although not tested in *rtell-3*, the specific non-CG hypermethylation is likely associated with and potentially a consequence of increased H3K9me2 levels. Indeed, in HeLa cells, replicative stress leads to an overaccumulation of H3.1K9me1 which is incorporated in newly synthesized chromatin and serves as a substrate to H3K9me3 (Jasencakova et al., 2010; Loyola et al., 2006). In *rtell-3*, increased loading of H3.1K9me1 during replicative stress could lead to H3K9me2 and non-CG hypermethylation.

Increase in CG methylation level, on the other hand, is unlikely caused by replicative stress as CG hypermethylation could be detected neither in HU-treated plants nor in some replication-related mutants (Bourguet et al., 2020). However, *fas2* mutants do display hypermethylation of heterochromatin at both CG and non-CG sites (Bourguet et al., 2020; Mozgova et al., 2018; Stroud et al., 2013). FAS2 is a subunit of the CAF-1 complex which incorporates H3.1 during DNA replication. The H3.1 variant is replaced by H3.3 at genes in a transcription-dependent manner (Stroud et al., 2012; Wollmann et al., 2012). H3.3 promotes gene body methylation by blocking H1 recruitment rendering chromatin accessible to DNA methyltransferases (Wollmann et al., 2017). In *fas2*, the replacement of H3.1 by H3.3 and/or decrease in H1 recruitment leads to an increase in heterochromatic DNA methylation in all



cytosine context (Mozgova et al., 2018; Stroud et al., 2013). Imbalance between H3.3 and H3.1 and/or decrease in H1 leading to increased chromatin accessibility may contribute to the gain in CG and non-CG methylation in *rtell-3* heterochromatin. Accordingly, our ATAC-seq data reveal that CG and non-CG hypermethylated regions show increased chromatin accessibility in *rtell* (Figure S8). It was previously reported that *FAS2* is required for genome stability and mutations in *FAS2* induces loss of 45S rDNA copies (Mozgová et al., 2010). Such loss was also identified as a consequence of *RTEL1* deficiency (Dorn et al., 2019; Röhrig et al., 2016). Interestingly, in *Drosophila melanogaster*, variation in rDNA copy number has been linked to modulation of genome-wide gene expression which might be due to a change in euchromatin/heterochromatin balance and/or a change in the nuclear pool of transcription-related proteins (Paredes and Maggert, 2009; Paredes et al., 2011). Whether this is the case in *Arabidopsis* remains unexplored, but it could explain the significant overlap between *rtell-3* and *fas2-4* upregulated loci (Figure 7b).

Unlike POL2a-, MAIL1/MAIN- or MORC-mediated pathways, heterochromatin organization does not seem to be involved in RTEL1-mediated silencing given that we saw no major defects in chromatin organization (Figure 5). Our results show a slight but significant decrease in heterochromatin fraction which is likely due to loss of heterochromatic repetitive sequences as reported before (Dorn et al., 2019; Röhrig et al., 2016).

Finally, our study indicates that RTEL1 promotes gene silencing independently of MAIL1/MAIN, MOM1 and POL2a. Furthermore, there is a lethal genetic interaction between *rtell-3* and *mail1-1* and between *rtell-3* and *pol2a-12*, and we only recovered one *rtell-3 main-2* individual, which suffered from extremely severe developmental defects (Figure 9a). Synthetic lethality between polymerase epsilon and RTEL1 has also been described in *C. elegans* likely due to extensive DNA damage and replication stress (Bellelli et al., 2020).

In conclusion, we propose that RTEL1 ensures proper parental histone recycling at DNA replication, thereby maintaining chromatin landscape and the underlying PCG's transcriptional state. In heterochromatic regions, increased non-CG DNA methylation, presumably caused by change heterochromatin histone composition and/or heterochromatin accessibility, may act as a compensatory mechanism to restrain TE activation at replication fork stalling sites. Proper parental histone recycling and control of heterochromatic non-CG methylation might be a general mechanism at play in the DNA Replication and Repair-mediated silencing pathway (DRR-TGS).

## Methods

### Plant material

Plants were grown in soil in long-day conditions (16 h light, 8 h dark) at 23 °C with 60% relative humidity. The *rtell-1* (SALK\_113285) mutant line used in this study was in a Col-0 genetic background and was crossed to introduce the L5 transgene. The *pol2a*- (Bourguet et al., 2020), *mail1-1* (GK-840E05) (Ühlken et al., 2014), *main-2* (GK-728H05) (Wenig et al., 2013) and *mom1-2* (SAIL\_610\_G01) mutant lines used in this study were all in a L5 genetic background. The *rtell-3* mutant allele reported in this study was isolated from a population of mutagenized L5 plants that we previously described (Ikeda et al., 2017). The *rtell-3* mutant was backcrossed twice to the L5 line before analysis.

For analyses of *rtell-3 mom1-2* double mutants and controls, all plants were derived from a F1 parent obtained by crossing *rtell-3* (2nd backcross) and *mom1-2*. Siblings were genotyped for *rtell-3* and *mom1-2* mutations.

### Histochemical staining

Whole seedlings or rosette leaves were vacuum infiltrated twice 5 min with 3 ml of X- Gluc staining solution (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7; 10mM EDTA; 0.2% Triton-X-100; 0.04% X-Gluc) and incubated 24 h at 37°C in the dark. Chlorophyll was subsequently cleared with repeated washes in ethanol at room temperature.

### Methylation level estimation by *CfoI* and *MspI* digestion

DNA was extracted from rosette leaves using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). 200 ng of DNA was digested with 2 units of *MspI* (NEB) or 2 units of *CfoI* (NEB) in CutSmart buffer (NEB). Reactions were incubated 16 h at 37°C followed by 20 min at 65°C. Digestion products were diluted to a final concentration of 2 ng/μl. The 5' extremity of the GUS coding region was amplified by PCR along with a control region of the *FWA* gene containing no *MspI* or *CfoI* restriction site. Methylation levels were estimated by measuring the amplification ratio between the transgene and the control gene.

### Mutagenesis and mapping

The mutant L5 population used in this study was obtained by mutagenesis as described in Ikeda et al., 2017. To screen for mutants impaired in transcriptional gene silencing, one leaf per M3 plant was dissected and histochemically stained as previously described.

We performed mapping-by-sequencing using genomic DNA from a pool of 50-100 individual F2 mutant plants segregating from a *p14 12-1* x Ler cross. Libraries were prepared using the TruSeq Nano DNA Sample Preparation kit (Illumina) and sequenced on a NextSeq 500 instrument (Illumina) at Fasteris S.A. (Geneva, Switzerland) to generate ~ 100M 150-bp paired-end reads. Reads were mapped on the *Arabidopsis* TAIR10 genome using (Li and Durbin, 2009) with the default options. Single-nucleotide polymorphisms calling was performed using SAMtools mpileup followed by BCFtools view with the -bvgN option. Distribution of the obtained Col-0/Ler single-nucleotide polymorphisms was analysed using Next\_Gen Mapping at <http://bar.utoronto.ca/ngm/>. Three candidate genes with EMS-induced non-synonymous mutations were identified in the mapping interval on chromosome 1. T-DNA mutant lines for the three candidate genes were analysed for release of gene silencing and allelic tests were performed, allowing identification of *RTELL1*.

### **Transcript analysis**

About 30–40 mg of rosette leaves was used for total RNA extraction with RNazol (Sigma), following the manufacturer's instructions. RNA (8 µg) was treated with 12 units of RQ1 DNase (Promega) for 1 h at 37°C and further purified by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. One-step reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was performed starting from 10 ng of RNA using the Sensi-FAST™ SYBR® No-ROX One-Step kit (Bioline) on an Eco™ Real-Time PCR System (Illumina), following a program of 10 min at 45°C, 5 min at 95°C, 40 cycles of 20 s at 95°C, and 30 s at 60°C. Amplification specificity was evaluated by analyzing a melting curve generated at the end of the reaction. Amplification of the *ACTIN2* gene transcripts was used as a reference for normalization and data were analyzed according to the 2- $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001). End-point RT-PCR was performed using the one-step RT-PCR kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions, in a final volume of 10 µl starting from 50 ng of RNA.

### **mRNA sequencing**

Total RNA was extracted from 16-day-old seedlings and treated as indicated above. Two biological replicates were collected for each genotype. Libraries were prepared using the TruSeq Stranded mRNA Library Prep kit (Illumina) and sequenced on a HiSeq 4000 instrument (Illumina) at Fasteris S.A. (Geneva, Switzerland) to generate ~ 26–35M 50-bp single-end reads. To detect differentially expressed PCGs and TEs, reads were aligned to the *Arabidopsis* TAIR10 genome using STAR version 2.7.2b (Dobin et al., 2013) retaining multi-mapped reads

mapping up to 10 positions. Subsequent read counting was performed with featureCounts version 2.0.0 (Liao et al., 2014) on the TAIR10 TE and PCG annotations. Normalization and differential analyses were done using DESeq2 version 1.26.0 (Love et al., 2014) with default parameters. Only loci with Benjamini-Hochberg adjusted *p-values* < 0.05 and with a log<sub>2</sub>-fold change  $\geq 0.585$  or  $\leq -0.585$  were considered differentially expressed. Gene ontology analysis was performed with PANTHER16.0 Overrepresentation Test (12/01/2020 release). We also re-analyzed publicly available data for *atxr5/6*, *mail1*, *main* (ERR1593751-ERR1593754, ERR1593757, ERR1593758, ERR1593761, ERR1593762 (Ikeda et al., 2017)), *fas2* and *pol2a-12* (ERR4194072- ERR4194079 (Bourguet et al., 2020)), *mom1* (SRR1159827, SRR1159829, SRR1159837, SRR1159839 (Moissiard et al., 2014)) and *clfswn* (SRR1931614, SRR1931620, SRR2500947, SRR2962411 (Wang et al., 2016)). In mRNA-seq and BS-seq (see below) analyses, allocation of genomic features to genomic compartments was based on the chromosomal pericentromeric heterochromatin coordinates previously defined by Bernatavichute et al. (Bernatavichute et al., 2008) based on the distributions of TEs, PCGs, and DNA methylation. Annotations lying within these coordinates were deemed pericentromeric, while annotations overlapping with or located outside these coordinates were assigned to chromosome arms.

### **Bisulfite sequencing (BS-seq)**

Genomic DNA was extracted from 16-day-old seedlings with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), following the manufacturer's instructions. Sodium bisulfite conversion, library preparation, and sequencing on a HiSeqXten were performed at the Beijing Genomics Institute (Hong Kong), producing ~ 26–35M 150-bp paired-end reads. All data analysis was done using the Methylypy analysis pipeline v1.4.6 (Schultz et al., 2015). Reads were filtered to remove PCR duplicates using Picard v2.23.3 and mapped to TAIR10 using Bowtie2 v2.4.1 (Langmead and Salzberg, 2012). Only cytosines with a minimum coverage of 6 reads were retained. To calculate average methylation levels at specific regions, we used the add-methylation-level function from Methylypy (Schultz et al., 2015).

### **Nuclei isolation and microscopy**

Rosette leaves from 3-week-old plants were fixed for 1 h in 4% formaldehyde in 1X PBS and subsequently chopped on a glass slide. Tissues were covered with a coverslip, manually squashed and frozen in liquid nitrogen for 10 s before rapidly removing the coverslip. Slides were washed twice in 1X PBS and DNA was stained with DAPI in Vectashield mounting

medium (Vector Laboratories). Nuclei were visualized using a Zeiss Axio Imager Z.1 epifluorescence microscope (Carl Zeiss AG) with a PL Aplanachromat 100X/1.40 oil objective and images were captured with a Zeiss AxioCam MRm camera using the Zeiss ZEN software. The relative heterochromatin fraction was computed for each nucleus by calculating the ratio of the sum of chromocenter volume (area x intensity) over that of the entire nucleus using the ImageJ software.

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP)**

ChIP were performed starting from 100–200mg of 3–4-week-old seedlings using the LowCell ChIP kit (Diagenode), following manufacture’s recommendations. Chromatin shearing was performed using the Bioruptor UCD-200 (Diagenode) for ten cycles of 30 s ‘ON’, 45 s ‘OFF’. Immunoprecipitation was performed using antibodies to H3 (Abcam ab1791; 2 mg). 3 ml per 100 ml purified DNA was used for real-time PCR amplification using the Eco Real-Time system (Illumina) and SensiFAST SYBR No-ROX kit (Bioline) in a final reaction volume of 10 ml. Data were collected from three biological replicates, and relative enrichment was expressed as percentage of input. *ACTIN2* promoter was used as a nucleosome-depleted control region.

### **ATAC-seq**

Library preparation and sequencing was done at the IPS2 Paris-Saclay lab, on 16-day-old seedlings. Reads were mapped to the *Arabidopsis* TAIR10 reference genome using STAR version 2.7.2b (Dobin et al., 2013). Peaks were called with MACS2 v2.2.(Zhang et al., 2008). Data for generating metaplots was obtained with DeepTools v3.3.2 (Ramírez et al., 2016).

### **References**

Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Scheid, O.M., and Paszkowski, J. (2000). Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* 405, 203–206.

Barber, L.J., Youds, J.L., Ward, J.D., McIlwraith, M.J., O’Neil, N.J., Petalcorin, M.I.R., Martin, J.S., Collis, S.J., Cantor, S.B., Auclair, M., et al. (2008). RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell* 135, 261–271.

Bellelli, R., Youds, J., Borel, V., Svendsen, J., Pavicic-Kaltenbrunner, V., and Boulton, S.J. (2020). Synthetic Lethality between DNA Polymerase Epsilon and RTEL1 in Metazoan

DNA Replication. *Cell Rep.* 31.

Bernatavichute, Y. V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 3, 3156.

Bourguet, P., De Bossoreille, S., López-González, L., Pouch-Pélissier, M.N., Gómez-Zambrano, Á., Devert, A., Pélissier, T., Pogorelcnik, R., Vaillant, I., and Mathieu, O. (2018). A role for MED14 and UVH6 in heterochromatin transcription upon destabilization of silencing. *Life Sci. Alliance* 1.

Bourguet, P., López-González, L., Gómez-Zambrano, Á., Pélissier, T., Hesketh, A., Potok, M.E., Pouch-Pélissier, M.N., Perez, M., Da Ines, O., Latrasse, D., et al. (2020). DNA polymerase epsilon is required for heterochromatin maintenance in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 21.

Clément, C., Orsi, G.A., Gatto, A., Boyarchuk, E., Forest, A., Hajj, B., Miné-Hattab, J., Garnier, M., Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.P., et al. (2018). High-resolution visualization of H3 variants during replication reveals their controlled recycling. *Nat. Commun.* 9.

Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452, 215–219.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.

Dorn, A., Feller, L., Castri, D., Röhrig, S., Enderle, J., Herrmann, N.J., Block-Schmidt, A., Trapp, O., Köhler, L., and Puchta, H. (2019). An *Arabidopsis* FANCI helicase homologue is required for DNA crosslink repair and rDNA repeat stability. *PLoS Genet.* 15.

Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y. V., Stroud, H., Feng, S., Caro, E., Vashisht, A.A., Terragni, J., Chin, H.G., Tu, A., et al. (2012). Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* 151, 167–180.

Du, J., Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., and Patel, D.J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 519–532.

Elmayan, T., Proux, F., and Vaucheret, H. (2005). *Arabidopsis* RPA2: A genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr. Biol.* 15, 1919–1925.

Evrin, C., Maman, J.D., Diamante, A., Pellegrini, L., and Labib, K. (2018). Histone H2A-H2B binding by Pol  $\alpha$  in the eukaryotic replisome contributes to the maintenance of repressive

chromatin. *EMBO J.* 37.

Han, J.J., Song, Z.T., Sun, J.L., Yang, Z.T., Xian, M.J., Wang, S., Sun, L., and Liu, J.X. (2018). Chromatin remodeling factor CHR18 interacts with replication protein RPA1A to regulate the DNA replication stress response in Arabidopsis. *New Phytol.* 220, 476–487.

Hu, Z., Cools, T., Kalhorzadeh, P., Heyman, J., and De Veylder, L. (2015). Deficiency of the Arabidopsis Helicase RTEL1 Triggers a SOG1-Dependent Replication Checkpoint in Response to DNA Cross-Links. *Plant Cell Online* 27, 149–161.

Iglesias, F.M., Bruera, N.A., Dergan-Dylon, S., Marino-Buslje, C., Lorenzi, H., Mateos, J.L., Turck, F., Coupland, G., and Cerdán, P.D. (2015). The Arabidopsis DNA Polymerase  $\delta$  Has a Role in the Deposition of Transcriptionally Active Epigenetic Marks, Development and Flowering. *PLoS Genet.* 11, 1–25.

Ikeda, Y., Pélissier, T., Bourguet, P., Becker, C., Pouch-Pélissier, M.N., Pogorelnik, R., Weingartner, M., Weigel, D., Deragon, J.M., and Mathieu, O. (2017). Arabidopsis proteins with a transposon-related domain act in gene silencing. *Nat. Commun.* 8, 15122.

Jasencakova, Z., Scharf, A.N.D., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G., and Groth, A. (2010). Replication Stress Interferes with Histone Recycling and Predeposition Marking of New Histones. *Mol. Cell* 37, 736–743.

Kotsantis, P., Segura-Bayona, S., Margalef, P., Marzec, P., Ruis, P., Hewitt, G., Bellelli, R., Patel, H., Goldstone, R., Poetsch, A.R., et al. (2020). RTEL1 Regulates G4/R-Loops to Avert Replication-Transcription Collisions. *Cell Rep.* 33, 108546.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.

Lansdorp, P., and van Wietmarschen, N. (2019). Helicases FANCI, RTEL1 and BLM act on guanine quadruplex DNA in vivo. *Genes (Basel)*. 10, 870.

Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11, 204–220.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.

Li, Z., Hua, X., Serra-Cardona, A., Xu, X., Gan, S., Zhou, H., Yang, W.S., Chen, C.L., Xu, R.M., and Zhang, Z. (2020). DNA polymerase  $\alpha$  interacts with H3-H4 and facilitates the transfer of parental histones to lagging strands. *Sci. Adv.* 6.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.

Liu, J., Ren, X., Yin, H., Wang, Y., Xia, R., Wang, Y., and Gong, Z. (2010). Mutation in

the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$  influences transcriptional gene silencing and homologous recombination in *Arabidopsis*. *Plant J.* *61*, 36–45.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* *25*, 402–408.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.

Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. *Mol. Cell* *24*, 309–316.

Moissiard, G., Cokus, S.J., Cary, J., Feng, S., Billi, A.C., Stroud, H., Husmann, D., Zhan, Y., Lajoie, B.R., McCord, R.P., et al. (2012). MORC family ATPases required for heterochromatin condensation and gene silencing. *Science* (80-. ). *336*, 1448–1451.

Moissiard, G., Bischof, S., Husmann, D., Pastor, W.A., Hale, C.J., Yen, L., Stroud, H., Papikian, A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., et al. (2014). Transcriptional gene silencing by *Arabidopsis* microorchidia homologues involves the formation of heteromers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7474–7479.

Morel, J.B., Mourrain, P., Béclin, C., and Vaucheret, H. (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* *10*, 1591–1594.

Mozgova, I., Wildhaber, T., Trejo-Arellano, M.S., Fajkus, J., Roszak, P., Köhler, C., and Hennig, L. (2018). Transgenerational phenotype aggravation in CAF-1 mutants reveals parent-of-origin specific epigenetic inheritance. *New Phytol.* *220*, 908–921.

Mozgová, I., Mokroš, P., and Fajkus, J. (2010). Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45s rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *22*, 2768–2780.

Nicolau, M., Picault, N., Descombin, J., Jami-Alahmadi, Y.I., Feng, S., Bucher, E.I., Jacobsen ID, S.E., Deragon, J.-M., Wohlschlegel, J.I., and Moissiard, G.I. (2020). The plant mobile domain proteins MAIN and MAIL1 interact with the phosphatase PP7L to regulate gene expression and silence transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet.* *16*, e1008324.

Paredes, S., and Maggert, K.A. (2009). Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17829–17834.

Paredes, S., Branco, A.T., Hartl, D.L., Maggert, K.A., and Lemos, B. (2011). Ribosomal dna deletions modulate genome-wide gene expression: “rDNA-sensitive” genes and natural



variation. *PLoS Genet.* 7, 1001376.

Probst, A. V., Franz, P.F., Paszkowski, J., and Mittelsten Scheid, O. (2003). Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J.* 33, 743–749.

Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W160–W165.

Raynaud, C., Sozzani, R., Glab, N., Domenichini, S., Perennes, C., Cella, R., Kondorosi, E., and Bergounioux, C. (2006). Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47, 395–407.

Recker, J., Knoll, A., and Puchta, H. (2014). The *Arabidopsis thaliana* Homolog of the Helicase RTEL1 Plays Multiple Roles in Preserving Genome Stability. *Plant Cell Online* 26, 4889–4902.

Reverón-Gómez, N., González-Aguilera, C., Stewart-Morgan, K.R., Petryk, N., Flury, V., Graziano, S., Johansen, J.V., Jakobsen, J.S., Alabert, C., and Groth, A. (2018). Accurate Recycling of Parental Histones Reproduces the Histone Modification Landscape during DNA Replication. *Mol. Cell* 72, 239-249.e5.

Röhrig, S., Schröpfer, S., Knoll, A., and Puchta, H. (2016). The RTR Complex Partner RMI2 and the DNA Helicase RTEL1 Are Both Independently Involved in Preserving the Stability of 45S rDNA Repeats in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 12.

Sarkies, P., and Sale, J.E. (2012). Propagation of histone marks and epigenetic memory during normal and interrupted DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 697–716.

Schönrock, N., Exner, V., Probst, A., Gruissem, W., and Hennig, L. (2006). Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 281, 9560–9568.

Schultz, M.D., He, Y., Whitaker, J.W., Hariharan, M., Mukamel, E.A., Leung, D., Rajagopal, N., Nery, J.R., Urich, M.A., Chen, H., et al. (2015). Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature* 523, 212–216.

Steimer, A., Amedeo, P., Afsar, K., Franz, P., Scheid, O.M., and Paszkowski, J. (2000). Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 1165–1178.

Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-Parra, E., Jacobsen, S.E., and Gutierrez, C. (2012). Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5370–5375.

Stroud, H., Greenberg, M.V.C., Feng, S., Bernatavichute, Y. V., and Jacobsen, S.E. (2013). Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell* 152, 352–364.

Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Probst, A. V, Angelis, K.J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Scheid, O.M., Shibahara, K.-I., et al. (2003). BRU1, a novel link between response to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev.* 18, 782–793.

Ühlken, C., Horvath, B., Stadler, R., Sauer, N., and Weingartner, M. (2014). MAIN-LIKE1 is a crucial factor for correct cell division and differentiation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 78, 107–120.

Uringa, E.J., Lisaingo, K., Pickett, H.A., Brind'Amour, J., Rohde, J.H., Zelensky, A., Essers, J., and Lansdorp, P.M. (2012). RTEL1 contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. *Mol. Biol. Cell* 23, 2782–2792.

Vaillant, I., Schubert, I., Tourmente, S., and Mathieu, O. (2006). MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis. *EMBO Rep.* 7, 1273–1278.

Vannier, J.B., Sandhu, S., Petalcorin, M.I., Wu, X., Nabi, Z., Ding, H., and Boulton, S.J. (2013). RTEL1 is a replisome-associated helicase that promotes telomere and genome-wide replication. *Science* (80-. ). 342, 239–242.

Wang, Z., Schwacke, R., and Kunze, R. (2016). DNA Damage-Induced Transcription of Transposable Elements and Long Non-coding RNAs in Arabidopsis Is Rare and ATM-Dependent. *Mol. Plant* 9, 1142–1155.

Wenig, U., Meyer, S., Stadler, R., Fischer, S., Werner, D., Lauter, A., Melzer, M., Hoth, S., Weingartner, M., and Sauer, N. (2013). Identification of MAIN, a factor involved in genome stability in the meristems of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 75, 469–483.

Wollmann, H., Holec, S., Alden, K., Clarke, N.D., Jacques, P.É., and Berger, F. (2012). Dynamic deposition of histone variant H3.3 accompanies developmental remodeling of the Arabidopsis transcriptome. *PLoS Genet.* 8, 1002658.

Wollmann, H., Stroud, H., Yelagandula, R., Tarutani, Y., Jiang, D., Jing, L., Jamge, B., Takeuchi, H., Holec, S., Nie, X., et al. (2017). The histone H3 variant H3.3 regulates gene body DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.* 18.

Yin, H., Zhang, X., Liu, J., Wang, Y., He, J., Yang, T., Hong, X., Yang, Q., and Gong, Z. (2009). Epigenetic regulation, somatic homologous recombination, and abscisic acid signaling are influenced by dna polymerase  $\epsilon$  mutation in arabidopsis. *Plant Cell* 21, 386–402.

Yokthongwattana, C., Bucher, E., Čaikovski, M., Vaillant, I., Nicolet, J., Scheid, O.M., and Paszkowski, J. (2010). MOM1 and Pol-IV/V interactions regulate the intensity and specificity of transcriptional gene silencing. *EMBO J.* 29, 340–351.

Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., and Zilberman, D. (2013). The arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* *153*, 193–205.

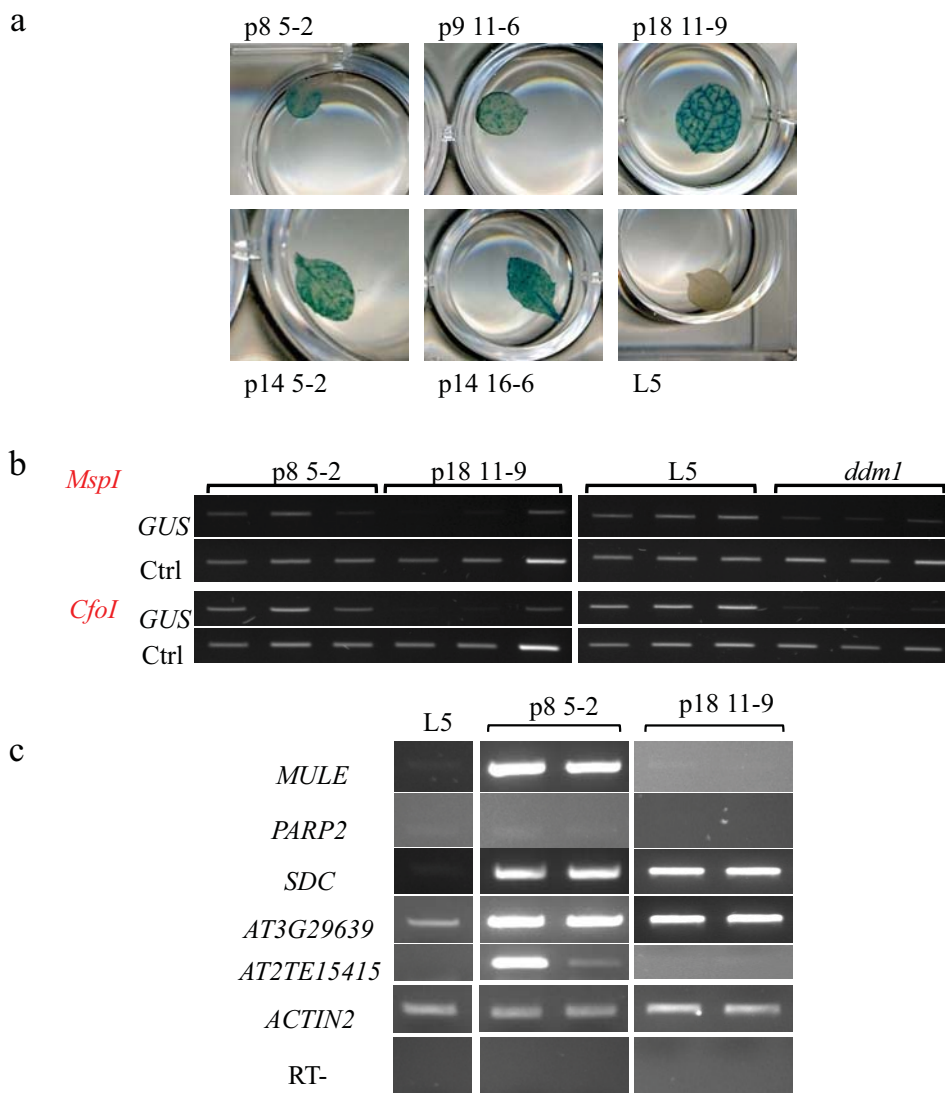
Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* *16*, 2–9.

Zhang, J., Xie, S., Zhu, J.-K., and Gong, Z. (2016a). Requirement for flap endonuclease 1 (FEN1) to maintain genomic stability and transcriptional gene silencing in Arabidopsis HHS Public Access. *Plant J* *87*, 629–640.

Zhang, J., Xie, S., Cheng, J., Lai, J., Zhu, J.-K., and Gong, Z. (2016b). The Second Subunit of DNA Polymerase Delta Is Required for Genomic Stability and Epigenetic Regulation. *Plant Physiol.* *171*, 1192–1208.

Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., et al. (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell* *126*, 1189–1201.

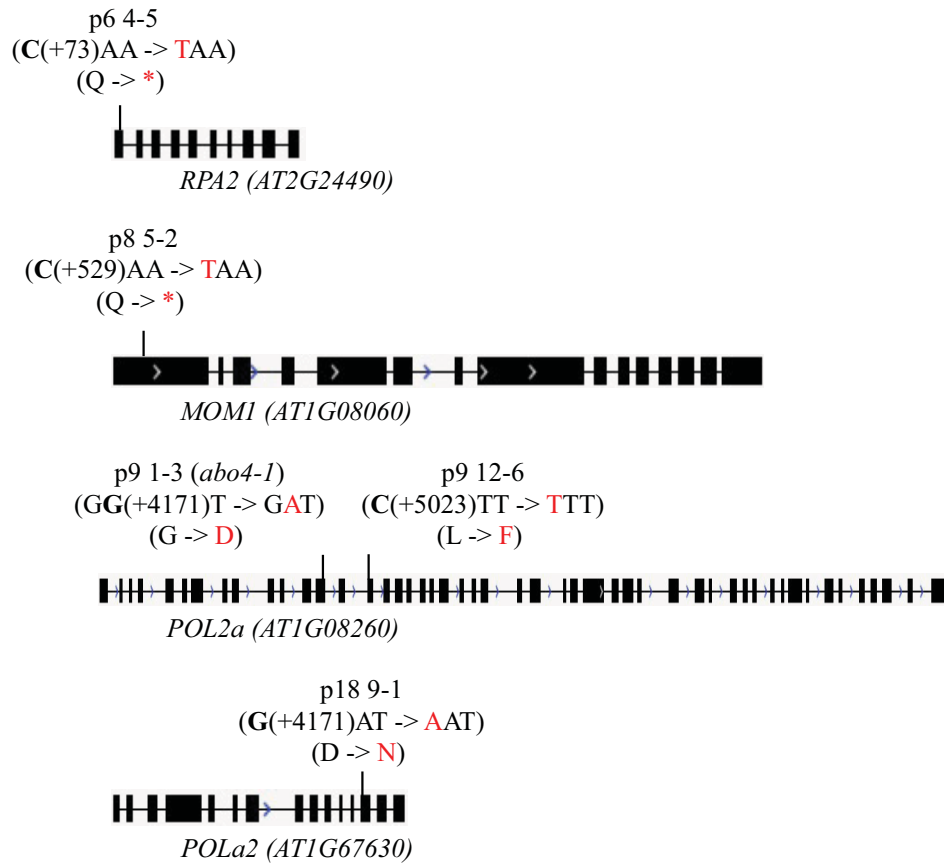
Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nussbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* *9*.



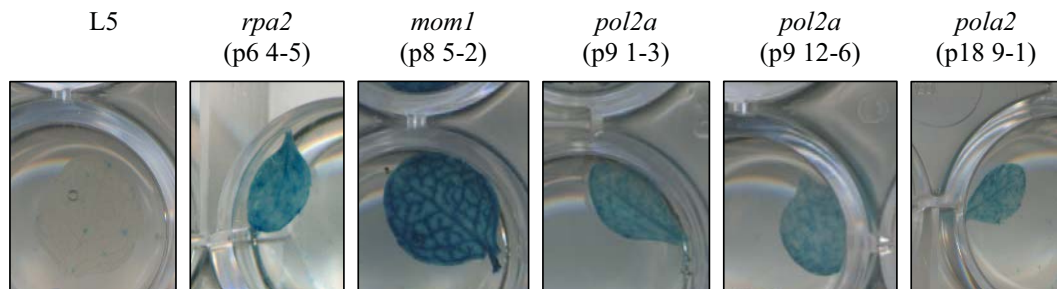
**Supplementary Figure 1: Screening strategy to isolate new silencing mutants.**

**(a)** Photos of the histochemical staining for GUS activity in leaves of mutants and L5 WT plant as control. **(b)** PCR amplification of the GUS transgene and a methylated endogenous locus after *MspI* or *CfoI* digestion. L5 and *ddm1* plants were used as positive and negative control respectively. Enzymatic digestion and PCR were done on three biological replicates. **(c)** RT-PCR at endogenous loci selected for their reactivation in known silencing mutants without associated loss of DNA methylation.

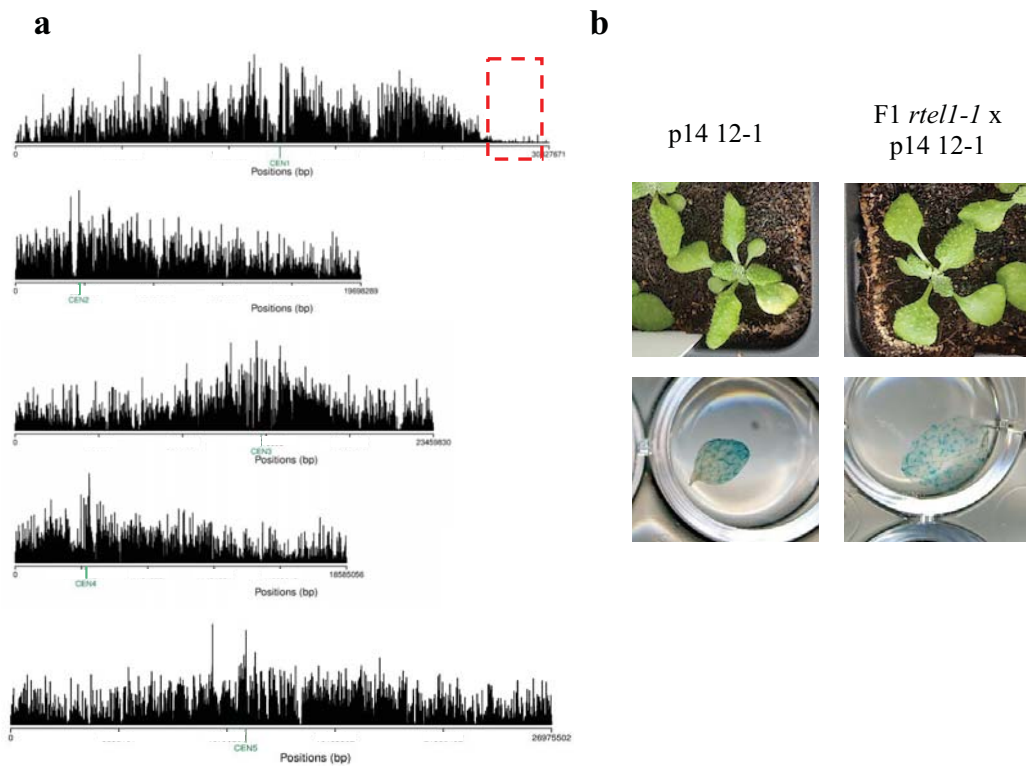
**a**



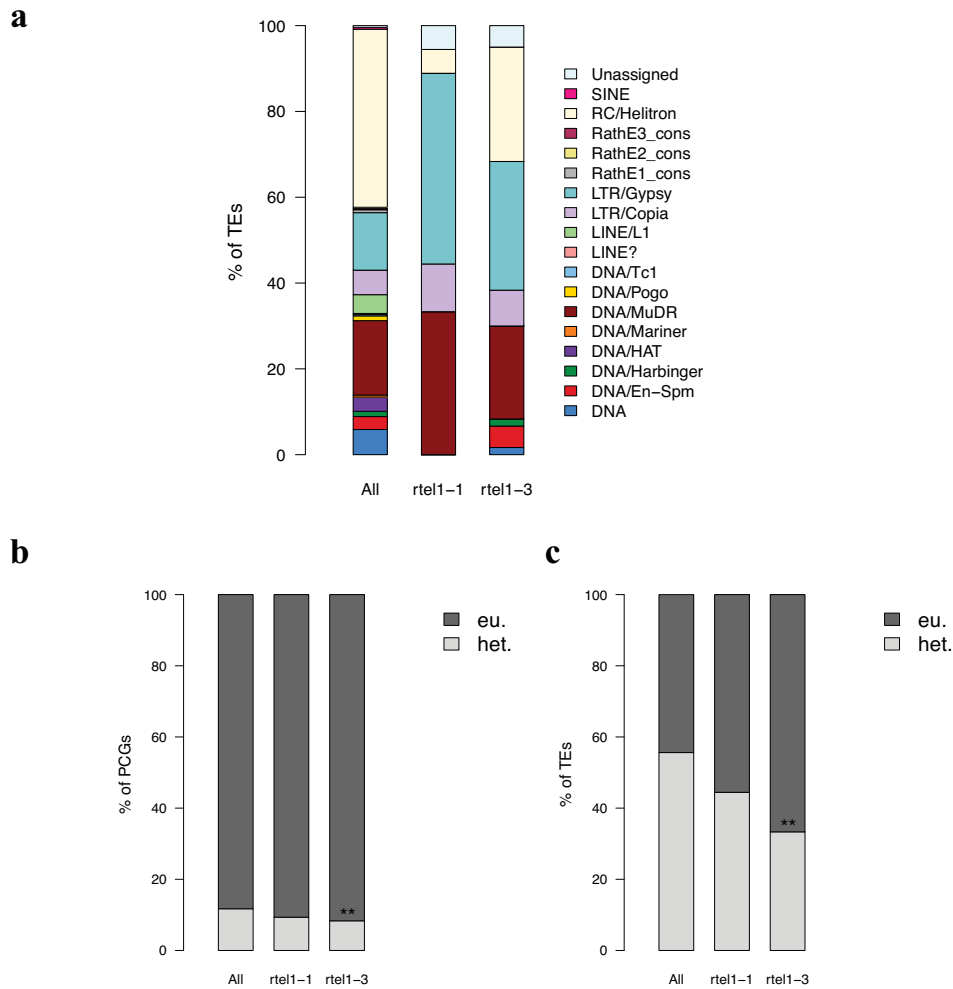
**b**



**Supplementary Figure 2:** Mutant alleles of known silencing factors isolated in this screen. **(a)** Representation of the genes with the mutation and the equivalent amino acid change in red. The numbers in brackets correspond to the position of the mutated nucleotide relative to the transcription start site. **(b)** Photos of the histochemical staining for GUS activity in leaves of the isolated mutants and L5 WT plant as control.



**Supplementary figure 3:** A mutation in *RTELI* is responsible for silencing defects in p14 12-1. **(a)** Mapping of p14 12-1 mutation by mapping-by-sequencing. Distribution of *Landsberg* (Ler) Single Nucleotide Polymorphism (SNP) frequency along the five *Arabidopsis* chromosomes in the F2 Ler x p14 12-1 progeny. The dashed red box marks the region depleted in Ler SNP frequency that carries the causative mutation. **(b)** Photos of 3-week-old plants (top) and histochemical staining for GUS activity (bottom) of the p14 12-1 mutant and complementation test.



**Supplementary Figure 4:** Percentage and superfamily-classification of TEs overexpressed in *rtell* mutants. The distribution of all TEs in *Arabidopsis* genome is shown for comparison. **(b)** Fraction of PCGs upregulated in *rtell* located in euchromatin (eu.) or in pericentromeric heterochromatin (het.). Genomic compartments were defined based on pericentromeric heterochromatin coordinates as in Bernatavichute *et al.*, 2008. Asterisks mark statistically significant differences from the distribution of total *Arabidopsis* PCGs (\*\*: z-score = 3,65, p-value < 0.01). **(c)** Same as **(b)** (\*\*: z-score = -3.47, p-value < 0.01).

**Table 1 : Upregulated PCGs in *rtell-1***

Upregulated PCGs in <i>rtell-1</i>	Arabidopsis thaliana - REFLIST (27462)	Input (920)	expected	fold Enrichment	raw P-value	FDR
GO biological process complete						
phloem sucrose unloading (GO:0110128)	2	2	0.03	70.24	1.16E-03	4.82E-02
double-strand break repair via synthesis-dependent strand annealing (GO:0045003)	8	3	0.11	26.34	4.17E-04	2.14E-02
telomere maintenance via telomerase (GO:0007004)	10	3	0.14	21.07	7.07E-04	3.37E-02
leucine biosynthetic process (GO:0009098)	14	4	0.2	20.07	1.00E-04	7.64E-03
removal of superoxide radicals (GO:0019430)	11	3	0.16	19.16	8.91E-04	3.96E-02
regulation of glucosinolate biosynthetic process (GO:0010439)	11	3	0.16	19.16	8.91E-04	3.99E-02
DNA unwinding involved in DNA replication (GO:0006268)	19	5	0.27	18.48	1.81E-05	1.74E-03
response to gamma radiation (GO:0010332)	16	4	0.23	17.56	1.55E-04	1.06E-02
glucosinolate biosynthetic process (GO:0019761)	39	9	0.56	16.21	2.00E-08	3.96E-06
lignin biosynthetic process (GO:0009809)	42	8	0.6	13.38	4.50E-07	6.88E-05
cellular response to metal ion (GO:0071248)	22	4	0.31	12.77	4.48E-04	2.28E-02
negative regulation of mitotic nuclear division (GO:0045839)	25	4	0.36	11.24	6.88E-04	3.33E-02
response to insect (GO:0009625)	32	5	0.46	10.97	1.60E-04	1.05E-02
induced systemic resistance (GO:0009682)	32	5	0.46	10.97	1.60E-04	1.06E-02
microtubule-based movement (GO:0007018)	66	10	0.94	10.64	1.11E-07	1.94E-05
mitotic cytokinesis (GO:0000281)	40	6	0.57	10.54	4.29E-05	3.76E-03
plant-type cell wall loosening (GO:0009828)	37	5	0.53	9.49	2.95E-04	1.67E-02
regulation of DNA endoreduplication (GO:0032875)	37	5	0.53	9.49	2.95E-04	1.69E-02
response to karrikin (GO:0080167)	127	14	1.81	7.74	1.32E-08	3.02E-06
flavonoid biosynthetic process (GO:0009813)	55	6	0.78	7.66	2.13E-04	1.30E-02
jasmonic acid metabolic process (GO:0009694)	50	5	0.71	7.02	1.04E-03	4.45E-02
pectin catabolic process (GO:0045490)	98	8	1.4	5.73	1.28E-04	9.06E-03
meiosis I (GO:0007127)	74	6	1.05	5.69	9.23E-04	4.04E-02
defense response to fungus (GO:0050832)	253	19	3.6	5.27	1.25E-08	2.98E-06
cellular response to radiation (GO:0071478)	110	8	1.57	5.11	2.68E-04	1.57E-02
response to UV (GO:0009411)	125	9	1.78	5.06	1.20E-04	8.75E-03
response to jasmonic acid (GO:0009753)	175	11	2.49	4.41	6.93E-05	5.73E-03
response to heat (GO:0009408)	231	14	3.29	4.26	1.08E-05	1.13E-03
response to wounding (GO:0009611)	236	14	3.36	4.17	1.36E-05	1.37E-03
response to water deprivation (GO:0009414)	359	15	5.11	2.93	2.94E-04	1.70E-02
response to salt stress (GO:0009651)	446	16	6.35	2.52	9.21E-04	4.06E-02

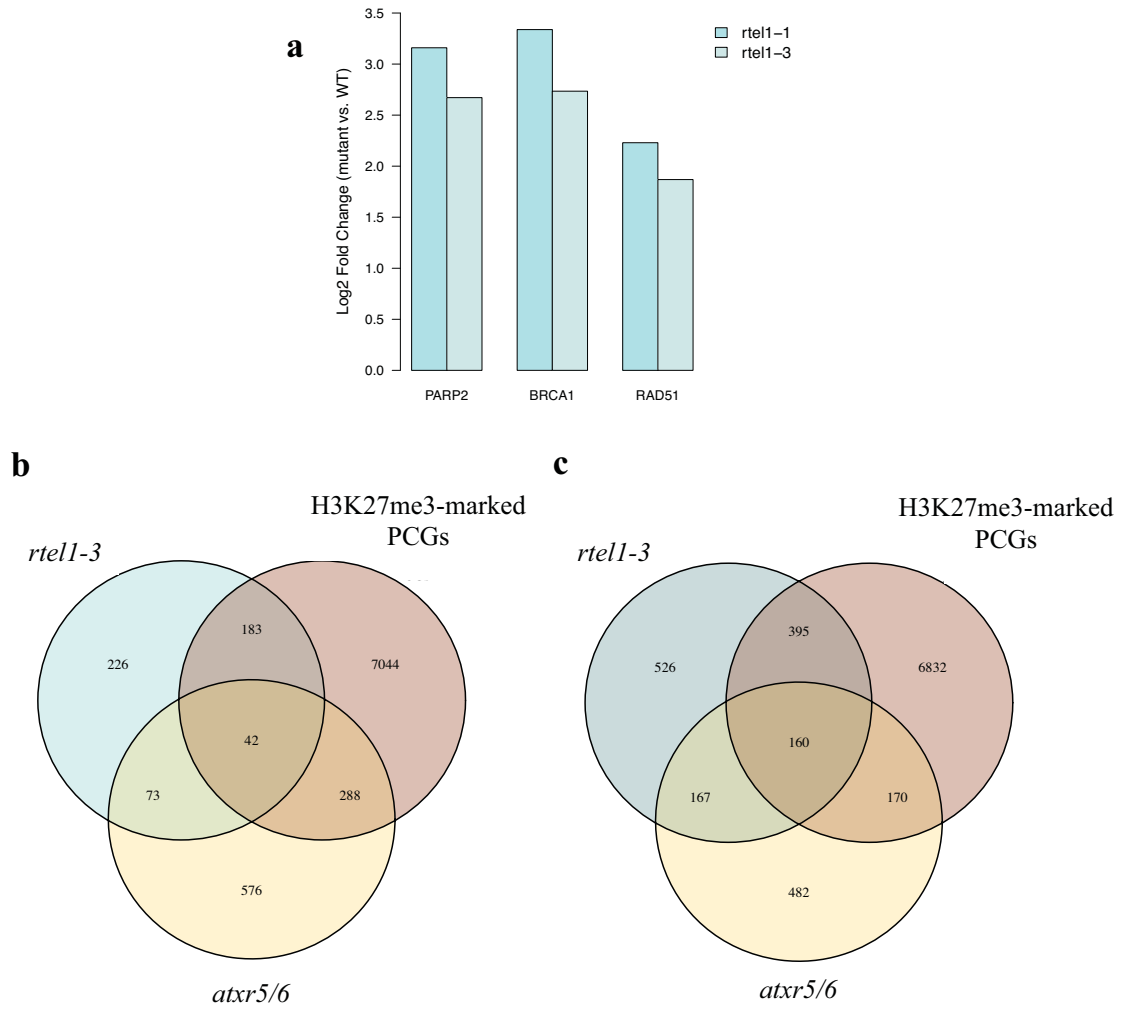


**Table 2 : Upregulated PCGs in *rtell-3***

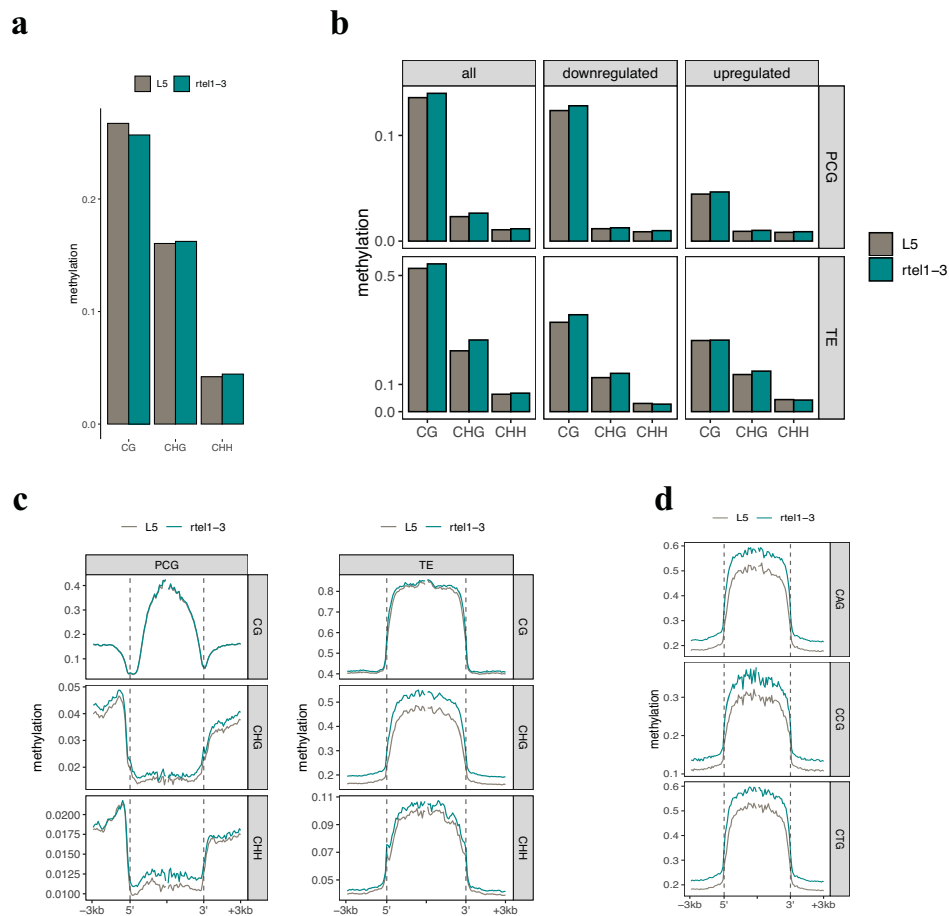
Upregulated PCGs in <i>rtell-3</i>	Arabidopsis	Input (920)	expected	fold Enrichm	raw P-value	FDR
GO biological process complete						
salicylic acid catabolic process (GO:0046244)	4	3	0.13	22.39	1.08E-03	3.19E-02
pyridoxine biosynthetic process (GO:0008615)	5	3	0.17	17.91	1.68E-03	4.51E-02
negative regulation of cytokinin-activated signaling pathway (GO:0080037)	5	3	0.17	17.91	1.68E-03	4.49E-02
fructose 1,6-bisphosphate metabolic process (GO:0030388)	12	5	0.4	12.44	1.58E-04	6.45E-03
response to herbivore (GO:0080027)	17	7	0.57	12.29	7.85E-06	4.41E-04
response to insect (GO:0009625)	32	13	1.07	12.13	1.12E-09	1.33E-07
cellular response to disaccharide stimulus (GO:0071324)	10	4	0.34	11.94	8.46E-04	2.65E-02
toxin catabolic process (GO:0009407)	46	16	1.54	10.38	8.84E-11	1.12E-08
defense response to insect (GO:0002213)	24	8	0.8	9.95	6.23E-06	3.67E-04
proline metabolic process (GO:0006560)	12	4	0.4	9.95	1.46E-03	4.08E-02
anthocyanin-containing compound biosynthetic process (GO:0009718)	18	6	0.6	9.95	9.31E-05	4.07E-03
regulation of systemic acquired resistance (GO:0010112)	23	7	0.77	9.08	3.89E-05	1.83E-03
response to molecule of fungal origin (GO:0002238)	20	6	0.67	8.96	1.51E-04	6.23E-03
phloem transport (GO:0010233)	21	6	0.7	8.53	1.88E-04	7.58E-03
lignin biosynthetic process (GO:0009809)	42	11	1.41	7.82	8.58E-07	6.38E-05
response to iron ion (GO:0010039)	23	6	0.77	7.79	2.86E-04	1.04E-02
glucosinolate biosynthetic process (GO:0019761)	39	10	1.31	7.65	3.18E-06	2.04E-04
systemic acquired resistance (GO:0009627)	62	15	2.08	7.22	2.21E-08	2.09E-06
cellular oxidant detoxification (GO:0098869)	25	6	0.84	7.16	4.20E-04	1.47E-02
glutathione metabolic process (GO:0006749)	77	18	2.58	6.98	1.41E-09	1.61E-07
L-phenylalanine metabolic process (GO:0006558)	26	6	0.87	6.89	5.02E-04	1.72E-02
jasmonic acid biosynthetic process (GO:0009695)	26	6	0.87	6.89	5.02E-04	1.70E-02
regulation of phenylpropanoid metabolic process (GO:2000762)	27	6	0.9	6.63	5.97E-04	1.98E-02
gluconeogenesis (GO:0006094)	23	5	0.77	6.49	1.87E-03	4.88E-02
response to ionizing radiation (GO:0010212)	28	6	0.94	6.4	7.06E-04	2.28E-02
response to ozone (GO:0010193)	33	7	1.11	6.33	2.69E-04	1.01E-02
cellular response to cold (GO:0070417)	35	7	1.17	5.97	3.68E-04	1.30E-02
response to wounding (GO:0009611)	236	47	7.91	5.94	2.62E-20	8.22E-18
regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway (GO:2000022)	41	8	1.37	5.82	1.64E-04	6.64E-03
regulation of secondary metabolite biosynthetic process (GO:1900376)	31	6	1.04	5.78	1.12E-03	3.31E-02
cell wall macromolecule catabolic process (GO:0016998)	31	6	1.04	5.78	1.12E-03	3.29E-02
salicylic acid mediated signaling pathway (GO:0009863)	42	8	1.41	5.69	1.90E-04	7.38E-03
endoplasmic reticulum unfolded protein response (GO:0030968)	32	6	1.07	5.6	1.30E-03	3.70E-02
induced systemic resistance (GO:0009682)	32	6	1.07	5.6	1.30E-03	3.68E-02
pentose-phosphate shunt (GO:0006098)	33	6	1.11	5.43	1.49E-03	4.15E-02
cellular response to reactive oxygen species (GO:0034614)	35	6	1.17	5.12	1.95E-03	5.02E-02
glucosinolate catabolic process (GO:0019762)	35	6	1.17	5.12	1.95E-03	4.99E-02
response to zinc ion (GO:0010043)	42	7	1.41	4.97	9.63E-04	2.96E-02
response to karrikin (GO:0080167)	127	21	4.25	4.94	1.44E-08	1.38E-06
leaf senescence (GO:0010150)	107	16	3.58	4.46	2.42E-06	1.58E-04
response to sucrose (GO:0009744)	70	10	2.35	4.26	2.58E-04	9.84E-03
defense response to fungus (GO:0050832)	253	36	8.48	4.25	5.49E-12	8.18E-10
jasmonic acid mediated signaling pathway (GO:0009867)	71	10	2.38	4.2	2.86E-04	1.05E-02
hyperosmotic salinity response (GO:0042538)	58	8	1.94	4.12	1.29E-03	3.70E-02
reactive oxygen species metabolic process (GO:0072593)	69	9	2.31	3.89	9.37E-04	2.90E-02
response to hydrogen peroxide (GO:0042542)	70	9	2.35	3.84	1.03E-03	3.12E-02
response to monosaccharide (GO:0034284)	72	9	2.41	3.73	1.23E-03	3.59E-02
response to light intensity (GO:0009642)	139	17	4.66	3.65	1.34E-05	6.93E-04
cellular response to hypoxia (GO:0071456)	234	28	7.84	3.57	3.75E-08	3.24E-06
programmed cell death (GO:0012501)	76	9	2.55	3.53	1.73E-03	4.60E-02
response to water deprivation (GO:0009414)	359	42	12.03	3.49	2.93E-11	3.96E-09
cellular amino acid catabolic process (GO:0009063)	89	10	2.98	3.35	1.41E-03	3.95E-02
response to UV (GO:0009411)	125	13	4.19	3.1	5.68E-04	1.91E-02
cellular amino acid biosynthetic process (GO:0008652)	184	18	6.16	2.92	1.11E-04	4.73E-03
cellular response to abscisic acid stimulus (GO:0071215)	134	13	4.49	2.9	1.03E-03	3.11E-02
response to chitin (GO:0010200)	138	13	4.62	2.81	1.31E-03	3.71E-02
alpha-amino acid biosynthetic process (GO:1901607)	160	14	5.36	2.61	1.67E-03	4.50E-02
cellular response to starvation (GO:0009267)	163	14	5.46	2.56	1.96E-03	4.99E-02
photosynthesis (GO:0015979)	188	16	6.3	2.54	1.06E-03	3.17E-02
response to cadmium ion (GO:0046686)	313	26	10.49	2.48	6.39E-05	2.90E-03
anion transmembrane transport (GO:0098656)	256	20	8.58	2.33	8.44E-04	2.66E-02
carbohydrate catabolic process (GO:0016052)	233	18	7.81	2.31	1.73E-03	4.59E-02

**Table 3: Upregulated PCGs in *rtell-1* and *rtell-3***

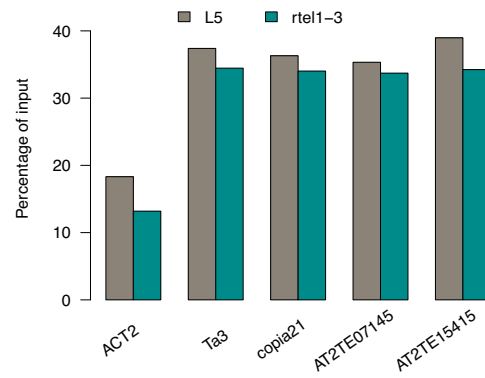
Upregulated PCGs in <i>rtell-1</i> and <i>rtell-3</i>	Arabidopsis t	258	expected	fold Enrichm	raw P-value	FDR
GO biological process complete						
phloem sucrose unloading (GO:0110128)	2	2	0.02	> 100	5.11E-04	3.35E-02
cellular response to ozone (GO:0071457)	3	2	0.03	70.96	8.47E-04	4.90E-02
leucine biosynthetic process (GO:0009098)	14	4	0.13	30.41	2.02E-05	2.56E-03
response to gamma radiation (GO:0010332)	16	4	0.15	26.61	3.16E-05	3.76E-03
glucosinolate biosynthetic process (GO:0019761)	39	9	0.37	24.56	5.57E-10	2.55E-07
negative regulation of mitotic nuclear division (GO:0045839)	25	4	0.23	17.03	1.45E-04	1.29E-02
lignin biosynthetic process (GO:0009809)	42	6	0.39	15.21	5.42E-06	8.50E-04
induced systemic resistance (GO:0009682)	32	4	0.3	13.31	3.42E-04	2.57E-02
response to insect (GO:0009625)	32	4	0.3	13.31	3.42E-04	2.54E-02
regulation of DNA endoreduplication (GO:0032875)	37	4	0.35	11.51	5.66E-04	3.41E-02
response to UV-B (GO:0010224)	73	5	0.69	7.29	8.16E-04	4.76E-02
double-strand break repair via homologous recombination (GO:0000724)	90	6	0.85	7.1	2.82E-04	2.16E-02
cellular response to radiation (GO:0071478)	110	7	1.03	6.77	1.16E-04	1.06E-02
defense response to fungus (GO:0050832)	253	16	2.38	6.73	5.59E-09	1.96E-06
pectin catabolic process (GO:0045490)	98	6	0.92	6.52	4.35E-04	2.97E-02
DNA replication (GO:0006260)	122	7	1.15	6.11	2.12E-04	1.76E-02
response to jasmonic acid (GO:0009753)	175	10	1.64	6.08	9.96E-06	1.41E-03
response to karrikin (GO:0080167)	127	7	1.19	5.87	2.68E-04	2.13E-02
response to wounding (GO:0009611)	236	12	2.22	5.41	4.06E-06	6.71E-04
response to water deprivation (GO:0009414)	359	13	3.37	3.85	5.14E-05	5.67E-03
response to salt stress (GO:0009651)	446	13	4.19	3.1	4.04E-04	2.80E-02
cell cycle process (GO:0022402)	419	12	3.94	3.05	7.78E-04	4.58E-02



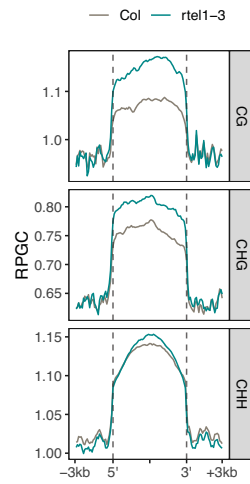
**Supplementary Figure 5: DNA damage markers are upregulated in *rtell* mutants.** (a) Log<sub>2</sub> fold change (mutant vs. WT) of *PARP2* (AT4G02390), *BRCA1* (AT4G21070) and *RAD51* (AT5G20850) in *rtell-1* and *rtell-3*. (b) Venn diagram of overlap between upregulated PCGs in *rtell-1*, *atxr5/6* and H3K27me3-marked PCGs. (c) Venn diagram of overlap between upregulated PCGs in *rtell-3*, *atxr5/6* and H3K27me3-marked PCGs.



**Supplementary Figure 6:** Transcript accumulation defects in *rtel1* are not linked to DNA methylation changes. **(a)** Average methylation level at the L5 transgene in all three cytosine context. **(b)** Average methylation level at all PCGs and TEs and at PCGs and TEs significantly upregulated or downregulated in *rtel1-3* in CG, CHG and CHH contexts. **(c)** Metaplots showing average methylation levels at all PCGs and TEs in all three cytosine contexts. PCGs and TEs were aligned at their 5' and 3' ends (dashed lines) and average methylation levels per 100 bp window was plotted 3kb upstream and 3kb downstream from the alignment points. **(d)** Metaplots showing average methylation levels at all TEs in the three CHG subcontexts. TEs were aligned at their 5' and 3' ends (dashed lines) and average methylation levels per 100 bp window was plotted 3kb upstream and 3kb downstream from the alignment points.



**Supplementary Figure 7:** Nucleosome occupancy appears unchanged in *rtel1* mutants. ChIP analysis of H3 at the indicated heterochromatic loci in L5 and *rtel1-3* leaves. Relative amount of immunoprecipitated DNA determined by real-time PCR is expressed as percentage of input. Bars represent the mean of two to three biological replicates. *ACTIN2* (*ACT2*) promoter region was used as a positive control depleted in nucleosome.



**Supplementary Figure 8:** Chromatin accessibility is impaired at DNA hypermethylated regions. Metaplot showing average RPGC in the indicated genotypes at *rtel1* DNA-hypermethylated regions. Hypermethylated regions were aligned at their 5' and 3' ends (dashed lines) and average RPGC in each 100bp window was plotted 3kb upstream and 3kb downstream from the alignment points.



## Dissection des couches de silencing de l'élément transposable *Evadé*

---

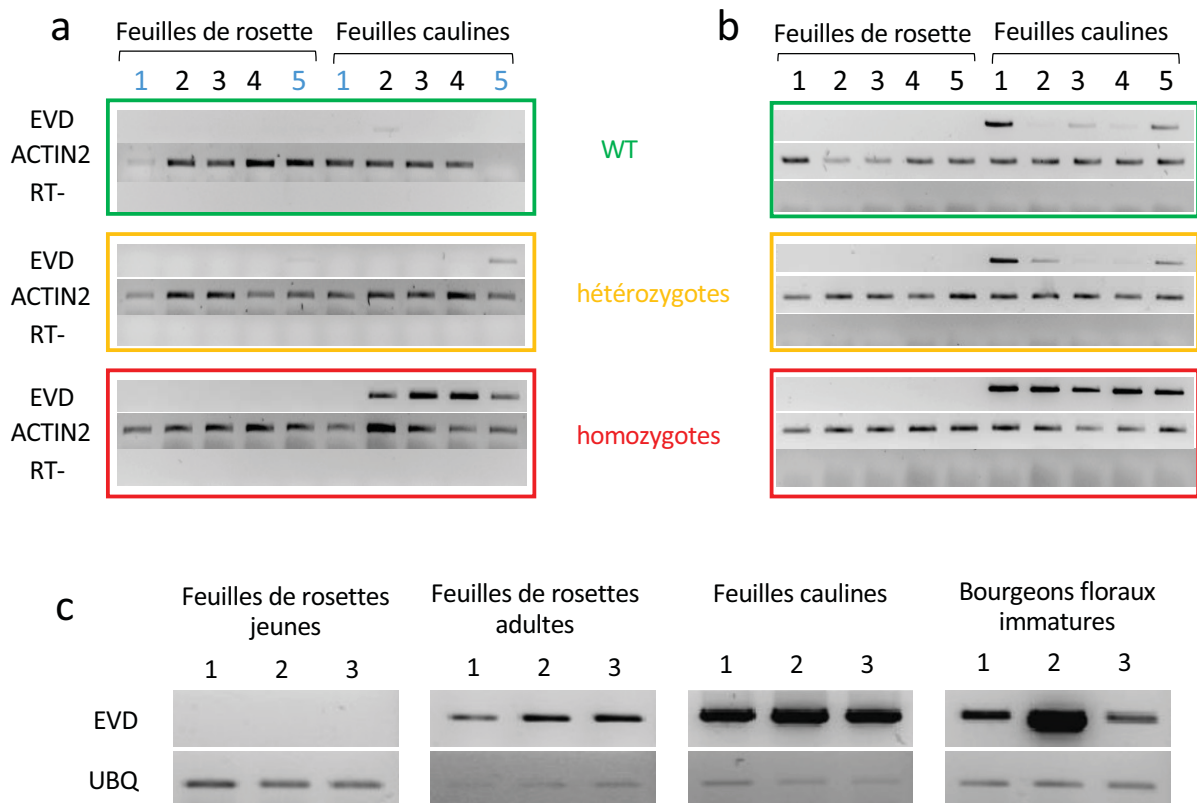
### 1. La méthylation CG n'est pas suffisante dans certains tissus pour maintenir le silencing d'*EVD*

Les données préliminaires du laboratoire sur l'allèle *met1-7* suggèrent l'existence de mécanismes de silencing d'*EVD* différents en fonction des types cellulaire et/ou des stades développementaux. Pour préciser ces observations nous avons, avec l'aide de Thierry Pélissier (CR dans l'équipe), testé la transcription d'*EVD* dans les feuilles de rosette et les feuilles caulines de dix plantes sœurs *met1-7* de la première génération mutante homozygote issue de l'autofécondation d'un individu hétérozygote (génération S1). Nous n'avons détecté aucun transcrits *EVD* dans les échantillons extraits des feuilles de rosettes jeunes de stade 2 (feuilles 4-5 sans trichome prélevées à 3,5 semaines), contrairement à ceux extraits des feuilles caulines (Figure 15a). La même observation a été faite sur la descendance issue de l'autofécondation de deux des plantes hétérozygotes S1 analysées (génération S2) (Figure 15b, Annexe 1). L'analyse de la génération S2 a été faite par Tiphanie Boisnier lors de son stage de Master 1 que j'ai encadré, sous la supervision d'Olivier Mathieu. Avec l'aide de Timothée Berçon, un stagiaire de Master 2 encadré par Thierry Pélissier, nous avons étendu l'analyse tissulaire aux feuilles de rosettes adultes de stade 3 (feuilles avec trichomes prélevées à 5,5 semaines) et bourgeons floraux immatures. En absence de méthylation CG on détecte des transcrits *EVD* dans les feuilles de rosettes adultes et leur niveau d'accumulation augmente dans les tissus apparaissant après la transition du stade végétatif au stade reproductif (Figure 15c). La perte de méthylation CG ne suffit donc pas à la réactivation d'*EVD* dans les tissus jeunes suggérant l'existence d'une ou plusieurs couche(s) supplémentaire(s) de silencing dans ces tissus. Au contraire, dans les tissus adultes, la méthylation CG est suffisante pour maintenir le silencing.

### 2. H3K27me3 semble constituer une couche de silencing supplémentaire tissu-spécifique

Afin d'identifier le mécanisme mis en jeu dans le contrôle tissu-spécifique de l'expression d'*EVD* dans un fond *met1*, nous avons, à partir de données publiées de CHIP-chip (Deleris et al., 2012) et de données du laboratoire, identifié les modifications post-traductionnelles d'histones présentent sur l'élément. Cette analyse a montré la présence de H3K9me2 et de H3K27me3, en plus de la méthylation de l'ADN (Figure 16a). Dans le mutant *met1-3*, la perte

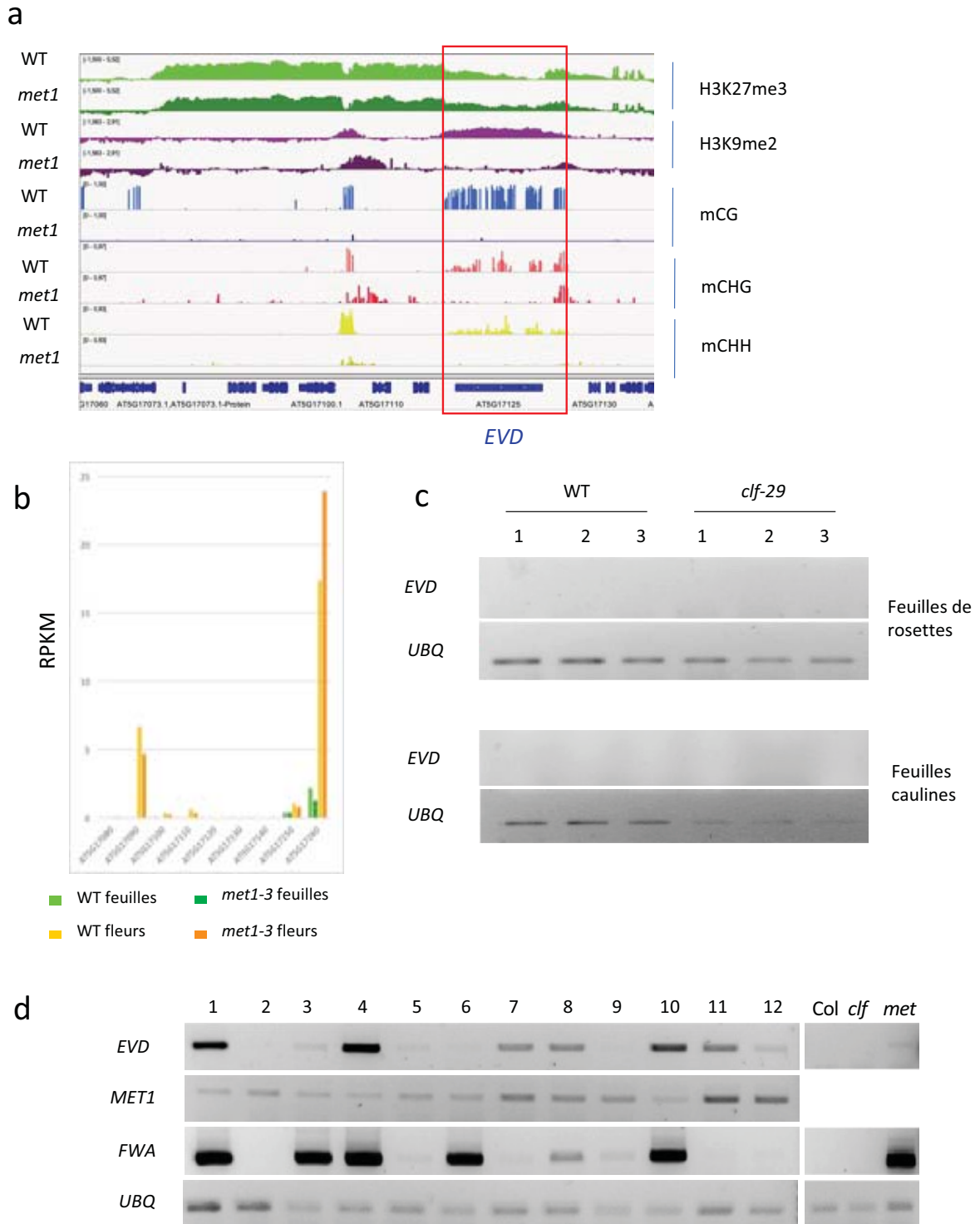




**Figure 15: *EVD* est réactivé spécifiquement dans les tissus apparaissant après la transition au stade reproductif**

**(a) (b)** Amplification par RT-PCR des transcrits *EVD* dans des feuilles de rosettes et feuilles caulines de cinq plantes sauvages (WT), *met1-7/+* (hétérozygotes) ou *met1-7* (homozygotes) en génération S1 (a) et génération S2 (descendance de la plante S1 *met1-7/+* numéro 1) (b). Les chiffres en bleu (a) correspondent aux numéros des deux plantes utilisées pour l'analyse des générations S2. **(c)** Amplification par RT-PCR des transcrits *EVD* dans les tissus indiqués de trois plantes individuelles. Les feuilles de rosettes jeunes ont été prélevées à 3,5 semaines et les feuilles de rosettes adultes à 5,5 semaines.

de la méthylation CG est couplée à la perte de H3K9me2 (Figure 16a). La marque H3K27me3 est, quant à elle, conservée dans le mutant *met1* (Figure 16a). Les variations de H3K27me3 jouent un rôle important dans les transitions développementales, ainsi de nombreux gènes présentent des profils H3K27me3 différents en fonction des types cellulaires ou stades développementaux (Bemer and Grossniklaus, 2012). On note que *EVD* est inséré dans une région génomique riche en gènes marqués par H3K27me3 (Figure 16a). L'analyse des transcriptomes de feuilles de rosettes (Rigal et al., 2016) et de fleurs (Oberlin et al., 2017) de plantes sauvages montre que certains gènes adjacents à *EVD* ont une expression faible dans les feuilles et, au contraire, une forte expression dans les fleurs (Figure 16b). Ces données suggèrent qu'un contrôle tissu spécifique est exercé par H3K27me3 sur ces gènes. Nous supposons donc que, de par sa localisation génomique, la transcription d'*EVD* est contrôlée par H3K27me3 dans les tissus jeunes des mutants *met1* (en l'absence de méthylation CG) et qu'une baisse ou perte de H3K27me3 dans les feuilles de rosettes adultes puis lors de la transition au stade reproductif est à l'origine de sa réactivation spécifiquement dans les tissus adultes. Une étude récente montre que la marque H3K27me3 est majoritairement déposée par CLF sur *EVD* et la perte de CLF entraîne une perte quasi-totale de H3K27me3 sur cet élément (Zervudacki et al., 2018). Dans le mutant *clf-29*, les transcrits *EVD* ne sont détectables ni dans les tissus jeunes, ni dans les tissus adultes suggérant que H3K27me3 n'est pas suffisant pour le silencing d'*EVD* (Figure 16c). Pour tester si H3K27me3 contrôle le silencing d'*EVD* en l'absence de méthylation CG, l'obtention d'un double mutant *clf met1* par croisement n'était pas souhaitable. En effet, le choc épigénomique potentiellement provoqué par ce croisement aurait pu rendre complexe la distinction entre les effets directs des mutations *clf* et *met1*, et des effets indirects dus à la création de nouveaux variants épigénétiques induite par ce choc. Thierry Pélissier a donc généré des lignées mutantes *clf-29* transformées avec un micro ARN artificiel (amiRNA ; *artificial micro-RNA*) qui cible le deuxième exon de *MET1*. Le silencing mis en jeu dans cette expérimentation est de type PTGS : l'amiRNA est chargé sur une protéine ARGONAUTE, principalement AGO1, et cible l'ARNm de *MET1* pour sa dégradation. Les plantes transformées T2 présentent des profils variables de réactivation du gène *FWA*, un gène dont le TGS est dépendant de *MET1*. On détecte également des transcrits *MET1* suggérant que l'amiRNA n'a pas une efficacité totale, ce qui est couramment observé dans ce type d'approche (Figure 16d). Il a récemment été montré qu'il y a une perte de performance de la voie de silencing médiée par AGO1 dans un fond mutant *clf*. Ceci serait un effet indirect de la perte de CLF induisant une dégradation accrue de AGO1 (Ré et al., 2019). Ceci pourrait également contribuer à la variabilité de l'altération de l'accumulation des transcrits *MET1* dans les plantes



**Figure 16: La régulation tissu spécifique d'*EVD* dans le mutant *met1* semble être médiée par H3K27me3**

**(a)** Visualisation de l'enrichissement en H3K27me3, H3K9me2 et méthylation CG (mCG) au locus *EVD* dans les plantes sauvage et *met1-3*. **(b)** RPKM des gènes adjacents à *EVD* dans les feuilles et fleurs de plantes sauvage et *met1-3*. **(c)** Amplification des transcrits *EVD* par RT-PCR dans les feuilles de rosettes ou caulines dans le mutant *clf-29*. **(d)** Amplification par RT-PCR des transcrits des gènes indiqués dans 12 plantes *clf-29* transformées avec un amiRNA dirigé contre l'ARNm *MET1*.

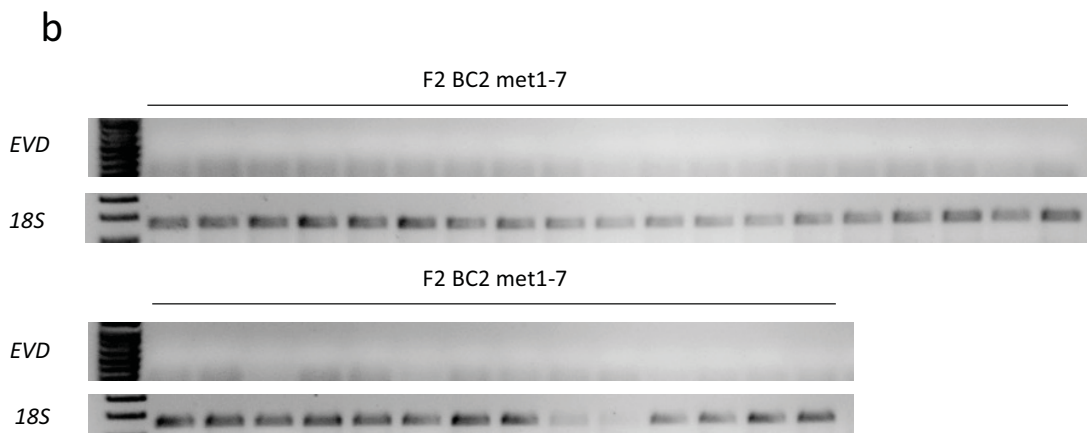
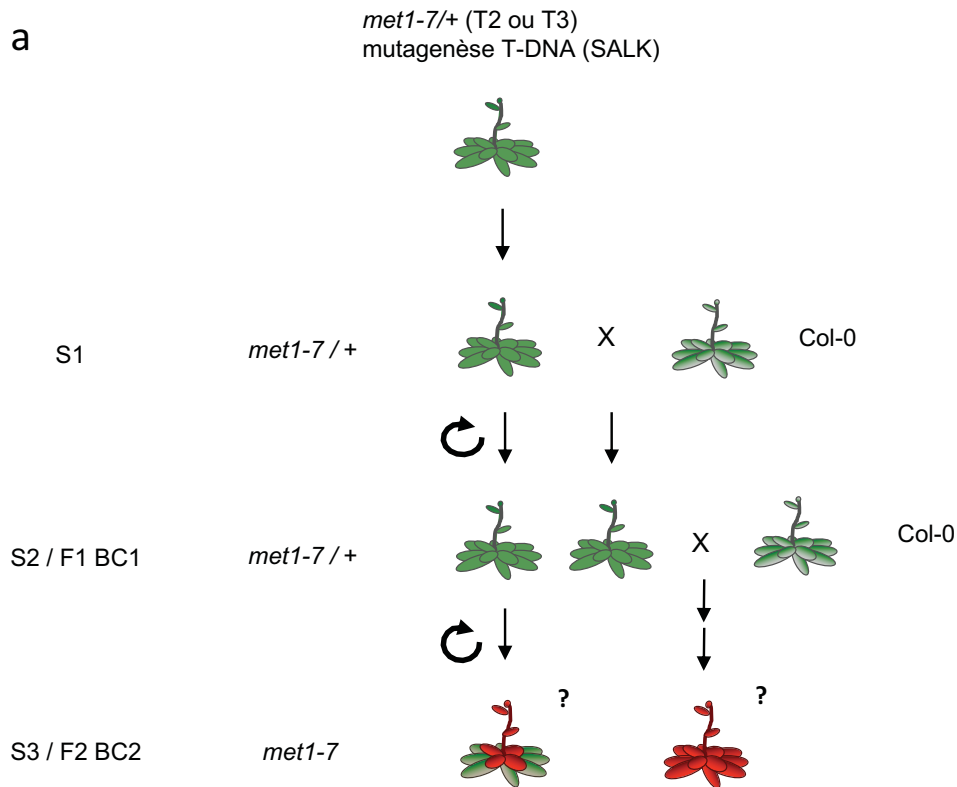
*clf-29* transformées. Malgré l'efficacité potentiellement réduite du amiRNA-MET1, on observe la réactivation d'*EVD* dans les feuilles de rosettes de plusieurs transformants (Figure 16d). Les profils de méthylation dans ces plantes restent à confirmer, toutefois, ces données préliminaires suggèrent que le silencing d'*EVD* dans les tissus jeunes dépend à la fois de la méthylation CG et de H3K27me3.

### 3. Transposition d'*EVD* et choc épigénomique

L'existence de lignées *met1-3* présentant une réactivation transcriptionnelle tissulaire ubiquiste ainsi qu'une transposition d'*EVD* indique qu'*EVD* peut, dans certaines conditions, échapper au contrôle cellulaire et être mobilisé dans un fond hypométhylé CG. En s'insérant à différentes localisations génomiques (par exemple dépourvues de H3K27me3), les nouvelles copies pourraient ne plus être soumises au même contrôle que la copie originelle et s'exprimer dans tous les tissus de la plante. Contrairement à *met1-3*, nous n'avons pas réussi à isoler une lignée présentant une transcription ubiquiste d'*EVD* dans la population ségrégeante *met1-7*.

Les plantes *met1-3* et *met1-7* utilisées diffèrent par leur pédigrée. En effet, dans le cas de *met1-3*, le mutant originel *met1-3* issu d'une mutagenèse T-DNA a subi deux rétro-croisements avec une plante sauvage avant que des individus homozygotes mutants *met1-3* ne soient sélectionnés. Dans le cas de *met1-7*, les plantes mutantes utilisées proviennent directement de l'autofécondation d'un individu hétérozygote obtenu du SALK et n'ayant jamais été rétro-croisé. Le choc épigénomique provoqué par les rétro-croisements pourrait être l'événement déclencheur de la transposition dans la population de mutants *met1-3*.

Pour tester cette hypothèse nous avons reproduit le schéma de croisement *met1-3* avec l'allèle *met1-7* et nous avons déterminé l'accumulation de transcrits *EVD* dans les feuilles de rosettes de plantes homozygotes *met1-7* ainsi obtenues. Deux plantes *met1-7/+* de la génération S1 ont été sélectionnées et rétro-croisées deux fois successivement et entre cinq et dix plantes ont été analysées individuellement à chaque génération. Deux lignées issues de l'autofécondation de plantes *met1-7/+* ont également été suivies en parallèle (Figure 15a, 15b, Annexe 1). Le détail du plan expérimental est présenté dans la figure 17a. Nous n'avons pas pu isoler de plantes présentant une réactivation d'*EVD* dans les tissus jeunes parmi la trentaine de plantes *met1-7* issue du deuxième rétro-croisement et donc présentant le même pédigrée que *met1-3* (Figure 17b). La transposition dans *met1-3* est un événement peu fréquent, qui semble survenir dans moins d'un dixième des plantes, ces résultats n'excluent donc pas totalement



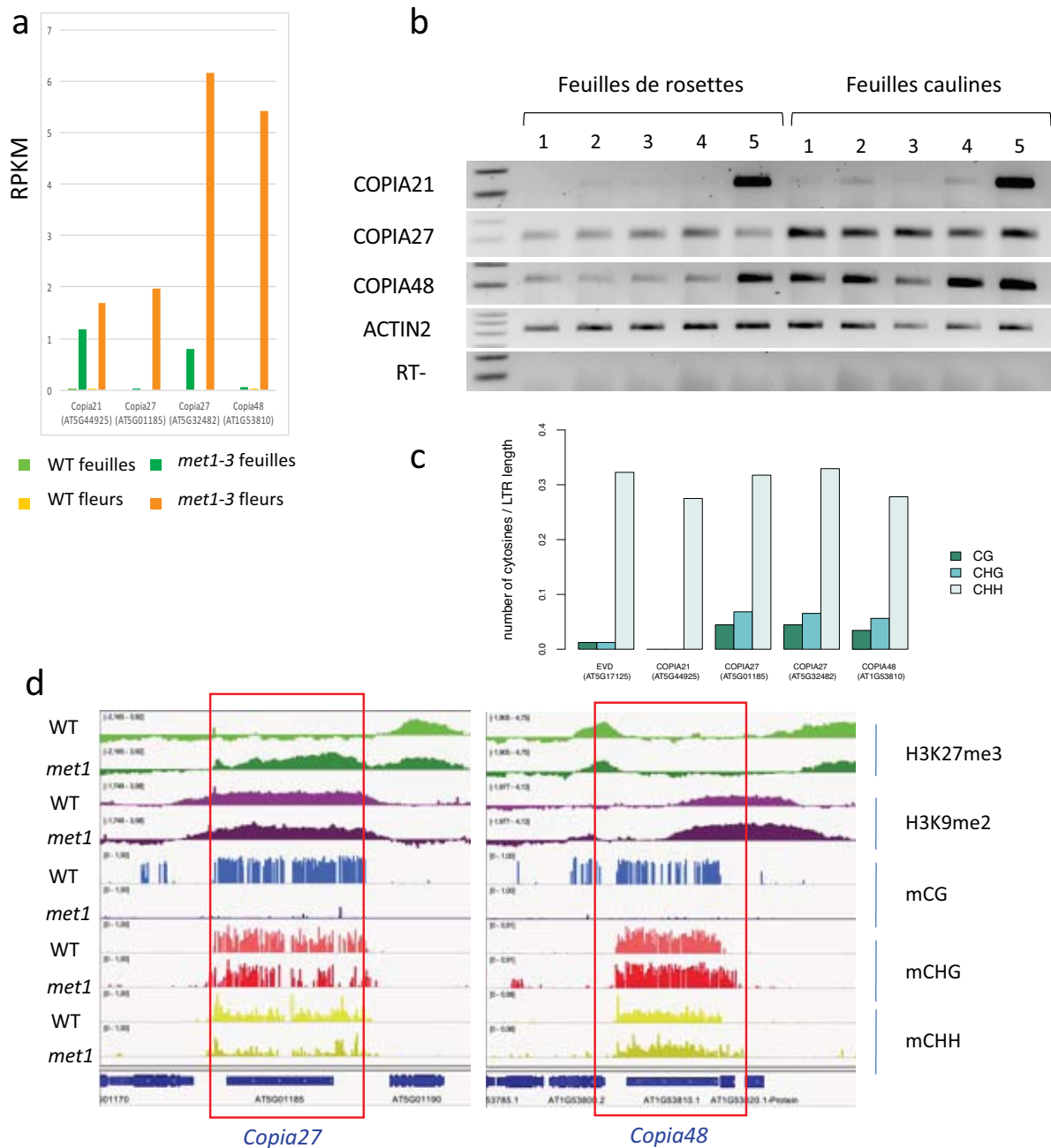
**Figure 17: Un choc épigénomique est-il à l'origine de la transposition et de la transcription globale de *EVD* ?**

(a) La ségrégation d'une plante *met1-7/+* issu d'une mutagenèse T-DNA a donné la génération S1. Deux plantes *met1-7/+* de cette génération ont été croisées avec une plante sauvage (Col-0) donnant la première génération du premier rétro-croisement (F1 BC1). Une plante *met1-7/+* de cette F1 a été croisée de nouveau avec une plante Col-0 donnant la génération F1 BC2. La génération suivante (F2 BC2) correspond à celle ayant le même pedigree que *met1-3*. En parallèle, les plantes *met1-7/+* de la génération S1 croisées avec Col-0 ont été suivies sur les générations suivantes issues de leur autofécondation (générations S2 et S3). Les tissus des plantes *met1-7* des générations S3 et F2 BC2 sont représentés en rouge lorsque l'on suspecte qu'il y aura transcription d'*EVD* et en vert quand il n'y aura pas de transcription. (b) Amplification par RT-PCR des transcrits *EVD* dans les feuilles de rosettes de 33 plantes *met1-7* de génération F2 BC2.

l'hypothèse du choc épigénomique. L'analyse d'un nombre plus important de plantes pourrait permettre de conclure de manière plus certaine.

#### 4. *Copia27* et *Copia48* sont également soumis à un TGS tissu-dépendant

Nous nous sommes également intéressés aux éventuels autres ETs dont le TGS serait dépendant du type cellulaire et/ou du stade développemental. Afin d'identifier ces ETs nous avons comparé des données de RNA-seq obtenus dans le laboratoire sur des feuilles de mutants *met1-3* (Rigal et al., 2016) à des données de RNA-seq de fleurs de *met1-3* (Oberlin et al., 2017). Cette comparaison a permis d'identifier notamment trois candidats, *Copia21*, *Copia27* et *Copia48* dont les niveaux d'expression sont plus importants dans les fleurs *met1-3* que dans les feuilles (Figure 18a). Pour tester l'expression de ces éléments, nous avons réalisé des RT-PCR sur des ARNs extraits de feuilles de rosettes ou de feuilles caulines de mutants *met1-7*. La réactivation de l'élément *Copia21* ne survient que dans une plante sur dix et de manière équivalente dans les deux tissus étudiés (Figure 18b). Quant aux éléments *Copia27* et *Copia48*, on observe une accumulation de transcrits dans les feuilles de rosettes et une accumulation plus importante dans les feuilles caulines (Figure 18b). La densité en cytosine en contexte CG dans la région LTR de *Copia21* est nulle (Figure 18c) suggérant que la méthylation CG n'est pas impliquée dans le TGS de cet élément. Sa réactivation occasionnelle pourrait donc être un effet indirect de la perte de la méthylation CG. La densité en sites CG au niveau des LTR de *Copia27* et *Copia48* est plus importante que celle du LTR d'*EVD* (respectivement 0,04 et 0,03, contre 0,01 pour *EVD* ; Figure 18c). MET1 et la méthylation CG pourraient donc avoir un impact plus important dans le TGS de *Copia27* et *Copia48* comparé à *EVD*, ce qui pourrait expliquer leur réactivation dans les jeunes feuilles de rosettes dès la première génération (Figure 18b). Toutefois, la réactivation étant plus marquée dans les feuilles caulines, ces éléments semblent être soumis à une voie de contrôle tissu-dépendante tout comme *EVD*. L'analyse des données de ChIP-chip (Deleris et al., 2012) montre la présence de H3K27me3 dans la région 5' LTR de *Copia48* dans les plantes sauvages et dans les plantes *met1-3* (Figure 18d). Au niveau de *Copia27*, H3K27me3 apparaît sur l'ensemble de l'ET suite à la perte de la méthylation CG (Figure 18d). D'autres éléments en plus d'*EVD* présentent donc une variation de leur expression tissu-spécifique en fond *met1* qui semble dépendre de la marque H3K27me3. Toutefois, l'effet de H3K27me3 est moins marqué pour *Copia27* et *Copia48* dont la réactivation est déjà visible dans les tissus jeunes. Ceci pourrait être dû à la présence d'autres couches de silencing sur ces



éléments, notamment H3K9me2 et la méthylation ADN non-CG, deux marques qui ne sont plus détectées au niveau d'*EVD* dans un fond *met1* (Figure 16a, 18d).





# Discussion

---



Ce projet de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les voies de TGS chez *Arabidopsis*. Je me suis tout d'abord intéressée aux voies de silencing moins bien comprises ne faisant pas intervenir la méthylation de l'ADN et qui contrôlent l'expression de certains PCGs et ETs. Dans un second temps, j'ai poursuivi les investigations pour comprendre le TGS des ETs en m'intéressant particulièrement à l'élément *Evadé*, élément autonome présent en copie unique et pouvant être activé et mobilisé dans certaines conditions (Mirouze et al., 2009; Tsukahara et al., 2009; Zervudacki et al., 2018).

## I. La voie de TGS médiée par la réplication et la réparation de l'ADN

---

D'autres laboratoires et nous-même avons mis en évidence un lien entre la réplication/réparation et le TGS par l'identification de plusieurs facteurs impliqués dans ces processus (Bourguet et al., 2020; Elmayan et al., 2005; Iglesias et al., 2015; Kapoor et al., 2005; Liu et al., 2010a, 2010b; Schönrock et al., 2006; Xia et al., 2006; Yin et al., 2009; Zhang et al., 2016a). Les travaux de cette thèse mettent en évidence l'implication dans le TGS de RTEL1, hélicase requise pour la progression de la fourche de réplication (Hu et al., 2015). Nous avons également montré que le traitement au HU de plantes sauvages, générant un stress réplicatif, provoque des défauts transcriptionnels (Bourguet et al., 2020). L'accumulation de ces preuves laisse supposer l'existence d'une voie de silencing médiée par la réplication et la réparation de l'ADN (*DNA Replication and Repair-mediated pathway ; DRR-TGS*). La forte conservation de ces facteurs suggère que cette voie de TGS aurait pu être conservée au cours de l'évolution. Une étude récente montre d'ailleurs que RTEL1 joue le rôle de régulateur transcriptionnel dans des cellules de souris (Kotsantis et al., 2020). De plus, l'utilisation d'un agent stabilisateur de G-quadruplex (G4), des structures secondaires de l'ADN se formant dans des régions riches en guanines et résolues, entre autres, par RTEL1, permet de reproduire les défauts de TGS liés à la déficience en *RTEL1* suggérant que les fonctions de réplication et de silencing de RTEL1 sont liées (Kotsantis et al., 2020). Le ou les mécanisme(s) mis en place dans cette voie de silencing médiée par la réplication et la réparation de l'ADN reste(nt), toutefois, à déterminer.

Le réassemblage de la chromatine après passage de la fourche de réplication a été beaucoup exploré. Les études s'accordent à dire que les histones parentales sont recyclées pour



obtenir des chromatines filles constituées à 50% d'histones parentales et 50% d'histones néo-incorporées (Duc and Thiriet, 2021). Cependant, le débat persiste concernant le mode de recyclage de ces histones. Certaines approches suggèrent que les histones parentales sont recyclées sur un même brin tandis que d'autres indiquent plutôt un recyclage plus ou moins équivalent sur les deux molécules d'ADN filles (Duc and Thiriet, 2021). Ce recyclage pourrait permettre, dans tous les cas, de recopier les PTMs d'histones parentales sur les nouvelles histones et ainsi maintenir l'état transcriptionnel des gènes après passage de la fourche de réplication (Duc and Thiriet, 2021; Jiang and Berger, 2017; Reverón-Gómez et al., 2018). Le maintien de H3K27me1 semble se faire de cette manière grâce à l'action réplication-dépendante de ATXR5 et ATXR6 (Raynaud et al., 2006). De plus, le double mutant *atxr5/6* présente à la fois des défauts réplcatifs et des défauts de silencing indiquant une fonction dans les deux processus mais le lien entre les deux reste flou (Hale et al., 2016; Jacob et al., 2009, 2014). Néanmoins, dans le cas de *POL2A*, le silencing des ETs semble être indépendant de la marque H3K27me1 (Bourguet et al., 2020) suggérant que la voie DRR-TGS pourrait dépendre d'au moins un autre mécanisme indépendant de H3K27me1.

Un lien a été établi entre la surexpression de PCGs et la diminution des niveaux de H3K27me3 dans les mutants *pol2a* (Bourguet et al., 2020), *fen1* (Zhang et al., 2016b), *pold2* (Zhang et al., 2016a) et un possible lien existe également dans le mutant *rtell* (cette thèse). Les complexes PRC1 et PRC2 se localisent au niveau des sites de réplication grâce à leur interaction avec le complexe CAF-1, qui lui-même interagit avec PCNA, et les niveaux de H3K27me3 sont rapidement rétablis après réplication de l'ADN (Jiang and Berger, 2017). Les données actuelles ne permettent pas de déterminer si les perturbations des niveaux de H3K27me3 dans les mutants de réplication sont une conséquence du stress réplcatif. Cependant, nous avons identifié, dans les mutants *pol2a* et *rtell*, des PCGs surexprimés, probablement en réponse au stress réplcatif, qui ne sont pas marqués par H3K27me3 indiquant l'existence d'un autre mécanisme (cette thèse; Bourguet et al., 2020).

L'hypothèse d'une perturbation des niveaux de H3K27me3 suppose un défaut dans le mécanisme de maintien et/ou de retrait de cette marque. Cependant, de manière plus générale, les perturbations transcriptionnelles dans les mutants de la réplication pourraient être une conséquence d'un mauvais recyclage des histones parentales y compris celles portant la marque H3K27me3. En effet, les histones H3 marquées H3K27me3 sont recyclées et incorporées dans les chromatines naissantes pendant la réplication, un mauvais recyclage pourrait donc induire



une baisse de H3K27me3 (Jiang and Berger, 2017; Reverón-Gómez et al., 2018). Les histones parentales sont dissociées de l'ADN sous la forme de deux dimers H2A-H2B et un tétramère [H3-H4]<sub>2</sub> (Groth et al., 2007). En plus des chaperonnes d'histones, ces dimers et tétramères interagissent avec des facteurs du réplisome, notamment les polymérase  $\alpha$  et  $\epsilon$ , chez la levure et dans les cellules animales (Bellelli et al., 2018; Evrin et al., 2018; Li et al., 2020). Ces interactions permettent de maintenir les histones parentales au site de réplication pour leur réincorporation suite au passage de la fourche de réplication. En absence de ces interactions, les histones parentales ne sont pas intégrées correctement dans les molécules d'ADN filles induisant des défauts transcriptionnels (Evrin et al., 2018). Chez *Arabidopsis*, de telles interactions n'ont pas encore été identifiées mais la forte conservation du processus et des facteurs de réplication laisse supposer l'existence d'un mécanisme similaire. Ces interactions pourraient également être perturbées dans le cas d'un stress répliatif causé par un traitement au HU ou par des mutations dans des facteurs n'interagissant pas directement avec les histones. Ceci pourrait alors provoquer un mauvais recyclage des histones parentales et une perturbation du TGS. Une étude sur des cellules HeLa montre que les histones parentales H3.1 sont réincorporées à une distance moyenne d'environ 500 nm du site de réplication. Un traitement au HU induit une augmentation de cette distance et les histones parentales H3.1 se retrouvent jusqu'à 3000 nm du site de réplication (Clément et al., 2018). Ces données suggèrent que le mauvais recyclage des histones en contexte de stress répliatif serait, au moins en partie, caractérisé par une réincorporation des histones parentales à des sites éloignés de leurs sites initiaux. Les contextes chromatinien ne seraient alors pas reproduits sur les bonnes cibles. Cette hypothèse pourrait expliquer la surexpression d'un ensemble de gènes associée à une baisse de H3K27me3 mais pas d'une baisse du niveau globale de cette marque dans le mutant *pol2* (Zhang et al., 2016a). Cette hypothèse soulève également la question des variants d'histones qui influent l'état transcriptionnel des gènes sous-jacents (Talbert and Henikoff, 2017). Une cartographie des origines de répliations montre que ces dernières sont enrichies en H2A.Z (Costas et al., 2011), un variant pouvant avoir un effet activateur ou répresseur selon qu'il soit inséré dans la région promotrice ou dans le corps d'un gène (Coleman-Derr and Zilberman, 2012; Gómez-Zambrano et al., 2019; Talbert and Henikoff, 2014; Yelagandula et al., 2014; Zilberman et al., 2008). Une mauvaise redistribution de H2A.Z lors d'un stress répliatif pourrait donc perturber la transcription. Les origines de réplication étant majoritairement localisées dans le corps de gènes (Costas et al., 2011), nous pouvons supposer qu'une telle redistribution aurait un effet principalement réactivateur. De manière intéressante, les gènes surexprimés dans *pol2a*, *rtell-1* et plus particulièrement *rtell-3* sont enrichis en gènes





de réponse à divers stimuli, une classe de PCGs dont la répression dépend de la présence de H2A.Z (Coleman-Derr and Zilberman, 2012; Talbert and Henikoff, 2014). Une mauvaise redistribution de H2A.Z lors d'un stress réplicatif pourrait donc être à l'origine de la surexpression de cette classe de PCGs.

Dans les cellules HeLa, la réincorporation des histones parentales dans les régions répliquant en fin de phase S, à savoir, les régions hétérochromatiques, est également perturbée par le traitement au HU mais de manière bien moins importante que dans les régions euchromatiques (Clément et al., 2018). De plus, *pol2a* ne présente pas de changement des niveaux de H2A.W, et dans les mutants *pol2a*, *pold2* et *fen1* on détecte plutôt une augmentation des niveaux de H3K9me2 (Bourguet et al., 2020; Zhang et al., 2016b, 2016a), sûrement liée à l'hyperméthylation CHG, du moins pour les mutants *pol2a* et *pold2* (Bourguet et al., 2020). Une mauvaise redistribution des histones parentales ne semble donc pas être à l'origine de la réactivation des ETs. Les régions hétérochromatiques sont difficiles à répliquer de par leur compaction et le nombre restreint d'origines de réplication présentes dans ces régions (Zeman and Cimprich, 2014). La cellule pourrait donc avoir développé des mécanismes pour rendre l'hétérochromatine suffisamment accessible pour la réplication tout en maintenant le TGS des ETs et séquences répétées. Un remodeleur de la chromatine, CHR18, interagit avec RPA1A pour réguler la réponse au stress réplicatif chez *Arabidopsis* par un mécanisme encore inconnu (Han et al., 2018). Le remodeleur de la chromatine DDM1 est connu pour faciliter la méthylation de l'ADN et des histones dans les régions hétérochromatiques principalement (Soppe et al., 2002; Zemach et al., 2013). Le recrutement de CHR18 et/ou d'autres remodeleurs spécifiquement à l'hétérochromatine pourrait donc être un moyen de moduler l'accessibilité de la chromatine pour faciliter la progression de la fourche de réplication tout en limitant la réactivation transcriptionnelle des ETs. Dans le cas de mutants de réplication où le stress réplicatif serait important ce mécanisme ne suffirait pas, provoquant une réactivation d'un nombre plus ou moins important d'ETs selon l'étendu du stress réplicatif. L'hyperméthylation ADN et/ou H3K9me2, discutées plus loin, pourraient faire partie de cette réponse.

La résolution d'un stress réplicatif peut provoquer l'apparition de cassures ADN double brins (DSB ; *Double Strand Breaks*) (Zeman and Cimprich, 2014). De plus, on détecte une surexpression de gènes de réponse aux dommages ADN dans les mutants de réplication témoignant d'une accumulation de dommages ADN (cette thèse ; Bourguet et al., 2020; Liu et al., 2010a, 2010b; Schönrock et al., 2006; Yin et al., 2009; Zhang et al., 2016b, 2016a). Par



conséquent, il est difficile de dissocier stress répliatif et DSB qui pourraient tout deux être à l'origine des défauts transcriptionnels des mutants de répliation. La réponse au stress répliatif dépend de la protéine kinase *ATAXIA TELANGIECTASIA AND RAD3 RELATED (ATR)*, tandis que la réponse aux DSB est dépendante de la protéine kinase *ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM)* (Zeman and Cimprich, 2014). L'activation de la voie *ATM*-dépendante et/ou la prise en charge des cassures pourrait être à l'origine de la réactivation transcriptionnelle dans les mutants évoqués précédemment. Toutefois, la présence de DSB et l'activation de la voie de réponse *ATM*-dépendante induisent une réactivation de PCG mais très peu d'ETs sont réactivés (Wang et al., 2016). De plus, nous n'avons pas détecté d'accumulation accrue de foci  $\gamma$ -H2A.X, forme phosphorylée de H2A.X qui s'accumule aux sites de DSB, dans les noyaux *pol2a* par rapport à des noyaux sauvages dans des conditions normales de croissances. Les DSB pourraient donc contribuer à la surexpression de certains PCGs et/ou ETs mais les défauts transcriptionnels semblent être majoritairement induits par le stress répliatif.

## II. Stress répliatif et hyperméthylation ADN

---

Nos données montrent que dans un contexte de stress répliatif, en plus d'un défaut transcriptionnel, il y a une hyperméthylation de l'ADN (cette thèse; Bourguet et al., 2020). Cette dernière est spécifique de l'hétérochromatine et survient en contexte CHG principalement (cette thèse; Bourguet et al., 2020). La méthylation CHG est majoritairement dépendante de CMT3 dont l'action semble être liée à la répliation de l'ADN (Du et al., 2012; Gouil and Baulcombe, 2016; Stroud et al., 2013b). Le ralentissement de la fourche de répliation lors d'un stress répliatif pourrait fournir une fenêtre d'action plus importante à CMT3 provoquant ainsi une hyperméthylation. Si tel était le cas, nous pourrions supposer qu'un stress répliatif provoquerait aussi une hyperméthylation en contexte CG dont la maintenance par MET1 est également liée à la répliation (Law and Jacobsen, 2010). Or, les mutations *pol2a*, *rpa2*, *pold2* ainsi que le traitement HU n'induisent pas d'augmentation des niveaux de méthylation CG (Bourguet et al., 2020). La méthylation non-CG étant intimement liée à H3K9me2 (Bernatavichute et al., 2008), l'hyperméthylation CHG pourrait être la conséquence d'une augmentation des niveaux de H3K9me2. Des cellules HeLa soumises à un stress répliatif accumulent environ trois fois plus d'histones H3.1 marquées H3K9me1 (Jasencakova et al., 2010), marque déposée sur les nouvelles histones H3.1 avant leur incorporation dans la chromatine et servant de substrat pour la tri-méthylation H3K9me3 (Loyola et al., 2006). Il



pourrait donc y avoir une incorporation accrue de H3.1K9me1 en condition de stress réplicatif, servant de base pour H3K9me2 et la méthylation non-CG par CMT3/CMT2. Dans le mutant *pol2a*, l'hyperméthylation CHG est associée à une augmentation du niveau de H3K9me2, même s'il n'est pas possible de déterminer si elle survient initialement. Nous montrons que la suppression partielle de l'hyperméthylation CHG dans le double mutant *pol2a cmt3* induit une réactivation d'un plus grand nombre d'ETs (Bourguet et al., 2020). L'hyperméthylation non-CG pourrait donc être un mécanisme spécifiquement mis en place pour compenser la réactivation transcriptionnelle des ETs. Le rétrocontrôle positif entre la méthylation non-CG et H3K9me2 (Bernatavichute et al., 2008; Du et al., 2012, 2015; Jackson et al., 2002; Johnson et al., 2007) en ferait un mécanisme efficace et rapide pour limiter la réactivation des ETs en cas de stress réplicatif.

Une hyperméthylation CG a également été observée dans les mutants *fas2* et *rtell*. FAS2 est l'une des sous-unités du complexe CAF-1 responsable de l'incorporation réplication-dépendante de H3.1. Le variant H3.3 est, quant à lui, incorporé de manière transcription-dépendante et limite le recrutement de l'histone H1 pour favoriser la méthylation CG des corps des gènes (Wollmann et al., 2017). Le remplacement de H3.1 par H3.3 et/ou la baisse de recrutement de H1 pourrait donc être à l'origine de l'hyperméthylation CG dans le mutant *fas2*. La balance H3.1/H3.3 et/ou les niveaux de H1 pourraient également être affectés dans le mutant *rtell* rendant la chromatine plus accessible et entraînant ainsi une hyperméthylation CG. En accord avec cette hypothèse, nos données montrent une augmentation de l'accessibilité de la chromatine au niveau des ETs hétérochromatiques hyperméthylés en contexte CG. L'hyperméthylation CG serait donc un phénotype particulier de certains mutants lié à des fonctions spécifiques plutôt qu'une conséquence du stress réplicatif.

### III. Les couches de silencing de l'élément *Evadé*

---

Plusieurs mécanismes existent pour maintenir le silencing des éléments transposables (Rigal and Mathieu, 2011). La méthylation de l'ADN, H3K9me2 et H3K27me1 sont les marques les plus étudiées et participent grandement au TGS des ETs (Bernatavichute et al., 2008; Hale et al., 2016; Rigal and Mathieu, 2011; Zhang et al., 2018b). Une autre voie médiée par AGO9 et des siARNs de 24 nucléotides est requise pour maintenir le TGS d'ETs dans les gamètes femelles (Olmedo-Monfil et al., 2010). Divers mécanismes ce sont donc développés



pour maintenir le TGS des ETs, parfois même de manière spécifique au type cellulaire et/ou stade développemental et la contribution de chacune de ces voies varie selon les ETs (Rigal and Mathieu, 2011). L'élément transposable *Evadé* a beaucoup été utilisé comme modèle ces dernières années pour comprendre les mécanismes de contrôle de l'activité des rétrotransposons (Marí-Ordóñez et al., 2013; Mirouze et al., 2009; Oberlin et al., 2017; Reinders et al., 2013; Rigal et al., 2016; Tsukahara et al., 2009). Il est établi que le silencing d'*EVD* dépend principalement de la méthylation CG et qu'il est réactivé dans un fond mutant *met1* ou *ddm1* (Mirouze et al., 2009; Tsukahara et al., 2009). Nous montrons qu'en absence de la méthylation CG un ou plusieurs mécanisme(s) permet(tent) de maintenir le silencing d'*EVD* dans les tissus adultes mais pas dans les tissus jeunes (Figure 15). D'autres voies de TGS participant au contrôle d'*EVD* ont été identifiées précédemment. Notamment, la voie RdDM permet de limiter l'accumulation de transcrits en absence de méthylation CG et KYP permet de limiter la mobilisation de l'élément au niveau post-transcriptionnel (Mirouze et al., 2009). Nous avons cherché à identifier la couche de silencing supplémentaire présente dans les tissus jeunes mais absente dans les tissus adultes pouvant expliquer la différence transcriptionnelle. Nous avons observé la présence de H3K27me3 et, bien que nos résultats ne permettent pas de conclure de manière certaine, le TGS d'*EVD* en absence de méthylation CG dans les tissus jeunes semble dépendre de H3K27me3 (Figure 16). Cette hypothèse est en accord avec une étude récente montrant la co-localisation de la méthylation ADN et de H3K27me3 sur *EVD* et l'accumulation plus importante de transcrits dans le double mutant *ddm1 clf* par rapport au simple *ddm1* dans des feuilles adultes (Zervudacki et al., 2018). Nous avons détecté, en fond *met1*, une accumulation de transcrits moins importante dans les feuilles adultes par rapport aux feuilles caulines ou aux bourgeons floraux immatures (Figure 15). La réactivation d'*EVD* étant exacerbée par la perte de l'histone méthyltransférase CURLY LEAF en fond *ddm1* dans les feuilles adultes (Zervudacki et al., 2018), il pourrait y avoir un niveau intermédiaire de H3K27me3 dans ces tissus avant une perte (quasi-)totale dans les feuilles caulines et les fleurs. Une redistribution de H3K27me3 sur les ETs est observée lors de leur déméthylation ADN (Deleris et al., 2012; Johnson et al., 2007; Mathieu et al., 2005). Dans le cas d'*EVD*, H3K27me3 est présent en fond sauvage et co-localise avec la méthylation ADN suggérant que H3K27me3 est une couche supplémentaire de silencing dans certains tissus et n'est pas lié à la redistribution suite à la perte de méthylation. La séquence d'*EVD* est identique à 99,5% à celle de l'élément péricentromérique *ATR* (Mirouze et al., 2009) qui lui est faiblement marqué par H3K27me3 et dont l'expression n'apparaît pas significativement différente entre les tissus jeunes et adultes (Zervudacki et al., 2018). Cela suggère que le TGS d'*EVD* médié par H3K27me3 est





principalement une conséquence de sa localisation dans un domaine H3K27me3. Notre analyse montre qu'une couche de silencing H3K27me3 existe aussi au niveau de deux autres ETs, *Copia27* et *Copia48* (Figure 18). Dans le cas de *Copia27*, on observe une propagation de H3K27me3 à partir d'un domaine adjacent en fond *met1*. Cet élément pourrait donc être différent d'*EVD* en ce que H3K27me3 serait redistribué au niveau de *Copia27* en absence de méthylation CG mais ne serait pas une couche de silencing supplémentaire en fond sauvage. Dans les cellules eucaryotes ancestrales, H3K27me3 aurait joué un rôle dans le silencing des ETs (Montgomery et al., 2020). Chez *Marchantia polymorpha*, 60% de la marque H3K27me3 est retrouvée sur des ETs (Montgomery et al., 2020), contrairement à *Arabidopsis* où H3K27me3 marque principalement des PCGs réprimés (Roudier et al., 2011; Zhang et al., 2007). Au cours de l'évolution, la fonction de PRC2 dans le silencing des ETs aurait été remplacée par la méthylation ADN et H3K9me2 mais cette fonction pourrait avoir été conservée au niveau de certains éléments.

Nous avons, d'autre part, cherché à identifier l'événement déclencheur de la transposition et de la réactivation ubiquiste d'*EVD* dans certaines lignées *met1-3*. Nous supposons qu'un choc épigénomique, générant des variants épigénétiques, provoquerait une réactivation et une transposition d'*EVD*. Dans le génome d'*Arabidopsis lyrata*, les nouvelles copies d'*EVD* s'insèrent préférentiellement dans les séquences répétées centromériques (Tsukahara et al., 2009). Au contraire, dans le génome *Arabidopsis thaliana* les nouvelles copies ciblent préférentiellement les gènes ou les régions proche des gènes où la méthylation ADN est moins importante (Mirouze et al., 2009; Quadrana et al., 2019). Nous supposons donc que ces nouvelles copies échapperaient au TGS, notamment celui médié par H3K27me3 permettant l'expression dans tous les tissus. Nous n'avons pas pu isoler de lignées présentant une réactivation ubiquiste d'*EVD* (Figure 17). Parmi les plantes *met1-3*, moins d'une plante sur dix correspond à ce profil. Ayant testé une trentaine de plantes *met1-7* avec le même schéma de croisement que *met1-3* (Figure 17) nous pourrions nous attendre à obtenir au moins une plante réactivant *EVD* dans les tissus jeunes dans le cas où notre hypothèse est correcte. Cette analyse a été réalisée sur des plantes homozygotes mutantes descendantes d'une plante hétérozygote *MET1/met1-7*. Les individus homozygotes *met1* sont sous-représentés (Mathieu et al., 2007; Saze et al., 2003) et une pré-sélection des graines a été faite pour augmenter la proportion de plantes mutantes. Cette sélection a pu induire un biais ne permettant pas d'isoler une lignée d'intérêt. De plus, les plantes *met1-7* présentaient, à ce stade de l'expérience, des défauts développementaux importants. La création de mutations additionnelles causées par la



transposition d'*EVD* pourrait avoir des conséquences létales dans ce fond mutant. Tester un nombre plus important de plantes est donc nécessaire pour valider ou réfuter notre hypothèse. Il pourrait également être nécessaire de faire l'analyse à la deuxième génération homozygote *met1-7*. En effet, la transposition dans le mutant *met1-3* n'a été détecté qu'à partir de la deuxième génération (Mirouze et al., 2009). Une autre étude montre que *EVD* est réactivé en réponse à un motif moléculaire associé à un pathogène (Zervudacki et al., 2018), la réactivation globale d'*EVD* dans certaines lignées *met1-3* pourrait donc originellement avoir été causée par un stress biotique restant à déterminer.

## Conclusion

---

Mon projet de thèse a permis, en grande partie, d'isoler et de caractériser un nouvel allèle mutant *rtell* et de montrer une nouvelle fonction pour RTEL1 dans le TGS, probablement dans une voie médiée par la réplication et la réparation de l'ADN. L'identification de nouveaux facteurs du silencing liés à la réplication apporte de nouvelles pistes de réflexion pour comprendre le fonctionnement et l'étendu de cette voie. Bien que cette dernière ne dépende pas de la méthylation ADN pour maintenir le TGS, un lien existe entre la voie DRR-TGS et la méthylation ADN pour assurer au mieux le silencing des régions hétérochromatiques en cas de stress réplicatif. Ceci met en évidence, encore une fois, le dialogue entre les différentes voies de silencing et la complexité des mécanismes développés pour assurer le TGS. Cette complexité se caractérise aussi par la superposition de multiples couches de silencing comme nous avons pu le constater pour l'élément transposable *Evadé*.



## **Matériels et méthodes**

---



### Matériel végétal et conditions de cultures

Toutes les plantes ont été cultivées en terreau en chambre climatique sous les conditions suivantes : 23°C, 60% d'humidité et photopériode de 16 h jour / 8 h nuit. Les mutants *rtell-1* (SALK\_113285), *met1-7* (SALK\_076522) (Blevins et al., 2014) et *clf-29* (SALK\_N521003) (Bouveret et al., 2006) sont en fond génétique Col-0. Notre allèle *rtell-3* est issu d'une mutagenèse à l'EMS et l'ensemble des analyses a été réalisé sur les mutants issus de deux rétrocroisements consécutifs avec le parent L5. Le double mutant *rtell-3 mom1-2* a été obtenu par croisement et les analyses ont été effectuées sur la génération F2.

### Coloration histochimique

L'activité enzymatique de la protéine GUS résultant de l'expression du transgène L5 est visualisée par hydrolyse du substrat X-Gluc. Des feuilles de rosette ou des plantules entières âgées de 3 semaines ont été prélevées et placées dans des puits en présence de 1-4 ml de solution de coloration X- Gluc (50 mM Na<sub>x</sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 ; 10 mM EDTA ; 0,2 % Triton-X-100 ; 0,04 % X-Gluc). Les plaques ont été placées dans une pompe à vide deux fois afin de faire pénétrer la solution de coloration. Après incubation à 37°C pendant 24 h, la chlorophylle est dissoute à l'éthanol 70 %.

### Analyse du niveau de méthylation ADN par digestion *MspI* et *CfoI*

L'ADN de feuilles de rosette est extrait à l'aide du kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega<sup>®</sup>). 200 nanogrammes d'ADN sont digérés avec 2U de *MspI* (NEB<sup>®</sup>) ou 2U de *CfoI* (NEB<sup>®</sup>) dans du tampon CutSmart<sup>®</sup> (NEB<sup>®</sup>). Les réactions sont incubées pendant environ 16h à 37°C suivi de 20 min à 65°C. Les produits de digestion sont ensuite dilués à une concentration finale de 2 ng/μl. La région 35S du transgène L5 est amplifiée par PCR en parallèle d'une région contrôle du gène *FWA* ne comportant pas de sites de restriction *MspI* ou *CfoI*. Les produits PCR sont ensuite visualisés sur un gel d'agarose 1-2% (m/v) par coloration au bromure d'éthidium (BET). Les niveaux de méthylation sont estimés en mesurant l'intensité des bandes correspondant au transgène rapporté à l'intensité de la bande du locus contrôle.





### Etude qualitative et quantitative des transcrits par RT-PCR et RT-qPCR

Les ARN totaux sont extraits à partir d'un groupe de plantules entières (30-40 mg) âgées de 2 à 3 semaines en utilisant du RNAzol<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>) selon les recommandations du fabricant. Pour l'analyse de l'expression d'*EVD* dans le *met1-7* les ARN totaux sont extraits à partir de différents tissus de plantes individuelles. Un traitement à la désoxyribonucléase RQ1 (DNase) (Promega<sup>®</sup>) est ensuite appliqué à 1 µg d'ARN (1h à 37°C) puis arrêté en suivant les instructions du fournisseur. Cinquante ou cent nanogrammes de ces ARNs sont utilisés comme matrice pour les analyses de RT-PCR semi-quantitative et de RT-PCR quantitative.

Les RT-PCR semi-quantitatives sont réalisées à l'aide du kit One-Step RT-PCR de Qiagen<sup>®</sup>. Les transcrits du gène *ACTIN2* ou *UBIQUITIN* sont amplifiés afin de normaliser le signal obtenu pour chaque échantillon. Un contrôle positif (ADN génomique) et un contrôle négatif (H<sub>2</sub>O) sont incorporés afin de s'assurer du bon déroulement de la PCR ainsi que de l'absence de contamination. Deux lots de réactions ont été réalisés avec (RT+) ou sans (RT-) étape initiale de transcription inverse (30 min à 50°C) afin d'exclure une éventuelle contamination par de l'ADN génomique. Les produits de PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1-2 % (m/v) et visualisés par coloration au BET.

C'est avec le kit SensiFAST<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> No-ROX One-Step (Bioline<sup>®</sup>) et l'appareil Eco<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Illumina<sup>®</sup>) que les RT-PCR quantitatives ont été réalisées. Les conditions sont : 10 min à 45°C, 5 min à 95°C, suivi de 40 cycles de 20 s à 95°C et 30 s à 60°C. La spécificité de l'amplification a été contrôlée grâce à la courbe de fusion. Les données obtenues ont été normalisées par rapport à l'*ACTIN2* puis analysées selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

### Mutagenèse et mapping par séquençage

La population de mutants criblée est issue de la mutagenèse décrite par Ikeda *et al.*, 2017. Les mutants EMS de génération M3 en fond génétique Col-0 sont croisés avec une plante sauvage d'écotype Landsberg (Ler-0) afin d'obtenir des populations F2 ségrégeantes. Ces populations F2 sont criblées pour l'activation du transgène L5. La ségrégation pour chaque mutant est vérifiée pour que celle-ci corresponde à celle d'une mutation récessive mono-locus. L'ADN de feuilles de rosette de cinquante à cent plantes réactivant le transgène est extrait à l'aide du kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega<sup>®</sup>) en suivant les recommandations du



fabriquant. Quatre cent nanogrammes d'ADN sont ensuite envoyés à Fasteris S.A. (Genève, Suisse) qui prépare les librairies et réalise le séquençage sur un NextSeq® 500 (Illumina®), produisant des lectures paires de 150 pb. Après un contrôle de qualité fastQC, les lectures sont alignées sur le génome de référence d'*Arabidopsis* TAIR10 grâce à l'outil BWA (Li and Durbin, 2009) en utilisant les options par défaut. Les SNPs sont identifiés en utilisant SAMtools mpileup puis les variants sont annotés à l'aide de BCFtools. La distribution des SNPs Col-0/Ler-0 est ensuite visualisée et analysée grâce à NGM – Next-generation EMS mutation mapping disponible à l'adresse <http://bar.utoronto.ca/ngm/>. Des gènes candidats portant des mutations induites par EMS non-synonymes sont identifiés pour chaque mutant et des lignées mutantes T-DNA sont commandées pour réaliser des tests alléliques.

### Mesure de la fraction hétérochromatique

La mesure de la fraction hétérochromatique est réalisée grâce à un marquage au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Des feuilles de rosette de plantes âgées de 3 semaines sont prélevées et fixées 1 h dans une solution de fixation (4 % Formaldéhyde, 1X PBS). Les feuilles sont ensuite transférées sur une lame et coupées finement avec une lame de rasoir dans une goutte de solution de fixation. Une lamelle est déposée sur l'échantillon, puis après passage dans de l'azote liquide, la lamelle est rapidement retirée afin de casser les noyaux. Les lames sont lavées dans deux bains de 1X PBS (5 min), puis les noyaux sont marqués par coloration au DAPI (1,5 µg/ml) dans 40 µl de solution de montage Vectashield® (Vector Laboratories) et recouverts d'une lamelle. Les noyaux isolés sont observés au microscope à fluorescence Zeiss AxioImager Z1 (Carl Zeiss AG, Allemagne) à l'aide d'un objectif à huile PL Apochromat 100X/1.40 et photographiés par une camera AxioCam Mrm (Carl Zeiss AG, Allemagne). Ces photos sont analysées à l'aide du programme de traitement d'image ImageJ (Schneider et al., 2012). Le volume (surface x intensité) des chromocentres est mesuré puis normalisé par rapport au volume total du noyau afin de déterminer la fraction hétérochromatique.

### Étude du transcriptome par séquençage ARN (RNA-seq)

Les ARN totaux sont extraits à partir d'un groupe de plantules entières (30-40 mg) âgées de 2 à 3 semaines en utilisant du RNazol® (Sigma®) selon les recommandations du fabricant. Un traitement à la désoxyribonucléase RQ1 (DNase) (Promega®) est ensuite appliqué à 8 µg



d'ARN (1h à 37°C) suivi d'une purification au phénol-chloroforme. L'intégrité des ARNs ribosomiques est évaluée par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel d'agarose 1,5% (m/v) : MOPS 1X, Formaldéhyde (FA) 1%, après dénaturation des ARNs 15 min à 65°C dans une solution dénaturante (7.4% FA, 1.2X MOPS). Les échantillons voyagent ensuite dans la carboglace pour la construction des banques et le séquençage par la société Fasteris S.A. (Suisse) sur HiSeq 4000, générant des lectures de 50 pb orientées non paires.

Suite au contrôle de qualité fastQC, les lectures sont alignés au génome de référence TAIR10 grâce à STAR (Dobin et al., 2013). Les séquences mappées sont ensuite assignées à des annotations de PCGs ou d'ETs. L'expression différentielle entre deux génotypes est évaluée grâce à l'outil DESeq2 (Love et al., 2014). Les annotations sont considérées comme significativement dérégulées lorsque le log<sub>2</sub> Fold Change (log<sub>2</sub>FC) est supérieur à 0,585 ou inférieur à -0,585 et la *p-value* ajustée est inférieure à 0,05.

### **Etude du méthylome par séquençage ADN après traitement au bisulfite (BS-seq)**

L'ADN de plantules entières âgées de 16 jours est extrait à l'aide du kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega<sup>®</sup>) selon les instructions du fabricant. Un à deux microgrammes de ces ADN sont livrés au Beijing Genomics Institute (Shenzhen, China) qui réalise la conversion au bisulfite, prépare les bibliothèques et réalise le séquençage sur un HiSeqXten, produisant environ 26 à 35 million de lectures paires de 150 pb.

L'analyse bioinformatique des données a été faite grâce à la pipeline d'analyse MethyIpy v1.4.6 (Schultz et al., 2015). Les lectures sont filtrées avec Picard v2.23.3 pour retirer les doublons de PCR et alignées au génome de référence TAIR10 avec Bowtie2 v2.4.1 (Langmead and Salzberg, 2012). Seules les cytosines ayant une couverture minimum de 6 lectures ont été retenues. Les niveaux de méthylation ADN moyen sur des régions données ont été calculés grâce à la fonction « add-methylation-level » de MethyIpy (Schultz et al., 2015). Les données pour les metaplots ont été obtenues à l'aide du programme DeepTools v3.3.2 (Ramírez et al., 2016) déployé sur une instance locale de Galaxy v3.3.2.0.0.

### **Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et quantification par qPCR**

L'expérience de ChIP a été réalisée à partir de 100-200 mg de plantules entières âgées de 3-4 semaines en utilisant le kit LowCell# ChIP (Diagenode<sup>®</sup>) en suivant les instructions du



fournisseur. La sonication de la chromatine s'est faite sur dix cycles de 30 s « ON », 45 s « OFF » sur le Bioruptor UCD-200 (Diagenode<sup>®</sup>). L'immunoprécipitation a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-H3 (Abcam ab1791; 2 µg). 3 µl d'ADN purifié ont été utilisés pour la quantification par qPCR sur l'appareil Eco Real-Time system (Illumina<sup>®</sup>) à l'aide du kit SensiFAST SYBR<sup>®</sup> No-ROX (Bioline<sup>®</sup>) dans un volume réactionnel de 10 µl. Les résultats de trois répliques biologiques ont été obtenus, et l'enrichissement relatif est exprimé en pourcentage d'apport. La région promotrice du gène *ACTIN2* a été utilisé comme contrôle de déplétion nucléosomale.

### Analyse de l'accessibilité de la chromatine par ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin)

L'expérience d'ATAC-seq a été effectuée en collaboration avec l'équipe menée par Moussa Benhamed à l'IPS2 Paris-Saclay, sur des plantules de 16 jours. Le séquençage Illumina a produit des lectures de 76pb non-pairées qui ont été alignées au génome de référence TAIR10 à l'aide de STAR v2.7.2b (Dobin et al., 2013). Les pics d'accessibilité ont été mesurés avec MACS2 v2.2.6 (Zhang et al., 2008).

### Transformation des plantes *clf-29* avec l'amiRNA dirigé contre *MET1*

La conception du amiRNA a été réalisée grâce à l'application web WMD3 disponible au lien suivant <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi> (Ossowski et al., 2008). La séquence du amiRNA est 5'-TAAAATCGATGATTGCCGCGC-3' et reconnaît la séquence 5'-GTGCGGCAATCATCGATTTTG-3' dans le deuxième exon de *MET1*. La construction du précurseur du amiRNA a été réalisé en suivant les recommandations disponible sur le site WMD3 en utilisant le vecteur pRS300. Le précurseur a ensuite été cloné dans le vecteur pTP2, un vecteur de type pBSK interne au laboratoire, par digestion enzymatique avec *BamHI* et *HindIII*. Enfin, le précurseur est transféré par recombinaison LR (Gateway) dans le vecteur d'expression pTP5 comportant le promoteur fort p35S pour l'expression du amiRNA ainsi qu'un gène de résistance à l'hygromycine permettant la sélection. Le plasmide est introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* par électroporation puis transformé dans *clf-29* par la méthode de trempage de fleur (Clough and Bent, 1998).





# **Bibliographie**

---



- Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Scheid, O.M., and Paszkowski, J. (2000). Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* 405, 203–206.
- Barber, L.J., Youds, J.L., Ward, J.D., McIlwraith, M.J., O’Neil, N.J., Petalcorin, M.I.R., Martin, J.S., Collis, S.J., Cantor, S.B., Auclair, M., et al. (2008). RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell* 135, 261–271.
- Barrero, J.M., González-Bayón, R., Del Pozo, J.C., Ponce, M.R., and Micol, J.L. (2007). INCURVATA2 encodes the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$  and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 2822–2838.
- Baubec, T., Finke, A., Mittelsten Scheid, O., and Pecinka, A. (2014). Meristem-specific expression of epigenetic regulators safeguards transposon silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 15, 446–452.
- Bellelli, R., Belan, O., Pye, V.E., Clement, C., Maslen, S.L., Skehel, J.M., Cherepanov, P., Almouzni, G., and Boulton, S.J. (2018). POLE3-POLE4 Is a Histone H3-H4 Chaperone that Maintains Chromatin Integrity during DNA Replication. *Mol. Cell* 72, 112-126.e5.
- Bemer, M., and Grossniklaus, U. (2012). Dynamic regulation of Polycomb group activity during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 523–529.
- Bernatavichute, Y. V, Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 3, 3156.
- Bewick, A.J., and Schmitz, R.J. (2017). Gene body DNA methylation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 36, 103–110.
- Blevins, T., Pontvianne, F., Cocklin, R., Podicheti, R., Chandrasekhara, C., Yerneni, S., Braun, C., Lee, B., Rusch, D., Mockaitis, K., et al. (2014). A Two-Step Process for Epigenetic Inheritance in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 54, 30–42.
- Bourguet, P., De Bossoreille, S., López-González, L., Pouch-Pélissier, M.N., Gómez-Zambrano, Á., Devert, A., Pélissier, T., Pogorelcnik, R., Vaillant, I., and Mathieu, O. (2018). A role for MED14 and UVH6 in heterochromatin transcription upon destabilization of silencing. *Life Sci. Alliance* 1.
- Bourguet, P., López-González, L., Gómez-Zambrano, Á., Pélissier, T., Hesketh, A., Potok, M.E., Pouch-Pélissier, M.N., Perez, M., Da Ines, O., Latrasse, D., et al. (2020). DNA polymerase epsilon is required for heterochromatin maintenance in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 21.
- Bouveret, R., Schönrock, N., Gruissem, W., and Hennig, L. (2006). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* MSI1. *Development* 133, 1693–1702.
- Brabbs, T.R., He, Z., Hogg, K., Kamenski, A., Li, Y., Paszkiewicz, K.H., Moore, K.A., O’Toole, P., Graham, I.A., and Jones, L. (2013). The stochastic silencing phenotype of *Arabidopsis* morc6 mutants reveals a role in efficient RNA -directed DNA methylation. *Plant J.* 75, 836–846.
- Čaikovski, M., Yokthongwattana, C., Habu, Y., Nishimura, T., Mathieu, O., and Paszkowski, J. (2008). Divergent evolution of CHD3 proteins resulted in MOM1 refining epigenetic control in vascular plants. *PLoS Genet.* 4, 1000165.
- Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2002a). Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16491–16498.



- Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2002b). Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* *12*, 1138–1144.
- Choi, J., Lyons, D.B., Kim, M.Y., Moore, J.D., and Zilberman, D. (2020). DNA Methylation and Histone H1 Jointly Repress Transposable Elements and Aberrant Intragenic Transcripts. *Mol. Cell* *77*, 310–323.e7.
- Chuong, E.B., Elde, N.C., and Feschotte, C. (2017). Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits. *Nat. Rev. Genet.* *18*, 71–86.
- Clément, C., Orsi, G.A., Gatto, A., Boyarchuk, E., Forest, A., Hajj, B., Miné-Hattab, J., Garnier, M., Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.P., et al. (2018). High-resolution visualization of H3 variants during replication reveals their controlled recycling. *Nat. Commun.* *9*.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *16*, 735–743.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* *452*, 215–219.
- Coleman-Derr, D., and Zilberman, D. (2012). Deposition of Histone Variant H2A.Z within Gene Bodies Regulates Responsive Genes. *PLoS Genet.* *8*, 1002988.
- Costas, C., De La Paz Sanchez, M., Stroud, H., Yu, Y., Oliveros, J.C., Feng, S., Benguria, A., López-Vidriero, I., Zhang, X., Solano, R., et al. (2011). Genome-wide mapping of *Arabidopsis thaliana* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 395–400.
- Deal, R.B., and Henikoff, S. (2011). Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* *14*, 116–122.
- Deleris, A., Stroud, H., Bernatavichute, Y., Johnson, E., Klein, G., Schubert, D., and Jacobsen, S.E. (2012). Loss of the DNA Methyltransferase MET1 Induces H3K9 Hypermethylation at PcG Target Genes and Redistribution of H3K27 Trimethylation to Transposons in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* *8*, 1003062.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21.
- Dorn, A., Feller, L., Castri, D., Röhrig, S., Enderle, J., Herrmann, N.J., Block-Schmidt, A., Trapp, O., Köhler, L., and Puchta, H. (2019). An arabidopsis FANCI helicase homologue is required for DNA crosslink repair and rDNA repeat stability. *PLoS Genet.* *15*.
- Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y. V, Stroud, H., Feng, S., Caro, E., Vashisht, A.A., Terragni, J., Chin, H.G., Tu, A., et al. (2012). Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* *151*, 167–180.
- Du, J., Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., and Patel, D.J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 519–532.
- Duc, C., and Thiriet, C. (2021). Replication-coupled chromatin remodeling: An overview of disassembly and assembly of chromatin during replication. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 1–11.
- Ebbs, M.L., and Bender, J. (2006). Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* *18*, 1166–1176.
- Elmayan, T., Proux, F., and Vaucheret, H. (2005). *Arabidopsis* RPA2: A genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr. Biol.* *15*, 1919–1925.



- Evrin, C., Maman, J.D., Diamante, A., Pellegrini, L., and Labib, K. (2018). Histone H2A-H2B binding by Pol  $\alpha$  in the eukaryotic replisome contributes to the maintenance of repressive chromatin. *EMBO J.* 37.
- García, J.A.P., Mazubert, C., del Olmo, I., Bourge, M., Domenichini, S., Bounon, R., Tariq, Z., Delannoy, E., Piñeiro, M., Jarillo, J.A., et al. (2017). Function of the plant DNA polymerase epsilon in replicative stress sensing, a genetic analysis. *Plant Physiol.* 173, 1735–1749.
- Gómez-Zambrano, Á., Merini, W., and Calonje, M. (2019). The repressive role of Arabidopsis H2A.Z in transcriptional regulation depends on AtBMI1 activity. *Nat. Commun.* 10.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., David, L., and Zhu, J.K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111, 803–814.
- Gouil, Q., and Baulcombe, D.C. (2016). DNA Methylation Signatures of the Plant Chromomethyltransferases. *PLoS Genet.* 12.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair. *Cell* 128, 721–733.
- Habu, Y., Mathieu, O., Tariq, M., Probst, A. V., Smathajitt, C., Zhu, T., and Paszkowski, J. (2006). Epigenetic regulation of transcription in intermediate heterochromatin. *EMBO Rep.* 7, 1279–1284.
- Hale, C.J., Potok, M.E., Lopez, J., Do, T., Liu, A., Gallego-Bartolome, J., Michaels, S.D., Jacobsen, S.E., Scheid, O.M., and Mendel, G. (2016). Identification of Multiple Proteins Coupling Transcriptional Gene Silencing to Genome Stability in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* 12.
- Han, J.J., Song, Z.T., Sun, J.L., Yang, Z.T., Xian, M.J., Wang, S., Sun, L., and Liu, J.X. (2018). Chromatin remodeling factor CHR18 interacts with replication protein RPA1A to regulate the DNA replication stress response in Arabidopsis. *New Phytol.* 220, 476–487.
- Han, Y.F., Zhao, Q.Y., Dang, L.L., Luo, Y.X., Chen, S.S., Shao, C.R., Huang, H.W., Li, Y.Q., Li, L., Cai, T., et al. (2016). The SUMO E3 ligase-like proteins PIAL1 and PIAL2 interact with MOM1 and form a novel complex required for transcriptional silencing. *Plant Cell* 28, 1215–1229.
- Harris, C.J., and Jacobsen, S.E. (2019). ADCP1: a novel plant H3K9me2 reader. *Cell Res.* 29, 6–7.
- Harris, C.J., Husmann, D., Liu, W., Kasmi, F. El, Wang, H., Papikian, A., Pastor, W.A., Moissiard, G., Vashisht, A.A., Dangl, J.L., et al. (2016). Arabidopsis AtMORC4 and AtMORC7 Form Nuclear Bodies and Repress a Large Number of Protein-Coding Genes. *PLoS Genet.* 12, 1005998.
- Hu, Z., Cools, T., Kalhorzadeh, P., Heyman, J., and De Veylder, L. (2015). Deficiency of the Arabidopsis Helicase RTEL1 Triggers a SOG1-Dependent Replication Checkpoint in Response to DNA Cross-Links. *Plant Cell Online* 27, 149–161.
- Hyun, Y., Yun, H., Park, K., Ohr, H., Lee, O., Kim, D.-H., Sung, S., and Choi, Y. (2013). The catalytic subunit of Arabidopsis DNA polymerase ensures stable maintenance of histone modification. *Development* 140, 156–166.
- Iglesias, F.M., Bruera, N.A., Dergan-Dylon, S., Marino-Buslje, C., Lorenzi, H., Mateos, J.L., Turck, F., Coupland, G., and Cerdán, P.D. (2015). The Arabidopsis DNA Polymerase  $\delta$  Has a Role in the Deposition of Transcriptionally Active Epigenetic Marks, Development and Flowering. *PLoS Genet.* 11, 1–25.





- Ikeda, Y., Pélissier, T., Bourguet, P., Becker, C., Pouch-Pélissier, M.N., Pogorelcnik, R., Weingartner, M., Weigel, D., Deragon, J.M., and Mathieu, O. (2017). Arabidopsis proteins with a transposon-related domain act in gene silencing. *Nat. Commun.* **8**, 15122.
- Iyer, D.R., and Rhind, N. (2017). The intra-S checkpoint responses to DNA damage. *Genes (Basel)*. **8**.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., and Jacobsen, S.E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**, 556–560.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T., and Jacobsen, S.E. (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* **112**, 308–315.
- Jacob, Y., Feng, S., LeBlanc, C.A., Bernatavichute, Y. V., Stroud, H., Cokus, S., Johnson, L.M., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Michaels, S.D. (2009). ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 763–768.
- Jacob, Y., Bergamin, E., Donoghue, M.T.A., Mongeon, V., LeBlanc, C., Voigt, P., Underwood, C.J., Brunzelle, J.S., Michaels, S.D., Reinberg, D., et al. (2014). Selective methylation of histone H3 variant H3.1 regulates heterochromatin replication.
- Jasencakova, Z., Scharf, A.N.D., Ask, K., Corpet, A., Imhof, A., Almouzni, G., and Groth, A. (2010). Replication Stress Interferes with Histone Recycling and Predeposition Marking of New Histones. *Mol. Cell* **37**, 736–743.
- Jiang, D., and Berger, F. (2017). DNA replication–coupled histone modification maintains Polycomb gene silencing in plants. *Science (80-. )*. **357**, 1146–1149.
- Jing, Y., Sun, H., Yuan, W., Wang, Y., Li, Q., Liu, Y., Li, Y., and Qian, W. (2016). SUVH2 and SUVH9 Couple Two Essential Steps for Transcriptional Gene Silencing in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **9**, 1156–1167.
- Johnson, L.M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J., and Jacobsen, S.E. (2007). The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation. *Curr. Biol.* **17**, 379–384.
- Joly-Lopez, Z., and Bureau, T.E. (2014). Diversity and evolution of transposable elements in *Arabidopsis*. *Chromosom. Res.* **22**, 203–216.
- Kanno, T., Mette, M.F., Kreil, D.P., Aufsatz, W., Matzke, M., and Matzke, A.J.M. (2004). Involvement of Putative SNF2 Chromatin Remodeling Protein DRD1 in RNA-Directed DNA Methylation. *Curr. Biol.* **14**, 801–805.
- Kapoor, A., Agarwal, M., Andreucci, A., Zheng, X., Gong, Z., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., and Zhu, J.K. (2005). Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA- methylation-independent manner in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **15**, 1912–1918.
- Kotsantis, P., Segura-Bayona, S., Margalef, P., Marzec, P., Ruis, P., Hewitt, G., Bellelli, R., Patel, H., Goldstone, R., Poetsch, A.R., et al. (2020). RTEL1 Regulates G4/R-Loops to Avert Replication-Transcription Collisions. *Cell Rep.* **33**, 108546.
- Lai, W.K.M., and Pugh, B.F. (2017). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 548–562.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359.



- Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 204–220.
- Lei, M., Zhang, H., Julian, R., Tang, K., Xie, S., and Zhu, J.K. (2015). Regulatory link between DNA methylation and active demethylation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 3553–3557.
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *25*, 1754–1760.
- Li, X., Jake Harris, C., Zhong, Z., Chen, W., Liu, R., Jia, B., Wang, Z., Li, S., Jacobsen, S.E., and Du, J. (2018). Mechanistic insights into plant SUVH family H3K9 methyltransferases and their binding to context-biased non-CG DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E8793–E8802.
- Li, Z., Hua, X., Serra-Cardona, A., Xu, X., Gan, S., Zhou, H., Yang, W.S., Chen, C.L., Xu, R.M., and Zhang, Z. (2020). DNA polymerase  $\alpha$  interacts with H3-H4 and facilitates the transfer of parental histones to lagging strands. *Sci. Adv.* *6*.
- Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H., and Ecker, J.R. (2008). Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis. *Cell* *133*, 523–536.
- Liu, J., Ren, X., Yin, H., Wang, Y., Xia, R., Wang, Y., and Gong, Z. (2010a). Mutation in the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$  influences transcriptional gene silencing and homologous recombination in Arabidopsis. *Plant J.* *61*, 36–45.
- Liu, Q., Wang, J., Miki, D., Xia, R., Yu, W., He, J., Zheng, Z., Zhu, J.-K., and Gong, Z. (2010b). DNA replication factor C1 mediates genomic stability and transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* *22*, 2336–2352.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* *25*, 402–408.
- Lorković, Z.J., Naumann, U., Matzke, A.J.M., and Matzke, M. (2012). Involvement of a GHKL ATPase in RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.* *22*, 933–938.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.
- Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A., and Almouzni, G. (2006). PTMs on H3 Variants before Chromatin Assembly Potentiate Their Final Epigenetic State. *Mol. Cell* *24*, 309–316.
- de Luxán-Hernández, C., Lohmann, J., Hellmeyer, W., Seanpong, S., Wöltje, K., Magyar, Z., Pettkó-Szandtner, A., Péliissier, T., De Jaeger, G., Hoth, S., et al. (2019). PP7L is essential for MAIL1-mediated transposable element silencing and primary root growth. *Plant J.* *tpj.14655*.
- Marí-Ordóñez, A., Marchais, A., Etcheverry, M., Martin, A., Colot, V., and Voinnet, O. (2013). Reconstructing de novo silencing of an active plant retrotransposon. *Nat. Genet.* *45*, 1029–1039.
- Mathieu, O., Probst, A. V., and Paszkowski, J. (2005). Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *EMBO J.* *24*, 2783–2791.
- Mathieu, O., Reinders, J., Čaikovski, M., Smathajitt, C., and Paszkowski, J. (2007). Transgenerational Stability of the Arabidopsis Epigenome Is Coordinated by CG Methylation. *Cell* *130*, 851–862.



- Matzke, M.A., and Mosher, R.A. (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 394–408.
- McClintock, B. (1950). THE ORIGIN AND BEHAVIOR OF MUTABLE LOCI IN MAIZE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *36*, 337–344.
- McKinley, K.L., and Cheeseman, I.M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 16–29.
- Mirouze, M., Reinders, J., Bucher, E., Nishimura, T., Schneeberger, K., Ossowski, S., Cao, J., Weigel, D., Paszkowski, J., and Mathieu, O. (2009). Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis*. *Nature* *461*, 427–430.
- Mittelsten Scheid, O., Probst, A. V., Afsar, K., and Paszkowski, J. (2002). Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13659–13662.
- Miura, A., Nakamura, M., Inagaki, S., Kobayashi, A., Saze, H., and Kakutani, T. (2009). An *Arabidopsis* *jmjC* domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *EMBO J.* *28*, 1078–1086.
- Moissiard, G., Cokus, S.J., Cary, J., Feng, S., Billi, A.C., Stroud, H., Husmann, D., Zhan, Y., Lajoie, B.R., McCord, R.P., et al. (2012). MORC family ATPases required for heterochromatin condensation and gene silencing. *Science* (80- ). *336*, 1448–1451.
- Moissiard, G., Bischof, S., Husmann, D., Pastor, W.A., Hale, C.J., Yen, L., Stroud, H., Papikian, A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., et al. (2014). Transcriptional gene silencing by *Arabidopsis* microorchidia homologues involves the formation of heteromers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7474–7479.
- Montgomery, S.A., Tanizawa, Y., Galik, B., Wang, N., Ito, T., Mochizuki, T., Akimcheva, S., Bowman, J.L., Cognat, V., Maréchal-Drouard, L., et al. (2020). Chromatin Organization in Early Land Plants Reveals an Ancestral Association between H3K27me3, Transposons, and Constitutive Heterochromatin. *Curr. Biol.* *30*, 573-588.e7.
- Morel, J.B., Mourrain, P., Béclin, C., and Vaucheret, H. (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* *10*, 1591–1594.
- Mozgova, I., Wildhaber, T., Trejo-Arellano, M.S., Fajkus, J., Roszak, P., Köhler, C., and Hennig, L. (2018). Transgenerational phenotype aggravation in CAF-1 mutants reveals parent-of-origin specific epigenetic inheritance. *New Phytol.* *220*, 908–921.
- Mozgová, I., Mokroš, P., and Fajkus, J. (2010). Dysfunction of chromatin assembly factor 1 induces shortening of telomeres and loss of 45s rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *22*, 2768–2780.
- Nicolau, M., Picault, N., Descombin, J., Jami-Alahmadi, Y.I., Feng, S., Bucher, E.I., Jacobsen ID, S.E., Deragon, J.-M., Wohlschlegel, J.I., and Moissiard, G.I. (2020). The plant mobile domain proteins MAIN and MAIL1 interact with the phosphatase PP7L to regulate gene expression and silence transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet.* *16*, e1008324.
- Nishimura, T., Molinard, G., Petty, T.J., Broger, L., Gabus, C., Halazonetis, T.D., Thore, S., and Paszkowski, J. (2012). Structural basis of transcriptional gene silencing mediated by *Arabidopsis* MOM1. *PLoS Genet.* *8*.
- Numa, H., Kim, J.M., Matsui, A., Kurihara, Y., Morosawa, T., Ishida, J., Mochizuki, Y., Kimura, H., Shinozaki, K., Toyoda, T., et al. (2010). Transduction of RNA-directed DNA methylation signals to repressive histone marks in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* *29*, 352–362.



- Oberlin, S., Sarazin, A., Chevalier, C., Voinnet, O., and Marí-Ordóñez, A. (2017). A genome-wide transcriptome and translome analysis of Arabidopsis transposons identifies a unique and conserved genome expression strategy for Ty1/Copia retroelements. *Genome Res.* *27*, 1549–1562.
- Oh, S., Park, S., and Van Nocker, S. (2008). Genic and global functions for Paf1C in chromatin modification and gene expression in Arabidopsis. *PLoS Genet.* *4*, 1000077.
- Ohno, Y., Narangajavana, J., Yamamoto, A., Hattori, T., Kagaya, Y., Paszkowski, J., Gruissem, W., Hennig, L., and Takeda, S. (2011). Ectopic gene expression and organogenesis in Arabidopsis mutants missing BRU1 required for genome maintenance. *Genetics* *189*, 83–95.
- Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Aufran, D., Grimaneli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A., and Vielle-Calzada, J.P. (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature* *464*, 628–632.
- Del Olmo, I., Lopez, J.A., Vazquez, J., Raynaud, C., Pineiro, M., and Jarillo, J.A. (2016). Arabidopsis DNA polymerase  $\epsilon$  recruits components of Polycomb repressor complex to mediate epigenetic gene silencing. *Nucleic Acids Res.* *44*, 5597–5614.
- Ono, T., Kaya, H., Takeda, S., Abe, M., Ogawa, Y., Kato, M., Kakutani, T., Scheid, O.M., Araki, T., and Shibahara, K.I. (2006). Chromatin assembly factor 1 ensures the stable maintenance of silent chromatin states in Arabidopsis. *Genes to Cells* *11*, 153–162.
- Osakabe, A., Lorković, Z.J., Kobayashi, W., Tachiwana, H., Yelagandula, R., Kurumizaka, H., and Berger, F. (2018). Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility. *Nucleic Acids Res.* *46*, 7675–7685.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* *53*, 674–690.
- Paredes, S., and Maggert, K.A. (2009). Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17829–17834.
- Paredes, S., Branco, A.T., Hartl, D.L., Maggert, K.A., and Lemos, B. (2011). Ribosomal dna deletions modulate genome-wide gene expression: “rDNA-sensitive” genes and natural variation. *PLoS Genet.* *7*, 1001376.
- Probst, A. V., Fransz, P.F., Paszkowski, J., and Mittelsten Scheid, O. (2003). Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J.* *33*, 743–749.
- Probst, A. V., Desvoyes, B., and Gutierrez, C. (2020). Similar yet critically different: The distribution, dynamics and function of histone variants. *J. Exp. Bot.* *71*, 5191–5204.
- Quadrana, L., Etcheverry, M., Gilly, A., Caillieux, E., Madoui, M.A., Guy, J., Bortolini Silveira, A., Engelen, S., Baillet, V., Wincker, P., et al. (2019). Transposition favors the generation of large effect mutations that may facilitate rapid adaption. *Nat. Commun.* *10*.
- Ramirez-Parra, E., and Gutierrez, C. (2007). E2F Regulates FASCIATA1, a Chromatin Assembly Gene Whose Loss Switches on the Endocycle and Activates Gene Expression by Changing the Epigenetic Status. *PLANT Physiol.* *144*, 105–120.
- Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* *44*, W160–W165.
- Raynaud, C., Sozzani, R., Glab, N., Domenichini, S., Perennes, C., Cella, R., Kondorosi, E., and Bergounioux, C. (2006). Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in Arabidopsis. *Plant J.* *47*, 395–407.





- Ré, D.A., Cambiagno, D.A., Arce, A.L., Tomassi, A.H., Giustozzi, M., Casati, P., Ariel, F.D., and Manavella, P.A. (2019). CURLY LEAF Regulates MicroRNA Activity by Controlling ARGONAUTE 1 Degradation in Plants. *Mol. Plant* *13*, 72–87.
- Recker, J., Knoll, A., and Puchta, H. (2014). The Arabidopsis thaliana Homolog of the Helicase RTEL1 Plays Multiple Roles in Preserving Genome Stability. *Plant Cell Online* *26*, 4889–4902.
- Reinders, J., Wulff, B.B.H., Mirouze, M., Marí-Ordóñez, A., Dapp, M., Rozhon, W., Bucher, E., Theiler, G., and Paszkowski, J. (2009). Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic Arabidopsis epigenomes. *Genes Dev.* *23*, 939–950.
- Reinders, J., Mirouze, M., Nicolet, J., and Paszkowski, J. (2013). Parent-of-origin control of transgenerational retrotransposon proliferation in Arabidopsis. *EMBO Rep.* *14*, 823–828.
- Reverón-Gómez, N., González-Aguilera, C., Stewart-Morgan, K.R., Petryk, N., Flury, V., Graziano, S., Johansen, J.V., Jakobsen, J.S., Alabert, C., and Groth, A. (2018). Accurate Recycling of Parental Histones Reproduces the Histone Modification Landscape during DNA Replication. *Mol. Cell* *72*, 239-249.e5.
- Rigal, M., and Mathieu, O. (2011). A “mille-feuille” of silencing: Epigenetic control of transposable elements. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1809*, 452–458.
- Rigal, M., Kevei, Z., Pélissier, T., and Mathieu, O. (2012). DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns. *EMBO J.* *31*, 2981–2993.
- Rigal, M., Becker, C., Pélissier, T., Pogorelcnik, R., Devos, J., Ikeda, Y., Weigel, D., and Mathieu, O. (2016). Epigenome confrontation triggers immediate reprogramming of DNA methylation and transposon silencing in Arabidopsis thaliana F1 epihybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E2083–E2092.
- Röhrig, S., Schröpfer, S., Knoll, A., and Puchta, H. (2016). The RTR Complex Partner RMI2 and the DNA Helicase RTEL1 Are Both Independently Involved in Preserving the Stability of 45S rDNA Repeats in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* *12*.
- Roudier, F., Ahmed, I., Bérard, C., Sarazin, A., Mary-Huard, T., Cortijo, S., Bouyer, D., Caillieux, E., Duvernois-Berthet, E., Al-Shikhley, L., et al. (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J.* *30*, 1928–1938.
- Rougée, M., Quadrana, L., Zervudacki, J., Hure, V., Colot, V., Navarro, L., and Deleris, A. (2020). Polycomb mutant partially suppresses DNA hypomethylation-associated phenotypes in Arabidopsis. *Life Sci. Alliance* *4*.
- Sarkies, P., and Sale, J.E. (2012). Propagation of histone marks and epigenetic memory during normal and interrupted DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 697–716.
- Saze, H., Scheid, O.M., and Paszkowski, J. (2003). Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat. Genet.* *34*, 65–69.
- Saze, H., Shiraishi, A., Miura, A., and Kakutani, T. (2008). Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in Arabidopsis thaliana. *Science (80- )*. *319*, 462–465.
- Schönrock, N., Exner, V., Probst, A., Gruissem, W., and Hennig, L. (2006). Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* *281*, 9560–9568.



- Schultz, M.D., He, Y., Whitaker, J.W., Hariharan, M., Mukamel, E.A., Leung, D., Rajagopal, N., Nery, J.R., Urich, M.A., Chen, H., et al. (2015). Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature* *523*, 212–216.
- Shi, L., Wang, J., Hong, F., Spector, D.L., and Fang, Y. (2011). Four amino acids guide the assembly or disassembly of Arabidopsis histone H3.3-containing nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10574–10578.
- Shook, M.S., and Richards, E.J. (2014). VIM proteins regulate transcription exclusively through the MET1 cytosine methylation pathway. *Epigenetics* *9*, 980–986.
- Shu, J., Chen, C., Thapa, R.K., Bian, S., Nguyen, V., Yu, K., Yuan, Z.C., Liu, J., Kohalmi, S.E., Li, C., et al. (2019). Genome-wide occupancy of histone H3K27 methyltransferases CURLY LEAF and SWINGER in Arabidopsis seedlings. *Plant Direct* *3*.
- Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., and Fransz, P.F. (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO J.* *21*, 6549–6559.
- Steimer, A., Amedeo, P., Afsar, K., Fransz, P., Scheid, O.M., and Paszkowski, J. (2000). Endogenous targets of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* *12*, 1165–1178.
- Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-Parra, E., Jacobsen, S.E., and Gutierrez, C. (2012). Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5370–5375.
- Stroud, H., Do, T., Du, J., Zhong, X., Feng, S., Johnson, L., Patel, D.J., and Jacobsen, S.E. (2013a). Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 64–72.
- Stroud, H., Greenberg, M.V.C., Feng, S., Bernatavichute, Y. V., and Jacobsen, S.E. (2013b). Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. *Cell* *152*, 352–364.
- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Probst, A. V., Angelis, K.J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Scheid, O.M., Shibahara, K.-I., et al. (2003). BRU1, a novel link between response to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev.* *18*, 782–793.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2014). Environmental responses mediated by histone variants. *Trends Cell Biol.* *24*, 642–650.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2017). Histone variants on the move: Substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 115–126.
- Tang, K., Lang, Z., Zhang, H., and Zhu, J.K. (2016). The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications. *Nat. Plants* *2*.
- Tariq, M., Saze, H., Probst, A. V., Lichota, J., Habu, Y., and Paszkowski, J. (2003). Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8823–8827.
- Tittel-Elmer, M., Bucher, E., Broger, L., Mathieu, O., Paszkowski, J., and Vaillant, I. (2010). Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS Genet.* *6*, 1–11.
- Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A., and Kakutani, T. (2009). Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. *Nature* *461*, 423–426.
- Ühlken, C., Horvath, B., Stadler, R., Sauer, N., and Weingartner, M. (2014). MAIN-LIKE1 is a crucial factor for correct cell division and differentiation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* *78*, 107–120.



- Underwood, C.J., Henderson, I.R., and Martienssen, R.A. (2017). Genetic and epigenetic variation of transposable elements in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **36**, 135–141.
- Uringa, E.J., Lisaingo, K., Pickett, H.A., Brind'Amour, J., Rohde, J.H., Zelensky, A., Essers, J., and Lansdorp, P.M. (2012). RTEL1 contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2782–2792.
- Vaillant, I., Schubert, I., Tourmente, S., and Mathieu, O. (2006). MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis. *EMBO Rep.* **7**, 1273–1278.
- Vannier, J.B., Sandhu, S., Petalcorin, M.I., Wu, X., Nabi, Z., Ding, H., and Boulton, S.J. (2013). RTEL1 is a replisome-associated helicase that promotes telomere and genome-wide replication. *Science* (80- ). **342**, 239–242.
- Varas, J., Santos, J.L., and Pradillo, M. (2017). The absence of the arabidopsis chaperone complex CAF-1 produces mitotic chromosome abnormalities and changes in the expression profiles of genes involved in DNA repair. *Front. Plant Sci.* **8**.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., and Richards, E.J. (1993). Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. *Science* (80- ). **260**, 1926–1928.
- Wang, J., Blevins, T., Podicheti, R., Haag, J.R., Tan, E.H., Wang, F., and Pikaard, C.S. (2017). Mutation of Arabidopsis SMC4 identifies condensin as a corepressor of pericentromeric transposons and conditionally expressed genes. *Genes Dev.* **31**, 1601–1614.
- Wang, Y., Liu, J., Xia, R., Wang, J., Shen, J., Cao, R., Hong, X., Zhu, J.K., and Gong, Z. (2007). The protein kinase TOUSLED is required for maintenance of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO Rep.* **8**, 77–83.
- Wang, Z., Schwacke, R., and Kunze, R. (2016). DNA Damage-Induced Transcription of Transposable Elements and Long Non-coding RNAs in Arabidopsis Is Rare and ATM-Dependent. *Mol. Plant* **9**, 1142–1155.
- Williams, B.P., Pignatta, D., Henikoff, S., and Gehring, M. (2015). Methylation-Sensitive Expression of a DNA Demethylase Gene Serves As an Epigenetic Rheostat. *PLoS Genet.* **11**.
- Wollmann, H., Holec, S., Alden, K., Clarke, N.D., Jacques, P.É., and Berger, F. (2012). Dynamic deposition of histone variant H3.3 accompanies developmental remodeling of the Arabidopsis transcriptome. *PLoS Genet.* **8**, 1002658.
- Wollmann, H., Stroud, H., Yelagandula, R., Tarutani, Y., Jiang, D., Jing, L., Jamge, B., Takeuchi, H., Holec, S., Nie, X., et al. (2017). The histone H3 variant H3.3 regulates gene body DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.* **18**.
- Xia, R., Wang, J., Liu, C., Wang, Y., Wang, Y., Zhai, J., Liu, J., Hong, X., Cao, X., Zhu, J.-K., et al. (2006). ROR1/RPA2A, a putative replication protein A2, functions in epigenetic gene silencing and in regulation of meristem development in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 85–103.
- Xu, L., Zhao, Z., Dong, A., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.-P., Steinmetz, A., and Shen, W.-H. (2008). Di- and Tri- but Not Monomethylation on Histone H3 Lysine 36 Marks Active Transcription of Genes Involved in Flowering Time Regulation and Other Processes in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1348–1360.
- Yadav, T., Quivy, J.P., and Almouzni, G. (2018). Chromatin plasticity: A versatile landscape that underlies cell fate and identity. *Science* (80- ). **361**, 1332–1336.



- Yang, X., Tong, A., Yan, B., and Wang, X. (2017). Governing the silencing state of chromatin: The roles of polycomb repressive complex 1 in arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* *58*, 198–206.
- Yelagandula, R., Stroud, H., Holec, S., Zhou, K., Feng, S., Zhong, X., Muthurajan, U.M., Nie, X., Kawashima, T., Groth, M., et al. (2014). The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in arabidopsis. *Cell* *158*, 98–109.
- Yin, H., Zhang, X., Liu, J., Wang, Y., He, J., Yang, T., Hong, X., Yang, Q., and Gong, Z. (2009). Epigenetic regulation, somatic homologous recombination, and abscisic acid signaling are influenced by dna polymerase  $\epsilon$  mutation in arabidopsis. *Plant Cell* *21*, 386–402.
- Yokthongwattana, C., Bucher, E., Čaikovski, M., Vaillant, I., Nicolet, J., Scheid, O.M., and Paszkowski, J. (2010). MOM1 and Pol-IV/V interactions regulate the intensity and specificity of transcriptional gene silencing. *EMBO J.* *29*, 340–351.
- Yuan, L., Song, X., Zhang, L., Yu, Y., Liang, Z., Lei, Y., Ruan, J., Tan, B., Liu, J., and Li, C. (2021). The transcriptional repressors VAL1 and VAL2 recruit PRC2 for genome-wide Polycomb silencing in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* *49*, 98–113.
- Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., and Zilberman, D. (2013). The arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* *153*, 193–205.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* *16*, 2–9.
- Zervudacki, J., Yu, A., Ameseffe, D., Wang, J., Drouaud, J., Navarro, L., and Deleris, A. (2018). Transcriptional control and exploitation of an immune-responsive family of plant retrotransposons. *EMBO J.* *37*, e98482.
- Zhang, C., Du, X., Tang, K., Yang, Z., Pan, L., Zhu, P., Luo, J., Jiang, Y., Zhang, H., Wan, H., et al. (2018a). Arabidopsis AGDP1 links H3K9me2 to DNA methylation in heterochromatin. *Nat. Commun.* *9*.
- Zhang, H., Lang, Z., and Zhu, J.K. (2018b). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 489–506.
- Zhang, J., Xie, S., Cheng, J., Lai, J., Zhu, J.-K., and Gong, Z. (2016a). The Second Subunit of DNA Polymerase Delta Is Required for Genomic Stability and Epigenetic Regulation. *Plant Physiol.* *171*, 1192–1208.
- Zhang, J., Xie, S., Zhu, J.-K., and Gong, Z. (2016b). Requirement for flap endonuclease 1 (FEN1) to maintain genomic stability and transcriptional gene silencing in Arabidopsis HHS Public Access. *Plant J* *87*, 629–640.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., et al. (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell* *126*, 1189–1201.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y. V., Pellegrini, M., Goodrich, J., and Jacobsen, S.E. (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol.* *5*, 1026–1035.
- Zhang, X., Bernatavichute, Y. V., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2009). Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.* *10*, 62.





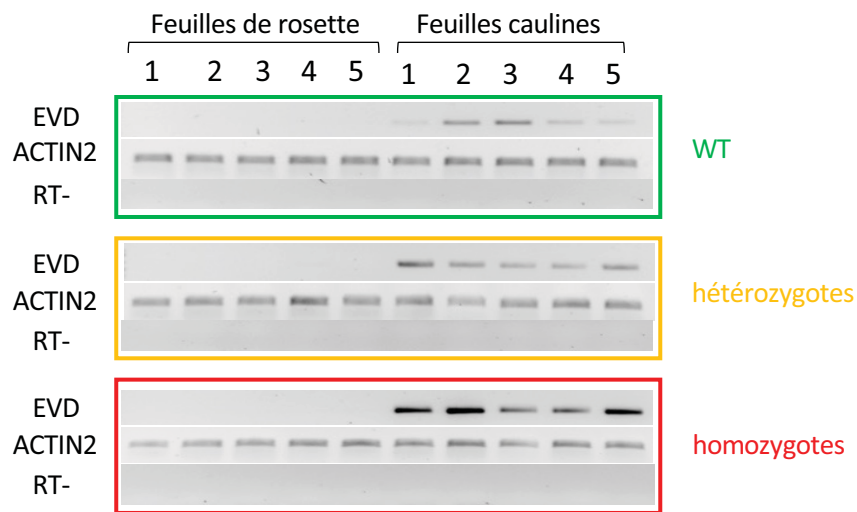
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nussbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 9.
- Zhao, S., Cheng, L., Gao, Y., Zhang, B., Zheng, X., Wang, L., Li, P., Sun, Q., and Li, H. (2019). Plant HP1 protein ADCP1 links multivalent H3K9 methylation readout to heterochromatin formation. *Cell Res.* 29, 54–66.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat. Genet.* 39, 61–69.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125–129.



# **Annexe**

---





**Annexe 1:** Amplification par RT-PCR des transcrits *EVD* dans des feuilles de rosettes et feuilles caulines de cinq plantes sauvages (WT), *met1-7/+* (hétérozygotes) ou *met1-7/met1-7* (homozygotes) en génération S2 (descendance de la plante S1 *met1-7/+* numéro 5 (Figure 1a))