



**HAL**  
open science

# Rôle de l'interférence à ARN (RNAi) dans l'intégrité du génome chez la levure *S. pombe*

Nina Farida Abderahmane

## ► To cite this version:

Nina Farida Abderahmane. Rôle de l'interférence à ARN (RNAi) dans l'intégrité du génome chez la levure *S. pombe*. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV022 . tel-03704776

**HAL Id: tel-03704776**

**<https://theses.hal.science/tel-03704776v1>**

Submitted on 26 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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L' UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **CSV/ Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Farida Nina ABDERAHMANE**

Thèse dirigée par le **Dr. André VERDEL** et  
co-encadrée par le **Dr. Leila TOUAT-TODESCHINI**

Préparée au sein de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences  
dans l'École Doctorale Chimie et Science du vivant (EDCSV)

## **Rôle de l'interférence à ARN (RNAi) dans l'intégrité du génome chez la levure *S. pombe***

Thèse soutenue publiquement le **25 Juin 2020**,  
devant le jury composé de :

**Pr. Gilles FAURY**

Professeur, UGA, Président

**Dr. Pei-Yun WU**

Directrice de Recherche, CNRS, Rapportrice

**Dr. Hervé SEITZ**

Directeur de Recherche, CNRS, Rapporteur

**Dr. Sarah LAMBERT**

Directrice de Recherche, CNRS, Examinatrice

**Dr. Jérôme POLI**

Maître de conférences, CNRS, Examineur

**Dr. Hervé MENONI**

Chargé de Recherche, INSERM, Examineur

**Dr. Leila TOUAT-TODESCHINI**

Ingénieure d'étude, INSERM, Co-encadrante de thèse, Invitée

**Dr. André VERDEL**

Directeur de Recherche, CNRS, Directeur de thèse





# Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail. Merci au Dr. Pei-Yun WU et au Dr. Hervé SEITZ pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse en tant que rapporteurs. Merci au Dr. Sarah LAMBERT, au Dr. Jérôme POLI et au Dr. Hervé MENONI pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant qu'examineurs. Je remercie également le Pr. Gilles FAURY d'avoir accepté de présider le jury de thèse. Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr. Saadi KHOCHBIN et le Dr. Ramesh PILLAI, pour leurs suggestions et leurs conseils avisés durant nos entrevues.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. André VERDEL pour m'avoir accueillie dans son équipe durant mes stages de Master 1 et Master 2, et pour être devenu, par la suite, mon directeur de thèse. Merci pour votre bienveillance, votre encadrement et votre implication scientifique et personnel durant ces années. Merci pour tous vos conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Merci de vous être toujours montré disponible quand j'avais besoin de discuter des manips et d'avoir souligné mes efforts. Merci également de m'avoir fourni l'opportunité d'aller travailler chez nos collaborateurs à l'Institut Curie, de découvrir un nouvel univers et de nouvelles méthodologies. Outre l'approche de la démarche scientifique, j'ai appris de solides compétences (*soft skills*) qui me seront fort utiles dans la poursuite de ma carrière. C'est surtout cet aspect que je retiendrai de mon passage dans votre équipe.

Je remercie également le Dr. Leila TOUAT-TODESCHINI, qui est devenue co-encadrante de ma thèse au cours de la deuxième année. Merci pour tes conseils et ton implication dans mon projet. Merci pour avoir partagé ton savoir-faire technique qui m'a permis de rapidement résoudre d'innombrables problèmes à la paillasse. Merci pour ta disponibilité (même quand je te sollicitais pendant tes propres manips) grâce à laquelle je ne me suis jamais sentie livrée à moi-même.

J'exprime également ma gratitude au Dr. Sarah LAMBERT et à son équipe, et en particulier à Karine FRÉON, pour leur implication dans ce projet qui est le fruit de notre étroite collaboration. Merci Sarah et merci à ton équipe de m'avoir accueillie pendant 6 mois lors de ma première année de thèse. Merci d'avoir partagé avec moi votre savoir-faire et votre expertise



dans l'étude du stress réplicatif, et de m'avoir formée à l'utilisation de nouvelles techniques. Ce fut une expérience très enrichissante autant d'un point de vue professionnel, que personnel (j'ai enfin pu découvrir Paris). Merci Sarah pour ta bienveillance et tous tes conseils durant l'ensemble de mes années de thèse.

Je suis reconnaissante envers l'association « Ligue nationale contre le cancer » pour le support financier lors de ma 4<sup>ème</sup> année de thèse.

Je remercie le Dr. Mylène PEZET et Jacques MAZZEGA de la plateforme MicroCell, pour leur gentillesse, leurs conseils et leur accompagnement lors de la réalisation des observations en microscopie. Merci également à Arnold FERTIN pour avoir mis en place une méthode automatisée de traitement d'images, adaptée spécialement à mon projet.

J'adresse mes remerciements à mes collègues de l'équipe « RNAi et Epigénétique » qui ont rendu mon quotidien et mon travail plus agréable : au Pr. Claire VOURC'H, au Dr. Daniel PERAZZA et au Dr. Daphné BERNY pour leurs gentillesse et leurs conseils toujours avisés (un autre merci spécial à Daniel, grâce à qui j'ai pu goûter à la fonction d'encadrante de TD); à ma douce Kalina TIMCHEVA pour son écoute attentive et son soutien ; à Solenne DUFOUR pour nos délires lors des pauses-café ; à Claire KARCZEWSKI pour sa gentillesse et son dévouement. Je remercie également les anciens membres de l'équipe que j'ai eu la chance de connaître : le Dr. Virginie FAURE et le Dr. Sivan KOSKAS pour leurs questions pertinentes lors de la préparation de mes présentations orales ; le Dr. Benoît GILQUIN que je n'ai connu que peu de temps mais qui m'a marquée par sa bonne humeur débordante ; Émeline LAMBERT pour ses conseils techniques ; le Dr. Aude GREZY pour nos discussions et le partage de ses expériences professionnelles en dehors de la recherche. Un grand merci aux anciens thésards, le Dr. Matteo CATTANEO (ou « Amore ») pour son amitié irremplaçable et son soutien encore actuel, et le Dr. Mathieu DANGIN. Nos discussions et nos fous-rires font partie de mes plus beaux souvenirs. C'est même votre accueil et votre bienveillance qui a contribué à mon désir de rejoindre l'équipe. Merci de m'avoir toujours aidée, même quand je vous sollicitais pendant vos propres manips.

Mention spéciale pour un ancien membre, le Dr. Cyril BOYAULT, qui m'a supervisée durant mes stages de Master 1 et Master 2. Je n'ai pas eu l'impression de travailler à tes côtés, tellement j'avais l'impression de rire tout le temps ! Un très grand merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, ta disponibilité, et pour avoir répondu à toutes mes questions scientifiques, mêmes les plus farfelues ou « stupides ». Je te remercie pour ton écoute sincère et bienveillante,

même après ton départ. Je te remercie grandement pour ta disponibilité, ton investissement et tes conseils dans la construction actuelle de mon projet professionnel.

Mes plus beaux fous rires l'ont également été en compagnie de « l'équipe de cœur » (membres actuels ou anciens de l'équipe MARCHE). Merci au Dr Alexis GONON avec qui j'ai adoré discuter ; au Dr. Bertrand HUARD ou BH, que j'ai adoré taquiner (je suis toujours un peu déçue de pas avoir eu le droit à un resto avec ton équipe et à TA charge) ; au Dr. Benoît MANFROI que j'ai adoré torturer (il ne veut toujours pas confesser ses blessures d'enfances) ; à ma tendre Laurie BAERT (Dr également) avec qui j'ai adoré partager de croustillantes confidences lors des pauses-café ou à la paillasse pendant les incubations. Vous avez contribué à rendre mon travail encore plus agréable. J'en profite aussi pour remercier Arindam DEY et Dr. Keerthi KURMA, pour leur gentillesse, leur bonté de cœur et ce beau voyage à Barcelone à leurs côtés. Merci également à Mohamed GRAIESS, Hélène MARCHE, Marion MERCEY, Tristan LE CLAINCHE, Christine CHARRAT, Patrick VERNET, Samuel DULEY, Fayçal BOUSSOUAR, Thierry BUCHOU, Michel PABION, Sophie BARRAL, Tao JIA et Olivier DESTAING pour leur gentillesse à mon égard.

Un grand merci à Pierre HAINAUT, directeur de l'IAB, et à Amélie FAUCONNET pour leur écoute attentive et leur soutien moral. Pour les mêmes raisons, ainsi que pour sa bonté et sa générosité, je remercie Dalenda BENMEDJAHED de l'équipe administrative. Je remercie également Michail GIDOPOULOS, Alexandre BABIN et Norbert MASCIAVE de la plateforme Logistique et Maintenance, pour leur bonne humeur, leur bonne volonté, leur disponibilité et leur aide précieuse quand il a fallu gérer des problèmes techniques dans l'urgence. Merci à Norbert d'avoir accepté d'innombrables fois de retarder le lancement autoclave quand je devais préparer des litres de milieu de culture.

Je remercie également anciennes doctorantes du comité des thèses et avec qui j'ai grandement apprécié organiser la journée thématique sur le Biomimétisme. Ce fut, encore à ce jour, le meilleur congrès organisé par des doctorantes à l'IAB (c'est grâce au Girl power) ! Je remercie également Candice ROBERT et Kamilia SAHLI du Pôle Carrière de l'IAB, de m'avoir donné l'opportunité de participer à l'organisation d'événements de networking et d'inviter des entreprises de technologie. Ces expériences furent extrêmement enrichissantes pour la réflexion autour mon projet professionnel.

Je suis reconnaissante à mon ancienne collègue, le Dr. Aude GREZY et à mon amie Samah, pour avoir pris le temps de relire ma thèse et d'y apporter des corrections de syntaxe.

Je souhaite profiter de cette occasion pour remercier les chercheurs qui m'ont donné l'opportunité d'intégrer leurs équipes durant l'ensemble de mon parcours universitaire et m'ont permise ainsi de construire ma carrière scientifique et d'enrichir mes compétences : le Dr. Alain BUISSON (en L1), le Dr. Mary CALLANAN (en L2) et le Dr. Saadi KHOCHBIN ainsi que le Dr. Fayçal BOUSSOUAR (en L3).

Je dédie cette rubrique spéciale à ma chère amie, le Dr. Sara EL KENNANI. Ton arrivée à l'institut a donné une belle tournure à ma thèse et à ma vie... Il y a véritablement eu un avant et un après toi. Merci pour ton immense bonté, ta sollicitude, ton soutien moral, ton dévouement et ton aide précieuse (en particulier pour les iconographies et la mise en page de mon manuscrit de thèse). Je te remercie sincèrement d'avoir été une épaule sur laquelle je pouvais me poser. Merci d'avoir redonné du boost à ma persévérance durant les nombreuses périodes où j'ai voulu lâcher l'affaire. Nos sorties restos (surtout au Mendo Mekan) font partie de mes plus beaux souvenirs...

Je tiens aussi à remercier mes amies hors de l'institut, qui m'ont donné de la force durant cette aventure. Ma chère Samah, merci pour ton accueil et ton accompagnement lors de mon aventure parisienne. Tu as été comme un phare pour la provinciale que je suis. À mes yeux, tu es un véritable modèle de *female leadership and empowerment*. Merci à Lamia pour ta gentillesse, ton grand cœur, ta sollicitude et ton écoute toujours attentive. Merci à Nawal : tu as été un véritable coach de vie, as toujours été là pour rebooster mon moral et, me fournir des conseils avisés et me soutenir dans mes projets pro et perso. Merci encore à Sara, mais également à Mimouna, Romayssa, Hajar, Nawelle Q et Farida. Vous avez toutes répondues présentes aux moments les plus critiques (comme durant les conditions difficiles et précaires de la rédaction de mon manuscrit de thèse). Je ferai de mon mieux pour vous rendre la pareille et je vous souhaite le meilleur ! Merci également à mes amies du collège et lycée, Aurore et Lucie, pour votre écoute et nos innombrables sorties revigorantes. Le Pernaud devrait être rebaptisé à notre honneur tellement on y a passé du temps !

Le paragraphe de la fin, va évidemment à ma famille. Merci à tous mes oncles, à mes tantes qui sont chacune comme une deuxième maman, à mes cousins/cousines. Je citerai en particulier à mon cousin Bilel et à ma tante Nathalie. Un immense merci à celle que je ne remercierai jamais assez, même si on m'offrait une vie éternelle... à **ma mère, Samera**, sans qui je n'aurai rien accompli dans vie, qui a toujours été mon roc et mon soutien indéfectible. Merci de m'avoir inculqué tes valeurs, dont le goût pour les études, et merci d'être un modèle de force et de persévérance. **C'est à toi et à mes amies que je dédie cette thèse.**



« Somewhere, something incredible is waiting to be known »,  
Carl SAGAN



# Résumé

Préserver l'intégrité du matériel génétique est crucial pour assurer la survie cellulaire et prévenir le développement tumoral. L'interférence à ARN (RNAi) joue un rôle important dans ce contexte. Il s'agit d'un processus conservé surtout connu pour sa fonction de *silencing* transcriptionnel permettant d'induire la formation d'hétérochromatine chez différentes espèces. Au vu des divers rôles protecteurs dans l'intégrité du génome que revêt cet état chromatinien, le RNAi concourt ainsi, par ce biais, à préserver la stabilité du génome. Le RNAi a également été impliqué plus directement dans la réponse au stress génotoxique chez une variété d'eucaryotes. Dans ce cas, il agirait dans la signalisation ou la réparation des dommages de l'ADN. Cependant, cette fonction et les mécanismes moléculaires, qui sous-tendent son implication, restent très peu caractérisés, bien que la fonction soit clairement conservée de la levure à l'Homme.

Dans cette étude, nous avons exploré la fonction moléculaire du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique, en utilisant la levure *Schizosacharomyces pombe* comme modèle d'étude. Dans cet organisme, la fonction clé du RNAi dans la formation d'hétérochromatine a été disséquée. Son mécanisme d'action se base sur le complexe effecteur RITS (*RNA Induced-Transcriptional Silencing*), qui se charge en petits ARN produits par Dcr1. Ces derniers permettent de guider RITS au niveau des régions cibles, ce qui aboutit au recrutement des facteurs assurant la déposition et la maintenance des marques épigénétiques répressives associées à la formation d'hétérochromatine. En parallèle, le RNAi participerait également à la résolution des collisions entre les machineries de réplication et de transcription se produisant au niveau de régions difficiles à répliquer, comme les régions riches en séquences d'ADN répétées. Selon le modèle proposé, il favoriserait la terminaison de la transcription, ce qui permettrait à la fourche de réplication de poursuivre sa progression (Zariatigui *et al.*, *Nature*, 2011 ; Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

Notre étude a d'abord montré que RITS, et pas seulement Dcr1, sont impliqués dans le maintien de la stabilité génomique chez *S. pombe*. La combinaison d'approches biochimiques et d'analyses microscopiques a révélé des connexions physiques entre RITS et les processus de réplication et de réparation de l'ADN. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la fonction du RNAi dans la stabilité des rDNA. Nos données ont indiqué que le RNAi participe

au maintien des nombreuses unités de rDNA, prévenant ainsi des réarrangements chromosomiques majeurs. Cette fonction requiert RITS et Dcr1, mais n'implique pas d'autres facteurs essentiels à la formation d'hétérochromatine RNAi-dépendante. D'autre part, nous avons mis en évidence que le RNAi contribue à favoriser la progression des fourches de réplication au niveau d'une région proche des origines de réplication de l'unité ribosomale. Les fourches arrêtées constituent des structures fragiles pouvant entraîner une instabilité génomique. Afin d'explorer plus en détail la fonction du RNAi dans leur prise en charge, nous avons utilisé un système permettant de bloquer localement et de façon inductible la progression d'une seule fourche de réplication dans le génome. L'essai génétique basé sur ce système suggère que RITS et Dcr1 favoriseraient le redémarrage *via* la recombinaison homologue au niveau de la fourche bloquée. Ils agiraient tout particulièrement sur l'étape de la résection initiant ce processus. Dans l'ensemble, ces travaux permettent une meilleure compréhension de la fonction moléculaire du RNAi dans la réponse cellulaire au stress réplcatif. Cet aspect a été assez peu exploré dans les études actuelles chez les autres espèces eucaryotes.

Interférence à ARN, réplication de l'ADN, réparation de l'ADN, stabilité génomique, ADN ribosomaux, levure



# Abstract

Preserving the integrity of genetic material is crucial to ensure cell survival and prevent tumor development. RNA Interference (RNAi) plays an important role in this context. This conserved process is well known to mediate sequence-specific transcriptional gene silencing *via* the induction of heterochromatin formation in a large variety of species. Through the various protective roles that this chromatin state has on the genome integrity, RNAi contributes to the preservation genomic stability. In parallel, RNAi has been involved also more directly in the cell response to genomic DNA damage in a variety of eukaryotes. In this case, it would participate to DNA damage signalization or repair. However, this function and the molecular mechanisms underlying its involvement remain poorly characterized, even though the function appears to be conserved from yeast to human.

In this study, we explored the molecular function of RNAi in maintaining genomic stability, using the yeast *Schizosacharomyces pombe* as a model. In this organism, the key function of RNAi in the formation of heterochromatin has been extensively studied. The mechanism of action relies on the effector RITS complex (RNA Induced-Transcriptional Silencing), which is loaded with Dcr1 produced small RNAs. These small RNAs guide RITS to the target regions in order to recruit the factors ensuring the deposition and maintenance of repressive epigenetic marks associated with the formation of heterochromatin. RNAi has also been involved in the resolution of collisions between the replication and transcription machineries, occurring at hard-to-replicate genomic regions, like at regions containing highly repeated DNA. According to the current model, RNAi favors transcription termination thereby favouring replication fork progression (Zariatégui *et al.*, *Nature*, 2011 ; Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

Our study first showed that RITS, and not just Dcr1, are involved in maintaining genomic stability in *S. pombe*. The combination of biochemical and microscopic approaches revealed physical connections between RITS and the DNA replication and repair processes. We studied in particular the implication of RNAi in the genomic stability of the rDNA region. Our data indicated that RNAi participates in the maintenance of the numerous rDNA units, thereby preventing major chromosomal rearrangements. This function requires RITS and Dcr1, but does not involve other factors essential for the formation of heterochromatin. Moreover, we

identified that RNAi contributes to promote replication fork progression within a region close to the origin of replication of the ribosomal unit. The terminally-arrested replication forks constitute fragile structures which can cause genomic instability. In order to further explore this function of RNAi, we used a conditional and inducible fork barrier to block replication at a unique locus in the genome. A genetic assay based on this system, strongly suggest that RITS and Dcr1 manages the homologous recombination-dependent fork restart by acting specifically on the DNA resection step of this process. Altogether, our findings provide a better understanding of the RNAi molecular function in the cellular response to replicative stress. This aspect has been poorly explored by the current studies led in other eukaryotic models.

RNA interference, DNA Replication, DNA Repair, genomic stability, ribosomal DNA, yeast

# Table des matières

Remerciements.....	1
Résumé.....	8
Abstract.....	10
Table des matières.....	12
Liste des principales abréviations .....	19
Liste des Figures.....	21
Liste des Tables.....	24
Avant-propos.....	25
INTRODUCTION .....	27
Chapitre I : Les fonctions du RNAi dans le <i>silencing</i> de l'expression des gènes.....	28
<b>1 Présentation des caractéristiques générales du RNAi et de son rôle dans la régulation de l'expression des gènes.....</b>	<b>29</b>
1.1 <i>Découverte du RNAi</i> .....	30
1.2 <i>Le processus du RNAi</i> .....	31
1.1.1 Les petits ARN interférents .....	32
1.1.2 Dicer .....	36
1.1.3 Les protéines Argonautes .....	38
1.1.4 Assemblage et activation du complexe effecteur.....	40
1.3 <i>La voie cytoplasmique PTGS</i> .....	43
<b>2 Rôle du RNAi dans la régulation de l'état chromatinien : la voie nucléaire TGS.....</b>	<b>44</b>
2.1 <i>Généralités sur l'organisation et la dynamique de la chromatine</i> .....	45
2.1.1 Organisation structurelle de la chromatine .....	45
2.1.2 Dynamique de la chromatine.....	45
2.1.3 Hétérochromatine et Euchromatine.....	47
2.2 <i>Rôle du RNAi dans la modification de l'état chromatinien</i> .....	49
2.3 <i>Autres processus RNAi-indépendants impliqués dans la formation d'hétérochromatine</i> ...	53

<b>3</b>	<b>Le rôle du RNAi dans la mise sous silence transcriptionnelle de la chromatine chez <i>S. pombe</i></b>	<b>54</b>
3.1	<i>S. pombe</i> : un modèle de référence pour l'étude de la formation de l'hétérochromatine constitutive et du maintien de la stabilité génomique.....	54
3.2	Localisation et structure de l'hétérochromatine constitutive chez <i>S. pombe</i> .....	57
3.2.1	Organisation spatiale des sites de l'hétérochromatine constitutive .....	57
3.2.2	Chromatine péricentromérique.....	59
3.2.3	Hétérochromatine subtélomérique.....	60
3.2.4	Hétérochromatine de la région du déterminisme sexuel.....	62
3.2.5	Hétérochromatine au niveau des rDNAs .....	63
3.3	Généralités sur la formation de l'hétérochromatine RNAi-dépendante chez <i>S. pombe</i> .....	65
3.4	Le rôle du RNAi dans l'initiation, la propagation et la maintenance de l'hétérochromatine péricentromérique chez <i>S. pombe</i> .....	66
3.4.1	Phase d'initiation .....	66
3.4.2	Phase d'amplification et de maintenance.....	69
3.4.3	La régulation de l'assemblage du complexe RITS .....	70
3.4.4	La voie des primal RNA (priRNAs) .....	72
3.5	Implication du RNAi à d'autres sites de formation de l'hétérochromatine.....	74
3.5.1	Au niveau de la région du déterminisme sexuel et des régions télomériques .....	74
3.5.2	Au niveau des rDNAs.....	76
3.5.3	Au niveau des gènes méiotiques .....	76
3.6	Implication du RNAi dans le maintien de la stabilité épigénétique des cellules quiescentes.....	77
	<b>Chapitre II : Processus moléculaires assurant la réplication et la réparation de l'ADN .....</b>	<b>79</b>
<b>1.</b>	<b>Lésions de l'ADN et mécanismes de réparation .....</b>	<b>81</b>
1.1	Sources de dommages à l'ADN .....	81
1.2	Signalisation du dommage et checkpoints cellulaires .....	82
1.3	Mécanismes de réparation .....	85
1.3.1	Généralités.....	85
1.3.2	Réparation des lésions simple-brin de l'ADN.....	85
1.3.3	Réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	86
<b>2</b>	<b>Mécanismes généraux de la réplication de l'ADN .....</b>	<b>91</b>
2.1	Généralités.....	91
2.2	Composition du réplisome .....	92

2.3	<i>Le déroulement de la réplication</i> .....	95
2.3.1	Initiation.....	95
2.3.2	Élongation .....	96
2.3.3	Terminaison .....	99
2.4	<i>Régulation de l'activation des origines de réplication</i> .....	101
2.5	<i>Contexte chromatinien de la réplication</i> .....	102
<b>3</b>	<b>Mécanismes de prises en charge des fourches de réplication bloquées.....</b>	<b>104</b>
3.1	<i>Les challenges de la réplication</i> .....	104
3.1.1	Le Stress réplicatif.....	104
3.1.2	Les barrières de la réplication .....	105
3.1.3	Le maintien des unités de rDNAs .....	112
3.2	<i>Les stratégies de prise en charge des fourches arrêtées</i> .....	116
3.3.	<i>Le rôle de la HR dans la réparation des fourches arrêtées</i> .....	119
<b>Chapitre III : RNAi et maintien de la stabilité du génome.....</b>		<b>123</b>
<b>1</b>	<b>Rôle des sncRNAs dans la réponse au stress génomique .....</b>	<b>124</b>
1.1	<i>L'implication de la voie des miRNAs</i> .....	124
1.2	<i>Rôle des sncRNAs associés aux dommages de l'ADN</i> .....	126
1.2.1	Données chez <i>Neurospora crassa</i> .....	127
1.2.2	Données chez la <i>Drosophile</i> .....	129
1.2.3	Données chez les plantes.....	130
1.2.4	Données chez les mammifères .....	133
1.2.5	Synthèse des fonctions probables du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique ... .....	136
<b>2</b>	<b>Quid de la fonction du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique chez <i>S. pombe</i> .....</b>	<b>138</b>
2.1	<i>Rôle dans progression du cycle cellulaire</i> .....	138
2.2	<i>Rôle du RNAi dans la résolution des conflits entre les machineries de réplication et de transcription</i> .....	139
<b>3</b>	<b>Implication des autres processus ARN-dépendants dans la réponse au stress génomique ....</b>	<b>144</b>
3.1	<i>Implication des lncRNAs</i> .....	144
3.2	<i>Rôle de l'ARN dans la réparation des DSBs</i> .....	145
<b>OBJECTIFS DE MON PROJET DE THÈSE .....</b>		<b>148</b>

<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>151</b>
<b>Chapitre I : Rôle du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome .....</b>	<b>152</b>
<b>1 Contribution personnelle aux travaux mentionnés.....</b>	<b>153</b>
<b>2 Article de recherche en préparation (en anglais) : .....</b>	<b>153</b>
2.1 <i>Introduction .....</i>	<i>154</i>
2.2 <i>Description des résultats.....</i>	<i>156</i>
<b>Chapitre II : Le RNAi joue un rôle dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées par la formation d'un complexe Protéine/ADN .....</b>	<b>174</b>
<b>1 Introduction &amp; Résumé .....</b>	<b>175</b>
<b>2 Contribution personnelle aux travaux mentionnés.....</b>	<b>176</b>
<b>3 Description des résultats obtenus (en anglais) : .....</b>	<b>176</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>192</b>
<b>1 Mise en évidence d'une connexion physique entre RITS et des protéines impliquées dans le maintien de la stabilité du génome .....</b>	<b>193</b>
<b>2 Le RNAi promeut la progression du cycle cellulaire et le maintien général de la stabilité du génome .....</b>	<b>195</b>
<b>3 Le RNAi participe à préserver la stabilité des rDNAs.....</b>	<b>197</b>
3.1 <i>RITS et Dcr1 sont tous les deux impliqués dans le maintien du nombre d'unités ribosomales .....</i>	<i>197</i>
3.2 <i>Le chargement d'ARN et l'activité enzymatique d'Ago1 sont requises pour la fonction d'Ago1 dans le maintien des unités ribosomales .....</i>	<i>199</i>
3.3 <i>La méthyltransférase Clr4 n'est pas requise pour le maintien des unités ribosomales .....</i>	<i>201</i>
3.4 <i>L'amplification de la production des siRNAs par Rdp1 ne semble pas être requise par le RNAi pour assurer sa fonction vis-à-vis de la stabilité des rDNAs .....</i>	<i>202</i>
3.5 <i>Le RNAi participe à préserver le contenu en rDNA en favorisant la progression des fourches de réplication à l'échelle de l'unité ribosomale .....</i>	<i>204</i>
3.6 <i>RITS et Dcr1 sont impliqués dans la progression des fourches à proximité de l'origine de réplication de l'unité ribosomale .....</i>	<i>205</i>
3.7 <i>RITS et Dcr1 ne sont pas impliqués dans l'efficacité de blocage des barrières programmées des rDNAs .....</i>	<i>206</i>
3.8 <i>Régionalisation de l'implication du RNAi à l'échelle de l'unité ribosomale .....</i>	<i>208</i>

<b>4</b>	<b>Le RNAi promeut le redémarrage par HR d'une fourche bloquée .....</b>	<b>210</b>
4.1	<i>RITS et Dcr1 participeraient à la régulation du processus de résection.....</i>	210
4.2	<i>La fonction moléculaire du RNAi dans le redémarrage de la fourche ne semble pas être liée à la formation d'hétérochromatine .....</i>	214
4.3	<i>La RNA Pol II pourrait être impliquée dans le redémarrage de la fourche bloquée.....</i>	215
4.4	<i>Perspective : le RNAi participerait-il au recrutement des facteurs impliqués dans le redémarrage des fourches de réplication arrêtées ?.....</i>	217
4.5	<i>Perspective : les hybrides ARN/ADN sont-ils impliqués dans le redémarrage d'une fourche bloquée et leur présence est-elle régulée par le RNAi ?.....</i>	217
4.6	<i>Perspective : le RNAi participerait-t-il à faciliter le remodelage de la chromatine au niveau de la barrière ?.....</i>	218
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>220</b>
	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>222</b>
<b>1</b>	<b>Matériel biologique et condition de culture .....</b>	<b>223</b>
1.1	<i>Souches utilisées lors de cette étude .....</i>	223
1.2	<i>Conditions de culture de S. pombe.....</i>	225
1.2.1	<i>Composition classique des milieux de culture liquides et solides .....</i>	225
1.2.2	<i>Conditions de culture spécifiques aux expérimentations mettant en jeu l'induction de la barrière RTS1-RFB .....</i>	226
1.3	<i>Plasmides utilisés .....</i>	227
1.4	<i>Amorces utilisées .....</i>	227
<b>2</b>	<b>Construction de souches .....</b>	<b>228</b>
2.1	<i>Stratégie d'introduction d'une séquence d'ADN dans le génome de S. pombe .....</i>	228
2.2	<i>Préparation du matériel ADN à introduire dans le génome de S. pombe.....</i>	228
2.2.1	<i>Préparation de la cassette d'ADN linéaire .....</i>	228
2.2.2	<i>Préparation de la cassette d'ADN circulaire (plasmide) .....</i>	231
2.3	<i>Transformation de S. pombe .....</i>	231
2.4	<i>Sélection des transformants positifs.....</i>	232
2.5	<i>Obtention de nouvelles souches par croisement aléatoire ou « random spore ».....</i>	233
<b>3</b>	<b>Test en gouttes.....</b>	<b>234</b>

<b>4</b>	<b>Analyse des interactions protéiques.....</b>	<b>235</b>
4.1	<i>Purification par affinité en tandem de complexes protéiques (méthode TAP) .....</i>	235
4.1.1	Principe .....	235
4.1.2	Préparation des culots de levures.....	236
4.1.3	Lyse des cellules .....	236
4.1.4	Préparation des complexes protéiques .....	237
4.1.5	Élution des complexes protéiques .....	237
4.1.6	Analyse des échantillons par LC-MS-MS.....	238
4.1.7	Détermination des « Gene Ontology » .....	239
4.2	« GST Pull-Down ».....	239
4.2.1	Principe .....	239
4.2.2	Production des protéines GST et GST-Ago1 par <i>Escherichia Coli</i> .....	240
4.2.3	Elaboration des colonnes GST et GST-Ago1.....	240
4.2.4	Ago1 « Pull-Down ».....	242
4.3	<i>Western Blot</i> .....	243
<b>5</b>	<b>Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....</b>	<b>244</b>
5.1	<i>Principe</i> .....	244
5.2	<i>Préparation et fixation des culots de culture de levures</i> .....	245
5.3	<i>Lyse et sonication des cellules</i> .....	245
5.4	<i>Immunoprécipitation</i> .....	246
5.5	<i>Purification de l'ADN immunoprécipité</i> .....	247
5.6	<i>Analyse de l'ADN immunoprécipité par qPCR</i> .....	247
<b>6</b>	<b>Analyse des évènements de glissements de réplication ou « replication slippage » .....</b>	<b>248</b>
6.1	<i>Principe de l'essai génétique</i> .....	248
6.2	<i>Protocole expérimental</i> .....	250
<b>7</b>	<b>Gels d'ADN bidimensionnels (2DGE).....</b>	<b>251</b>
7.1	<i>Principe de la méthode</i> .....	251
7.2	<i>Interprétation des signaux obtenus suite à l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE</i> .....	253
7.3	<i>Conditions expérimentales de cultures (système RTS1-RFB)</i> .....	254
7.4	<i>Pontage de l'ADN génomique</i> .....	254



7.5	<i>Préparation des sphéroblastes</i> .....	254
7.6	<i>Préparation des échantillons l'ADN génomique</i> .....	255
7.7	<i>Enrichissement et purification des intermédiaires de réplication</i> .....	256
7.8	<i>Séparations des intermédiaires de réplication par électrophorèse bidimensionnelle</i> .....	257
7.9	<i>Réversion du pontage et Southern Blot</i> .....	257
<b>8</b>	<b>Électrophorèse sur gel en champ pulsé (PGFE)</b> .....	<b>258</b>
8.1	<i>Principe de la méthode</i> .....	258
8.2	<i>Protocole expérimental</i> .....	260
<b>9</b>	<b>Analyse du contenu génomique nucléaire par cytométrie de flux</b> .....	<b>261</b>
<b>10</b>	<b>Microscopie sur cellules vivantes</b> .....	<b>261</b>
10.1	<i>Travaux de comparaison des localisations en foci nucléaires des protéines candidates étiquetées YFP avec Tas3-CFP ou mCherry-Swi6</i> .....	261
10.2	<i>Travaux de comparaison des localisations en foci nucléaires des protéines Tas3-GFP et Swi6-mCherry</i> .....	262
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>264</b>

# Liste des principales abréviations

<b>2DGE</b>	<b>Gel d'ADN bidimensionnel</b>
<b>Ago 1</b>	<i>Argonaute 1</i>
<b>Arb1-2</b>	<i>Argonaute Binding Protein 1-2</i>
<b>ARC</b>	<i>Argonaute siRNA Chaperone</i>
<b>aRNA</b>	transcrit aberrant
<b>CDK</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
<b>cDNA</b>	ADN complémentaire
<b>CDS</b>	Séquence codante ( <i>Coding Sequence</i> )
<b>ChIP</b>	Immunoprécipitation de chromatine ( <i>Chromatin Immunoprecipitation</i> )
<b>Chp1</b>	<i>Chromodomain Protein 1</i>
<b>clr4</b>	<i>cryptic loci regulator gene 4</i>
<b>CLRC</b>	<i>Cryptic Loci Regulator Complex</i>
<b>dcr1</b>	<i>Dicer1</i>
<b>dCTP</b>	désoxycytosine triphosphate
<b>DDR</b>	Réponse au dommage de l'ADN ( <i>DNA Damage Response</i> )
<b>DDRNA</b>	<i>DROSHA-dependent small RNA</i>
<b>dilncRNA</b>	<i>Damage-Induced long non-coding RNA</i>
<b>diRNA</b>	<i>DSB-induced small RNA</i>
<b>D-loop</b>	<i>Displacement loop</i>
<b>DNA</b>	Acide désoxyribonucléique ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNA Pol</b>	ADN polymérase
<b>DNase</b>	Désoxyribonucléase
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DSB</b>	Cassure double brin de l'ADN ( <i>Double Strand Break</i> )
<b>dsRNA</b>	ARN double brin ( <i>Double Stranded RNA</i> )
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tetra-acétique
<b>EMM</b>	<i>Edinburgh minimum medium</i>
<b>ERC</b>	éléments circulaires extrachromosomiques ribosomaux ( <i>Extra-chromosomal rDNA Circles</i> )
<b>Exo1</b>	Exonucléase 1
<b>g</b>	gramme ou force gravitationnelle selon le sujet discuté
<b>GCR</b>	Réarrangement chromosomique complexe ( <i>Gross Chromosomal Rearrangement</i> )
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>
<b>GSR</b>	Réponse au stress génomique ( <i>Genomic Stress Response</i> )
<b>H3K9me<sub>2</sub></b>	Diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9
<b>HDAC</b>	histone désacétylase
<b>HR</b>	Recombinaison Homologue ( <i>Homologous Recombination</i> )
<b>HU</b>	Hydroxyurée

<b>IR</b>	Répétitions inversées ( <i>Inverted Repeats</i> )
<b>kb</b>	Kilobase
<b>L</b>	litre
<b>lncRNA</b>	ARN long non codant ( <i>long non-coding RNA</i> )
<b>M</b>	molaire (mol/L)
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>mRNA</b>	ARN messenger (messenger RNA)
<b>NHEJ</b>	<i>Non Homologous End Joining</i>
<b>pb</b>	paire de bases
<b>PCNA</b>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PFGE</b>	Électrophorèse sur gel en champ pulsé ( <i>Pulse Filled Electrophoresis</i> )
<b>piRNA</b>	<i>piwi-interacting RNA</i>
<b>PTGS</b>	répression post-transcriptionnelle ( <i>Post-transcriptional Gene Silencing</i> )
<b>qiRNA</b>	<i>QDE-2-interacting small RNA</i>
<b>qPCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
<b>Rad51</b>	<i>RecA family recombinase</i>
<b>RdDM</b>	Méthylation de l'ADN dirigée par l'ARN ( <i>RNA-dependant DNA methylation</i> )
<b>rDNA</b>	ADN ribosomal
<b>rdp1</b>	<i>RNA-directed RNA polymerase</i>
<b>RDRC</b>	<i>RNA-Directed RNA polymerase Complex</i>
<b>RFB</b>	<i>Replication Fork Barriers</i>
<b>RISC</b>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
<b>RITS</b>	<i>RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing</i>
<b>RNA</b>	Acide ribonucléique
<b>RNA Pol</b>	ARN polymérase
<b>RNAi</b>	Interférence à ARN ( <i>Interference RNA</i> )
<b>RNase</b>	Ribonucléase
<b>RPA</b>	<i>Replication Protein A</i>
<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>sDNA</b>	ADN simple brin
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>siRNA</b>	petit ARN interférent ( <i>Small Interfering RNA</i> )
<b>sncRNA</b>	petit ARN non codants ( <i>Small non Coding RNA</i> )
<b>SSB</b>	Cassure simple brin de l'ADN ( <i>Single Strand Break</i> )
<b>Swi6</b>	<i>SWItching protein</i>
<b>TAP</b>	<i>Tandem Affinity Purification</i>
<b>Tas3</b>	<i>Targeting Subunit 3</i>
<b>tDNA</b>	séquences codantes pour les ADN de transfert
<b>TE</b>	transposons ou Tris EDTA selon le sujet discuté
<b>TGS</b>	répression transcriptionnelle ( <i>Transcriptional Gene Silencing</i> )
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>uvi-RNA</b>	<i>DSB-induced small RNA</i>
<b>µL</b>	micro litre (10 <sup>-6</sup> litre)
<b>µm</b>	micromètre (10 <sup>-6</sup> mètre)

# Liste des Figures

Figure 1 : Schéma général d'action du RNAi .....	31
Figure 2: Les voies de biogénèse des miRNAs et des piRNAs .....	35
Figure 3: Architecture de la version humaine de Dicer .....	37
Figure 4: Architecture des protéines Argonautes .....	39
Figure 5: Modèle d'assemblage du complexe RISC par un duplex de miRNAs chez la Drosophile .....	42
Figure 6: Mécanismes de <i>silencing</i> par le RNAi dans le cytoplasme selon la qualité d'appariement entre le petit ARN interférent chargé dans le complexe effecteur et sa cible ARN .....	44
Figure 7: Organisation dynamique de la chromatine .....	47
Figure 8: Organisation de la chromatine eucaryote en deux domaines distincts : l'hétérochromatine et l'euchromatine .....	49
Figure 9: Modèle de la méthylation de l'ADN induit par la voie du RNAi chez <i>A. thaliana</i> ..	51
Figure 10: Cycle cellulaire de la levure <i>S. pombe</i> .....	54
Figure 11: Localisation des sites d'hétérochromatine constitutives chez <i>S. pombe</i> .....	57
Figure 12: Schéma de l'organisation de l'hétérochromatine péricentromérique .....	59
Figure 13: Schéma de l'organisation de l'hétérochromatine subtélomérique du chromosome II .....	60
Figure 14 : Schéma de l'organisation de l'hétérochromatine au niveau de la région du déterminisme sexuel .....	62
Figure 15 : Organisation d'une unité ribosomale .....	63
Figure 16 : Modèle de nucléation de l'hétérochromatine par la voie des siRNA et celle des priRNAs chez <i>S. pombe</i> .....	67
Figure 17: Modèle de régulation de l'assemblage du complexe RITS lors de la formation d'hétérochromatine.....	72
Figure 18: Mécanismes d'initiation de la formation d'hétérochromatine aux différentes régions d'hétérochromatine constitutives chez <i>S. pombe</i> .....	75
Figure 19: Exemples de lésions affectant la double hélice d'ADN .....	81

Figure 20 : La signalisation de la réponse au stress génomique .....	84
Figure 21 : Modèle de réparation d'une cassure double brin par la recombinaison homologue .....	88
Figure 22: Les différents modèles proposés d'accomplissement de la phase post-synaptique de la recombinaison homologue .....	90
Figure 23: Le mécanisme de la réplication chez les eucaryotes .....	98
Figure 24: Modèle de la terminaison de la réplication chez les eucaryotes.....	100
Figure 25: Modèle de couplage entre la progression de la fourche de réplication et le réassemblage de la chromatine.....	103
Figure 26 : Les types d'obstacles à l'origine des barrières de la réplication .....	105
Figure 27: Exemples de structures génomiques secondaires formées en fonction de l'organisation des séquences répétées. ....	107
Figure 28 : Caractéristiques des RFBs programmées localisées au niveau des rDNA .....	110
Figure 29: Caractéristiques des RFBs programmées situées au locus <i>mat1</i> de la région du déterminisme sexuel chez <i>S. pombe</i> .....	112
Figure 30: Modèle de mécanisme à l'origine de la contraction des rDNA.....	113
Figure 31 : Modèle de mécanisme à l'origine de l'amplification des unités de rDNA.....	115
Figure 32: Les stratégies de prise en charge d'une fourches de réplication lors de la rencontre avec un obstacle .....	117
Figure 33: Modèles de redémarrage des fourches de réplication par la recombinaison homologue chez <i>S. pombe</i> .....	121
Figure 34: Régulation miRNA-dépendente de la réponse au stress génotoxique .....	126
Figure 35: Les deux voies du RNAi chez <i>Neurospora crassa</i> .....	128
Figure 36: Modèle d'implication des diRNAs dans la réparation d'une DSB chez <i>Arabidopsis</i> .....	131
Figure 37: Modèle d'implication des uvi-RNAs dans la réparation des dimères de pyrimidine chez <i>A. thaliana</i> .....	133
Figure 38: Modèle d'implication des DDRNAs dans la signalisation d'une DSB chez les mammifères.....	135
Figure 39 : Fonctions possibles des sncRNAs associés aux dommages de l'ADN .....	137
Figure 40 : Rôle potentiel du RNAi dans la coordination des machineries de transcripton et de réplication chez <i>S. pombe</i> .....	144
Figure 41: Modèles de réparation d'une DSB médiée par un lncRNA.....	146

Figure 42: The interactome of Chp1, a sub-unit of RITS, uncovers multiple physical links to chromatin silencing and genomic stability maintenance.....	157
Figure 43: Medium throughput validation of Chp1 interactome reinforces the physical connexion to genome stability maintenance .....	160
Figure 44: Tas3 and Swi6 present the same localization pattern .....	165
Figure 45: The RNAi machinery is required for ribosomal DNA (rDNA) integrity .....	170
Figure 46: RNAi is required proper resolution of replication fork blocks at ribosomal DNA (rDNA) .....	173
Figure 47: The RNAi machinery promote DNA replication recovery from HU treatment ...	178
Figure 48: Presentation of the conditional <i>RTS1</i> -RFB system .....	181
Figure 49: Characterization of RNAi impact on genomic stability by using the <i>RTS1</i> -RFB system.....	184
Figure 50: The <i>RTS1</i> -RFB system integrated at <i>ura4</i> locus does not form heterochromatin.	187
Figure 51: The RNA Pol II might be involved in the recovery of an arrested fork .....	190
Figure 52: Profils de distribution de diverses protéines au niveau de l'unité ribosomale, analysés chez le mutant <i>dcr1Δ</i> dans les travaux publiés de Castel <i>et al.</i> , <i>Cell</i> , 2014.....	205
Figure 53: Implication des facteurs du RNAi dans la progression des fourches de réplication au niveau de l'unité ribosomale .....	209
Figure 54: Modèle de redémarrage par recombinaison homologue d'une fourche arrêtée....	211
Figure 55: Modèle proposé pour expliquer l'implication du RNAi dans la gestion des fourches de réplication arrêtées chez <i>S. pombe</i> .....	214
Figure 56: Les différents types de transformation de <i>S. pombe</i> basée sur la recombinaison homologue.....	229
Figure 57: Présentation du système <i>RTS1</i> -RFB .....	249
Figure 58: Schéma de la procédure expérimentale d'analyse des "replication slippage" .....	251
Figure 59: Schéma d'interprétation des signaux observés sur l'autoradiogramme suite à l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE .....	253
Figure 60: Schéma de la migration en PFGE sur gel d'agarose.....	259

# Liste des Tables

Tableau 1 : Tableau recensant les différents types de petits ARN non codant. ....	33
Supplementary Table 3 : Medium throughput validation of Chp1 interactome using microscopy and GST pull-down approaches .....	162
Supplementary Table 4: Swi6 colocalization assay .....	166
Tableau 5: Liste des souches utilisées dans cette étude .....	225
Tableau 6: Liste des plasmides utilisés. ....	227
Tableau 7: Listes des amorces utilisés.....	227
Tableau 8: Composition d'une réaction classique de PCR pour amplifier une cassette d'ADN .....	230
Tableau 9: Composition d'une réaction classique de PCR pour identifier des transformants	233
Tableau 10: Liste des principaux anticorps primaires utilisés dans cette étude, de leurs origines et des dilutions appropriées .....	244

# Avant-propos

Les gènes renferment les instructions nécessaires au façonnement, au développement et au fonctionnement de l'organisme. En 1958, le biologiste anglais Francis Crick émet l'hypothèse que cette information passe de manière unidirectionnelle de l'ADN, molécule stable, à l'ARN de façon transitoire, puis aux protéines exécutrices des instructions dans la cellule. Cette hypothèse a constitué le dogme central d'étude de la biologie moléculaire pendant de nombreuses années avant d'être complétée par la découverte des ARN non-codants. En effet seulement 5% du génôme humain code pour des protéines, bien qu'il soit quasiment totalement transcrit. Cette observation a ouvert le champ à l'étude des fonctions biologiques de ces ARN non codants. De multiples travaux durant les deux dernières décennies ont ainsi démontré que la composante ARN n'est pas qu'un simple messenger éphémère dans la transmission de l'information génétique, mais constitue un acteur clé de la régulation de l'expression génique.

Découvert en 1998 par Andrew Z. Fire et Craig C. Mello, l'interférence à ARN (RNAi) est un processus conservé au cours de l'évolution, qui utilise des petits ARN non codants ayant, entre autres, la capacité de réduire l'expression des gènes. La littérature actuelle l'associe à une large variété de petits ARN non codants et de mécanismes d'action. Le RNAi a été mis en évidence comme étant impliqué dans des aspects cellulaires fondamentaux tels que le métabolisme, la senescence, le développement, l'apoptose, et la prolifération. Sa conservation chez la très grande majorité des modèles eucaryotes, plaide pour son importance biologique. Le détournement de sa fonction dite de *silencing*, en a fait un outil puissant et incontournable pour les laboratoires de recherche ayant permis de saisir la fonction biologique d'une multitude de protéines. Outre son application technologique, le RNAi n'en reste pas moins un processus cellulaire qui renferme encore des mystères quant à ses rôles biologiques et ses mécanismes d'action moléculaires.

Depuis un peu plus d'une dizaine d'années, il a été établi que le RNAi joue également un rôle important dans le maintien de la stabilité génomique chez de nombreuses espèces, dont les mammifères. D'une part, il participe à la formation de l'hétérochromatine, dont le rôle est essentiel à la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire et à la mise sous silence transcriptionnel de séquences répétées telles que les transposons (Lippman &



Martienssen, *Nature*, 2004). D'autre part, des études récentes laissent à penser que le RNAi aurait un rôle plus direct dans la stabilité génomique, en agissant au niveau des processus de réplication et de réparation de l'ADN (Hawley *et al.*, *Cell Death and Diff*, 2017). Dans ce second cas, son mode d'action reste néanmoins encore très peu caractérisé. Ces découvertes rajoutent une couche de complexité supplémentaire quant au rôle régulateur du RNAi, et ont ouvert la voie à un champ d'investigation nouveau et très stimulant, dans lequel s'est inscrit mon projet de thèse.

Mon projet de thèse a porté sur l'étude de l'implication directe du RNAi dans la stabilité génomique. J'ai utilisé à cet effet la puissance de la génétique moléculaire de la levure *Schizosaccharomyces pombe*. J'ai effectué cette thèse au sein de l'équipe du Dr. VERDEL, localisée à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences, et qui s'intéresse aux rôles régulateurs des ARN non-codants, notamment ceux produits par la voie du RNAi, dans la structure et la fonction des chromosomes et dans le contrôle de l'expression génique. Afin d'élucider l'implication du RNAi dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN, nous avons mis en place une étroite collaboration avec l'équipe du Dr. LAMBERT, localisée à l'Institut CURIE. Celle-ci est spécialisée dans l'étude des mécanismes de la recombinaison homologue, une voie de réparation de l'ADN. Mon projet de recherche s'est ainsi inscrit dans la combinaison de ces deux champs d'expertise.

Avant d'exposer les résultats obtenus, je présenterai dans un premier temps, le rôle et les modes d'action conservés du RNAi dans la régulation de l'expression génique et la mise en place de certaines modifications épigénétiques répressives. Dans un deuxième temps, je décrirai de manière non exhaustive, les processus de réplication et de réparation de l'ADN. Pour finir, je dresserai l'état de l'art quant à la compréhension actuelle de l'implication du RNAi dans ces processus de réplication et réparation de l'ADN. Ayant conscience que l'introduction de mon manuscrit de thèse est assez dense, je tenterai au mieux de guider le lecteur vers les points essentiels à prendre en considération.

# INTRODUCTION

# Chapitre I : Les fonctions du RNAi dans le *silencing* de l'expression des gènes

Mon projet de recherche a visé à mieux comprendre l'implication de l'interférence à ARN dans le maintien de la stabilité génomique. L'objectif de ce premier chapitre d'introduction, divisé en trois parties, est de vous présenter la fonction bien caractérisée du RNAi dans la régulation de l'état chromatinien. À cet effet, je présenterai d'abord, les caractéristiques générales de la voie du RNAi et son rôle bien connu dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Dans un second temps, j'exposerai le rôle du RNAi dans la mise sous silence transcriptionnelle de la chromatine. De plus, je fournirai brièvement des notions relatives à l'organisation et à la dynamique de la chromatine. Pour terminer, je détaillerai plus particulièrement la signalisation et la fonction de régulation transcriptionnelle du RNAi chez l'organisme *S. pombe*, que j'ai utilisé comme modèle d'étude.

## **1 Présentation des caractéristiques générales du RNAi et de son rôle dans la régulation de l'expression des gènes**

Le RNAi a été défini originellement comme un processus spécifique de réduction de l'expression des gènes (ou *silencing*), initié par de longs ARN double-brin d'origine exogène ou endogène, et basé sur l'utilisation de petits ARN appelés siRNAs (pour small interfering RNA ; Fire *et al.*, *Nature*, 1998 ; Hamilton et Baulcombe, *Science*, 1999). La découverte d'autres types de petits ARN interférents et de mécanismes de *silencing* a conduit à une re-définition du RNAi. Dans la littérature actuelle, ce terme inclut désormais une large variété de petits ARN non codants en association à des membres de la famille Argonaute, et qui mènent à un *silencing* selon différents modes d'action (pour revues : Martienssen et Moazed, *CSH Perpect in Biol*, 2015 ; Castel et Martienssen, *Nat Rev Genet*, 2013 ; Bhattacharjee *et al.*, *RNA Bio*, 2019 ; Cf. section 1.1.1). J'attire l'attention du lecteur quant au fait que j'utilise dans ce manuscrit, cette définition plus large du terme « RNAi » qui ne se réfère donc pas uniquement au processus basé sur les siRNAs et découvert par Andrew Fire et Craig Mello en 1998 (Cf. section 1.1).

Le RNAi est conservé dans la plupart des eucaryotes, vertébrés et invertébrés, en passant de la levure à l'Homme (exception faite de quelques organismes comme la levure *S. cerevisiae* ; Aravind *et al.*, *PNAS*, 2000). Il participe à presque tous les processus biologiques fondamentaux comme le maintien de la stabilité génomique, la prolifération et la différenciation cellulaire,

l'apoptose et la défense contre les intrusions virales. Ce processus, et en particulier la voie des miRNAs, a également été montré comme étant essentiel au développement embryonnaire chez les mammifères (Bernstein *et al.*, *Nat Gen*, 2003). Chez cette même classe, la suggestion qu'au moins 30% des gènes seraient sujet à une régulation par le RNAi conforte son importance biologique (Hime and Somers, *Cell Adh Migr.*, 2009). De nos jours, le RNAi est utilisé non seulement en tant qu'outil d'étude des fonctions biologiques d'un gène donné, mais également en tant qu'approche thérapeutique dans le cadre de traitement du cancer ou d'autres maladies (Vaishnaw *et al.*, *Silence*, 2010 ; Wu, *et al.*, *Sci Transl Med*, 2014 ; Iorio et Croce, *EMBO Mol Med*, 2012). Ils peuvent dans ce cas, s'avérer utiles contre des cibles difficilement atteignables par des drogues chimiques.

## **1.1 Découverte du RNAi**

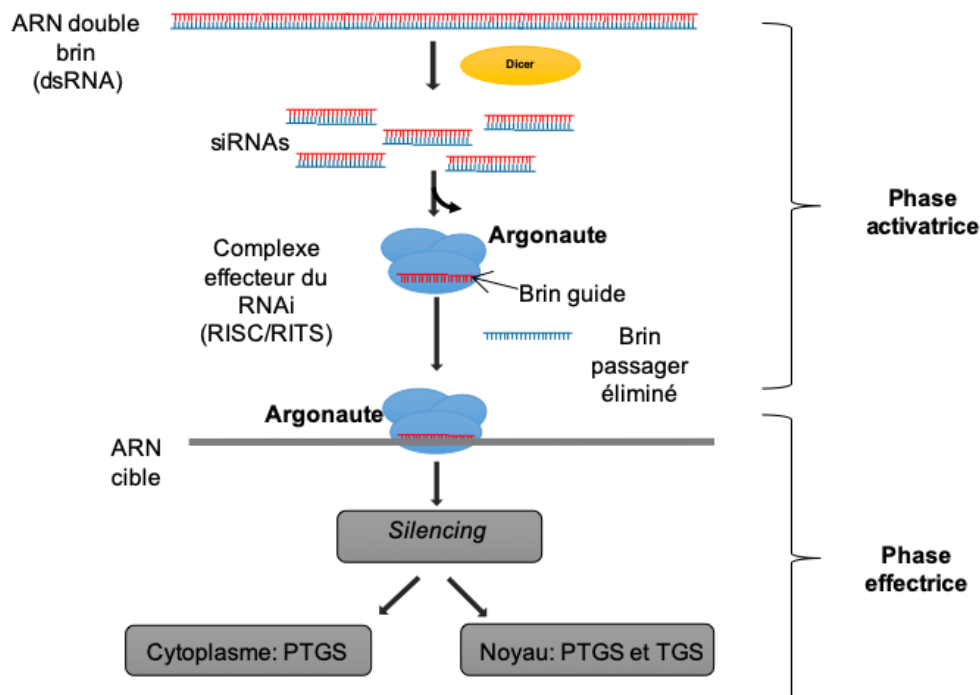
Le RNAi est un processus initialement décrit comme étant associé à une réduction au silence (ou *silencing*) de l'expression de gènes cibles. Suite à sa découverte chez les plantes (Napoli, Lemieux & Jorgensen, 1990) et les *Fungi* (Romano et Macino, 1992) où il porte l'appellation historique de « Quelling », ses bases moléculaires ont été décryptées grâce à des travaux précurseurs chez le nématode *C. elegans* au cours des années 1990. Différentes équipes ont mis en évidence que de petits ARN régulent l'expression de gènes clés contrôlant le timing du développement chez le nématode (Lee *et al.*, *Cell*, 1993 ; Ruvkun *et al.*, *Cell*, 1993). Ils ont suggéré que l'hybridation de ces petits ARN sur des sites de séquences complémentaires dans la région 3'UTR, déstabilise les ARN messagers cibles, inhibant ainsi leur traduction.

En 1998, Andrew Fire et Craig Mello, nobélisés en 2006 pour leurs travaux, ont montré que l'introduction exogène d'une petite quantité ARN double brin (dsRNA) chez le nématode était suffisante pour induire une répression de l'expression de gènes. Cet effet est non seulement héréditaire, mais également plus efficace que l'introduction d'un simple ARN anti-sens, suggérant ainsi que le dsRNA en est l'élément déclencheur. En plus de nommer ce mécanisme « interférence par l'ARN » ou RNAi (pour *RNA interference*), ces chercheurs ont ouvert la voie à la mise au point d'une technique aujourd'hui routinière de manipulation du génôme, le « knock-down » par le RNAi qui consiste en l'inactivation de gènes *via* la production ou l'introduction de petits ARN interférents dans la cellule.

Par la suite, les études portant sur le mécanisme de défense des plantes contre les infections virales, ont fortement contribué à mettre en évidence les éléments de la voie cytoplasmique du RNAi. Ainsi, Andrew J. Hamilton et David C. Baulcombe, ont identifié l'existence d'intermédiaires dans le mécanisme du RNAi en détectant pour la première fois des petits ARN anti-sens d'une vingtaine de nucléotides (Hamilton et Baulcombe, *Science*, 1999).

La révélation de la conservation du RNAi chez différentes espèces, dont les mammifères, a permis la reconnaissance du RNAi en tant qu'acteur clé dans la régulation de divers processus biologiques (Pasquinelli *et al.*, *Nature*, 2000 ; Lagos-Quintana *et al.*, *Science*, 2001 ; Elbashir *et al.*, *Nature*, 2001 ; Elbashir et Tuschl, *Genes Dev*, 2001).

## 1.2 Le processus du RNAi



**Figure 1 : Schéma général d'action du RNAi**

Au cours de la phase activatrice, un ARN double brin (dsRNA) est clivé en petits ARN interférents (siRNAs) par Dicer. Ces siRNAs sont ensuite chargés dans la sous-unité Argonaute du complexe effecteur de la voie du RNAi. Au cours de la phase effectrice, les siRNAs contenus dans le complexe effecteur vont cibler un ARN dans le cytoplasme et/ou dans le noyau et y induire possiblement deux types de *silencing* : post-transcriptionnel (PTGS) et/ou transcriptionnel (TGS). Figure entièrement produite.

Le RNAi est un processus de répression de l'expression des gènes qui s'opère avec une grande spécificité de séquence et selon le même schéma général (**Figure 1**). Le processus est initié par la production d'un ARN double brin (dsRNA) qui est clivé en petits ARN interférents (siRNAs) d'une vingtaine de nucléotides (phase initiatrice) par la ribonucléase Dicer. Ces derniers s'associent à des membres de la famille Argonaute (Ago) au sein d'un complexe effecteur (Meister *et al.*, *RNA*, 2004 ; Meister et Peters, *Mol Cell*, 2007), permettant ainsi le ciblage spécifique de ce complexe par complémentarité de base entre le petit ARN interférent et l'ARN cible. Ce recrutement du complexe effecteur aboutit à la réduction de l'expression du gène cible ou « silencing », soit de manière post-transcriptionnelle (PTGS pour *Post-Transcriptional Gene Silencing*) dans le cytoplasme ou le noyau, soit transcriptionnelle (TGS pour *Transcriptional Gene Silencing*) par l'intermédiaire d'une modification de la structure chromatinienne (phase activatrice). Les composants principaux et canoniques de la voie du RNAi sont détaillés dans les sections suivantes.

### **1.1.1 Les petits ARN interférents**

Une grande diversité de petits ARN interférents variant de 19 à 30 nucléotides a été décrite dans différents modèles eucaryotes (Tableau 1). Cette diversité est le reflet de l'implication de la voie du RNAi dans une multitude de processus cellulaires variant selon les espèces. Il existe presque une dizaine de classes connues de ces petits ARN dont les principaux types sont : les miRNAs (microRNAs), les siRNAs (small interfering RNAs) et les piRNA (piwi-interacting RNAs ; Ghildiyal et Zamore, *Nat Rev Genet.*, 2009). Ces voies du RNAi se différencient par : 1) l'origine génomique du dsRNA ; 2) les enzymes nécessaires à la biosynthèse des petits ARN ; 3) le type de protéine Argonautes constituant le complexe effecteur ; 4) leur localisation cellulaire ; 5) la fonction biologique à laquelle le RNAi participe (PTGS ou TGS).

Nom	Organisme	Taille (ntd)	Facteurs de Biogénèse	Origine génomique ou Source de déclenchement		Effecteur	Fonction
Exo-siRNA	Métazoaires, <i>fungi</i> , protistes	~ 21	Dicer	ADN viral, dsRNA injecté		Sous-famille Ago (complexe RISC)	Défense contre infection virale, régulation PTGS
	Plantes	~ 21 et 24					
miRNA	Plantes, métazoaires, algues, virus, protistes	21-24	Drosha (métazoaires) et Dicer	différents locus (introns ou exons) transcrits par RNA Pol II en pri-miRNAs			régulation PTGS (stabilité et traduction des mRNAs)
tasiRNA	Plantes	21	DCL4, RDR6	miRNA provenant des loci <i>TAS</i>		Sous-famille Ago	régulation PTGS
natsiRNA		21-24	DCL1 et/ou DCL2, RDR6	Transcription bidirectionnelle de certaines loci en réponse à un stress		Sous-famille Ago	régulation PTGS de gènes impliqués dans la réponse au stress
Endo-siRNA	Plantes, métazoaires	21-24	Dicer	Eléments répétés, transposons, unités de transcription convergentes, loci structurés		Sous-famille Ago	Régulation PTGS des transposons
casiRNA	Plantes	24	DCL3, RDR2, RNA Pol IV	Eléments répétés enrichis en transposons, répétition en tandem		Sous-famille Ago (AGO4, AGO6, AGO9)	méthylation <i>de novo</i> de l'ADN (RdDM) au niveau des transposons et des sites asymétriques répétés de type CHH
siRNA	<i>S. pombe</i>	21-23	Dcr1, Rdp1	Répétitions hétérochromatiques		Sous-famille Ago (Ago1 [RITS])	Formation d'hétérochromatine constitutive (H3K9me)
	<i>C. elegans</i> (22G)		Complexe effecteur chargé en 21U, RdRP	Loci génomiques dispersés		Sous-famille WAGO (NRDE-3)	Formation d'hétérochromatine (H3K9me)
piRNA	souris	24-31	Cycle Ping-Pong Dicer-indépendent	Cellules germinales	Primaire : clusters piRNA dispersés (précurseurs sens) Secondaire : transcription anti-sens des transposons	Sous-famille PIWI (MILI2, MIWI)	méthylation <i>de novo</i> de l'ADN
	Drosophile	23-29	Cycle Ping-Pong Dicer-indépendent		Primaire : clusters piRNA hétérochromatiques (précurseur anti-sens) Secondaire : transcription sens des transposons	Sous-famille PIWI (Piwi, Aub, and Ago3)	PTGS des transposons actifs & Formation d'hétérochromatine (H3K9me)
	<i>C. elegans</i> (21U)	21	Dicer-indépendent, voie peu caractérisé		2 clusters situés sur le chromosome IV	Sous-famille PIWI (PRG1 avec 21U) et WAGO avec 22G	Formation d'hétérochromatine (H3K9me), voie de synthèse des siRNA 22G
priRNA	<i>S. pombe</i>	22-23	Triman, Dicer-indépendent,	Répétitions hétérochromatiques, ADN ribosomiaux		Ago1	Formation d'hétérochromatine (encore à l'étude)

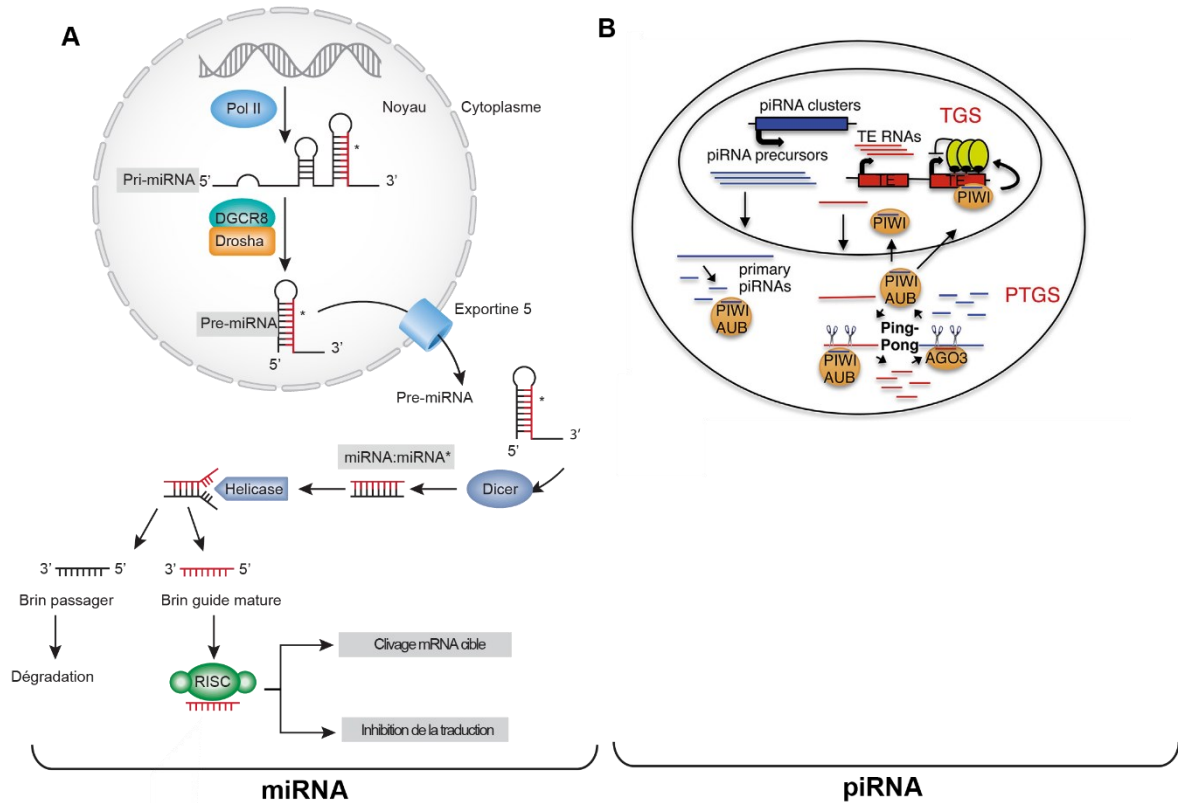
**Tableau 1 : Tableau recensant les différents types de petits ARN non codant.**

siRNA : small interfering RNA ; exo-siRNA: siRNA exogènes ; miRNA: microRNA ; pri-miRNA : primary microRNA ; tasiRNA: trans-acting siRNA ; natsiRNA: natural antisense transcript-derived siRNA ; endo-siRNA : endogenous siRNA ; casiRNA: cis-acting siRNA ; piRNA : Piwi-interacting RNA ; pri-RNA : primal RNA ; RdRP: RNA-dependant RNA polymerase ; DCL: Dicer-like ; RNA Pol: ARN polymerase ; Ago : Argonaute ; PIWI : *P-element- Induced Wimpy testes* ; dsRNA : double stranded RNA. La taille est indiquée en nucléotides. Travail de synthèse élaboré principalement à partir de l'analyse des revues de : Ghildiyal et Zamore, *Nat Rev Genet.*, 2009 ; Castel et Martienssen, *Nat Rev Genet.*, 2013.



Par exemple les miRNAs et les siRNAs ont une distribution assez large au sein des différents tissus et organismes et ils s'associent à la sous-famille Ago des protéines Argonautes. A l'inverse, les piRNAs sont principalement limités aux cellules germinales des métazoaires et se lient à la sous-famille PIWI des protéines Argonautes. Par ailleurs, concernant la biogénèse des petits ARN, la voie des siRNAs suit le schéma général décrit dans la section précédente (**Figure 1**). Notons qu'elle peut être induite par un élément génétique d'origine exogène tel de l'ADN viral ou un dsRNA injecté (Fire *et al.*, *Nature*, 1998). La production des miRNAs, de son côté, nécessite l'action de deux ribonucléase (RNAase) de type III : DROSHA (en complexe avec un cofacteur appelé Pasha chez la Drosophile et *C. elegans* ; DGCR8 chez l'Homme) et Dicer, chargées de convertir successivement un long transcrit primaire caractérisé par la présence de plusieurs structures secondaires de type « épingle à cheveux » (Lee *et al.*, *Nat Gen*, 2003) en des duplexes de miRNAs (**Figure 2**). Quant aux piRNAs, ils sont produits selon deux mécanismes : i) La biogénèse primaire à partir de longs ARN simple brin produits par certains loci spécifiques du génome et composés de fragments d'éléments transposables actifs, qui sont soit organisés sous forme de clusters de piRNAs et localisés dans les régions hétérochromatiques (chez la Drosophile), soit dispersés dans le génôme (chez la souris) ; ii) la boucle d'amplification appelée « ping-pong ». Ces mécanismes sont conservés dans de nombreux organismes tels que la souris, la Drosophile le Xénope, le poisson zèbre et l'Homme. La voie de biosynthèse des piRNAs est la plus complexe et a comme particularité de ne pas faire intervenir de RNAse de type III telle que Dicer, donc de ne pas être initiée par la production d'un dsRNA (**Figure 2**). Elle diffère donc de la voie canonique.

Il est à noter, que plusieurs voies de signalisation peuvent cohabiter au sein d'une même espèce, offrant l'avantage d'une possible compensation en cas de défaillance. Par exemple, il a été mis en évidence que la dé-répression des transposons, suite à la déplétion des protéines PIWI chez la Drosophile, peut être en partie sauvée par la voie des siRNAs (Barckmann *et al.*, *NAR*, 2018).



**Figure 2: Les voies de biogénèse des miRNAs et des piRNAs**

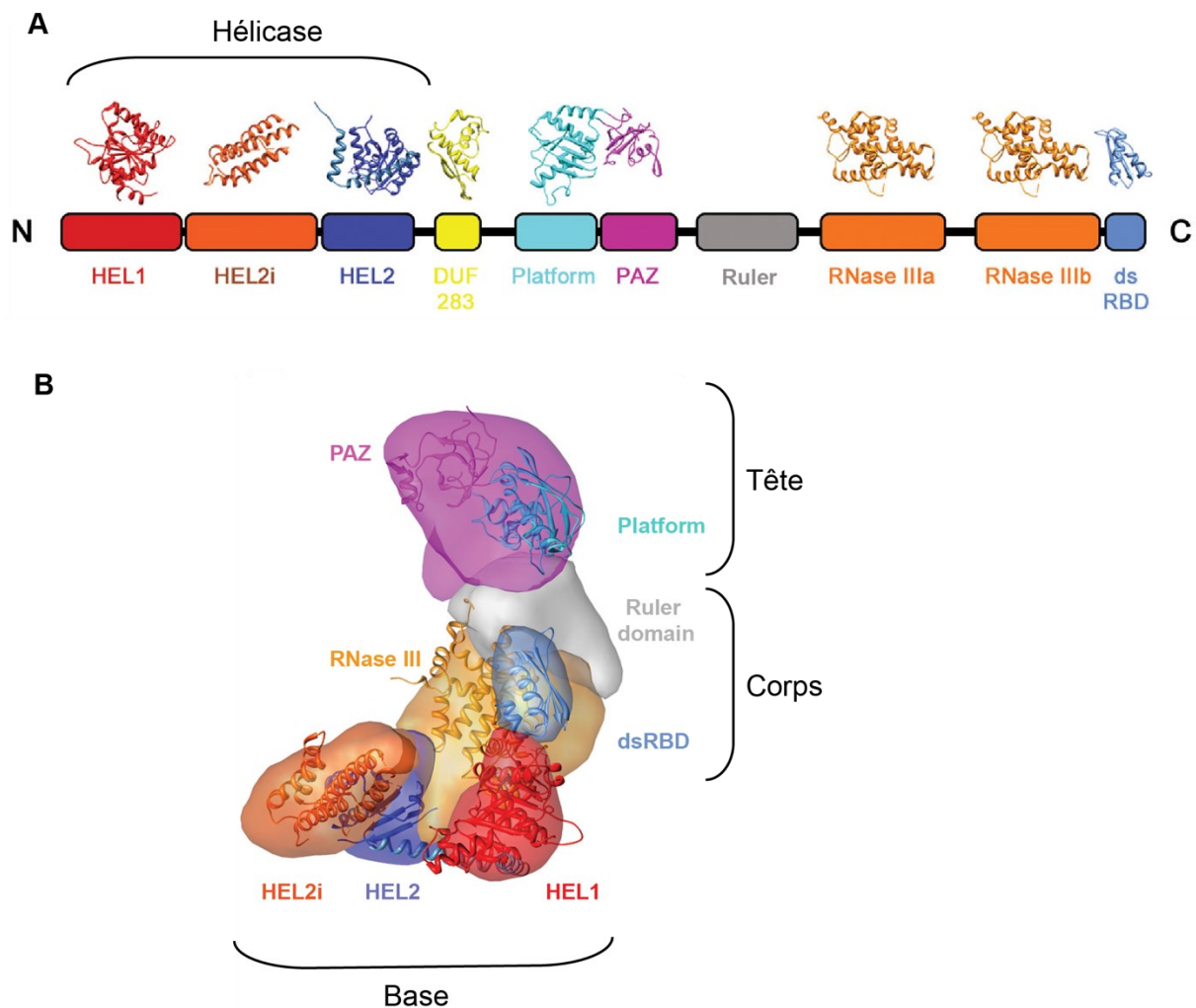
- A)** Voie de biogénèse des miRNAs dans les cellules humaines. De longs transcrits primaires (pri-miRNA) sont synthétisés par la RNA Pol II à partir de régions génomiques spécifiques. Ils sont clivés en précurseurs plus courts (pre-miRNAs) par le complexe microprocesseur composé de Drosha et du co-facteur DGCR8 (Pasha chez la Drosophile). Ces pre-RNA sont ensuite exportés dans le cytoplasme, selon un mécanisme impliquant l'Exportine 5, où ils sont convertis en duplex de miRNAs d'environ 22 nucléotides (miRNA/miRNA\*) par Dicer. L'un des deux brins est chargé dans la protéine Argonaute qui s'associe à d'autres facteurs pour former le complexe RISC. Celui-ci va conduire à l'inhibition post-transcriptionnelle de l'ARN messager (mRNA), principalement en clivant ou en inhibant la traduction du mRNA. Image modifiée de Iorio et Croce, EMBO Mol Med, 2012.
- B)** Voie de biogénèse des piRNAs dans les cellules ovariennes de la Drosophile. Les précurseurs sont générés par la transcription anti-sens du cluster de piRNAs (en bleu) et la transcription sens des transposons (TE) actifs (rouge). Dans le cytoplasme, des piRNAs anti-sens (bleu) sont d'abord produits suite au clivage des précurseurs piRNAs par les protéines argonautes de la famille PIWI. Ces piRNAs anti-sens sont ensuite chargés dans Aub ou PIWI et mènent au clivage des transcrits TE, ce qui génère des piRNAs sens (rouge). Les piRNAs anti-sens sont également produits par l'action d'Ago3 sur les précurseurs piRNAs. L'ensemble constitue le cycle ping-pong qui s'auto-alimente et permet d'amplifier la production des piRNAs. Les complexes Piwi/piRNA sont importés dans le noyau où ils conduisent à un silencing TGS à travers le recrutement de HP1/Su(var)3-9 (rond jaune). Image tirée de Khanduja *et al.*, Mol Cell, 2016.

### 1.1.2 Dicer

Dicer est une endoribonucléase de la famille des RNAses de type III. Elle fût décrite pour la première fois chez la Drosophile en 2001 par Bernstein *et al.*, qui a également montré que cette enzyme était essentielle pour le développement embryonnaire de la souris (Bernstein *et al.*, *Nature*, 2001 ; Bernstein *et al.*, *Nat Gen*, 2003). La famille des RNase de type III se caractérise par leur affinité pour les dsRNAs. La fonction de DICER dans le cadre du RNAi, est de générer des petits ARN interférents double brins qui partagent des caractéristiques structurales communes : i) une taille de 20 à 30 nucléotides de long, ii) une extrémité 5' mono-phosphorylée, iii) une extrémité 3' se terminant par un groupe hydroxyle, et iiiii) l'extrémité 3' est dépassante de 2 nucléotides (« 3' overhang ») (Elbashir *et al.*, *EMBO J*, 2001).

La cristallisation de l'enzyme chez différentes espèces a révélé que la structure de celle-ci est assez conservée de la levure *S. pombe* à l'Homme (Sawh et Duchaine, *Nat Struc Mol Bio*, 2012 ; Lau *et al.*, *Nat Struc Mol Bio*, 2012 ; Du Z *et al.*, *PNAS*, 2008 ; Qin *et al.*, *RNA*, 2010 ; Barraud *et al.*, *EMBO J*, 2011). La structure s'organise principalement en six domaines distincts (**Figure 3**) : hélicase, DUF283 (*Domain of Unknown Function*), plateforme, PAZ, les domaines de type ribonucléase III (RNase III), et le dsRBD (*dsRNA binding domain*). Le corps de l'enzyme est constitué des deux domaines RNase III adjacents et sièges de l'activité catalytique de clivage ATP-dépendante dite « dicing », ainsi que du domaine dsRBD de fixation au dsRNA. Chez *S. pombe*, des études ont suggéré que le domaine dsRBD renferme un site de liaison zinc qui serait responsable de la rétention nucléaire de l'orthologue Dcr1 (Barraud *et al.*, *EMBO J*, 2011 ; Woolcock *et al.*, *Genes Dev*, 2012 ; Oberti *et al.*, *Cell*, 2014). En condition de stress thermique, le domaine dsRBD se déplierait ce qui favoriserait la translocation de Dcr1 vers le cytoplasme, permettant l'expression des gènes codant pour des protéines de stress thermique normalement réprimés grâce à Dcr1 (Oberti *et al.*, *Cell*, 2014). S'en suit le petit domaine DUF283, encore très peu caractérisé, bien que des études chez les plantes aient suggéré qu'il participerait aux interactions protéiques avec les co-facteurs de Dicer (Qin, *et al.*, *RNA*, 2010). Un large domaine hélicase structure la base de Dicer et posséderait plusieurs propriétés intéressantes. Ce domaine tient son nom de l'homologie et non de la fonction dite hélicase (une telle activité n'a pas encore été mise en évidence pour ce domaine). Il contribuerait à la processivité de l'enzyme, c'est-à-dire à sa capacité à produire plusieurs petits ARN à partir d'un même précurseur (Cenik *et al.*, *Mol Cell*, 2011 ; Welker *et al.*, *Mol Cell*, 2011). De plus, il a été révélé que ce domaine renferme une activité auto-inhibitrice,

suggérée comme étant nécessaire pour inhiber l'activité enzymatique de Dicer lors de son assemblage avec d'autres co-facteurs (Ma *et al.*, *J Mol Biol*, 2008). Des travaux chez la *Drosophile* ont également montré que ce domaine participe à la reconnaissance du pre-miRNAs (Tsutsumi *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2011). Par ailleurs, il serait requis pour la spécificité de production d'un type de petits ARN interférents, les endo-siRNAs, chez *C. elegans* (Welker *et al.*, *RNA*, 2010). La « tête » comporte un domaine dit « plateforme » et le domaine PAZ de liaison à l'ARN. Ce dernier est le principal module de reconnaissance et d'ancrage du substrat dsRNA (Ma *et al.*, *Nature*, 2004). De plus, des données indiquant que la délétion du domaine PAZ entraîne des coupures aléatoires du substrat, suggèrent que ce domaine est impliqué dans



**Figure 3: Architecture de la version humaine de Dicer**

- A) Schéma des domaines conservés de l'enzyme (N et C : extrémités terminales).  
B) Modèle de positionnement des domaines après repliement tridimensionnel. La tête, le corps et la base sont respectivement formés par : i) les domaines plateforme et PAZ, ii) les domaines RNase et dsRBD, iii) les domaines hélicases. Images adaptées de Lau *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2012

la sélectivité du clivage et donc la spécification de la taille des produits ARN (MacRae *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007).

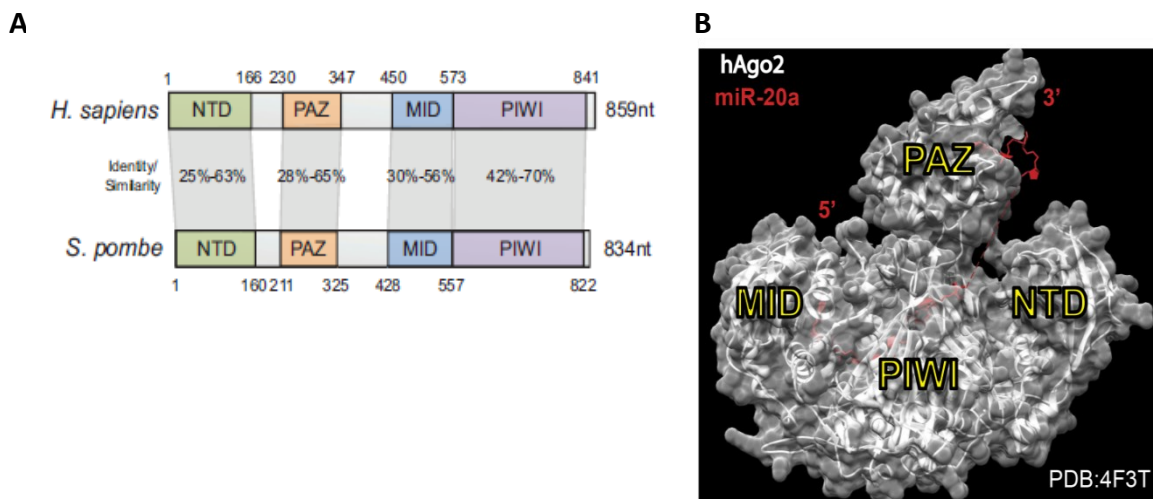
Outre sa fonction conservée de produire de petits ARN interférents, Dicer facilite également le chargement en siRNAs des protéines Argonautes chez la Drosophile, en prenant part au complexe RLC (pour *RISC Loading Complex*, Liu *et al.*, *Science*, 2003, voir section suivante). À ce jour, seules des interactions *in vitro* entre Dicer et des protéines Argonautes ont pu être mises en évidence (Tahbaz *et al.*, *EMBO*, 2004 ; Sasaki *et al.*, *Gene*, 2007).

Par ailleurs chez *S. pombe*, il a été suggéré que Dcr1 participerait à la terminaison de la transcription de gènes les plus fortement transcrits pendant la réplication, et selon un mécanisme qui n'impliquerait pas sa fonction catalytique (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). Son mode d'action reste néanmoins non élucidé. Je reviendrai sur cette fonction de Dcr1 dans le dernier chapitre de l'introduction.

### **1.1.3 Les protéines Argonautes**

Il existe une grande diversité de protéines de type Argonaute qui se classifient principalement en deux sous-familles de paralogues : celle des Ago qui est exprimée de manière ubiquitaire dans de multiples organismes et celle des PIWI dont l'expression se restreint principalement aux cellules germinales (pour revues : Carmell *et al.*, *Genes & Dev*, 2002 ; Höck et Meister, *Genome Biol*, 2008 ; Hutvagner et Simard, *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2008 ; Sheu-Gruttadauria et MacRae, *J Mol Bio*, 2017). Il est à noter que d'autres sous-classes peuvent exister chez certaines espèces, comme par exemple celle nommée WAGO chez les nématodes, tel que *C. elegans* (pour revue : Billi *et al.*, *WormBook*, 2014). Les cristallisations de différents membres réalisées chez de multiples espèces ont révélé que les Argonautes possèdent un arrangement tridimensionnel laissant apparaître quatre domaines conservés de la levure à l'Homme (**Figure 4**) : N-terminal, PAZ (*Piwi-Argonaute-Zwille*), MID (*MIDdle*) et PIWI (*P-element- Induced Wimpy testes*). Le domaine MID, avec une partie du domaine PIWI forment une poche qui permet d'ancrer l'extrémité 5' monophosphorylée des petits ARN interférents (Ma *et al.*, *Nature*, 2005 ; Parker *et al.*, *Nature*, 2005). Le domaine PAZ permet de reconnaître spécifiquement l'extrémité dépassante 3'OH « overhang » du duplex de siRNAs et le distingue ainsi des autres produits de dégradation possibles de transcrits (Song *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2003 ; Ma *et al.*, *Nature*, 2004). Le domaine PIWI ressemble au domaine catalytique de la ribonucléase H (RNase H). Il est le siège de l'activité catalytique dite « slicer » des protéines

Argonautes, qui requiert la présence du motif conservé DDH (Asp-Asp-His) pour médier la dégradation du substrat (Liu *et al.*, *Science*, 2004 ; Song *et al.*, *Science*, 2004 ; Sontheimer *et al.*, *Science*, 2004). Certains résidus conservés au niveau des domaines MID et PIWI ont par ailleurs été impliqués dans les interactions avec les protéines à domaine GW (pour Gly-Trp ; Behm-Ansmant *et al.*, *Genes Dev*, 2006 ; Till *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007 ; Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). La fonction du domaine N-terminal a été la dernière à être élucidée. Celui-ci est impliqué dans la dissociation du duplex de siRNAs, étape nécessaire à la maturation du complexe effecteur (Kwak et Tomari, *Nat Struct Mol Bio*, 2012). De plus, il contiendrait des résidus qui seraient important pour la fonctionnalité du domaine PIWI. Il a ainsi été proposé que le domaine N terminal permettrait de positionner correctement le centre catalytique vis-à-vis de la cible ARN (Hauptmann *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2013 ; Schürmann *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2013).



**Figure 4: Architecture des protéines Argonautes**

- A)** Schéma des domaines et analyse de leur conservation entre l'Homme et la levure *S. pombe*.  
**B)** Modèle de structure de la protéine Ago2 humaine en complexe avec miR-20a, montrant l'interaction des domaines MID et PAZ avec respectivement les extrémités 5' et 3' du miRNA. Images adaptées de Bhattacharjee *et al.*, *RNA Bio*, 2019.

L'activité catalytique des protéines Argonautes revêt deux fonctions biologiques. Premièrement, elle permet de se débarrasser de l'un des deux brins du duplex de siRNAs, et ainsi d'aboutir à la formation d'un complexe effecteur mature et compétent pour l'hybridation



avec la cible dans le cadre du PTGS ou du TGS. Le brin dégradé est alors appelé « passager » tandis que l'autre est nommé « guide ». Il est à noter que cette fonction ne concerne pas la sous-famille des PIWI-like qui se charge directement en élément ARN simple brin. Deuxièmement, il s'agit d'une activité endoribonucléase permettant de cliver les liaisons phosphodiester de l'ARNm cible et donc de le dégrader dans le cadre du PTGS.

#### **1.1.4 Assemblage et activation du complexe effecteur**

Dans le cadre de mes travaux de recherche, j'ai étudié l'effet de l'altération de l'activité *slicer* d'Ago1 sur l'intégrité des ADN ribosomiaux chez *S. pombe*. Cette section a donc pour but de vous donner des informations générales concernant le chargement d'Argonaute en duplex de siRNAs et la libération du brin passager.

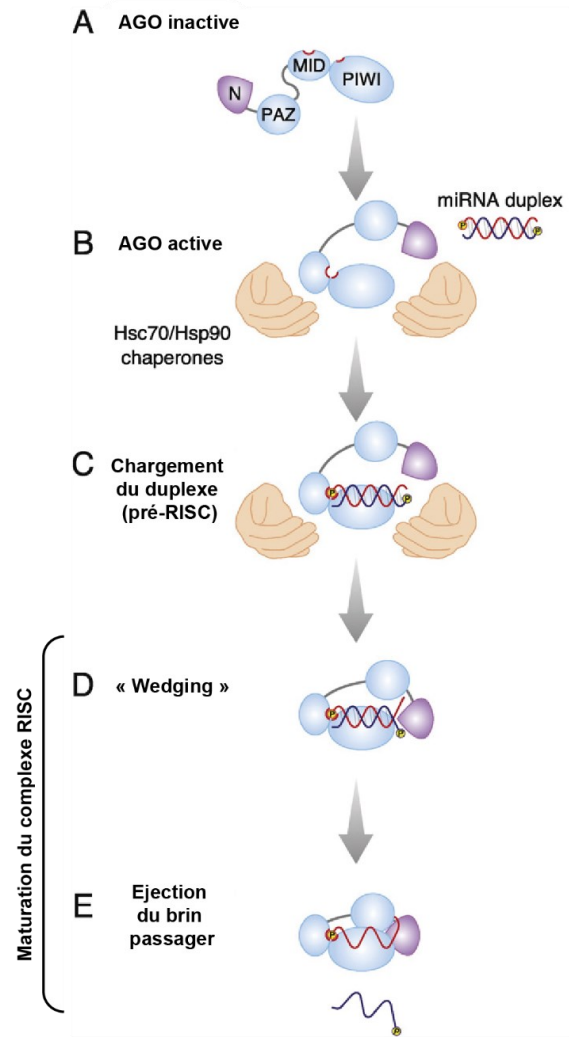
L'étude de l'assemblage du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) chez les plantes et la *Drosophile* a grandement contribué à la compréhension générale de la phase effectrice du RNAi. Le principe est le même, qu'il s'agisse de duplex de miRNAs ou de siRNAs. D'abord le complexe se charge en un duplex de petits ARN interférents et prend alors le nom de « pré-RISC » (**Figure 5**). Cela s'accompagne de l'ancrage et de la stabilisation du brin guide vis-à-vis des domaines fonctionnels. Puis le complexe subit un processus de maturation en deux étapes : une première étape appelée « wedging » durant laquelle la dissociation du duplex est entamée, suivie de l'étape d'élimination du brin passager (Kobayashi et Tomari, *Bioch and Biophys Acta*, 2016). La sélection du brin guide ne se fait pas au hasard. Elle est déterminée par la polarité selon laquelle le duplex de petits ARN interférents va se charger dans la protéine Argonaute. Ce chargement est lui-même conditionné par l'identité du premier nucléotide en 5' et l'asymétrie thermodynamique des extrémités résultant de leur composition en ribonucléotides. En règle générale, le brin guide est celui dont l'extrémité 5' commence préférentiellement par une uridine ou une adénosine (Suzuki *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015) et présente une complémentarité de base la moins stable (Khvorova *et al.*, *Cell*, 2003 ; Schwarz *et al.*, *Cell*, 2003). Une fois le duplex de petits ARN chargé, s'en suit l'ancrage et la stabilisation du brin guide, qui fait appel aux domaines MID et PAZ de la protéine Argonaute. Le brin passager à l'inverse, n'est pas très bien stable au sein de l'enzyme.

Chez plusieurs espèces telles que la levure *S. pombe*, le chargement de la protéine argonaute nécessite le soutien de protéines accessoires de type chaperonnes (*Cf.* section 3.4.3). Chez la *Drosophile*, l'asymétrie thermodynamique est d'abord reconnue par l'hétérodimère

RLC (*RISC Loading Complex*) qui s'associe transitoirement à Ago2 et se compose de Dcr2 et de R2D2 (protéine de liaison au dsRNA). R2D2 se lie à l'extrémité thermodynamiquement la plus stable et Dcr2 est recrutée à la moins stable, conférant ainsi une polarité au duplex de petits ARN (Tomari *et al.*, *Science*, 2004). En plus de rôle dans la sélection du brin passager, le complexe RLC est important pour le chargement du duplex (Liu *et al.*, *Science*, 2003 ; Pham *et al.*, *Cell*, 2004 ; Tomari *et al.*, *Cell*, 2004). Chez l'Homme, il a été suggéré que la protéine Ago2 détecterait elle-même l'asymétrie thermodynamique *via* son domaine MID. Selon le modèle proposé, l'ancrage du groupement 5'-phosphate dans le domaine MID est favorisé s'il s'agit de l'extrémité la moins stable d'un point de vue énergétique, ce qui déterminerait donc l'identité du brin guide (Noland et Doudna, *RNA*, 2013 ; Suzuki *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015).

Une fois le duplex de petits ARN chargé, s'en suit l'étape de maturation du complexe RISC (**Figure 5**). Le domaine N terminal pivote d'abord de sorte à initier l'ouverture et donc la dissociation du duplex du côté de l'extrémité 3' (étape de *wedging* ; Wang *et al.*, *Nature*, 2009 ; Kwak et Tomari, *Nat Struct Mol Bio*, 2012). Puis, l'éjection du brin passager du brin passager se produit. Celle-ci peut impliquer ou non l'activité *slicer*, selon la protéine Argonaute et le type de duplex de petits ARN. Dans le cas d'un duplex de siRNAs caractérisé par une complémentarité de base presque parfaite (à noter que des imperfections en 3' du brin guide sont généralement bien tolérées), la protéine Ago clive au centre du brin passager, ce qui déstabilise encore plus ce brin et conduit à son éjection (Matranga *et al.*, *Cell*, 2005 ; Miyoshi *et al.*, *Genes Dev*, 2005 ; Rand *et al.*, *Cell*, 2005 ; Leuschner *et al.*, *EMBO Rep*, 2006). C'est le mode utilisé par Ago1 dans le modèle d'étude *S. pombe*. Dans le cas des protéines Ago non fonctionnelles d'un point de vue catalytique, ou bien de duplexes de miRNAs présentant généralement des mésappariements de bases, l'éjection du brin passager se fait de manière passive, sans impliquer l'activité *slicer* (Kawamata *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2009 ; Yoda *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2010). Elle mettrait en jeu le domaine PAZ qui appliquerait une certaine pression pour favoriser la dissociation du duplex (Gu *et al.*, *Curr Biol*, 2012).





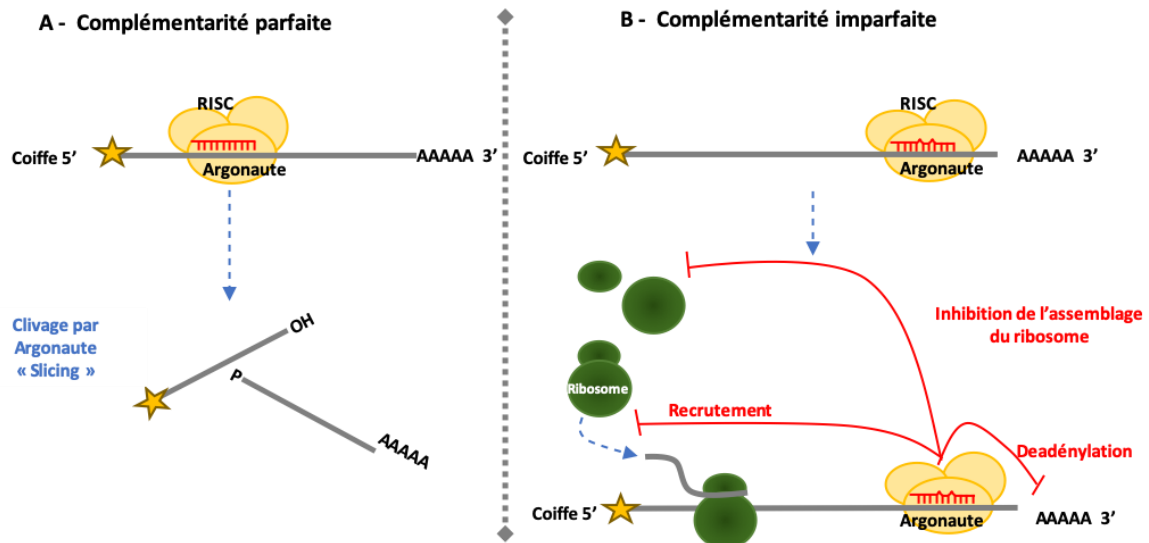
**Figure 5: Modèle d'assemblage du complexe RISC par un duplex de miRNAs chez la Drosophile**

A : protéine Argonaute (AGO) dans une conformation inactive et instable. B : dans cet exemple, AGO acquiert une conformation active capable de se charger en miRNA, grâce au soutien des protéines de type HSP. C : chargement de AGO en duplex de miRNAs marqués, suivi de l'ancrage et de la stabilisation du brin guide aboutissant à une conformation stable et fermée d'AGO. D : initiation de l'ouverture du duplex de miRNAs. E : Libération du brin passager. Voir texte principal pour plus de détails. Image modifiée de Kobayashi et Tomari, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016

### **1.3 La voie cytoplasmique PTGS**

L'inhibition post-transcriptionnelle ou PTGS est un mode d'action utilisé par la voie du RNAi pour réguler spécifiquement l'expression des gènes dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau (dans le cas des transposons). Le PTGS protège contre les infections virale (voie des siRNAs), la mobilisation des transposons (voie des piRNAs) et régule différents processus cellulaires endogènes (voies des miRNAs et siRNAs).

Les siRNAs et les miRNAs sont chargés dans un complexe effecteur nommé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) dont la composition en protéines Argonautes et en co-facteurs varient selon les espèces. Ce complexe va conduire à une répression de l'expression génique selon deux modes qui dépendent du niveau de complémentarité entre le petit ARN interférent et sa cible (au niveau de la région 3'UTR dans le cas de la voie des miRNAs). En règle générale, lorsque la complémentarité est parfaite, le complexe effecteur entrainera une dégradation par clivage de la cible, *via* l'activité « slicer » du composant Argonaute. Cette configuration concerne généralement la voie des siRNAs, mais également celle des miRNAs issus des plantes (Rhoades *et al.*, *Cell*, 2002). En revanche, dans le cas de la voie des miRNAs chez les animaux, la complémentarité est généralement partielle et implique surtout les 7 premiers ribonucléotides en position 5' en plus de quelques-uns situés ailleurs dans le miRNA (Freidman *et al.*, *Genome Res*, 2009). Ce type d'appariement conduit à une inhibition de la traduction de l'ARN messenger cible (mRNA) et/ou à sa déstabilisation selon plusieurs cas de procédés possibles résumés dans la Figure 6 (pour revue Fabian *et al.*, *Annu Rev Biochem*, 2010). Quant aux piRNAs, la règle de leur ciblage aboutissant à la dégradation des transposons est encore à l'étude mais il semblerait qu'un appariement imparfait avec la cible soit tolérable (à l'exception des 7 premiers ribonucléotides du piRNA ; Zhang *et al.*, *Science*, 2018).



**Figure 6: Mécanismes de *silencing* par le RNAi dans le cytoplasme selon la qualité d'appariement entre le petit ARN interférent chargé dans le complexe effecteur et sa cible ARN**

- A) En règle générale, dans le cas d'une complémentarité parfaite (principalement voie des siRNA), la cible est clivée par l'activité « slicer » d'Argonaute.
- B) Dans le cas d'une complémentarité imparfaite (principalement voie des miRNAs chez les mammifères), plusieurs modes d'action existent. Le RNAi peut empêcher l'initiation de la traduction de l'ARN messager cible (mRNA) en inhibant l'assemblage du ribosome ou son recrutement (via l'inhibition de la reconnaissance de coiffe du mRNA). Il peut aussi déstabiliser le mRNA en favorisant le recrutement du complexe responsable de la déadénylation. Figure entièrement produite.

## 2 Rôle du RNAi dans la régulation de l'état chromatinien : la voie nucléaire TGS

Le RNAi possède également la compétence de réguler spécifiquement l'expression des gènes de manière transcriptionnelle, en induisant des modifications épigénétiques de la chromatine. Cette fonction conservée chez une vaste majorité des eucaryotes, peut se restreindre aux cellules somatiques ou germinales selon les espèces (revue : Castel et Martienssen, *Nat Rev Genet*, 2013). Pour mieux la comprendre, je vais d'abord rappeler quelques généralités sur l'organisation de la chromatine et les modes de régulation de sa structure.

## **2.1 Généralités sur l'organisation et la dynamique de la chromatine**

### **2.1.1 Organisation structurale de la chromatine**

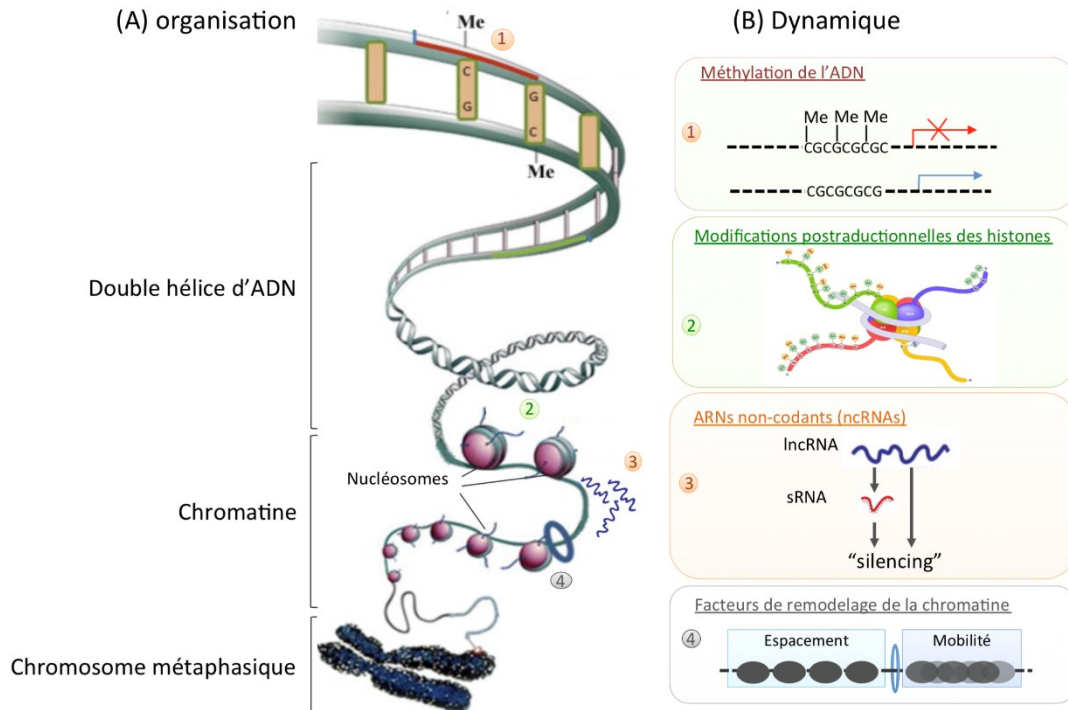
Dans le noyau des cellules eucaryotes, la molécule d'ADN s'associe à des protéines histones et non-histones pour former un ensemble appelé chromatine (Figure 7). L'association aux histones est importante pour l'organisation structurale et la dynamique de la chromatine. Les protéines non-histones, sont quant à elles, impliquées dans divers processus telles que la régulation de la dynamique chromatinienne, la réplication de l'ADN, la synthèse de l'ARN, *etc* (Fedele et Fusco, Springer, 2005). L'association avec les histones repose sur des interactions électrostatiques entre ces protéines chargées positivement et l'ADN chargé négativement (Kornberg, *Annual Rev of Biochem*, 1977). L'unité de base de cette structure est le nucléosome, constitué d'un fragment d'ADN de 146 pb enroulé autour d'un octamère d'histones qui comprend deux copies de chacune des histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4. Cet enchainement de nucléosomes, appelé nucléofilament, s'organise ensuite selon différents niveaux de compaction stabilisés par l'histone linker H1 (Luger *et al.*, *Nature*, 1997 ; Richmond et Davey, *Nature*, 2003). Cette organisation structurale de la chromatine permet non seulement de condenser la longue molécule d'ADN (soit 2 mètres dans la cellule humaine) au sein du compartiment nucléaire, mais également de protéger le patrimoine génétique et de faciliter sa transmission *via* la mitose et la méiose. Par ailleurs, elle permet également de moduler l'accessibilité de l'ADN aux machineries protéiques chargées de la réplication, de la transcription ou de la réparation de celui-ci. La chromatine possède donc une structure dynamique dont la régulation est l'élément clé qui influence, entre autres, l'expression des gènes. La régulation de cette dynamique revêt ainsi une importance cruciale pendant le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

### **2.1.2 Dynamique de la chromatine**

La régulation de la dynamique chromatinienne aboutit à un changement de la densité en nucléosomes et du degré de compaction de la structure. Elle passe d'une part, par le biais de modifications structurales telles que l'incorporation ou l'enlèvement de nucléosomes assurés par les facteurs de remodelage ATP-dépendant et les chaperonnes d'histones. Ce procédé inclut

également l'incorporation au sein de la chromatine, d'histones non conventionnelles appelées « variants d'histones » qui sont des isoformes non alléliques des histones canoniques. La dynamique de la chromatine met, d'autre part, en jeu des modifications biochimiques qualifiées d'épigénétiques (**Figure 7**). Celles-ci ont pour caractéristiques de ne pas induire de changement dans la séquence nucléotidique, d'être réversibles et transmissibles au cours de la division cellulaire. En général, elles constituent des « marques » qui caractérisent un état transcriptionnel plus ou moins actif de la chromatine. Elles permettent soit d'altérer les propriétés physiques de la fibre chromatinienne (perturbation de l'association ADN-histones qualifiée d'effet en *cis*), soit de favoriser ou non le recrutement ou la stabilisation de complexes protéiques effecteurs tels que les facteurs de remodelage ou les facteurs de transcription (d'effet en *trans*). Les protéines qui apportent ces modifications sont appelées les « writers », celles qui les retirent sont les « erasers » tandis que celles qui les « lisent » sont appelées les « readers » (Rothbart et Strahl, 2014). Il existe deux types majeurs de modifications épigénétiques affectant la dynamique de la chromatine : les modifications covalentes et post-traductionnelles des histones d'une part, la méthylation d'ADN d'autre part. La première catégorie se retrouve en majorité sur la queue N-terminale des histones, positionnées en périphérie des nucléosomes et donc facilement accessibles. Il existe une grande variété de ces modifications comme par exemple, la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation, qui constituent le « code histone » (pour revues : Kouzarides, *Cell*, 2007 ; Latham et Dent, *Nat Struct Mol Bio*, 2007). Chacune d'entre elle peut caractériser un état transcriptionnel plus ou moins actif de la chromatine selon la position de l'acide aminé modifié, ou ne faire aucune distinction. La deuxième catégorie de modification se réfère à l'adjonction covalente d'un groupe méthyle sur le carbone en position 5 des résidus cytosines (5-méthylcytosine : 5mC). Cette modification se retrouve principalement sur les régions présentant une faible densité de dinucléotides CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine) et est associée à une répression de la transcription (Razin et Riggs, *Science*, 1980 ; revue Smith et Meissner, *Nat Rev Genet*, 2013).

Les ARN non codants participent à la mise en place de certaines de ces modifications de la chromatine. Je reviendrai en détail sur l'implication de la voie du RNAi dans les sections ultérieures de chapitre.



**Figure 7: Organisation dynamique de la chromatine**

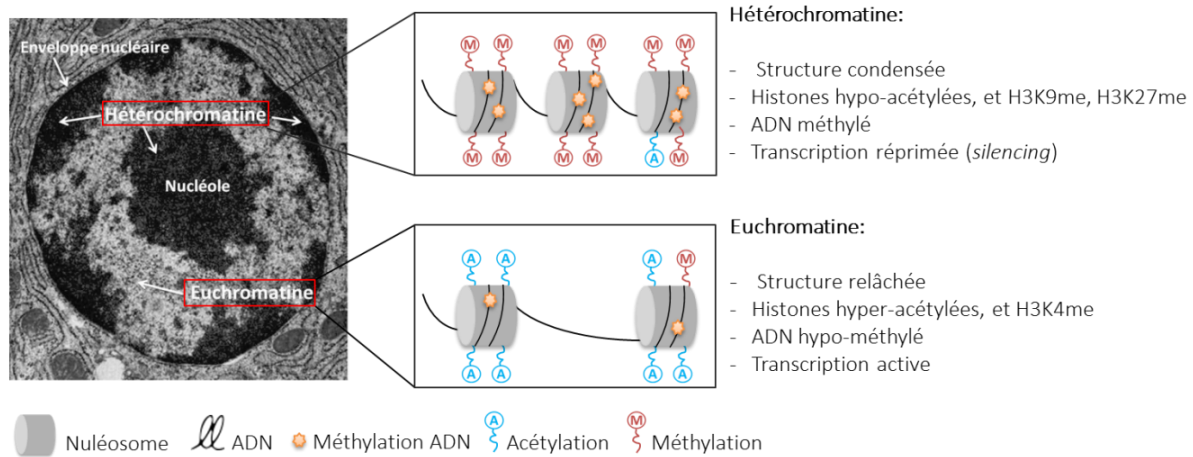
- A) Structures et différents degrés de compaction de la chromatine.  
 B) Modifications épigénétiques et processus régulant la dynamique de la chromatine. Image modifiée de Rajender *et al.*, *Mutat Res*, 2011, par le Dr. Todescini. Voir texte principal pour plus de détails.

### 2.1.3 Hétérochromatine et Euchromatine

La chromatine s'organise en deux compartiments qui se distinguent selon leurs propriétés cytologiques, spatiales, fonctionnelles et épigénétiques (**Figure 8**). D'un côté l'euchromatine adopte une structure relâchée en interphase, et se localise plutôt au centre du compartiment nucléaire. Elle est enrichie en gènes codant pour des protéines, comme les gènes de ménage, qui sont répliqués en début de phase S. Elle est associée à un état transcriptionnel actif qui se caractérise par des marques épigénétiques telles que l'hyperacétylation des résidus lysines des histones H3 et H4 et la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me<sub>3</sub>). A l'inverse, l'hétérochromatine correspond à une forme plus condensée et se regroupe dans des domaines autour du nucléole et sous l'enveloppe nucléaire en interphase (Fawcett, 1981). Elle est très faiblement enrichie en gènes codant pour des protéines (dont l'expression est généralement tissu-spécifique) et se compose surtout de séquences répétées d'ADN qui sont

répliquées généralement à la fin de la phase S. D'un point de vue fonctionnel, l'hétérochromatine est considérée comme étant transcriptionnellement inactive et caractérisée par des marques épigénétiques telles qu'un niveau de méthylation d'ADN 5mC relativement élevé, une hypoacétylation des histones H3 et H4, une triméthylation de l'histone H4 sur la lysine 20 (H4K20 me<sub>3</sub>) et de l'histone H3 sur les lysines 9 et 27 (H3K27 me<sub>3</sub>) qui s'associent à la protéine à chromodomaine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*, orthologue de Swi6). Elle crée un environnement répressif tel que l'expression d'un transgène inséré à proximité ou à l'intérieur des régions concernées, s'en trouve réduite au silence (ou *silencing*) de manière héréditaire - phénomène connu sous le nom de « position effect variegation » (revue Elgin et Reuter, *CSH Persp*, 2013). Cela souligne une autre caractéristique de l'hétérochromatine, qui est que sa répression transcriptionnelle se renouvelle au niveau des mêmes régions au cours du cycle cellulaire. De plus, elle se subdivise elle-même en deux catégories : constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive est d'une part, enrichie en éléments mobiles, les transposons, dont la mobilité et la capacité à se réinsérer de manière aléatoire dans le génome est une véritable menace pour la stabilité génomique. (Lander *et al.*, *Nature*, 2001 ; Schueler et Sullivan, *Annu Rev Gen Hum Genet*, 2006). Elle se compose d'autre part, des séquences répétées que l'on retrouve principalement au niveau des centromères et télomères de tous les eucaryotes. Ses caractéristiques fonctionnelles participent à la préservation de l'intégrité du génome en empêchant les phénomènes de transposition et en inhibant les possibles recombinaisons homologues illégitimes entre séquences répétées (Grewal et Elgin, *Nature*, 2007 ; Beisel et Paro, *Nat Rev Genet*, 2011). L'hétérochromatine facultative, de son côté, se retrouve au sein de gènes dont l'expression doit être régulée au cours du développement (Grewal et Jia, *Nat Rev Genet*, 2007 ; Hirasawa et Feil, *Essays Biochem*, 2010) et de la différenciation cellulaire. Elle joue ainsi un rôle dans l'identité et la spécialisation fonctionnelle de la cellule (Surani *et al.*, *Cell*, 2007).





**Figure 8: Organisation de la chromatine eucaryote en deux domaines distincts : l'hétérochromatine et l'euchromatine**

À gauche : image de microscopie électronique à transmission du noyau d'un plasmocyte issu de la moelle osseuse de cobaye (image tirée de Fawcett, 1981). L'hétérochromatine apparaît plus dense que l'euchromatine, se regroupe dans autour du nucléole et sous l'enveloppe nucléaire. À droite : Représentation schématique de l'hétérochromatine (en haut) et de l'euchromatine (en bas), et résumé de leur principales caractéristiques épigénétiques. Image modifiée à partir du manuscrit de thèse du Dr. Todeschini.

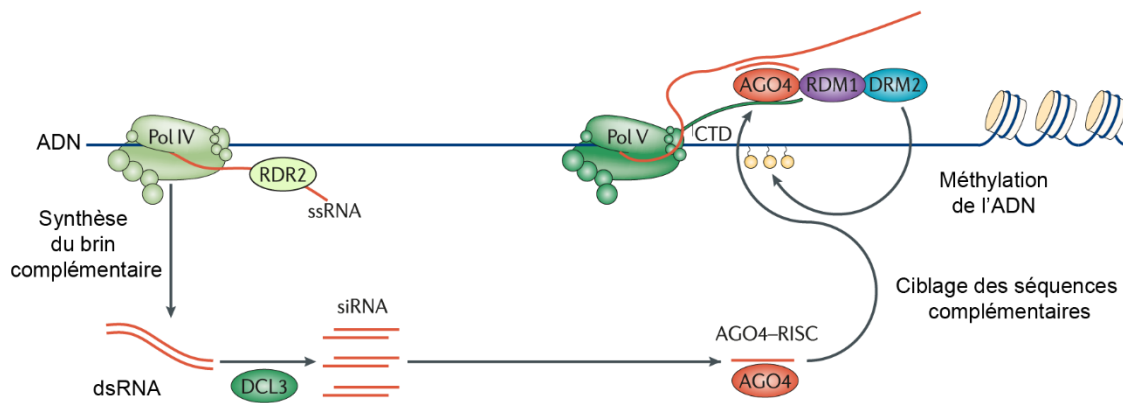
## 2.2 Rôle du RNAi dans la modification de l'état chromatinien

Le RNAi exerce sa fonction de *silencing* transcriptionnel ou TGS pour en induisant la déposition de marques épigénétiques répressives. Cette fonction est conservée chez différentes espèces allant de la levure aux mammifères. Elle a été extrêmement bien étudiée chez deux organismes modèles : la levure fissipare *S. pombe* et la plante *A. thaliana*. Les travaux effectués chez ces organismes ont mis en évidence un mode d'action globalement similaire tout en révélant un certain paradoxe : un ARN doit être produit à partir de la région qui est elle-même sujette au *silencing* transcriptionnel. Cet ARN sert de « plateforme » pour le ciblage spécifique du complexe effecteur qui induit, à son tour, le recrutement d'autres complexes responsables de la déposition de marques répressives. Ce mode de répression se ferait donc de manière co-transcriptionnelle. De plus, ces études ont en commun de révéler que le RNAi non seulement initie le *silencing* transcriptionnel mais participe également à sa propagation et son maintien *via* une boucle de rétro contrôle positive.



Chez *S. pombe*, le RNAi initie la formation d'hétérochromatine selon un processus très bien disséqué car ce modèle ne contient qu'une copie unique des gènes mis en jeu. Cet aspect sera décrit de manière détaillée dans la section 3.4 de ce chapitre.

Chez *A. thaliana*, il permet d'induire la méthylation *de novo* des cytosines, modèle connu sous le nom de RdDM (*RNA-directed DNA methylation*), au niveau des transposons et des sites asymétriques répétés de type CHH (où H désigne un nucléotide autre que la guanine). Dans ce modèle (**Figure 9**), les transcrits aboutissant à la synthèse des siRNAs ou bien servant de plateforme de recrutement du complexe effecteur sont produits par des ARN polymérases différentes. La première étape est la production de transcrits par l'ARN polymérase de type IV (RNA Pol IV ; Herr *et al.*, *Science*, 2005 ; Onodera *et al.*, *Cell*, 2005) qui servent de substrats pour la production des dsRNAs par la polymérase ARN dépendante de l'ARN appelée RDR2 (*RNA-dependent RNA Polymerase* ou RdRP). Ces dsRNAs sont ensuite convertis en siRNAs de 24 nucléotides par la ribonucléase de la famille Dicer, DCL3, qui sont par la suite exportés dans le cytoplasme (Ye *et al.*, *Mol Cell*, 2012) où ils sont chargés dans la protéine de la famille Argonaute AGO4. Une fois importé dans le noyau, AGO4 utilise les siRNAs pour cibler et s'associer spécifiquement des transcrits produits par l'ARN polymérase de type V (RNA PolV) au niveau de la région cible (Wierzbicki *et al.*, *Nat Genet.*, 2009). Son recrutement est stabilisé par des interactions directes avec la RNA PolV ainsi qu'avec un cofacteur de celle-ci (Li *et al.*, *Cell*, 2006 ; El-Shami *et al.*, *Genes Dev*, 2007 ; He *et al.*, *Genes Dev*, 2009). La méthylation *de novo* de la région cible est ensuite assurée par l'enzyme DRM2 qui est recrutée selon un mécanisme encore inconnu et est stabilisée en formant un complexe multi-protéique comprenant AGO4 (Gao *et al.*, *Nature*, 2010 ; Zhong *et al.*, *Cell*, 2014). La notion la plus intéressante dans la voie RdDM, est la boucle de renforcement du *silencing* qui allie le RNAi, la méthylation *de novo* de l'ADN et la méthylation des histones. Sans rentrer dans les détails des identités protéiques, la méthylation de l'ADN est reconnue soit par des protéines *readers* qui recrutent ensuite la RNA PolV, soit par des histones méthyltransférases chargées de déposer la marque H3K9me<sub>3</sub>, elle-même reconnue par des protéines *readers* qui recrutent la RNA Pol IV. L'ensemble aboutit donc à renforcer à la fois la production de siRNAs et le recrutement de AGO4, accentuant ainsi la méthylation de l'ADN (revue He *et al.*, *Mol Plant*, 2014 ; Holoch et Moazed, *Nat Rev Genet*, 2015).



**Figure 9: Modèle de la méthylation de l'ADN induit par la voie du RNAi chez *A. thaliana***

La voie de méthylation de l'ADN ARN-dépendante (RdDM) est initiée par l'ARN polymérase IV (Pol IV), générant des transcrits servant de matrice pour la production d'ARN double brin (dsRNA) par RDR2. Des siRNA de 24 nt sont produits par le clivage des dsRNA par DCL3, puis chargés dans le complexe RISC contenant AGO4. RISC cible un ARN plateforme transcrit par la Pol V via un appariement de bases avec le siRNA. Par l'intermédiaire du facteur RDM1, AGO4 interagit avec la méthyltransférase DRM2, qui va induire la méthylation *de novo* des cytosines de l'ADN au niveau de la région ciblée. Image modifiée de Haag et Pikaard, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011.

Chez les métazoaires, la voie des piRNAs a été impliquée dans la répression transcriptionnelle des transposons, en plus de son action post-transcriptionnelle au sein des cellules germinales. Cependant, contrairement aux modèles décrits chez *S. pombe* et *A. thaliana*, il manque des données moléculaires pour expliquer la transmission du signal répresseur du RNAi à la chromatine. De plus, aucune boucle de rétraction rappelant celle décrite chez *A. thaliana* (Cf. paragraphe précédent) n'a clairement été mise en évidence entre la méthylation H3K9 et le RNAi. Ainsi, dans les cellules ovariennes de la Drosophile, il a été proposé que la protéine PIWI chargée en piRNA, scannerait le génôme à la recherche de transcrits naissants et issus des transposons. Une fois la détection faite, PIWI serait à l'origine de leur répression transcriptionnelle en limitant l'accès de l'ARN polymérase et en promouvant l'induction de méthylation H3K9 au niveau de ces régions (Klenov *et al.*, *NAR*, 2014 ; Le Thomas *et al.*, *Genes Dev*, 2013 ; Rozhkov *et al.*, *Genes Dev*, 2013 ; Sienski *et al.*, *Cell*, 2012). Bien que PIWI n'ait pu être détectée expérimentalement sur ces régions cibles, une interaction a pu être mise en évidence avec une protéine de type HP1, requise pour l'assemblage de

l'hétérochromatine (Brower-Toland *et al.*, *Genes Dev*, 2007). Néanmoins, une étude suggère que PIWI ne serait pas nécessaire pour induire une répression transcriptionnelle complète des transposons, en se basant sur des résultats indiquant que les marques d'hétérochromatines ne sont pas totalement abolies en absence de PIWI (Klenov *et al.*, *NAR*, 2014). Cette étude suggère ainsi l'existence de voies PIWI-dépendantes et PIWI-indépendantes menant à ce *silencing*. D'autre part, des équipes de chercheurs ont mis en évidence que la protéine Rhino de type HP1 participe à la production de piRNAs à partir d'un cluster spécifique, soumis à une répression transcriptionnelle et arborant des marques H3K9me reconnues par cette protéine (Klattenhoff *et al.*, *Cell*, 2009 ; Mohn *et al.*, *Cell*, 2014). Leurs données soulèvent l'interrogation sur l'existence d'une boucle de rétroaction entre l'hétérochromatine et la production de piRNAs, toutes deux nécessaires au *silencing* des transposons.

Chez la souris, deux protéines Argonautes, MILI et MIWI2 sont impliquées dans la méthylation *de novo* des gènes codant pour les transposons durant le développement des cellules germinales masculines, mais selon un mode d'action encore peu expliqué (Carmell *et al.*, *Dev Cell*, 2007 ; Aravin *et al.*, *Mol Cell*, 2009 ; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, *Genes Dev*, 2008). De plus, il a été montré que le niveau des piRNAs n'est pas impacté par la délétion de l'enzyme responsable de cette méthylation, ce qui plaide contre l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif (Aravin *et al.*, *Mol Cell*, 2009). Par ailleurs, la voie des piRNAs a été identifiée comme jouant un rôle dans la méthylation *de novo* du gène *rasgfr* soumis à empreinte (la modification ne concerne que l'un des deux allèles parentaux). Le ciblage spécifique du complexe PIWI-piRNA sur un ARN non-codant (pit-RNA : *piRNA targeted noncoding RNA*) transcrit *en cis* à partir d'une séquence de rétrotransposon située en amont du gène *rasgfr1*, constituerait une étape cruciale pour la méthylation de ce dernier (Watanabe *et al.*, *Science*, 2011) Le modèle actuel est que cet ARN naissant servirait à la production des piRNA et au recrutement du complexe PIWI-piRNA. Il en résulterait un *silencing* transcriptionnel de la région ciblée (selon un mécanisme non élucidé), lié à la méthylation de l'ADN, qui se propagerait jusqu'au locus *rasgfr1*. Cette étude a ainsi, permis de suggérer pour la première fois, un mécanisme de ciblage du complexe Piwi-piRNA sur un ARN naissant semblable au mécanisme RNAi-dépendant de la formation d'hétérochromatine découvert chez *S. pombe* (Cf. section 3.4).

La voie nucléaire du RNAi peut également entraîner des modifications plus extrêmes de la chromatine. C'est le cas chez les ciliés comme *Tetrahymena*, où le génome du nouveau macro-noyau (MAC) obtenu après conjugaison, subit un réarrangement incluant l'élimination massive et programmée de milliers de séquences. Il a été suggéré, dans ce cas, que la déposition

de la marque H3K9me induite par le RNAi au niveau des séquences d'ADN IESs (Internal Eliminated Sequences), servait de module de reconnaissance conduisant à l'excision de ces séquences (Mochizuki *et al.*, *Cell*, 2002 ; Aronica *et al.*, *Genes Dev*, 2008).

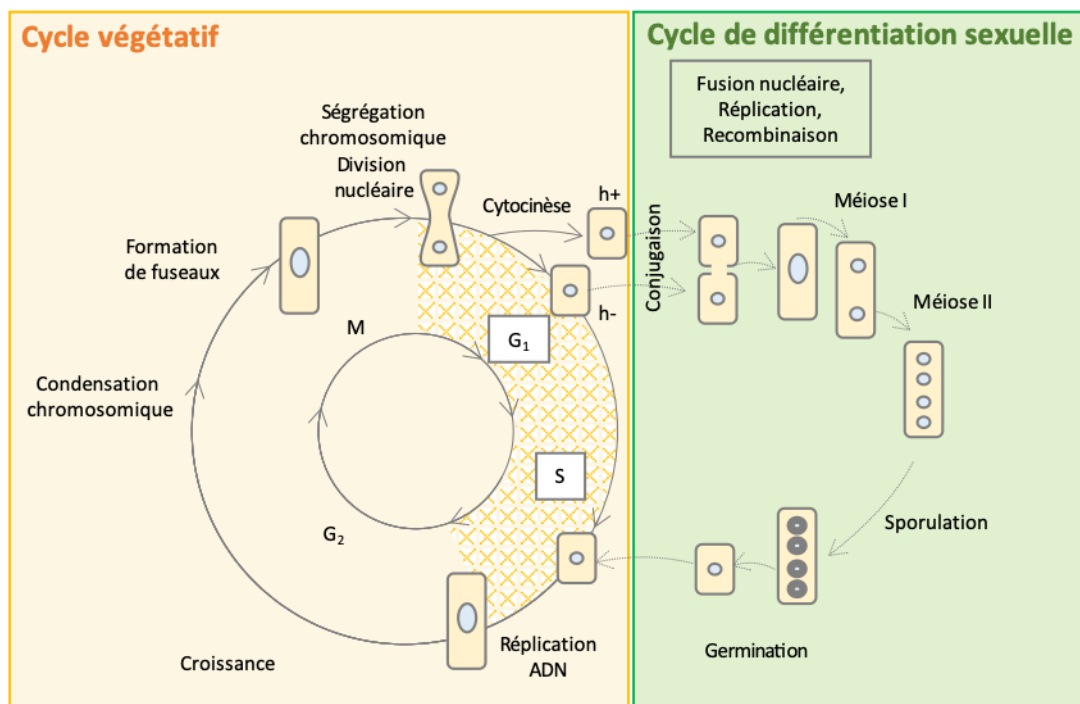
### **2.3 Autres processus RNAi-indépendants impliqués dans la formation d'hétérochromatine**

Les petits ARN interférents ne possèdent pas le monopole de l'implication dans la régulation de l'expression des gènes. Ils appartiennent à la grande classe des ARN non codants qui comporte également la sous-classe des longs ARN non codants (lncRNAs). Ceux-ci se définissent arbitrairement par leur taille supérieure à 200 bases. Outre les ARN de transferts, les ARN ribosomiaux et les ARN participant à l'épissage, déjà connus pour réguler l'expression de gènes, de nombreux lncRNAs prennent part aux processus de régulation épigénétique de la chromatine. Cette fonction se base principalement sur leur capacité à recruter divers complexes modificateurs de la chromatine, et qui sont responsables d'induire la formation de l'hétérochromatine. C'est le cas par exemple chez *S. pombe* ou bien les plantes, où un lncRNA permet de recruter la voie du RNAi. Un autre exemple connu, est celui de XIST (*X inactive-specific transcript*) codé par un gène localisé sur le chromosome X et qui participe à l'inactivation d'un des chromosomes X chez les mammifères (Brown *et al.*, *Cell*, 1992 ; Penny *et al.*, *Nature*, 1996 ; Galupa et Heard, *Curr Opin Genet Dev*, 2015). Il s'agit d'un lncRNA de 17 à 20 kbp qui recouvre uniquement l'un des deux chromosomes X et permet le recrutement du complexe Polycomb responsable de la déposition de la marque histone répressive H3K27me<sub>3</sub>. Les lncRNAs peuvent également réguler transcriptionnellement les gènes en *trans*. Ainsi, le lncRNA HOTAIR (*HOX antisens intergenic RNA*) est transcrit à partir du locus HOXC mais permet la répression transcriptionnelle du locus HOXD localisé sur un autre chromosome, en recrutant le complexe Polycomb (Rinn *et al.*, *Cell*, 2007). Par ailleurs, les lncRNAs participent aussi à la régulation post-transcriptionnelle des gènes selon plusieurs mécanismes (revues : Fernandes *et al.*, *NonCoding RNA*, 2019). Par exemple, les ceRNAs (*Competitive Endogenous RNA*) sont des lncRNAs de type circulaires ou linéaires qui présentent des séquences d'appariement pour certains miRNAs et peuvent ainsi les séquestrer pour permettre l'expression des ARNm cibles. Ce type de mécanisme a été mis en évidence entre autres, dans le métabolisme du phosphate chez *A. thaliana* (Franco-Zorrilla *et al.*, *Nat Genet*, 2007), le

contrôle de la différenciation musculaire (Zhu *et al.*, *Nat Comm*, 2017), l'infection virale par l'hépatite C (Fu *et al.*, *Discov Med*, 2016) ou encore la progression tumorale chez la souris (Karreth *et al.*, *Cell*, 2011).

### 3 Le rôle du RNAi dans la mise sous silence transcriptionnelle de la chromatine chez *S. pombe*

#### 3.1 *S. pombe* : un modèle de référence pour l'étude de la formation de l'hétérochromatine constitutive et du maintien de la stabilité génomique



**Figure 10: Cycle cellulaire de la levure *S. pombe***

Le cycle végétatif mitotique se divise en quatre phases : Au cours d'une première phase de croissance assez brève, appelée interphase G1 (Gap1), les cellules préparent la réplication de l'ADN notamment en synthétisant les protéines requises. La phase S (Synthèse) ou étape de réplication de l'ADN, est suivie d'une deuxième période d'interphase plus longue, la phase G2 (70% du cycle). La mitose permet la division de la cellule mère en deux cellules filles haploïdes, présentant chacune le même matériel génétique. Dans un milieu riche en nutriments (principalement en azote et glucose) la levure *S. pombe*

prolifère en cycle mitotique à l'état haploïde. Chaque cellule est de type sexuel M (Minus ou h<sup>-</sup>) ou P (Plus ou h<sup>+</sup>). Cette prolifération est aussi appelée cycle végétatif. Quand les conditions de pousse sont défavorables, principalement lors d'un appauvrissement en nutriments, la levure cesse sa croissance végétative et peut alors entrer en phase de quiescence réversible, la phase G0. Dans le cas où des cellules de types sexuels opposés sont relativement proches, les phéromones produites par chacune des cellules induisent l'attraction puis la fusion des deux cellules par conjugaison pour aboutir, après caryogamie, à la formation d'un zygote diploïde. Le zygote va alors répliquer son ADN, puis entamer une méiose pour produire quatre cellules haploïdes. Ces cellules vont subir une dernière étape de maturation qui comprend une compaction de leur génome et la formation d'une paroi épaisse qui permettra aux spores de résister aux contraintes de l'environnement. Une fois les nutriments de nouveau disponibles et les conditions de pousse favorables, les spores germent pour permettre le retour au cycle végétatif haploïde. Image inspirée de Allshire et Ekwall, *CSH Persp Bio*, 2015. Figure entièrement produite.

La levure *Schizosaccharomyces pombe* est un eucaryote unicellulaire portant un nom aux origines multiples : « schizo » dérive du Grec « skhizein » qui signifie diviser et se réfère ainsi au mode de reproduction asexuée par fission médiane de cet organisme (d'où son autre nom de levure fissipare) ; « saccharo » provient du latin « saccharum » qui signifie sucre ; « myces » provient du grec « mukes » qui signifie champignon ; et « pombe » signifie bière en swahili. Elle a été nommée en tant que tel par Paul Linder qui l'a isolée à partir d'une bière au millet est-africaine.

D'un point de vue anatomique, *S. pombe* adopte une forme de bâtonnet de 3 à 4 µm de diamètre et dont la longueur varie de 7 à 15 µm selon la phase du cycle cellulaire. La morphologie des cellules révèle ainsi le moment du cycle cellulaire où elles se trouvent. *S. pombe* possède d'ailleurs un temps de génération d'environ 3h (variable selon le milieu), dont près de 70% de cette durée est consacré à la phase G2 (Moreno et al., 1991). Le cycle de vie de la levure alterne entre deux phases en fonction des conditions de cultures (**Figure 10**). Dans un milieu de culture riche en nutriments, principalement en azote et glucose, la levure *S. pombe* prolifère selon un cycle mitotique à l'état haploïde, qui se réfère à la phase végétative. Chaque cellule est alors d'haploïde sexuel M (Minus ou h<sup>-</sup>) ou P (Plus ou h<sup>+</sup>). Lors d'une privation nutritionnelle (généralement d'azote), la levure cesse sa croissance végétative pour entrer dans la phase de quiescence réversible G0 (Harigaya et Yamamoto, *Chromosome Res*, 2007). La différenciation sexuelle se produit quand des cellules de types sexuels opposés sont relativement proches. Celle-ci inclut la formation du zygote et aboutit à celle des spores après



méiose. Une fois les nutriments de nouveau disponibles, les spores germent pour permettre le retour au cycle végétatif haploïde (Egel, *Springer*, 2004).

Dans le milieu académique, cet organisme est surtout connu pour avoir permis des avancées majeures permettant de comprendre les mécanismes moléculaires conservés qui sous-tendent la progression du cycle cellulaire et la division mitotique. Ainsi les travaux menés par Paul Nurse ont contribué à identifier et à élucider la fonction moléculaire des cyclines (en particulier Cdc2 chez *S. pombe* et son homologue humain CDK1) dans la régulation du cycle cellulaire. Ces découvertes ont d'ailleurs valu au chercheur d'être récompensé par le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 2001.

Aujourd'hui encore, la levure *S. pombe* continue de susciter un vif intérêt en tant que modèle classique d'étude de nombreux processus biologiques conservés au cours l'évolution. Elle rassemble de nombreux avantages tels que sa petite taille, sa manipulation facile à la fois en culture liquide et sur support solide, son temps de génération rapide (2 heures en condition optimale de pousse), la facilité de réaliser des croisements et la possibilité de combiner des manipulations d'analyse génétiques et biochimiques. D'autre part, le génome de *S. pombe* a été l'un des premiers génomes eucaryotes à être séquencé. Il se répartit sur trois chromosomes et contient environ 5000 gènes codant pour des protéines et 5000 gènes non codant. Il est de petite taille (environ 13.8 Mb) par comparaison à celui de l'Homme (environ 3 Gb pour au moins 20 000 gènes codants ; Chial, *Nature Education*, 2008) ou de la Drosophile (environ 137 Mb pour 13 000 gènes), ce qui le rend d'autant plus pratique pour les analyses génétiques. De plus la localisation subcellulaire de 95% des protéines est bien connue (Matsuyama *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2006). La levure fissipare se retrouve principalement sous forme haploïde, ce qui représente un avantage considérable pour étudier l'effet de la délétion d'un gène et apprécier la fonction cellulaire de la protéine qu'il code. Il est d'ailleurs très facile chez *S. pombe* de manipuler le génome de sorte à exciser un gène, le muter ponctuellement ou lui ajouter une étiquette (Bahler *et al.*, *Yeast*, 1998), grâce à la forte efficacité de la recombinaison homologue.

La levure *S. pombe* est devenue un modèle de référence pour l'étude des modes de régulation épigénétiques depuis la découverte du phénomène « Position Effect Variegation » ou PEV (Allshire, *Genes Dev*, 1995 ; Grewal et Jia, *Nat Rev Genet*, 2007 ; White et Allshire, *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008 ; Fodor *et al.*, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010). Ce phénomène décrit la répression de l'expression d'un gène suite à son insertion ectopique à proximité ou à l'intérieur d'une région d'hétérochromatine. Cet effet est maintenu au cours des divisions cellulaires. L'exploitation du PEV chez *S. pombe* a permis d'identifier les mécanismes

moléculaires qui gouvernent l'assemblage et la maintenance de l'hétérochromatine, et a notamment mis à jour le rôle primordial du RNAi dans ces processus. Ces données ont constitué un apport considérable d'autant que les voies et machineries impliquées sont conservées chez les métazoaires, dont l'Homme. Elles n'auraient pas pu être mise en évidence chez *S. cerevisiae* car celle-ci ne possède pas la voie du RNAi, ni les modifications post-traductionnelles des histones comme la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me). Par ailleurs, les protéines intervenant dans la voie du RNAi sont présentes en copie unique dans le génome, ce qui offre un avantage précieux pour disséquer les autres fonctions nucléaires du RNAi. Cette voie n'est d'ailleurs pas connue comme agissant au niveau du cytoplasme chez *S. pombe*.

### 3.2 Localisation et structure de l'hétérochromatine constitutive chez *S. pombe*

J'attire le lecteur à porter une attention plus particulière à l'organisation de la région des ADN ribosomiaux car celle-ci est impliquée dans une part importante de mon projet de recherche.

#### 3.2.1 Organisation spatiale des sites de l'hétérochromatine constitutive

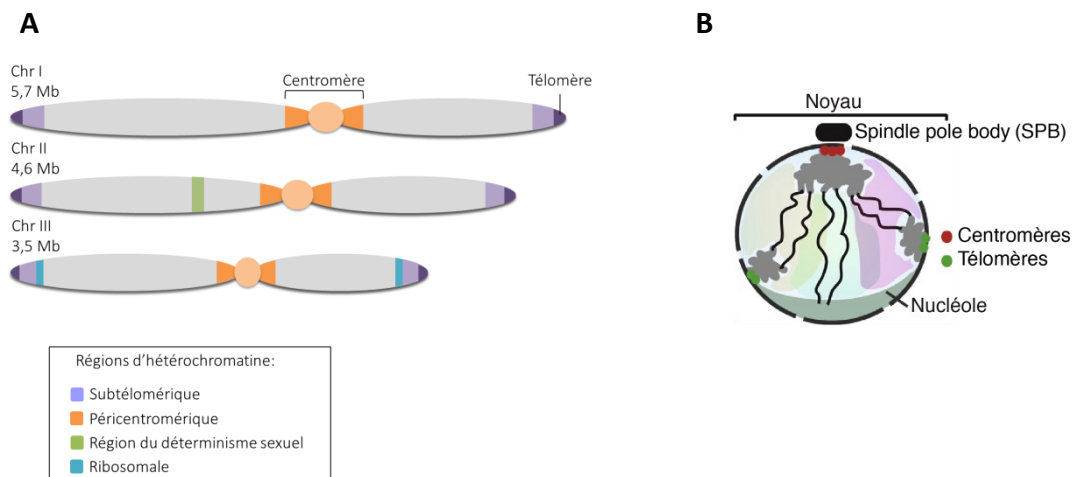


Figure 11: Localisation des sites d'hétérochromatine constitutives chez *S. pombe*

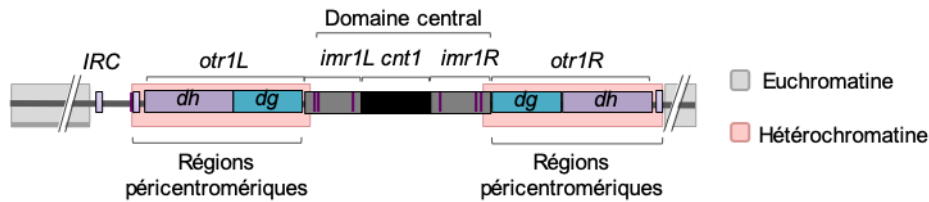
- A) Au niveau des chromosomes (image entièrement réalisée)
- B) Au sein du noyau interphasique (image modifiée de Mizuguchi *et al.*, FEBS, 2015).



A l'instar des métazoaires, l'hétérochromatine existe sous deux formes chez *S. pombe* et présente les caractéristiques classiques à savoir, le faible niveau d'acétylation des histones, la méthylation H3K9 et le recrutement de protéines à chromodomaine de type HP1. L'hétérochromatine facultative se retrouve notamment au niveau des gènes méiotiques dont l'expression est indispensable au déroulement de la différenciation sexuelle de levure, mais qui doit être réprimée pendant le cycle végétatif (Cam *et al.*, *Cell*, 2005 ; Hiriart *et al.*, *EMBO*, 2012 ; Zofall *et al.*, *Science*, 2012). Je ne détaillerai pas son organisation car son étude n'a pas fait l'objet de ma thèse. L'hétérochromatine constitutive quant à elle, se retrouve principalement au niveau de 4 régions (**Figure 11**) : les centromères, les télomères, les séquences codant pour les ARN ribosomiaux (rDNAs) et une partie de la région du déterminisme sexuel (Egel, *Springer*, 2004). Chacune de ces régions joue un rôle dans le maintien de la stabilité génomique et possède une structure et une organisation spatiale différentes les unes des autres (voir les sous-parties suivantes). De plus, le RNAi a été décrit comme exerçant un rôle bien identifié dans l'assemblage de cette hétérochromatine, sauf au niveau des rDNAs.

Le génome eucaryote s'organise d'une manière bien définie dans l'espace nucléaire en interphase (Figure 11 ; Comings, *Hum Genet*, 1980 ; Mekhail et Moazed, *Nat Gen*, 2010 ; Politz *et al.*, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013). *S. pombe* n'échappe à cette règle. En effet, les régions d'hétérochromatine constitutive adoptent une localisation nucléaire qui leur est propre, et qui corrèle avec un microenvironnement répressif (Grand *et al.*, *NAR*, 2014). Les trois centromères et la région du déterminisme sexuel se regroupent au niveau du « Spindle Pole Body » (SPB) qui est l'équivalent du centrosome (Funabiki *et al.*, *JCB*, 1993 ; Alfredsson-Timmings *et al.*, *J Cell Sci*, 2007). Les télomères s'associent également en 2 à 4 foyers à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, mais pas à proximité du SPB. Les clusters de rDNAs, de leur côté, se compartimentent au sein du nucléole (Uzawa *et al.*, *J Cell Sci*, 1993) situé à l'opposé du SPB. L'hétérochromatine se retrouve également au niveau des éléments transposables et est enrichie en CENP-B (Cam *et al.*, *Nature*, 2008). Chez *S. pombe*, les transposons existent sous 2 groupes, Tf1 et Tf2 appartenant à la famille des rétrotransposons LTR (*Long Terminal Repeat*). Ils sont présents en plusieurs copies dispersées dans le génome, qui se regroupent en clusters appelés « Tf bodies ».

### 3.2.2 Chromatine péricentromérique



**Figure 12: Schéma de l'organisation de l'hétérochromatine péricentromérique**

Le domaine central est flanqué par domaines otr constitués de répétitions en tandem dg/dh. (*otr*: outermost repeats; *Cnt*: centromere core region; *imr*: innermost repeats. Figure entièrement produite.

Les centromères jouent un rôle crucial pour la ségrégation des chromosomes durant la mitose et la méiose. C'est à leur niveau que s'assemble le kinétochore, une structure multiprotéique complexe qui interagit avec un microtubule émanant d'un des centres de nucléation (appelé « spindle pole body » et équivalent au centrosome chez les mammifères). La cohésion est maintenue entre les chromatides sœurs par le complexe appelé cohésine, jusqu'à ce qu'un kinétochore soit établi sur chacune d'entre elle avant l'anaphase (revues : Cleveland *et al. Cell*, 2003 ; Schueler et Sullivan, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006)

Les trois centromères de la levure fissipare présentent une organisation similaire malgré une taille différente, allant de 35 à 110 kpb. On y distingue un domaine central encadré par des répétitions péricentromériques (**Figure 12**). Le domaine central inclut l'élément *cnt* (*centromere core region*) flanqué par deux séquences répétées inversées et appelées domaines *imr* (*innermost repeats*). De part et d'autre du domaine central, se trouvent les régions péricentromériques composées des domaines *otr* (*outermost repeats*). Ceux-ci sont constitués de répétitions en tandem, *dg* et *dh*, dont le nombre varie entre les centromères. Les domaines *central* et *otr* se distinguent par une structure et une composition différente de la chromatine, reflétant des fonctions également différentes pour permettre la ségrégation des chromosomes. Le noyau central *cnt* et la grande majorité des domaines *imr* présentent un assemblage non conventionnel des nucléosomes, qui ne sont pas espacés par un intervalle régulier. La digestion partielle par la nucléase micrococcalle produit, en effet un « smear » au lieu du signal classique de type « barreau d'échelle » (Takahashi *et al.*, *Mol Bio of the Cell*, 1992 ; Marschall et Clarke, *JCB*, 1995). De plus, ces régions sont enrichies en Cnp1, un variant d'histone H3 homologue

de CENP-A chez les mammifères. Celui-ci a pour fonction de spécifier le site d'assemblage du kinétochore au niveau du domaine central (pour revue : Durand-Dubief et Ekwall, *Bioessays*, 2008). La portion restante des domaines *imr* et les régions *otr* quant à elles, présentent une structure classique d'hétérochromatine constitutive. Il a été montré que la protéine Swi6 de type HP1, qui est l'un des marqueurs de de l'hétérochromatine, est responsable du recrutement du complexe cohésine (Bernard *et al.*, *Science*, 2001 ; Yamagishi *et al.*, *Nature*, 2008). La structure des deux types de chromatines est ainsi nécessaire pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes.

Le centromère comprend également la présence de cluster de gènes codant pour des ARN de transferts, soit au niveau des séquences *imr*, soit à l'extrémité des domaines *otr* (seulement à l'extrémité de gauche sur le chromosome I). Il existe aussi des séquences IRC (*Inverted Repeat Centromere*) qui flanquent les extrémités pericentromériques au niveau des chromosomes I et III (Cam *et al.*, *Nat genet*, 2005 ; Noma *et al.*, *Cell*, 2006). L'ensemble de ces régions coïncident avec la barrière séparant l'hétérochromatine péricentromérique de l'euchromatine. Cette barrière est le site d'interaction du facteur Epe1 (*Enhancement Position Effect*) qui restreint la propagation des marques d'hétérochromatines (Ayoub *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2003 ; Zofall *et Grewal*, *Mol Cell*, 2006 ; Isaac *et al.*, *Genetics*, 2007 ; Trewick *et al.*, *EMBO J*, 2007 ; Wang *et al.*, *Genes Dev*, 2013).

### 3.2.3 Hétérochromatine subtélomérique



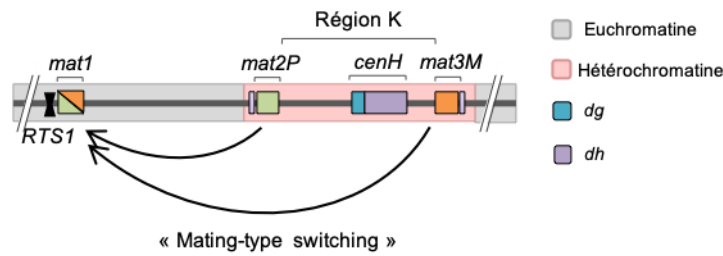
**Figure 13: Schéma de l'organisation de l'hétérochromatine subtélomérique du chromosome II**

Les gènes qui y sont localisée comme *tlh2*, contiennent des séquences de fortes homologies avec les répétitions *dh/dg*. Figure entièrement produite.

L'extrémité des chromosomes chez *S. pombe* se termine par un ADN simple brin qui succède à une région double brin d'environ 300 nucléotides, enrichie en une séquence consensus répétée (GGTTAC). Ces domaines sont dépourvus de nucléosomes et constituent la région télomérique. Ils adoptent une structure en boucle maintenue par l'association du complexe Shelterin qui forme la coiffe de protection (revue Xue *et al.*, *Cell Res*, 2017). Le site d'hétérochromatine se trouve dans la région située du côté proximal de l'extrémité télomérique, appelée subtélomère (**Figure 13**). Elle contient plusieurs cadres de lectures ouverts, ou ORFs (Open Reading Frames), parmi lesquels *tlh1* et *tlh2* (telomere-linked helicase) situés dans les parties les plus distales des régions subtélomériques des chromosomes 1 et 2, respectivement. Ces gènes ont la particularité de posséder des séquences de fortes homologies avec les répétitions *dh/dg* des domaines *otr* péri-centromériques, dites *dh/dg-like* (Hansen *et al.*, *NAR*, 2006). La coiffe ainsi que l'hétérochromatine subtélomérique préviennent l'érosion et de l'extrémité chromosomique et empêchent la machinerie de réparation de l'ADN de la reconnaître en tant que cassure double brin, ce qui pourrait mener à la fusion bout-à-bout des extrémités chromosomiques (Kano *et al.*, *J Mol Bio*, 2003 ; Bisht *et al.*, *Yeast*, 2008). Dans les deux cas, cela enclencherait autrement l'apoptose ou la sénescence (pour revues : McEachern *et al.*, *Annu Rev Genet*, 2000 ; Maser et DePinho, *Science*, 2002 ; Siderkis et Tarsounas, *Chromosoma*, 2008). Dans les cellules germinales et les cellules souches, la télomérase participe également à prévenir le raccourcissement des télomères (Counter *et al.*, *EMBO J*, 1992).

La frontière entre l'hétérochromatine subtélomérique et l'euchromatine n'est pas aussi bien définie qu'au niveau des centromères à cause de l'absence de barrière de propagation d'hétérochromatine. Une étude a cependant suggéré que Fft3 (ou FUN30, *Fission yeast fun thirty*), facteur de remodelage ATP-dépendant de la famille SNF2, serait recruté au niveau de séquences LTR (Long Terminal Repeats) localisées dans les régions subtélomériques, pour empêcher la propagation des marques d'euchromatine telles que l'acétylation des histones H3 et H4 (Strålfors *et al.*, *Plos Genet*, 2011).

### 3.2.4 Hétérochromatine de la région du déterminisme sexuel



**Figure 14 : Schéma de l'organisation de l'hétérochromatine au niveau de la région du déterminisme sexuel**

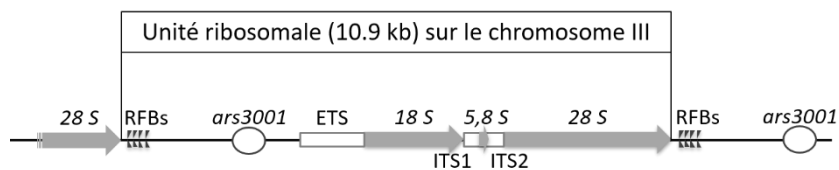
La région K contient le domaine *cenH* composé des séquences de type *dh/dg*. Des événements de recombinaison au niveau du locus *mat1* déterminent le type sexuel (« mating-type switching »). La levure sera de type P ou M si la séquence recombinante est respectivement *mat2P* ou *mat3M*. Image entièrement réalisée.

Chaque levure *S. pombe* possède l'information génétique permettant l'expression des deux types sexuels M ou P. Au cours du cycle végétatif, elle peut produire des cellules filles haploïdes de type P ou M qui conservent ou non la capacité de changer leur type sexuel (« mating type switching »). L'information génétique se situe au niveau de la région du déterminisme sexuel, qui s'étend sur au moins 34 kpb au niveau du bras droit du chromosome II (**Figure 14**). Elle se subdivise en deux parties : i) une sous-région d'euchromatine d'environ 14 kb contenant le gène *mat1* qui s'exprime et ii) une sous-région d'hétérochromatine d'environ 30 kb renfermant les allèles *mat2-M* et *mat3-P* dont l'expression est réprimée (Egel, Springer, 2004). Les loci *mat2-M* et *mat3-P* sont séparés par une région d'environ 11 kpb appelée « région K ». Celle-ci contient un domaine appelé *cenH*, qui présente des séquences de type *dh/dg* comme les domaines *otr* péri-centromériques. La sous-région d'hétérochromatine est flanquée par des séquences répétées inversées IR (Inverted Repeat) qui jouent le rôle de barrières impliquant également le facteur *Epe1* pour empêcher la propagation d'hétérochromatine (Trewick *et al.*, *EMBO J*, 2007). Cette hétérochromatine joue un rôle important pour déterminer le type sexuel de la levure.

Le type sexuel M ou P est déterminé respectivement par les allèles *mat2-M* et *mat3-P*. Le passage de l'un à l'autre dépend de l'allèle qui s'exprimera suite à un événement de

recombinaison se produisant au locus *mat1* pour lesquels les deux allèles peuvent être donneurs. Suite à cet évènement, appelé dans la littérature « mating-type switching », les cellules qui auront recombiné *mat2-P* au locus *mat1* seront de type sexuel P et celles qui auront recombiné *mat3-M* au locus *mat1* seront de type sexuel M (Thon et Klar, *Genetics*, 1993 ; Arcangioli *et al.*, *EMBO J*, 1998 ; Egel, *Springer*, 2004).

### 3.2.5 Hétérochromatine au niveau des rDNAs



**Figure 15 : Organisation d'une unité ribosomale**

L'unité ribosomale est répétée en tandem environ 150 fois à chaque extrémité sub-télomérique du chromosome III. Chaque unité possède : (i) les séquences génomiques des ARN ribosomiaux 18S, 5.8S et 28S ; (ii) le promoteur de la RNA Pol I qui synthétise un précurseur contenant les séquences des ARN ribosomiaux ainsi que les régions *ETS* et *ITS* (pour *External/Internal Transcribed Spacer*). Ce précurseur subira un processus de maturation générant les ARN ribosomiaux ; (iii) une origine de réplication (*ars3001*) ; (iv) des barrières de la réplication programmables (RFBs pour *Replication Fork Barrier*). Image entièrement réalisée.

La région nucléolaire a été suggérée comme étant une zone de répression transcriptionnelle (Jakočiūnas *et al.*, *PNAS*, 2013). Dans cette étude, il a été montré que l'insertion d'une unité de rDNA à la place de la séquence *IR* située à droite de la région du déterminisme sexuel, provoque la relocalisation de celle-ci vers la région péri-nucléolaire. Cette translocation serait stabilisée grâce à la protéine Reb1, connue pour polariser la progression des fourches de réplication au niveau des rDNAs, et dont la dimérisation lui permet d'interagir *en trans* avec deux sites éloignés (phénomène appelé « chromosome kissing » ; Singh *et al.*, *Cell*, 2010). La relocalisation permet de restaurer le *silencing* de la région du déterminisme sexuel (effet mesuré par l'insertion d'un gène rapporteur dans cette région) altéré par la délétion de la séquence *IR*. Cependant, cet effet ne semble pas requérir certains éléments clés du RNAi, mais potentiellement des facteurs nucléolaires pas encore identifiés.

Les séquences génomiques des ARN ribosomiaux 18S, 5.8S et 28S sont arrangées en « tête à queue » et forment une unité ribosomale de 10.4 kb (**Figure 15**). Celle-ci se répète en tandem environ 150 fois, formant ainsi un cluster de 500 à 100 kb, localisé dans la partie flanquant chaque région subtélomérique du chromosome III. Chaque unité est dotée de son propre promoteur reconnu par la RNA Pol I et de sa propre origine de réplication, ce qui lui confère la capacité théorique d'être transcrite et répliquée indépendamment des autres unités. La séquence génomique 5S, quant à elle, est présente en plusieurs copies dispersées dans le génome et transcrite par la RNA Pol III (Barnitz *et al.*, *FEBS Letters*, 1982 ; Schaak *et al.*, *NAR*, 1982 ; Toda *et al.*, *Current Genet*, 1984).

L'effet « PEV » a également été observé comme au niveau des autres régions d'hétérochromatine constitutive : l'expression d'un gène codant suite à son insertion dans le cluster des rDNAs est réprimée (Thon et Verhein-Hansen, *Genetics*, 2000 ; Shankaranarayana *et al.*, *Curr Bio*, 2003 ; Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005). La fonction de l'hétérochromatine au niveau des rDNAs n'a cependant pas encore été clairement identifiée chez *S. pombe*. Elle pourrait intervenir dans le maintien de l'intégrité du cluster en empêchant les phénomènes de recombinaisons entre les unités. De plus, on ne connaît pas encore quelle proportion exacte des unités ribosomales sont transcriptionnellement exprimées dans cet organisme. Des éléments de réponse ont été apportés par des études utilisant d'autres modèles. Chez l'Homme, il a été estimé que 50% des unités sont transcriptionnellement réprimées (Li *et al.*, *EMBO J*, 2005 ; Schlesinger *et al.*, *Genes Dev*, 2009). Une étude chez la drosophile a mis en évidence que la présence d'hétérochromatine au niveau des rDNAs permet de limiter la formation d'éléments circulaires extrachromosomiques ou ERC (extra-chromosomal rDNA Circles) générés par des processus de recombinaison (Peng et Karpen, *Nat Cell Biol*, 2007). Chez *S. cerevisiae*, 50% des unités seraient également réprimées selon un procédé impliquant l'histone désacétylase Sir2 (Gasser et Cockell, *Gene*, 2001 ; French *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2003). De plus, seule une faible proportion des origines de réplication seraient activées, et seraient regroupées en clusters, de sorte à ce que chaque origine permette la réplication de plusieurs unités (Linskens et Huberman, *Mol Cell Biol*, 1988 ; Pasero *et al.*, *Genes Dev*, 2002). Le *silencing* induit par Sir2 permettrait de réguler le nombre d'origines de réplication actives (Pasero *et al.*, *Genes Dev*, 2002). Par ailleurs, d'autres données ont montré que la cellule a tendance à être plus sensible aux agents génotoxiques suite à la perte d'unités ribosomales réprimées (Ide *et al.*, *Science*, 2010). Ces résultats suggèrent que le *silencing* participerait au maintien du nombre optimal de copies de rDNAs. Je reviendrai sur cette notion dans le chapitre 2.



### 3.3 Généralités sur la formation de l'hétérochromatine RNAi-dépendante chez *S. pombe*

Le *silencing* de la chromatine s'effectue à deux niveaux : premièrement la dégradation sur le lieu de leur production des ARN émanant des sites ciblés par la formation d'hétérochromatine (processus appelé *cis*-PTGS), et deuxièmement, la compaction et la mise en place de marques épigénétiques caractéristiques de l'hétérochromatine. Le RNAi intervient à ces niveaux de manière plus ou moins importante.

Le RNAi participe au processus *cis*-PTGS entre autres *via* son complexe effecteur RITS (RNA Induced-Transcriptional Silencing). Celui-ci est ciblé sur un ARN naissant au niveau de l'hétérochromatine grâce au siRNAs qu'il contient et permet le clivage de cet ARN *via* l'activité *slicer* de sa sous-unité argonaute (Irvine *et al.*, *Science*, 2006). De plus, une enzyme de type dicer contribue à ce processus en clivant des dsRNAs produits au niveau de ces régions. En parallèle, le processus *cis*-PTGS fait aussi intervenir un élément RNAi-indépendant : l'exosome. Il s'agit une machinerie multi-protéique spécialisée dans la dégradation des ARN non codants qui sont « signalés » par une polyadénylation induite par le complexe TRAMP chez *S. pombe* (Bülher *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2008 ; Murakami *et al.*, *Plos one*, 2007 ; Halic et Moazed, *Cell*, 2010 ; Reyes-Turcu *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2011).

Durant l'assemblage de l'hétérochromatine, une signature épigénétique caractéristique se met en place chez *S. pombe*, comme chez les autres eucaryotes: i) hypoacétylation générale des histones H3 et H4 impliquant les histones désacétylases (HDAC) Clr3, Clr4 et Sir2 ; ii) diméthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9me<sub>2</sub> et HeK27me<sub>2</sub>) réalisée par la seule histone méthyltransférase (HMT) identifiée chez *S. pombe*, à savoir, Clr4 ; et enfin iii) recrutement de Swi6 et Chp2, protéines structurales de type HP1, aux sites de formation d'hétérochromatine (Canzio *et al.*, *Mol Cell*, 2011; Sadaie *et al.*, *EMBO J*, 2004; Sadaie *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2008). C'est chez *S. pombe* que le RNAi a été directement impliqué pour la première fois dans la formation de l'hétérochromatine (Volpe *et al.*, *Science*, 2002 ; Verdel *et al.*, *Science*, 2004). Il joue un rôle primordial dans la déposition de la marque H3K9me<sub>2</sub> et le recrutement des protéines de types HP1. Son mécanisme d'action, détaillé dans la prochaine section, a bien été élucidé au niveau des régions péri-centromériques.



### 3.4 Le rôle du RNAi dans l'initiation, la propagation et la maintenance de l'hétérochromatine péricentromérique chez *S. pombe*

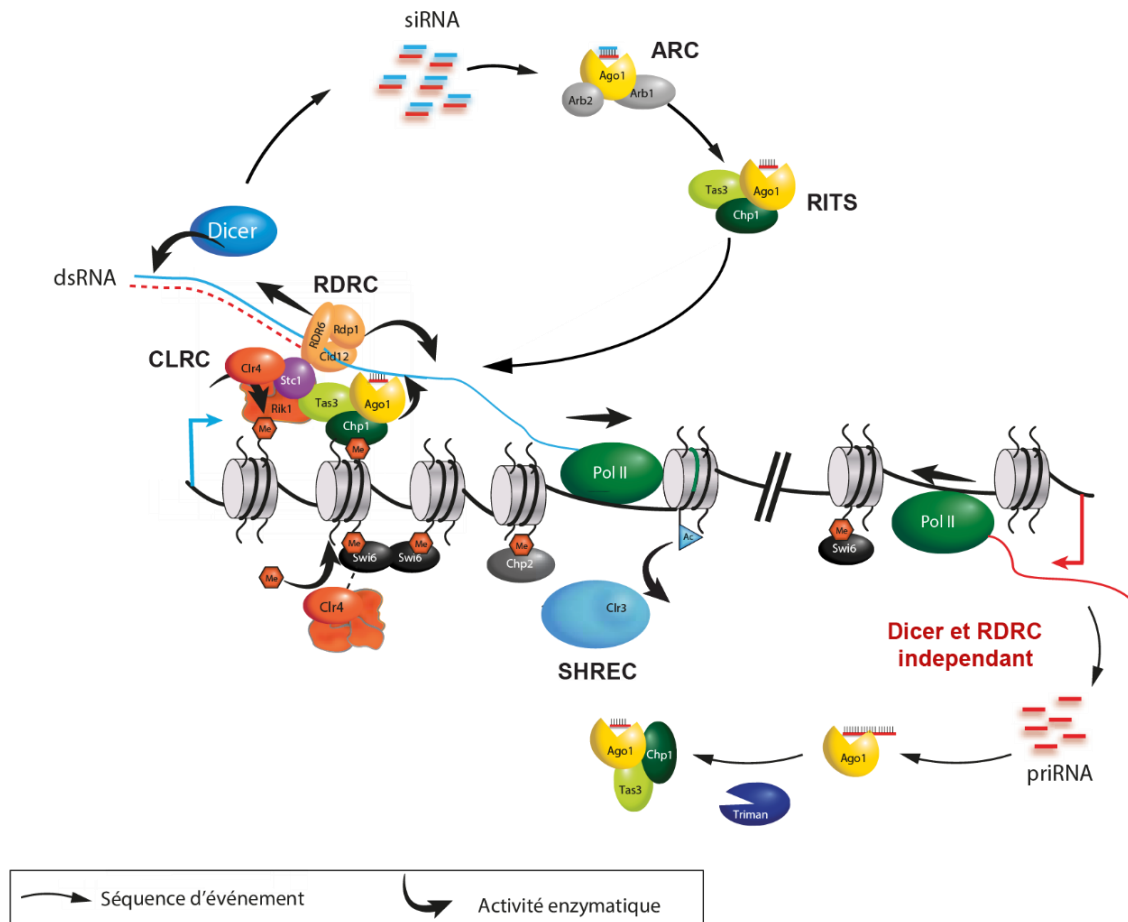
Cette section constitue le cœur de ce premier chapitre d'introduction. J'y présente la signalisation du RNAi chez *S. pombe* ainsi que ses rôles dans la formation et la maintenance de l'hétérochromatine péricentromérique. J'invite le lecteur à retenir plus particulièrement les fonctions assurées par les complexes RITS, ARC, RDRC et les protéines Clr4 et Swi6. Il s'agit des acteurs clés de la voie du RNAi, auxquels je me suis particulièrement intéressée afin de comprendre le rôle du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome. Leurs fonctions sont expliquées dans les paragraphes suivants et résumées dans la **Figure 16**.

L'ensemble des études menées depuis la découverte de l'implication du RNAi dans la formation d'hétérochromatine a abouti à un modèle détaillé au niveau des régions péricentromériques, qui pour la première fois, a proposé que le recrutement à la chromatine, d'un complexe effecteur du RNAi se ferait par l'intermédiaire d'un ARN en cours de transcription, dit « ARN plateforme », et que ce recrutement induit la méthylation H3K9me. Dans ce modèle de répression qualifié de co-transcriptionnel ou CTGS (*Co-Transcriptional Gene Silencing*) l'action du RNAi se ferait principalement en *cis* au niveau du site de production des ARN double brins, par opposition aux métazoaires (*Cf.* section 2.2 à propos du TGS induit par les piRNAs ; Emmerth *et al.*, *Dev Cell*, 2010 ; Woolcock *et al.*, *Genes Dev*, 2012). De plus, la spécificité d'action n'impliquerait donc pas des protéines de liaison à l'ADN, comme c'est le cas chez *S. cerevisiae* (revue : Moazed, *Cell*, 2011). L'émergence de ce modèle a eu une résonance particulière dans l'étude plus globale des mécanismes de régulation épigénétiques car il a révélé un certain paradoxe. En effet, le *silencing* transcriptionnel d'une région sujette à la formation d'hétérochromatine induite par le RNAi, nécessite, une étape initiale de transcription.

#### 3.4.1 Phase d'initiation

La délétion des gènes *dcr1* et *ago1*, qui codent pour des enzymes clés de la voie du RNAi, entraîne une forte dé-répression transcriptionnelle ainsi qu'une perte d'accumulation des marques d'hétérochromatine (H3K9me<sub>2</sub> et Swi6) au niveau des régions péricentromériques (Hall *et al.*, *Science*, 2002 ; Volpe *et al.*, *Science*, 2002). Ces données montrent à quel point

l'action du RNAi est essentielle pour initier et orchestrer formation d'hétérochromatine au niveau des centromères.



**Figure 16 : Modèle de nucléation de l'hétérochromatine par la voie des siRNA et celle des priRNAs chez *S. pombe***

La transcription bidirectionnelle des régions péri-centromériques (traits rouges et bleus) produit de l'ARN double brin (non représenté pour la clarté de la figure) qui active la voie du RNAi et la production de siRNA via Dcr1. Ces siRNA sont pris en charge par Ago1 au sein du complexe ARC, puis du complexe RITS. Ce dernier utilise ces siRNA afin de cibler un ARN plateforme (trait bleu). Il recrute : (i) le complexe CLRC qui induit la méthylation H3K9me<sub>2</sub>, (ii) RDRc qui permet *in fine* d'amplifier la production des siRNA *in cis*. La marque H3K9me<sub>2</sub> est reconnue par les protéines Swi6 et Chp2, qui sont importantes pour l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine et concourent à recruter le complexe SHREC composé de la désacétylase Clr3. En parallèle, la dégradation des transcrits péri-centromériques participent à la genèse des priRNAs selon un processus n'impliquant ni Dcr1, ni RDRc. Ces priRNAs sont pris en charge par Ago1 et excisés par la nucléase Triman. Cette voie contribue également à la formation d'hétérochromatine. Voir le texte pour plus de détails. Image modifiée de Martienssen et Moazed, *CSH*, 2015.

Le mode d'action CTGS du RNAi suit le schéma général présenté de ce chapitre. Le modèle propose que l'activation du RNAi débute par la production d'ARN double brin (dsRNA) issus soit de la transcription bidirectionnelle des séquences répétées *dh/dg* péricentromériques, soit d'un long ARN non-codant simple brin replié en épingle à cheveux (Djupedal *et al.*, *EMBO J*, 2009). La transcription des répétitions *dh/dg* a été identifiée comme étant assurée par la RNA Pol II (Djupedal *et al.*, *Genes Dev*, 2005 ; Kato *et al.*, *Science*, 2005). Ces dsRNAs sont clivés par l'enzyme Dcr1 (Dicer1) pour aboutir à des petits ARN interférents double brins de 21 à 23 nucléotides (siRNAs ; **Figure 16**). Ces derniers sont pris en charge par la sous-unité Ago1 (Argonaute 1) du complexe ARC (*Argonaute siRNA Chaperone*) qui comprend deux chaperonnes, essentielles au chargement des siRNAs dans Ago1 et à l'activité *slicing* de celle-ci (Buker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007 ; Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Une fois le brin passager éliminé, Ago1 s'associe à d'autres protéines pour former le complexe RITS, effecteur de la fonction du RNAi dans la formation de l'hétérochromatine (**Figure 16**). Celui-ci se compose alors de la protéine Ago1 liée à Chp1 (*Chromodomain Protein 1*) par l'intermédiaire de Tas3 (*Targeting subunit 3* ; Verdel *et al.*, *Science*, 2004 ; Petrie *et al.*, *Mol Cell Bio*, 2005). Comme son nom l'indique, Chp1 possède un chromodomaine lui permettant d'interagir avec les histones méthylées, tandis que Tas3 possède un domaine conservé du côté N-terminal appelé « Ago hook » ou GW car composé de répétitions des résidus Glycine et Tryptophane, et qui confère à la protéine, sa capacité d'interagir avec les protéines de type Argonaute au niveau de leur domaine MID et PIWI (Ma *et al.*, *Nature*, 2005 ; Till *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2007 ; Braun *et al.*, *Mol Cell*, 2011 ; Fabian *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2011 ; Pontier *et al.*, *Mol Cell*, 2012). RITS utilise les siRNAs comme guides pour cibler et être recruté sur des ARN « plateformes » produits également par la RNA Pol II au niveau des régions péricentromériques (**Figure 16**). L'ancrage du complexe sur la chromatine serait stabilisé par la liaison du chromodomaine de Chp1 sur une marque H3K9me potentiellement pré-existante (Schalch *et al.*, *Mol Cell*, 2009). A ce niveau, RITS recrute le complexe CLRC (*Cryptic Loci Regulator Complex*) par l'intermédiaire de sa sous-unité Rik1 et d'une autre protéine Stc1 (*siRNA to Chromatin*, protéine à domaine LIM, Bayne *et al.*, *Cell* – 2010). En plus de Rik1, CLRC est composé de Cul4 (*Cullin 4*, E3 ubiquitin ligase) Raf1 (*Rik1-Associated Factor 1*, Clr8/Dos1), Raf2 (*Rik1-Associated Factor 2*, Clr7/Dos2), et surtout Clr4 (*Cryptic Loci 4* ; SUV39H chez l'humain et de Su(var)39 chez la drosophile) la seule HMT identifiée comme étant responsable de la déposition de la marque H3K9me<sub>2</sub> (Hong *et al.*, *RNA Bio*, 2005 ; Horn *et al.*, *Genes Dev*, 2005 ; Jia *et al.*, *Nat Cell Biol*, 2005 ; Sadaie *et al.*, *EMBO*

J, 2004; Thon *et al.*, *Genetics*, 2005 ; Zhang *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2008 ; Gerace *et al.*, *Mol Cell*, 2010). Cette marque entraîne le recrutement des protéines Swi6 (*SWItching protein*) et Chp2 (*Chromodomain Protein 2*) qui sont importantes pour l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine (Sadaie *et al.*, *EMBO J*, 2004 ; Sadaie *et al.*, *Mol and Cell Bio*, 2008). En effet bien que leurs rôles respectifs soient distincts, ces deux protéines concourent en somme, à recruter des HDAC et potentiellement des facteurs de remodelage de la chromatine pour limiter l'accès à la RNA PolII (Sugiyama *et al.*, *Cell*, 2007 ; Motamedi *et al.*, *Mol Cell*, 2008 ; Sadaie *et al.*, *Mol and Cell Bio*, 2008). De plus, Swi6 possède la capacité de se multimériser grâce à son domaine *chromoshadow*, ce qui faciliterait la condensation de la chromatine (Cowieson *et al.*, *Curr Bio*, 2000 ; Canzio *et al.*, *Mol Cell*, 2011).

### **3.4.2 Phase d'amplification et de maintenance**

Au cours de l'initiation de la formation d'hétérochromatine, RITS recrute le complexe RDRC (*RNA-Directed RNA polymerase Complex*) qui se compose de l'hélicase à ARN Hrr1 (*Helicase Required for RNAi-mediated heterochromatin assembly*), de la poly-(A) polymérase Cid12 (*Caffeine-Induced cell Death 12*) et l'ARN polymérase dépendante de l'ARN Rdp1 (*RNA-directed RNA polymerase*). Ce complexe a pour fonction de synthétiser un ARN double brin en se servant de l'ARN plateforme comme matrice, grâce à l'activité de la sous-unité Rdp1 (**Figure 16**). Cette activité serait couplée au recrutement de Dcr1 dont la connexion physique avec RDRC a été mise en évidence (Colmenares *et al.*, *Mol Cell*, 2007), ce qui aboutirait à amplifier le recrutement siRNA-dépendant de RITS sur la chromatine, et la déposition et la propagation *in fine* des marques épigénétiques répressives (H3K9me<sub>2</sub>, Swi6, Chp2). Cette boucle d'amplification est essentielle à la formation d'hétérochromatine, étant donné que la délétion du gène *rdp1* phénocopie les mutants *ago1Δ* et *dcr1Δ* et abolit la production de siRNAs (Hall *et al.*, *Science*, 2002 ; Volpe *et al.*, *Science*, 2002 ; Motamedi *et al.*, *Mol Cell*, 2008).

De façon similaire à ce qui est observé chez les plantes, il existe une forte interdépendance entre d'un côté, le ciblage siRNA-dépendant de RITS, et de l'autre, l'une des fonctions finales du RNAi, à savoir la méthylation de H3K9. D'une part, l'accumulation de siRNAs et l'interaction de RITS avec RDRC sont sévèrement impactées par la délétion du gène *clr4* (Motamedi *et al.*, *Cell*, 2004 ; Motamedi *et al.*, *Mol Cell*, 2008 ; Halic et Moazed, *Cell*, 2010), indiquant que la production de siRNAs nécessite la méthylation H3K9me et vice versa. De plus, l'ancrage de RITS à la marque H3K9me<sub>2</sub> *via* sa sous-unité Chp1, est également

important pour la propagation efficace de la formation d'hétérochromatine (Schalch *et al.*, *Mol Cell*, 2009). Par ailleurs, une étude a montré que Swi6 s'associerait aux transcrits issus des régions péricentromériques, ce qui favoriserait la localisation de RITS et de RDRC sur ces transcrits selon un mécanisme qui n'impliquerait pas de connexion physique entre Swi6 et ces complexes (Motamedi *et al.*, *Mol Cell*, 2008). L'ensemble de ces mécanismes constitue ainsi une boucle de rétrocontrôle positif qui renforce la biogénèse des siRNAs, la stabilisation de RITS à la chromatine, et permet d'aboutir à une formation plus efficace de l'hétérochromatine (**Figure 16**).

La transmission des marques d'hétérochromatine aux cellules-filles nécessite un couplage entre la déposition de ces marques et la progression de la fourche de réplication durant la phase S (Li *et al.*, *Nature*, 2011). Or, la formation d'hétérochromatine est un phénomène co-transcriptionnel (modèle appelé CTGS, *Cf.* sections ci-dessus). Par conséquent, des conflits entre la RNA Pol et le réplisome peuvent survenir si les processus concomitants de transcription et de réplication ne sont pas coordonnés. Il a récemment été proposé que le RNAi contribue à résoudre ces conflits en permettant de faciliter la terminaison de la transcription par la RNA Pol II (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011). Je reviendrai plus en détail sur cette fonction dans le chapitre 3 de l'introduction car ce modèle est à la base de mes travaux de thèse.

### **3.4.3 La régulation de l'assemblage du complexe RITS**

Avant de prendre part au complexe RITS, effecteur du RNAi dans la formation de l'hétérochromatine, Ago1 a été identifiée comme faisant partie d'un complexe distinct nommé ARC (ARgonaute siRNA Chaperone) qui se compose également des chaperonnes Arb1 et Arb2 (*Argonaute Binding Protein 1/2* ; **Figure 17**). Bien que ces chaperonnes n'aient pas été détectées comme se localisant au niveau des régions péricentromériques, leur présence est requise pour l'assemblage de l'hétérochromatine et la production des siRNAs (Bucker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007 ; Halic et Moazed, *Cell*, 2010).

Le complexe ARC a d'abord été identifié en tant que régulateur négatif de l'activité *slicing* d'Ago1 qui consiste à la libération du brin passager. L'analyse des petits ARN a montré qu'Ago1 s'associe *in vivo* principalement à des duplexes de siRNAs au sein du complexe ARC, et à des siRNAs simples brins au sein du complexe RITS. De plus, des expériences *in vitro*, ont montré que le complexe ARC inhibe l'activité *slicing* d'Ago1 de façon dose-dépendante

(Bucker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007). Ces observations suggèrent que l'activité *slicing* d'Ago1 et la libération du brin passager se produiraient une fois la protéine faisant partie du complexe RITS. Une étude récente a également montré que le complexe ARC serait requis pour le chargement d'Ago1 en duplexes de siRNAs produits par Dcr1 mais également pour celui en priRNAs dont la production est Dcr1-indépendante (voir section suivante ; Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Néanmoins, des études complémentaires menées *in vitro* ont révélé une distinction entre les chaperonnes : seule la présence d'Arb1 serait indispensable au chargement de Ago1 en petits ARN (Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Il a été fait l'hypothèse qu'Arb2 pourrait être importante pour la localisation subcellulaire du complexe ARC. Par ailleurs, les deux chaperonnes seraient nécessaires à l'interaction d'Ago1 avec Tas3 et donc à la formation de RITS (**Figure 17**). De plus, des données apportées par l'utilisation de protéines Ago1 mutées au niveau du domaine PAZ de liaison au dsRNA, ont indiqué que son chargement en duplex de siRNAs est une condition pour l'interaction d'Ago1 avec Tas3 (Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Cela soulève l'hypothèse que Tas3 serait capable de détecter si Ago1 est chargée ou non. Il est probable que le chargement d'Ago1 en petits ARN puisse entraîner un changement conformationnel qui rendrait son domaine PIWI compétent pour interagir avec le domaine GW de Tas3.

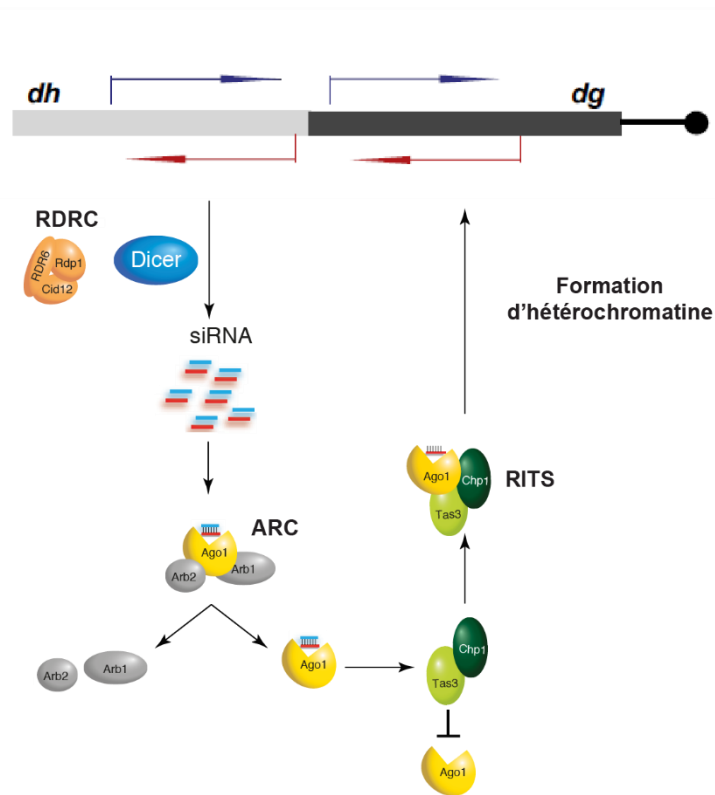
En somme, ces différentes données ont montré que le complexe ARC est le module de chargement d'Ago1 en duplexes de petits ARN chez *S. pombe*, rendant l'enzyme compétente pour former le complexe RITS (**Figure 17**). De plus, en inhibant l'activité *slicing* d'Ago1, les chaperonnes l'empêcheraient de cibler manière non contrôlée les ARN présents dans la cellule. Des études complémentaires doivent être encore menées pour comprendre comment ARC permet le chargement d'Ago1 en duplexe de siRNAs. Arb1 possède un domaine C-terminal homologue à celui des maturases impliquées dans le *splicing* au sein des mitochondries et des chloroplastes chez les plantes (Bucker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007 ; Schmitz-Linneweber *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2015). Arb2, quant à elle, possède un domaine du côté N-terminal conservé de la levure à l'Homme, et qui est retrouvé chez les HDAC de classe II tel que Clr3 (Bucker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007). Cependant, aucune étude n'a impliqué à ce jour, ces domaines structuraux dans la contribution du complexe ARC vis-à-vis du *silencing* de l'hétérochromatine. De plus, aucune de ces protéines ne semble posséder de domaine de liaison à l'ARN double brin. Par conséquent, leur mode opératoire semble différer de celui des protéines R2D2 et TRBP, identifiées comme étant des réceptacles provisoires des dsRNAs produits par Dicer, respectivement chez la Drosophile et l'Homme (Liu *et al.*, *Science*, 2003 ;



Chendrimada *et al.*, *Nature*, 2005 ; Gregory *et al.*, *Cell*, 2005). De plus, contrairement à ces protéines, Arb1 et Arb2 n'ont pas été détectées comme s'associant avec la protéine de type Dicer chez *S. pombe*.

### 3.4.4 La voie des primal RNA (priRNAs)

Une autre classe de petits ARN a été mise en évidence chez *S. pombe*, les primal RNA (priRNAs). J'attire l'attention du lecteur sur cette voie, qui n'a pas fait l'objet d'étude au cours de ma thèse, mais qui sera évoquée dans la discussion des résultats que j'ai obtenus.



**Figure 17: Modèle de régulation de l'assemblage du complexe RITS lors de la formation d'hétérochromatine**

Ago1 s'associe avec les chaperonnes Arb1 et Arb2 qui permettent son chargement en duplex de siRNA. Ces derniers proviennent des régions péri-centromériques et sont générés par l'action combinée de Dcr1 et RDRB. Le chargement d'Ago1 rend cette enzyme compétente pour s'associer à Tas3 et former le complexe RITS avec Chp1. Tas3 ne s'associe pas à l'enzyme Ago1 non chargée en siRNA, ce qui pourrait autrement altérer la fonction *silencing* de RITS. L'activité *slicing* d'Ago1 est également inhibée au sein du complexe ARC. RITS orchestre la déposition de la marque d'hétérochromatine. H3K9me<sub>2</sub>.

Les priRNAs seraient le produit de dégradation de transcrits s'accumulant au niveau de régions génomiques sujettes à de la transcription bidirectionnelle (**Figure 16**). Dans ce cadre, les séquences répétées péri-centromériques constitueraient des régions privilégiées pour la production de priRNAs, de même que les rDNAs (Halic et Moazed, *Cell*, 2010, Figure 4). Ils constitueraient une forme minoritaire de petits ARN associés à Ago1, par opposition aux siRNAs. La particularité de cette voie, est que la production de ces priRNAs ne requiert pas l'unique ribonucléase de type Dicer chez *S. pombe*, Dcr1, ni le complexe RDRC. Les précurseurs de ces priRNAs seraient d'abord clivés en produits simple brin plus courts et de différentes tailles par une nucléase encore inconnue, puis ils seraient pris en charge par Ago1 *via* le complexe ARC. La nucléase Triman, nouvellement identifiée, serait alors spécifiquement recrutée sur ces priRNAs associés à Ago1 (Marasovic *et al.*, *Mol Cell*, 2013). Elle aurait pour fonction, *via* son activité exonucléase 3'-5', d'exciser les priRNAs jusqu'à leur taille finale de 22 à 23 nucléotides, rendant leur association plus stable avec Ago1. La possibilité qu'Ago1 chargée en priRNA mature puisse se retrouver au sein du complexe RITS, est envisageable (**Figure 16**). Cette maturation des priRNAs par Triman rappelle la formation du complexe PIWI-piRNA. De façon intéressante, Triman exercerait le même rôle vis-à-vis des siRNAs suite à la libération du brin passager, suggérant que Dcr1 ne produirait pas spécifiquement des duplexes de siRNAs à la taille appropriée (Halic et Moazed, *Cell*, 2010).

Cette voie des priRNAs a été proposée comme étant le signal d'initiation induisant la formation d'hétérochromatine au niveau des régions péri-centromériques. Le complexe Ago1-priRNA agirait comme un mécanisme de surveillance du transcriptome, qui détecterait l'accumulation de transcrits en particulier au niveau de régions de régions sujettes à de la transcription bidirectionnelle (car cela générerait des cibles anti-sens pouvant être ciblée par le complexe). S'en suivrait le recrutement de Dcr1 et RDRC activant la voie classique des siRNAs et aboutissant à la déposition des marques d'hétérochromatine.

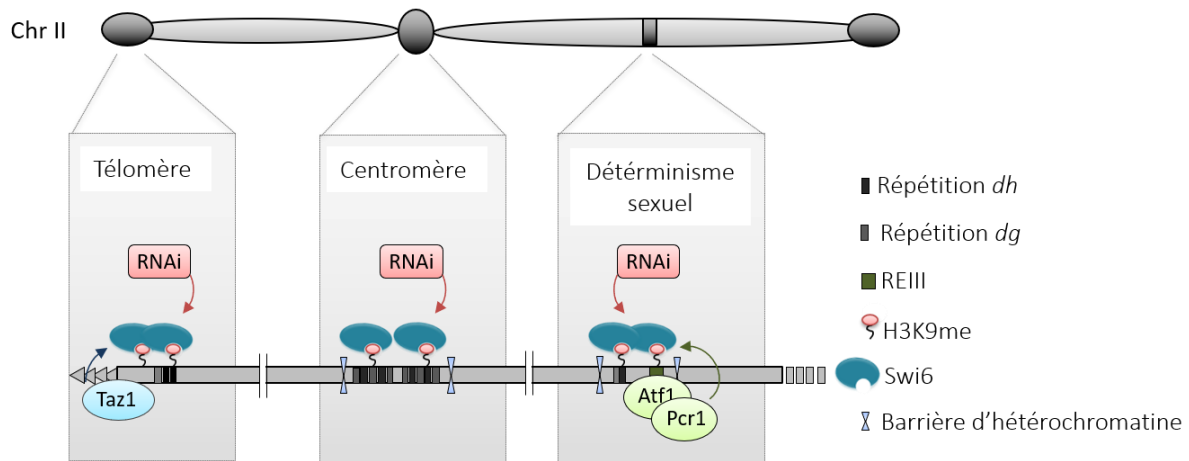


## 3.5 Implication du RNAi à d'autres sites de formation de l'hétérochromatine

### 3.5.1 Au niveau de la région du déterminisme sexuel et des régions télomériques

Le RNAi est également impliqué dans l'initiation de la formation d'hétérochromatine au niveau des régions d'homologies aux séquences *dh/dg* présentes dans les régions subtélomériques (*tlh1* et *tlh2*) et celle du déterminisme sexuel (domaine *cenH*) (Hall *et al.*, *Science*, 2002 ; Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005). Les premières études portant sur le rôle du RNAi dans la formation d'hétérochromatine chez *S. pombe*, ont cependant révélé une distinction majeure entre les sites d'hétérochromatine. La délétion unique des gènes *dcr1*, *ago1* ou *rdp1* n'a pas d'impact significatif sur la maintenance des marques épigénétiques d'hétérochromatine, ni même sur le *silencing* transcriptionnel au niveau des régions subtélomériques et de la région du déterminisme sexuel, contrairement aux régions péricentromériques (Hall *et al.*, *Science*, 2002 ; Volpe *et al.*, *Science*, 2002 ; Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005). Ce résultat signifie que le RNAi, bien qu'il soit à l'origine de la formation d'hétérochromatine au niveau de ces régions, n'intervient pas dans la maintenance celle-ci une fois qu'elle est assemblée. Ce constat s'explique par l'existence de voies parallèles RNAi-indépendantes qui y orchestrent également la formation d'hétérochromatine, en mettant en jeu des protéines de liaison à l'ADN (**Figure 18**). La perte d'hétérochromatine est observée quand les deux voies RNAi-dépendante et indépendante sont altérées.

Ainsi au niveau de la région du déterminisme sexuel, les facteurs de transcription Atf1/Pcr1, appartenant à la famille ATF/CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding protein) guident la formation d'hétérochromatine *via* leur interaction avec une séquence « silencer » dénommée REIII (située en amont du locus *mat3-M*). Cette fixation permet alors le recrutement des protéines clés du *silencing* de l'hétérochromatine présentées précédemment et que sont les HDACs, Clr3, Clr6 et Sir2, l'HMT Clr4 et les protéines de type HP1 (Jia *et al.*, *Science*, 2004 ; Noma *et al.*, *Nat Gen*, 2004 ; Yamada *et al.*, *Mol Cell*, 2005). De façon similaire, la protéine Taz1 de la famille TRF (TTAGGG Repeat Factor) se fixe directement aux répétition télomériques et y recrute le complexe SHREC (*Snf2/Hdac-containing Repressor Complex*) constitué d'HDAC et la protéine Swi6 (Kano et *al.*, *Curr Bio*, 2005 ; Hansen *et al.*, *NAR*, 2006 ; Sugiyama *et al.*, *Cell*, 2007).



**Figure 18: Mécanismes d'initiation de la formation d'hétérochromatine aux différentes régions d'hétérochromatine constitutives chez *S. pombe***

Au niveau des télomères et de la région du déterminisme sexuel, Taz1 et Atf1/Pcr1, participent respectivement à la formation d'hétérochromatine en parallèle du RNAi. Au niveau des centromères, ce phénomène dépend uniquement du RNAi. Chr : chromosome. Image modifiée à partir du manuscrit de thèse du Dr. Todeschini.

De façon intéressante, l'hétérodimère Chp1-Tas3 a été identifié comme ayant une existence en dehors du complexe RITS au niveau des régions télomériques et de celle du déterminisme sexuel. Son association avec ces régions ne dépend pas, en effet, de la présence d'Ago1, ni de celle de Dcr1 (Petrie *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2005). Il semble donc agir en dehors de la voie classique du RNAi. Ce complexe est recruté au niveau de la séquence REIII de la région du déterminisme sexuel, mais il n'a pas été identifié comme ayant un rôle additionnel ni dans l'établissement, ni dans la maintenance de l'hétérochromatine à cette région (Petrie *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2005). Une hypothèse est que le complexe Chp1-Tas3 pourrait constituer un pool de réserve facilement mobilisable par le RNAi dans le cadre de ses fonctions. Au niveau télomérique, ce complexe a été suggéré comme contribuant au *silencing* post-transcriptionnel de façon RNAi-indépendante, mais son mécanisme d'action est encore inconnu (Hansen *et al.*, *NAR*, 2006 ; DeBeauchamp *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2008 ; Schalch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2011).

### 3.5.2 Au niveau des rDNAs

Peu d'études ont investigué le mode d'assemblage de l'hétérochromatine au niveau des rDNAs. L'exploitation du phénomène PEV a mis en évidence l'implication du RNAi dans le *silencing* du gène rapporteur inséré au niveau des rDNAs (Thon et Verhein-Hansen, *Genetics*, 2000 ; Shankaranarayana *et al.*, *Curr Bio*, 2003 ; Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005). Par ailleurs, l'analyse à large échelle du profil de distribution de certains facteurs du RNAi dans le génome, a révélé des observations surprenantes (Cam *et al.*, *Nat Gen* – 2005). Premièrement, Rdp1 dont la présence est enrichie au niveau du gène rapporteur, ne semble pas se localiser de manière endogène au niveau des rDNAs. Deuxièmement, Ago1 et les siRNAs d'une part et la marque H3k9me de l'autre, semblent avoir une localisation presque antinomique à l'échelle de l'unité ribosomale. L'ensemble de ces observations suggèrent : i) tout comme au niveau des régions télomériques et de celle du déterminisme sexuel, il pourrait y avoir plusieurs mécanismes impliqués dans la formation d'hétérochromatine au niveau des rDNAs, dont celui du RNAi ; ii) le RNAi pourrait exercer une autre fonction au niveau des rDNAs, qui n'est pas lié à la déposition de la marque répressive H3K9me. L'implication du RNAi dans la maintenance du nombre d'unités ribosomales a d'ailleurs été étudiée dans le contexte de la réplication (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). Je détaillerai plus précisément cet aspect dans le chapitre 3 car il a également constitué l'un des objectifs de mon projet de recherche.

### 3.5.3 Au niveau des gènes méiotiques

La protéine Mmi1 (pour *Meiotic mRNA Interception 1*) est une protéine de fixation à l'ARN, qui permet de recruter la machinerie de surveillance des ARN (dont l'exosome) aux gènes cibles. Elle joue ainsi un rôle fondamental dans la répression de l'expression de gènes de la différenciation sexuelle dans les cellules au cours du cycle végétatif (Harigaya *et al.*, *Nature* - 2006). Le RNAi a été montré comme participant également au contrôle de la différenciation sexuelle médiée par Mmi1 (Hiriart *et al.*, *EMBO*, 2012). En effet, RITS est recruté à la chromatine et au mRNA naissant des gènes *mei4* et *ssm4* par Mmi1 et sa machinerie de surveillance, au niveau desquels il est impliqué dans leur *silencing* transcriptionnel pendant la phase végétative. Son association à la chromatine n'est que partiellement dépendante de Dcr1 et Clr4. De plus, la liaison de RITS aux gènes et aux mRNA de *mei4* et *ssm4* est perdue dans

des cellules induites en différenciation sexuelle, suggérant bien un rôle du RNAi dans le contrôle de leur expression. Par ailleurs, une analyse transcriptomique à large échelle des cibles de Mmi1 a révélé que Chp1 se localise à une majorité d'entre elle de façon Mmi1-dépendante, soulignant ainsi l'importance du RNAi dans la régulation de l'entrée en différenciation sexuelle (Hiriart *et al.*, *EMBO*, 2012).

### **3.6 Implication du RNAi dans le maintien de la stabilité épigénétique des cellules quiescentes**

Une étude récente a mis en évidence l'implication du RNAi dans le maintien de l'état de quiescence. La quiescence (ou phase G0) se définit comme un état dans lequel la cellule ne se divise plus mais reste métaboliquement active. Dans le cas de *S. pombe*, l'entrée en quiescence est induite par une privation de source d'azote, conjuguée à l'absence de partenaire d'haplotype différent. L'état de quiescence est réversible par définition: la cellule conserve la capacité à reprendre les cycles de divisions mitotiques en fonction des stimuli environnementaux. Sur la base de l'ensemble des données, il a été suggéré que l'accumulation de la RNA Pol I au niveau des rDNAs pendant la phase de quiescence, provoquerait un stress génotoxique et une accumulation de marques d'hétérochromatine sur cette région (Roche *et al.*, *Science*, 2016). Ces phénomènes seraient associés à la diminution de la viabilité des cellules durant un état de quiescence prolongé. Selon le modèle proposé, le RNAi aurait pour rôle de maintenir la stabilité épigénétique du locus des rDNAs. Pour cela, il serait impliqué dans la terminaison de la transcription par la RNA Pol I, ce qui permettrait d'éviter la formation accentuée d'hétérochromatine au niveau des rDNAs (Roche *et al.*, *Science*, 2016).

Comme nous l'aurons vu dans ce premier chapitre, le RNAi est un processus de *silencing* conservé chez différentes espèces, qui s'exerce soit au niveau post-transcriptionnel, soit au niveau transcriptionnel en influençant l'état chromatinien. L'utilisation de *S. pombe* comme modèle d'étude a d'ailleurs permis une meilleure compréhension de la formation d'hétérochromatine avec notamment la découverte d'un rôle direct du RNAi dans ce processus.

En induisant la déposition de marques épigénétiques répressives, le RNAi promeut, voire orchestre selon les espèces, la formation d'hétérochromatine. Par ce biais et au vu des divers rôles protecteurs de l'hétérochromatine, le RNAi concourt donc à préserver la stabilité du génôme. Des données chez *S. pombe* viennent appuyer cette affirmation. En effet, des études ont rapportées que des mutants du RNAi, notamment *ago1Δ*, *dcr1Δ*, et *rdp1Δ*, présentaient des défauts de cohésion des centromères et des problèmes de ségrégation des chromosomes pendant la mitose et la méiose (Hall *et al.*, *PNAS*, 2003 ; Volpe *et al.*, *Chromosome Res*, 2003). Ces observations indiquent que le RNAi est donc requis pour assurer la bonne ségrégation des chromosomes. D'autre part, une autre étude, basée sur l'évaluation de la cytokinèse suite à différents stress, a émis l'hypothèse que Dcr1 et Ago1 participeraient à l'activation ou la maintenance de la voie contrôle (« checkpoint ») du passage en mitose et de la signalisation des dommages à l'ADN (Carmichael *et al.*, *MBC*, 2004).

Afin d'explorer le rôle du RNAi dans la maintenance de la stabilité du génôme, il est nécessaire de rappeler les mécanismes moléculaires déjà élucidés qui jouent un rôle dans ce maintien. L'objectif du chapitre suivant est donc de présenter les processus de réplication et de réparation de l'ADN. J'insisterai plus particulièrement sur les voies de signalisation en lien avec la réponse au stress répliatif, qui a été l'un des thèmes abordés dans le cadre de mon projet de thèse.

# **Chapitre II : Processus moléculaires assurant la réplication et la réparation de l'ADN**

La stabilité du génome est le pivot central du développement et de la survie cellulaire. La molécule d'ADN renferme en effet les instructions nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. Préserver l'intégrité du génome est donc essentiel pour garantir une transmission fidèle du patrimoine génétique. Les altérations du génome peuvent entraîner une instabilité qui est l'un des principaux facteurs étiologiques de la carcinogénèse, des maladies neurodégénératives et des immunodéficiences (pour revue : Ciccia et Elledge, *Mol Cell*, 2010). L'instabilité génomique se manifeste à deux niveaux : i) au niveau nucléotidique, en se traduisant par des substitutions, délétions, ou insertions de base pouvant entraîner des décalages de cadre de lecture ; ii) au niveau chromosomique, en impliquant des échanges de matériel génétique par le biais de réarrangement complexes nommés *GCR* (pour *Gross Chromosomal Rearrangements*), tels que les duplications/délétions/inversions/translocations.

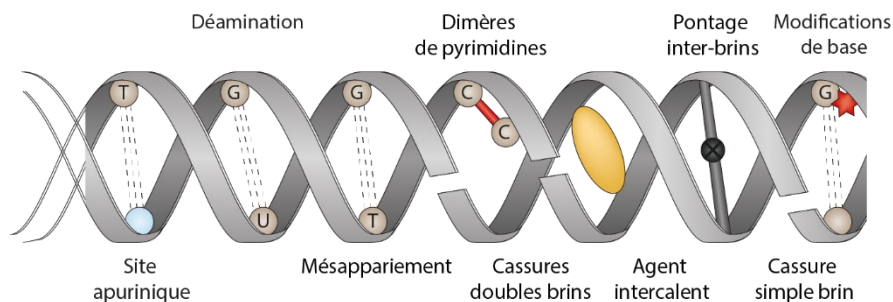
La cellule dispose d'un arsenal de mécanismes moléculaires concourant à maintenir la stabilité du génome. Ils permettent, entre autres, d'assurer la fidélité de la réplication, la ségrégation correcte des chromosomes durant la division cellulaire, la détection et la réparation des lésions de l'ADN. La stabilité génomique est influencée par différents facteurs : la ploïdie, la phase du cycle cellulaire, l'aptitude des systèmes de contrôle/qualité de l'ADN, les processus métaboliques, et surtout l'exposition à des stress endogènes ou exogènes susceptibles d'induire des lésions de l'ADN.

Dans le cadre de mon projet de recherche, j'ai étudié le lien entre le RNAi et les processus de réplication et de réparation de l'ADN. De plus, j'ai investigué le rôle de certains acteurs du RNAi dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées. Le but de ce second chapitre d'introduction en trois parties, est donc de vous présenter les mécanismes connus de prise en charge des fourches de réplication en arrêt. J'introduirai d'abord les systèmes généraux de réparation des dommages à l'ADN. Puis je vous expliquerai le processus de réplication de l'ADN. Enfin, je présenterai les stratégies de prise en charge des fourches bloquées lors d'un stress réplicatif.

## 1. Lésions de l'ADN et mécanismes de réparation

### 1.1 Sources de dommages à l'ADN

Les cellules sont constamment soumises à une grande variété de stress menaçant leur intégrité génomique. Ces menaces peuvent être issues de sources endogènes, telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par le métabolisme, ou de sources exogènes de nature physique comme les rayonnements ultraviolets (UVs) et les radiations ionisantes, ou chimique comme les agents utilisés dans certaines chimiothérapies (methyl-methane sulfonate, temozolomide, mitomycine C, cisplatine, etc). Ces agents génotoxiques peuvent induire des lésions de l'ADN de nature très diverse (**Figure 19**) : mésappariements de nucléotides, modifications de base (alkylation, oxydation, désamination), pontage covalent intra- ou inter-brins, cassure de l'hélice simple brin (SSB pour *Single Strand Break*) ou double brin (DSB pour *Double Strand Break*).



**Figure 19: Exemples de lésions affectant la double hélice d'ADN**

Il existe différents types de dommages pouvant affecter un seul ou les deux brins de la double hélice d'ADN. Ils sont causés par des sources endogènes ou exogènes. Image modifiée de Helleday *et al.*, *Nat Rev Genet*, 2014



## **1.2 Signalisation du dommage et checkpoints cellulaires**

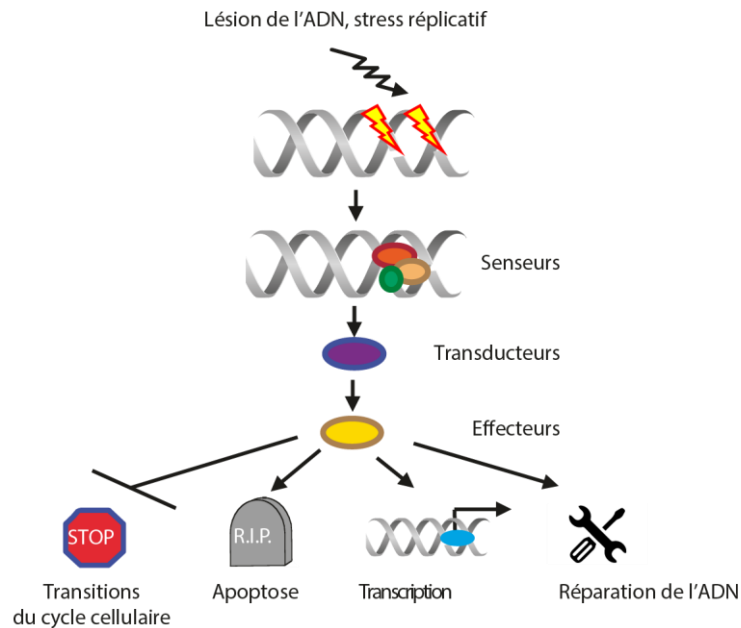
Si les lésions de l'ADN sont non ou mal réparées, elles peuvent engendrer des conséquences délétères comme une instabilité génétique se traduisant par des mutations ou un réarrangement du génome, l'arrêt de la prolifération ou bien la mort cellulaire. Une panoplie de mécanismes, acquis par les cellules au cours de l'évolution, participent à la réponse au stress génomique ou GSR (pour *Genomic Stress Response* ; Hanawalt, *DNA repair*, 2015). Il s'agit d'une désignation plus large qui englobe la réponse aux dommages de l'ADN (ou DDR pour *DNA Damage Response*) mais aussi la réponse aux stress non lésionnels qui affectent la dynamique de la réplication (Cf. section 3.1.1 sur le stress réplicatif). La GSR inclue les mécanismes de surveillance de l'ADN, les voies de réparation ou de tolérance des lésions génomiques ainsi que les points de contrôle de la prolifération cellulaire. L'ensemble des réseaux moléculaires impliqués sont organisés de sorte à évaluer l'intégrité structurale du génome et à coordonner le choix de la voie de réparation avec la progression du cycle cellulaire.

D'un point de vue schématique, la GSR s'organise comme une voie de signalisation classique constituée de capteurs ou « senseurs » détectant les dommages à l'ADN ou les blocages de la fourche de réplication, de médiateurs, transducteurs du signal et de protéines effectrices (**Figure 20**). Il existe différents senseurs en fonction du type de lésions, mais ils ne sont pas encore tous caractérisés. On peut citer par exemple, le complexe XPC-RAD23B (XPC pour *Xeroderma Pigmentosum group C* ; Rad4 chez *S. cerevisiae*, deux homologues Rhp41-42 chez *S. pombe*) chez l'Homme, impliqué dans la reconnaissance de distorsions de l'hélice ADN infligées par les rayonnements UV ou la présence d'adduits, qui sont réparés par excision de nucléotide (voie NER ; Sugawara, *DNA Repair*, 2016). Les cassures simple brin (ou SSBs) sont reconnues par des enzymes de la famille PARP (poly (ADP-ribose) polymerase-1 ; Schreiber *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006). Les cassures double brins (ou DSBs) peuvent être reconnues par différents facteurs indépendants : l'hétérodimère Ku70/Ku80, le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1), certaines enzymes de la famille PARP et l'accumulation du complexe RPA (pour *Replication Protein A* ; Mahaney *et al.*, *Biochem J*, 2009 ; Williams *et al.*, *Biochem Cell Biol*, 2007 ; Schreiber *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006 ; Zou et Elledge, *Science*, 2003). Les blocages de la fourche de réplication, quant à eux, sont signalés, en autres, par le complexe 9-1-1 (RAD9-HUS1-RAD1 ; Ellison et Stillman, *Plos Biol*, 2003) et l'accumulation du complexe RPA. Il est à noter que les DSBs et les fourches bloquées

constituent des sites de genèse d'ADN simples brins (ssDNAs pour *Single Stranded DNA*) recouverts et stabilisés par l'accumulation de RPA (Cf. sections 1.3.3.2 et 3.3).

La détection des lésions de l'ADN active ensuite les médiateurs qui initient la transduction du signal de réponse au stress génotoxique ou réplicatif. Les médiateurs principaux sont des sérine-thréonine kinases appartenant à la famille des PIKK (*Phosphatidylinositol 3-Kinase-like protein Kinases*) : ATR (Rad3 chez *S. pombe*), ATM (Tel1 chez *S. pombe*) et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*, absente chez les levures). De façon très simplifiée et pour n'évoquer que deux types de stress, la voie ATR est activée par le ssDNA recouvert par RPA (fourches bloquées et DSBs), la voie ATM est activée par le complexe MRN (DSBs) et la voie DNA-PK est activée par l'hétérodimère Ku (DSBs ; pour revue : Ciccio et Elledge, *Mol Cell*, 2010).

Les médiateurs vont induire des modifications du paysage épigénétique au niveau du site lésé, nécessaires au recrutement et à la stabilisation de facteurs impliqués dans les processus de réparation. L'exemple le plus caractérisé est la phosphorylation du variant d'histone H2AX sur la sérine 139 ( $\gamma$ H2AX) au niveau des DSBs chez les mammifères (Rogakou *et al.*, *J Biol Chem*, 1998 ; Dickey *et al.*, *Chromosoma*, 2009). On peut citer également la phosphorylation de l'histone H2A sur la sérine 129 chez *S. cerevisiae* (Downs *et al.*, *Nature*, 2000 ; Redon *et al.*, *EMBO Rep*, 2003), et celle sur les sérines 129 et 128 des histones H2A.1 et H2A.2 respectivement, chez *S. pombe* (Nakamura *et al.*, *MCB*, 2004). D'autre part, les médiateurs principaux vont induire directement ou par l'intermédiaire de Chk1 (*Checkpoint Kinase 1*) et Chk2 (*Checkpoint Kinase 2*, Cds1 chez *S. pombe*) une cascade de phosphorylation conduisant à la transmission du signal et à l'activation de différentes voies intracellulaires. Différentes issues sont possibles en fonction du degré d'atteinte de l'intégrité génomique : ralentissement ou arrêt du cycle cellulaire *via* l'inhibition de l'activité des CDKs (*Cyclin Dependant Kinase*), enclenchement de la mort par apoptose ou activation des systèmes de réparation. Ces réponses s'accompagnent de la stimulation de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans ces processus (**Figure 20**). Chez les mammifères, la protéine p53 (absence d'homologue chez *S. pombe*) joue également un rôle dans la modulation de ces réponses (pour revue : Attardi et Brady, *J Cell Sci*, 2010).



**Figure 20 : La signalisation de la réponse au stress génomique**

Schéma représentant le réseau de transduction du signal généré par la présence d'un stress génotoxique (lésion de l'ADN, blocage de l'avancée de la fourche de réplication). Le stress génomique est détecté par des senseurs (ex : le complexe MRN pour la détection des cassures double brin), puis l'information est transmise en cascade à des transducteurs (ex : ATM et ATR qui activent les checkpoints kinases Chk2 et Chk1) et des effecteurs (généralement les protéines cibles de Chk1/Chk2, telles que p53 et Wee1). Plusieurs issues sont possibles suites à l'activation de la voie : arrêt du cycle cellulaire, activation de l'apoptose, réparation de la lésion, et activation de la transcription de certains gènes impliqués dans ces processus. Image modifiée de Zhou et Elledge, *Nature*, 2000.

Il existe classiquement trois points de contrôle (ou « checkpoints ») de l'intégrité du génome au cours du cycle cellulaire. Leur activation a pour but d'assurer une synthèse fidèle du génome avant l'entrée en mitose. Leur action passe par la modulation de l'activité des CDK, essentiellement *via* des modifications post-traductionnelles. Le *checkpoint* G1/S empêche l'entrée de la cellule en phase S, si des lésions importantes surviennent en phase G0/G1. La phase G1 est très courte chez *S. pombe* et donc l'existence de ce *checkpoint* n'a pas clairement été mis en évidence dans ce modèle. Si des atteintes du génome interviennent au cours de la réplication, le *checkpoint* intra-S permet de ralentir ce processus. Des études chez les levures, ont montré que cet effet est lié à l'inhibition de l'activation tardive de certaines origines de réplication et à la stabilisation des fourches en cours de progression (Tercero et Diffley, *Nature*, 2001 ; Iyer et Rhind, *Plos Genet*, 2017). Si des lésions subsistent en phase G2, le *checkpoint*

G2/M bloque ou retarde l'entrée en mitose. Ce checkpoint a très bien été caractérisé chez *S. pombe* (Voir chapitre *DNA checkpoints*, *J Cell Sci*, 2003).

## **1.3 Mécanismes de réparation**

### **1.3.1 Généralités**

La réponse cellulaire peut être activée au-delà d'un certain seuil de dommages détectés (Hanawalt, chez les éditeurs Greim et Albertini, *Royal Society of Chemistry*, 2012). Il existe une voie de réparation adaptée spécifiquement à chaque type de lésion. Parfois, certaines voies peuvent entrer en compétition pour prendre en charge la même lésion. Chaque étape dans une voie de réparation donnée peut également produire un intermédiaire qui constitue une lésion (par exemple SSB ou DSB) et qui est susceptible de faire intervenir une enzyme affiliée à une autre voie de réparation. De plus, il se peut que certains types de lésions, comme les DSBs, doivent faire l'objet d'une prise en charge plus rapide que pour d'autres.

La restauration de la réplication suite à un blocage de la fourche sera traitée individuellement à la fin de ce chapitre. Je vais brièvement décrire dans cette section, les cinq voies principales de réparation des dommages à l'ADN, conservées de la levure à l'Homme : la réparation des mésappariements (MMR, pour *MisMatch repair*), la réparation par excision de nucléotide (NER, pour *Nucleotide Excision Repair*), la réparation par excision de base (BER, pour *Base Excision Repair*), la réparation par la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ, pour *Non Homologous End Joining*) et la recombinaison homologue (HR). Elles mettent en jeu plusieurs protéines et nécessitent toutes l'excision, la resynthèse du brin d'ADN endommagé et la ligation pur assurer la continuité du brin.

### **1.3.2 Réparation des lésions simple-brin de l'ADN**

La réparation des mésappariements (MMR) intervient pour réparer les erreurs d'insertions, de délétions ou de mésappariements des nucléotides, qui échappent à l'activité correctrice de certaines DNA polymérases lors de la réplication ou bien qui apparaissent lors de la recombinaison méiotique. La réparation par excision de nucléotide (NER) est sollicitée pour éliminer les lésions qui altèrent la structure de l'hélice d'ADN, telles que les pontages

covalents induits par les radiations UVs ou des agents chimiques comme la cisplatine. La réparation par excision de base (BER), quant à elle, permet de réparer les lésions qui n'altèrent pas le squelette de l'hélice. Il peut s'agir de résidus uracile incorporés par erreur ou générés par la désamination de la cytosine, ou bien de nucléotides dont la base a été modifiée (alkylation, oxydation, déamination) par les ROS ou des agents chimiques.

Je fais le choix de ne pas décrire les processus moléculaire associés à ces différents mécanismes de réparation car ils n'ont pas fait l'objet d'étude ou d'analyse durant ma thèse.

### **1.3.3 Réparation des cassures double-brin de l'ADN**

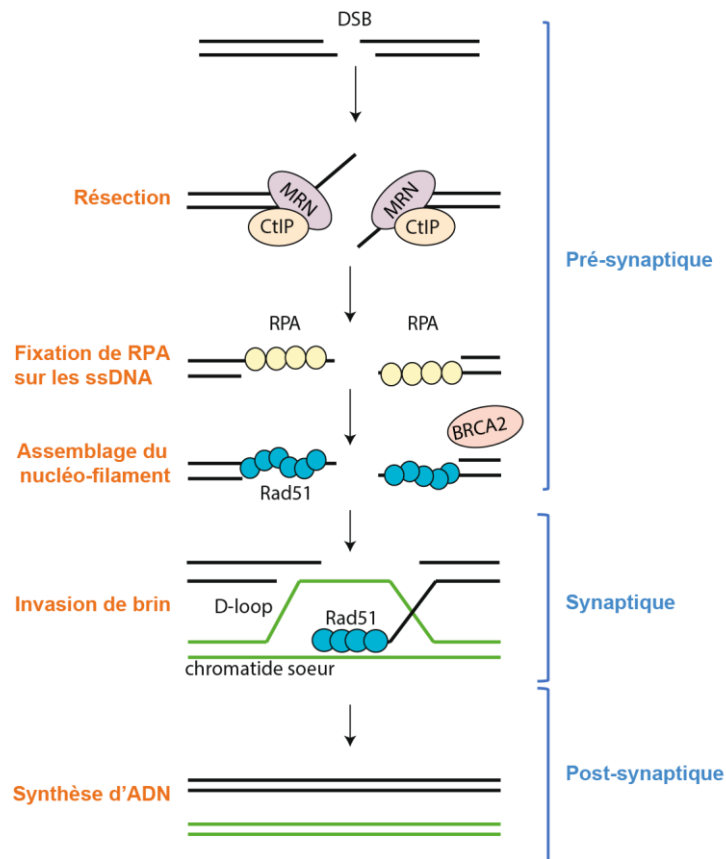
#### **1.3.3.1 Généralités**

Les DSBs représentent l'une des menaces les plus délétères pour la stabilité du génome (Pfeiffer *et al.*, *Mutagenesis*, 2000). La formation de DSBs peut faire partie d'un processus hautement régulé et programmé, comme c'est le cas lors des recombinaisons méiotiques (Keeney et Neale, *Biochem Soc Trans*, 2006), de la détermination sexuelle chez les levures (Beach, *Nature*, 1983 ; Kostriken *et al.*, *Cell*, 1983 ; Holmes *et al.*, *Mol Cell Bio*, 2005) ou de la recombinaison V(D)J immunitaire chez les vertébrés (Schatz et Li, *Nature*, 2011). Les DSBs peuvent être également générés lors d'un stress de la cellule, telle qu'une exposition aux radiations ionisantes ou suite à un blocage de la fourche de réplication. Elles sont prises en charge par deux voies majeures : la recombinaison homologue et la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ). Si une copie double brin de la séquence lésée est disponible, la réparation de la DSB se fait préférentiellement par HR, sinon elle s'opère par le mécanisme de NHEJ. Ce dernier est considéré comme étant un processus infidèle et mutagène, qui ne restaure pas toujours la séquence initiale de l'ADN endommagé (contrairement à la HR) mais seulement sa continuité. Le choix entre la NHEJ et la HR se basant essentiellement sur la disponibilité d'une matrice, il dépend donc de la progression du cycle cellulaire. La HR prévaut pendant les phases S et G2. La voie NHEJ, quant à elle, peut être activée durant l'ensemble du cycle cellulaire, mais prédomine pendant la phase G1 (Aylon *et al.*, *EMBO J*, 2004 ; Ira *et al.*, *Nature*, 2004 ; Ferreira et Cooper, *Gene Dev*, 2004).

Au cours de ma thèse, j'ai obtenu des données indiquant l'implication de certains acteurs du RNAi dans le redémarrage par HR d'une fourche de réplication bloquée. Je fais donc le choix de détailler uniquement le processus moléculaire associé à cette voie de réparation.

### 1.3.3.2 *La réparation par la recombinaison homologue (HR)*

La réparation de la DSB par HR se base sur un échange de séquences ADN identiques entre deux molécules. Elle nécessite donc la disponibilité d'une copie double brin intacte (le donneur). Celle-ci peut provenir de la chromatide sœur ou du chromosome homologue chez une cellule diploïde, ou bien d'une région située ou non sur le même chromosome dans le cas de séquences homologues répétées. Le processus moléculaire de la HR suit le schéma général suivant (**Figure 21**) : 1) la phase pré-synaptique qui comprend la reconnaissance de la cassure, la résection des extrémités et l'assemblage du filament de Rad51, 2) la phase synaptique qui se réfère à la recherche du duplex homologue et à son invasion par le filament présynaptique aboutissant à la formation d'une structure appelée « D-loop » (pour *Displacement loop*), et 3) la phase post-synaptique durant laquelle l'ADN est resynthétisé en utilisant l'ADN donneur intact comme matrice, puis les intermédiaires de recombinaison formés à l'étape précédente sont résolus. Le modèle de *S. cerevisiae* a permis d'élucider un grand nombre des mécanismes moléculaires impliqués (retrouvés aussi chez *S. pombe* et l'Homme), que je vais évoquer ci-dessous.



**Figure 21 : Modèle de réparation d'une cassure double brin par la recombinaison homologue**

Le processus de réparation d'une cassure double brin par la recombinaison homologue peut se décomposer en trois phases : 1) phase pré-synaptique incluant la résection et la formation du nucléo-filament ; 2) phase synaptique qui aboutit à la formation de la D-loop ; 3) phase post-synaptique comprenant la résolution des intermédiaires de recombinaison et la resynthèse de la région manquante. Image produite en s'inspirant de Brandsma et Gent, *Genome Integr*, 2012.

### ***La phase pré-synaptique***

L'étape de résection fait suite à la reconnaissance du site de cassure par le complexe MRN (MRX chez *S. pombe*). Elle consiste en une dégradation de part et d'autre de la cassure, du brin d'ADN orienté dans le sens 5'-3', selon un procédé en deux étapes (Mimitou et Symington, *Nature*, 2008 ; Takeda *et al.*, *Mol Cell*, 2007 ; Limbo *et al.*, *Mol Cell*, 2007 ; Nimonkar *et al.*, *Gene Dev*, 2011). Elle débute d'abord par une dégradation limitée s'étendant sur environ 100 à 300 pb, et impliquant l'action conjointe du complexe MRN (Mre11/Rad50/Xrs2) et de Sae2 (Ctp1 chez *S. pombe*, CtIP chez les mammifères). La résection devient ensuite extensive, en exposant jusqu'à plusieurs milliers de bases d'ADN simple brin



(ssDNA). Cette phase peut être accomplie par deux voies parallèles, d'une part celle d'Exo1 et d'autre part celle de Sgs1 (BLM chez l'homme et Rqh1 chez *S. pombe*) et Dna2. Les ssDNAs générés sont recouverts par RPA dès l'initiation de la résection, ce qui les protège contre la dégradation et prévient la formation de structures secondaires pouvant entraver la fixation de Rad51 (Chen *et al.*, *Mol Cell*, 2013). De plus, RPA permet de stimuler la résection extensive (Cejka *et al.*, *Nature*, 2010 ; Chen *et al.*, *Mol Cell*, 2013) et de recruter ATR.

La formation du nucléo-filament, issu de l'assemblage de Rad51 (Rad21 chez *S. pombe*) avec le ssDNA, est nécessaire pour conférer une capacité recombinogène au ssDNA, indispensable à l'échange de brin. Le chargement de la recombinaison Rad51 sur le ssDNA doit vaincre l'affinité plus forte de RPA pour le ssDNA. Pour cela, le chargement est opéré par des médiateurs qui permettent de déstabiliser l'interaction entre RPA et le ssDNA (pour revue : Krejci *et al.*, *NAR*, 2012). Il s'agit de Rad52 chez *S. cerevisiae*, Rad22 *S. pombe* chez et BRCA2 ainsi que DSS1 chez les vertébrés.

### ***La phase synaptique***

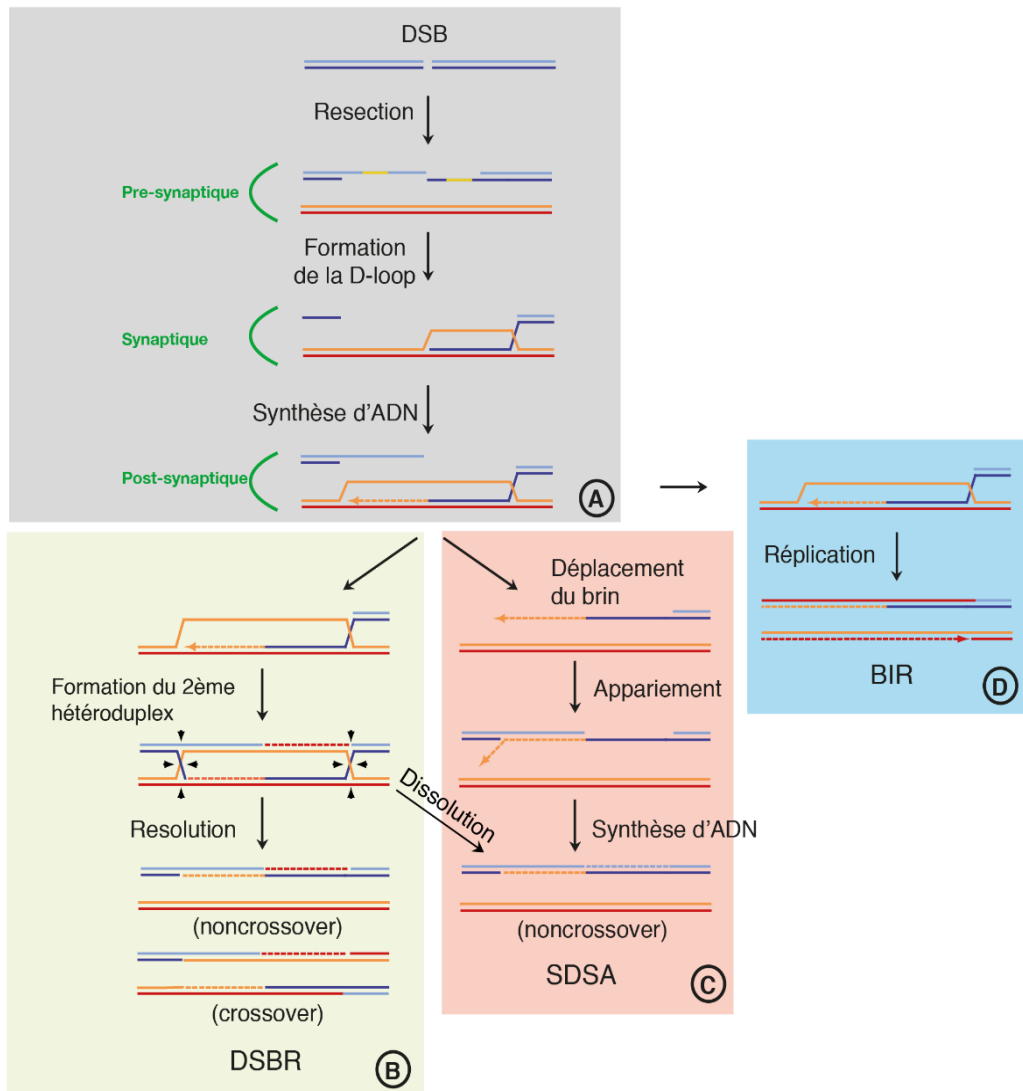
Une fois le nucléo-filament assemblé, commence la recherche d'homologie guidée par Rad51, selon un mécanisme encore très peu caractérisé. L'ensemble du génome peut être scanné et cette étape peut donc s'apparenter à la recherche d'une aiguille dans la botte de foin. Une fois le duplex homologue identifié, l'extrémité 3' du ssDNA envahit le duplex, s'apparie avec le brin complémentaire du donneur formant un hétéroduplex et déplace le brin non-complémentaire (**Figure 21**). Cette étape est catalysée par des facteurs qualifiés de « médiateurs de la recombinaison » dotés, pour la plupart, d'une activité ATPase et d'une capacité de remodelage de la chromatine, comme Rad54 chez *S. cerevisiae* (Petukhova *et al.*, *J Biol Chem*, 1999). L'étape d'invasion aboutit à la formation d'une structure appelée « D-loop ».

### ***La phase post-synaptique***

La HR peut s'accomplir selon différents modèles illustrés dans la **Figure 22**. La synthèse d'ADN peut s'opérer en utilisant un seul ou les deux brins du duplex homologue comme matrice. Elle peut s'accompagner ou non d'un *crossover*, c'est-à-dire une translocation entre la molécule initialement cassée et la molécule qui sert de matrice pour la réparation. De tels événements sont néanmoins beaucoup plus fréquents lors de la méiose Elle peut concerner tout le chromosome ou bien se limiter au segment qui est sensé s'apparier avec le ssDNA. À la fin de cette phase, les différents intermédiaires de recombinaison doivent être résolus en



impliquant des clivages de brins, de sorte à obtenir deux jeux de duplexes ADN ; Ce mécanisme s'accompagne d'une ligature des segments synthétisés afin d'obtenir des brins d'ADN continus.



**Figure 22: Les différents modèles proposés d'accomplissement de la phase post-synaptique de la recombinaison homologue**

- A) Les phases principales du déroulement de la HR comme décrite en **Figure 21** et aboutit à l'invasion d'un duplex donneur par l'ADN simple brin envahissant (ssDNA).
- B) Modèle DSBR (pour *Double Strand Break Repair*): l'extrémité 3' du brin non-envahissant s'apparie au brin déplacé du duplex donneur qui lui sert de matrice pour la synthèse d'ADN. L'intermédiaire formé contient deux hétéroduplexes encadrés par deux arrangements structurels appelés jonctions de Holliday. La résolution de cette structure peut produire ou non des événements de crossovers.  
(Voir page suivante)

- C) Modèle SDSA (pour *Synthesis Dependant Strand Annealing*) : Le brin envahissant et nouvellement synthétisé se dissocie de l'hétéroduplex et s'apparie avec le simple brin exposé de la deuxième extrémité de la DSB. La réparation se poursuit par la synthèse de l'ADN sur les segments restants.
- D) Modèle BIR (pour *Break-Induced Replication*) : Ce mécanisme est proposé pour la réparation des DSBs lorsqu'une seule extrémité est disponible (par exemple au niveau des télomères érodés ou lors d'un redémarrage de la fourche de réplication cassée). Il implique la conversion de la D-loop en une fourche de réplication. La synthèse du brin envahissant peut s'effectuer par migration de la D-loop et peut se poursuivre sur de très grandes régions d'ADN. Dans ce cas, la réplication est alors décrite comme étant non conservative et peut résulter en une perte d'hétérozygoté. Image issue de la revue Krejci *et al.*, *NAR*, 2012.

## 2 Mécanismes généraux de la réplication de l'ADN

Un des objectifs de ma thèse a consisté à investiguer l'impact du RNAi sur la progression des fourches de réplication au niveau de la région des rDNAs et au niveau d'un locus spécifique. Dans cette section, je reviendrai donc sur la définition de la fourche de réplication et présenterai les éléments constitutifs de cette machinerie. Je reviendrai aussi sur le déroulement de la réplication, en abordant son contexte chromatinien et les origines à partir desquelles émanent les fourches.

### 2.1 Généralités

À chaque cycle cellulaire, le matériel génétique doit être fidèlement dupliqué afin d'être transmis de manière équitable et identique aux cellules filles. Le mécanisme de production d'une nouvelle copie du génome est appelé réplication. Il est assuré par une machinerie complexe de protéines appelées « réplisome », dont l'ADN polymérase (DNA Pol) est l'élément central responsable de la synthèse d'un nouveau brin d'ADN. Que ce soit chez les eucaryotes ou procaryotes, la réplication est de nature semi-conservative car chacun des brins de la molécule d'ADN parentale est utilisé comme matrice pour synthétiser un nouveau brin complémentaire (Meselson et Stahl, *PNAS*, 1957). Ainsi, chaque cellule-fille hérite d'une double hélice d'ADN constitué d'un brin parental et d'un brin néosynthétisé. Le processus de réplication requiert un déroulement de la molécule d'ADN en amont de la DNA Pol, qui expose ainsi les deux brins et permet leur lecture ainsi que l'incorporation des nucléotides

complémentaires. Un tel procédé est à l'origine d'une configuration spatiale asymétrique en forme de « Y » de la région répliquée. L'ensemble, constitué du réplisome et de la région d'ADN cible, est ainsi désigné par l'expression « fourche de réplication ».

Chez beaucoup d'eucaryotes, les régions d'euchromatine sont les premières à être répliquées, alors que les régions d'hétérochromatine le sont plus tardivement au cours la phase S. Par contre, chez *S. pombe* l'hétérochromatine des régions subtélomériques est la seule à être associée à une réplication tardive. Celle des régions péricentromériques et du déterminisme sexuel, contient des origines de réplication activées en début de phase S (Kim et Huberman, *EMBO J*, 2001). Concernant les rDNAs, des données chez l'Homme indiquent que les unités transcriptionnellement réprimées sont répliquées plus tardivement en phase S que leurs consœurs transcriptionnellement activées (Li *et al.*, *EMBO J*, 2005 ; Schlesinger *et al.*, *Genes Dev*, 2009). En revanche, chez *S. pombe* et *S. cerevisiae*, la réplication des rDNAs est initiée en début de phase S indépendamment du statut transcriptionnel (Kim et Huberman, *EMBO J*, 2001 ; Pasero *et al.*, *Genes Dev*, 2002).

## **2.2 Composition du réplisome**

Le réplisome est une machinerie complexe composée de protéines spécialisées dont la coopération coordonne la réplication sur les deux brins matrices. Sa composition de base comprend essentiellement la DNA Pol, la primase, les hélicases, le trimère PCNA et des protéines d'interaction avec l'ADN simple brin permettant de stabiliser le brin dit retardé. Le réplisome est également associé à des facteurs qui régulent sa fonction, maintiennent sa structure ou qui sont impliqués dans les mécanismes de surveillances des lésions de l'ADN. Sa composition peut ainsi évoluer au cours de la progression de la réplication, en fonction du contexte chromatinien ou des obstacles rencontrés.

Je vais détailler la fonction des éléments cœur du réplisome dans la suite de cette section. Je ferai aussi référence à d'autres facteurs dans l'ensemble du chapitre. Pour plus d'informations, je conseille le lecteur de se référer à la table 1 de la revue rédigée par Tabancay et Forsburg (*Current Topics in Developmental Biology*, 2006) qui liste l'ensemble des facteurs constitutifs ou impliqués dans la formation du réplisome, ainsi que leur conservation entre la levure et les métazoaires.

La DNA Pol est une holoenzyme possédant une structure conservée, constituée de plusieurs sous-unités protéiques stabilisées par la liaison de cofacteurs ioniques métalliques (Klinge *et al.*, *EMBO J*, 2009 ; Netz *et al.*, *Nat Chem Biol*, 2011). L'ensemble forme une structure semi-fermée qui se charge sur le brin matrice et peut s'y déplacer. Elle possède une activité de pyrophosphorolyse qui est à la base de son rôle de polymérase nucléotidique, et éventuellement une activité exonucléase 3'→5' impliquée dans la correction sur épreuves ou « proofreading ». De plus, la DNA Pol II polymérase possède la capacité de « lire » le brin matrice et d'incorporer le bon nucléotide au brin en cours de synthèse. Cette sélectivité se baserait sur l'acquisition d'un changement conformationnel thermodynamiquement favorable de la DNA Pol, prenant en compte les interactions du nucléotide avec le brin matrice et le site catalytique (Johnson, *J Biol Chem*, 2008 ; Johnson, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010 ; Freudenthal *et al.*, *Cell*, 2013). Il existe sept familles de polymérases (A, B, C, D, X, Y, et celle des transcriptases inverses) déterminées par des analyses phylogénétiques d'homologies de séquences (pour revue : Johansson et Dixon, *CSH Persp.*, 2011). La cellule procaryote ou eucaryote peut contenir différents types de DNA Pol appartenant à plusieurs familles. La cellule humaine peut être dotée de 18 types de DNA Pol (source : base de données *GeneCards*) tandis que la levure fissipare en contient 12 (source : base de données *PomBase*) dont 11 sont homologues à celles de *S. cerevisiae* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\phi$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  et Rev1) et une lui est spécifique ( $\kappa$ ). Les DNA Pol se distinguent aussi en polymérases répliquatives ou alternatives, par leurs fonctions moléculaires et leurs propriétés catalytiques, à savoir, la fidélité et la processivité (voir table 1, revue Skoneczna *et al.*, *FEMS Microb. Rev*, 2015). La fidélité désigne la capacité de la DNA Pol à insérer le nucléotide complémentaire à celui du brin matrice. Le degré de processivité se réfère au nombre de nucléotides que peut ajouter la DNA Pol une fois liée au brin matrice. Ainsi les polymérases répliquatives sont les plus fidèles et appartiennent en général aux familles A et B. Ses représentants les plus étudiés sont les DNA Pol  $\alpha$ , DNA Pol  $\epsilon$  et DNA Pol  $\delta$ , qui assurent classiquement la réplication de l'ADN chez les eucaryotes. Leur haute-fidélité est garantie par leur capacité de section du nucléotide et de *proofreading*. Elles peuvent en effet se rendre compte du mésappariement du dernier nucléotide, l'exciser et incorporer celui approprié. Malgré cela, il est estimé que les polymérases répliquatives réalisent en moyenne une erreur (mésappariement, délétion, insertion) tous les  $10^5$  à  $10^7$  nucléotides incorporés selon la polymérase et le type d'erreur (Shcherbakova *et al.*, *J Biol Chem*, 2003 ; Fortune *et al.*, *J Biol Chem*, 2005 ; voir table 1, revue Skoneczna *et al.*, *FEMS Microb. Rev*, 2015), et qui est en général corrigée par le système de réparation MMR. Les polymérases alternatives, quant à elles,

sont les moins fidèles, peu processives et retrouvées principalement parmi les familles X et Y. Elles sont impliquées dans les processus de réparation de l'ADN, notamment le mécanisme appelé « Translesion Synthesis » (TLS, Cf. section 3.2).

La progression de la fourche de réplication nécessite un déroulement de la double hélice d'ADN afin d'exposer les matrices génomiques simple brin. Chez les eucaryotes, cette activité est prise en charge par les hélicases MCM (acronyme pour *Mini-Chromosome Maintenance*) appartenant à la famille des ATPases de type AAA (AAA pour *ATPases Associated with a variety of cellular Activities*). Ces enzymes forment un complexe hexamérique appelé Mcm2-7 (Mcm2, Mcm3, Mcm4, Mcm5, Mcm6 et Mcm7 [Maine *et al.*, *Genetics*, 1984 ; Takahashi *et al.*, *Mol Biol Cell*, 1994]), qui utilise l'hydrolyse de l'ATP pour réaliser sa fonction. Pour être fonctionnel, l'héxamère d'hélicases nécessite des facteurs additionnels incluant Cdc45 et le complexe GINS (go-ichi-ni-san), l'ensemble formant ainsi le complexe CMG (Cdc45-MCM-GINS). Ces facteurs sont également importants pour coupler l'activité des hélicases avec la réplication en interagissant avec les DNA Pol par l'intermédiaire de protéines différentes selon qu'il s'agisse du brin avancé ou retardé (Gambus *et al.* *EMBO J*, 2009 ; Lou *et al.*, *Mol Cell*, 2008). Le déroulement de la double hélice génère des tensions topologiques, qui peuvent induire la formation de supertours positifs (dans le sens de la double hélice) en amont de la fourche ou de pré-caténas en aval de de la fourche. Ces contraintes peuvent interférer avec la progression de la fourche. Elles sont résolues par l'action des topoisomérases de type I ou II, générant respectivement des cassures simples ou double brin de l'ADN.

L'homotrimère PCNA (pour *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) forme une structure en anneau qui encercle le brin matrice. En interagissant avec la DNA Pol, il permet de stabiliser l'enzyme sur le brin matrice et ainsi d'améliorer sa processivité (Fukuda *et al.*, *J Biol Chem*, 1995 ; Johansson *et al.*, *J Biol Chem*, 2004). D'autre part, PCNA constitue un élément de transduction principal permettant de moduler l'activité du réplisome en fonction de circonstances spécifiques. Cela peut passer par des interactions protéiques ou des modifications post-traductionnelles. Par exemple, il a été montré que la mono-ubiquitination induite après une exposition des cellules à des agents génotoxiques, permettait d'orienter l'affinité de l'homotrimère vers une polymérase alternative. Ce changement de polymérase au sein du réplisome permettrait de contourner une lésion présente sur le brin matrice (Hoegge *et al.*, *Nature*, 2002 ; Kannouche *et al.*, *Mol Cell*, 2004). D'autres modifications de PCNA par des protéines impliquées dans la signalisation des dommages à l'ADN ont été mises en évidence.

L'ensemble des données indique que ces modifications permettraient de contrôler l'activité du réplisome en fonction de la voie de réparation de l'ADN activée durant la réplication.

Durant sa progression le long du génome, la fourche de réplication est escortée par des facteurs additionnels constituant le complexe de protection de la fourche (FPC pour *Fork Protection Complex*). FPC est un hétérodimère composé de : Timeless (Tim) et Tipin chez les métazoaires, Tof1 et Csm3 chez *S. cerevisiae*, et Swi1 et Swi3 chez *S. pombe*. Comme son nom l'indique, ce complexe maintient l'intégrité du réplisome et participe à faciliter sa progression, notamment au niveau de certaines régions délicates et des sites d'interaction avec les cohésines (pour revue : Leman et Noguchi, *Cell Cycle*, 2012). Des interactions avec différents éléments du réplisome ont pu être mises en évidence. En cas d'arrêt de la fourche de réplication provoqué par un stress réplcatif, le complexe FPC permet de stabiliser le réplisome afin d'éviter le démantèlement de celui-ci et participe à l'activation la signalisation du *checkpoint* en servant de plateforme de recrutement (Noguchi *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2003 ; Unsal-Kaçmaz *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2007 ; Leman et Noguchi, *Cell Cycle*, 2012).

## **2.3 Le déroulement de la réplication**

La réplication se déroule selon le même procédé chez les eucaryotes et les procaryotes. Elle débute par une phase d'initiation qui comprend : i) la reconnaissance d'une origine de réplication, ii) l'ouverture de la double hélice d'ADN, iii) l'assemblage du réplisome. Il s'en suit une phase d'élongation (ou de polymérisation) qui correspond à la synthèse des nouveaux brins d'ADN par la DNA Pol. Cette étape nécessite la synthèse de courts segments d'ARN comme amorces pour la DNA Pol (pour revues : Barry et Bell, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006 ; Leman et Noguchi, *Genes*, 2013). Enfin, l'étape de terminaison a lieu quand l'ensemble du génome a été dupliqué.

### **2.3.1 Initiation**

La réplication de l'ADN débute au niveau de sites appelés origines de réplication qui respectent certains critères. Celles-ci doivent avoir été autorisées (étape de « licensing ») en fin de mitose et durant la phase G1, puis activées (étape de « firing ») durant la transition G1-S (**Figure 23A**). D'abord, le complexe ORC, un hexamère composé des protéines Orc1 à Orc6,

reconnaît les origines de réplication sur lesquelles il reste fixé durant tout le cycle cellulaire. En fin de mitose et durant la phase G1, les facteurs de chargement Cdt1 et Cdc6 (Cdc18 chez *S. pombe*) s'associent avec ORC et permettent le recrutement de deux hexamères Mcm2-7. Le complexe de pré-réplication ou pre-RC (pour *Pre-Replication Complex*) ainsi formé par les facteurs de chargement et les hexamères Mcm2-7, signifie le « licensing » de l'origine de réplication (Diffley *et al.*, *Cell*, 1994 ; Coleman *et al.*, *Cell*, 1996, Nishitani *et al.*, *Nature*, 2000 ; Remus *et al.*, *Cell*, 2009). À la transition G1/S le complexe pre-RC est converti en complexe de pré-initiation ou pre-IC (pour *Pre-Initiation Complex*) suite à la phosphorylation des hexamères Mcm2-7 par les protéines kinases DDK (*Dbf4-Dependant Kinase*) et CDK (*Cyclin Dependant Kinase*, [revue Labib, *Genes*, 2011]). Ce complexe est caractérisé par le détachement des protéines Cdt1 et Cdc6 et le recrutement de multiples facteurs dont les composant du complexe CMG permettant l'activation catalytique des hélicases. L'assemblage du pre-IC marque l'activation de l'origine (ou « firing ») et permet l'ouverture de la double hélice d'ADN. Les brins d'ADN simples brins sont protégés et stabilisés par les protéines RPA (*Replication Protein A*) qui préviennent ainsi la formation de structures secondaires inhibitrices de la progression des DNA Pol. Il s'en suit le recrutement des autres constituants du réplisome, dont les DNA Pol, conduisant ainsi au démarrage de la réplication, selon un mode bidirectionnel à partir de l'origine. Cela s'illustre par la formation d'une « bulle » de réplication dans laquelle deux fourches émergent et progressent en direction opposée (**Figure 23A**).

### 2.3.2 Élongation

D'un point de vue biochimique, la polymérisation consiste en l'adjonction d'un nucléotide libre (dNTP) au dernier nucléotide du brin en cours de synthèse. Cela passe par la formation d'une liaison phosphodiester covalente entre le mono-phosphate en 5' du dNTP et l'extrémité 3' OH libre du brin en cours de synthèse. La libération du pyrophosphate (ou diphosphate) catalysée par la DNA Pol, expose le mono-phosphate en 5' du dNTP et génère l'énergie nécessaire pour la création de la liaison covalente.

La synthèse des nouveaux brins d'ADN ne s'effectue pas de manière symétrique mais dans des directions opposées au niveau de la fourche de réplication. Cela s'explique par deux raisons : i) l'appariement de nature anti-parallèle des deux brins d'ADN pour former une double hélice, ii) la synthèse des nouveaux brins uniquement dans le sens 5'→3' par les DNA Pol. Par conséquent, l'un des deux brins est synthétisé de manière continue en suivant la direction de

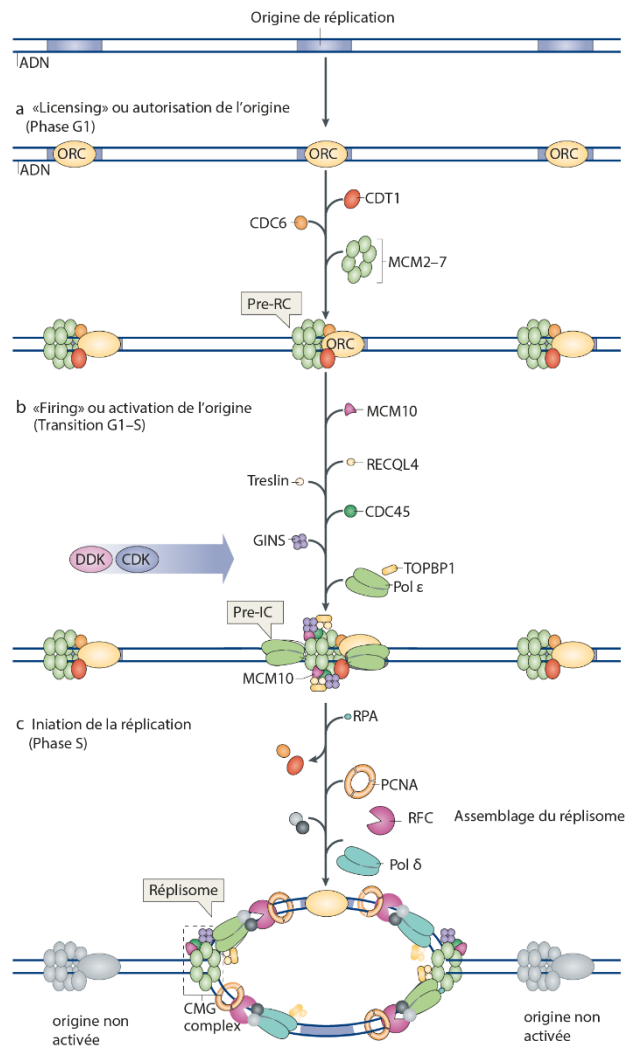


progression de la fourche (brin « précoce » ou *leading strand*). L'autre est synthétisé dans le sens opposé à celui de la progression de la fourche, et de manière discontinue en impliquant la formation de fragments d'Okazaki de 100 à 200 nt (brin « retardé » ou *lagging strand*).

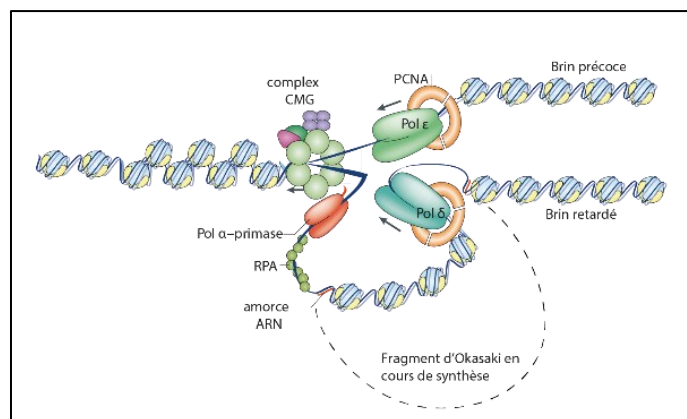
Trois DNA Pol aux fonctions spécialisées collaborent pour permettre la réplication du génome, dans le modèle classique. La DNA Pol  $\alpha$  initie la synthèse d'ADN au niveau du brin précoce à partir de l'origine de réplication et au niveau de chaque fragment d'Okasaki du brin retardé (**Figure 23B**). Une primase associée à la DNA Pol  $\alpha$  génère une amorce ARN d'environ 10 nucléotides, à la suite de laquelle la DNA Pol  $\alpha$  ajoute 20 à 30 nucléotides. L'extension de la polymérisation est ensuite prise en charge par des polymérases plus processives, à savoir, la DNA Pol  $\epsilon$  au niveau du brin précoce, et la DNA Pol  $\delta$  au niveau des fragments d'Okasaki du brin retardé (aboutissant à un fragment de 100 à 200 nt). Des études récentes ont indiqué que la DNA Pol  $\delta$  participerait également à l'initiation de la réplication du brin précoce, avant l'intervention de la DNA Pol  $\epsilon$  (Garbacz *et al.*, *Nat Com*, 2018 ; Aria et Yeeles *Mol Cell*, 2019). Les fragments d'Okasaki subissent un processus de maturation finement régulé et impliquant des enzymes spécialisées. Selon le modèle actuel, la DNA Pol  $\delta$  déplace de manière séquentielle l'amorce ARN du précédent fragment d'Okasaki formé, ce qui lui permet de synthétiser la portion manquante (Garg *et al.*, *Genes Dev*, 2004 ; Stodola et Burgers, *Nat Struct Mol Bio*, 2016). Les amorces sont excisées et les fragments reliés entre eux par une DNA ligase.



**A**



**B**



**Figure 23: Le mécanisme de la réplication chez les eucaryotes**

(Légende sur page suivante)

- A)** Etapes de la réplication. De bas en haut : (a) *Licensing* de l'origine de réplication en phase G1 aboutissent à l'assemblage du complexe du pre-RC (b) Activation de l'origine à la transition G1-S, caractérisée par la formation du complexe pre-IC et l'activation des hexamères Mcm2-7 par les kinases CDK (*cyclin-dependent kinases*) et DDK (*DBF4-dependent kinases*) ; (c) La conversion du complexe pre-IC en réplisome fonctionnel via le recrutement des autres composants, permet l'ouverture de la double hélice, et la formation de deux fourches de réplication progressant dans des directions opposées à partir de l'origine. Image modifiée de Fragkos *et al.*, *Nature Rev Mol Cell*, 2015.
- B)** La fourche de réplication en cours d'élongation est détaillée avec notamment la polymérase  $\epsilon$  sur le brin précoce et la polymérase  $\delta$  sur le brin retardé. Le complexe polymérase  $\alpha$  / primase qui permet la synthèse de quelques nucléotides d'ARN suivis d'une trentaine de nucléotides ADN sur le brin retardé. Le fragment d'Okazaki fait référence à l'amorce ARN suivi du fragment d'ADN synthétisé par la polymérase  $\delta$ . Image modifiée de García-Muse *et al.*, *Nature Rev Mol Cell*, 2016.

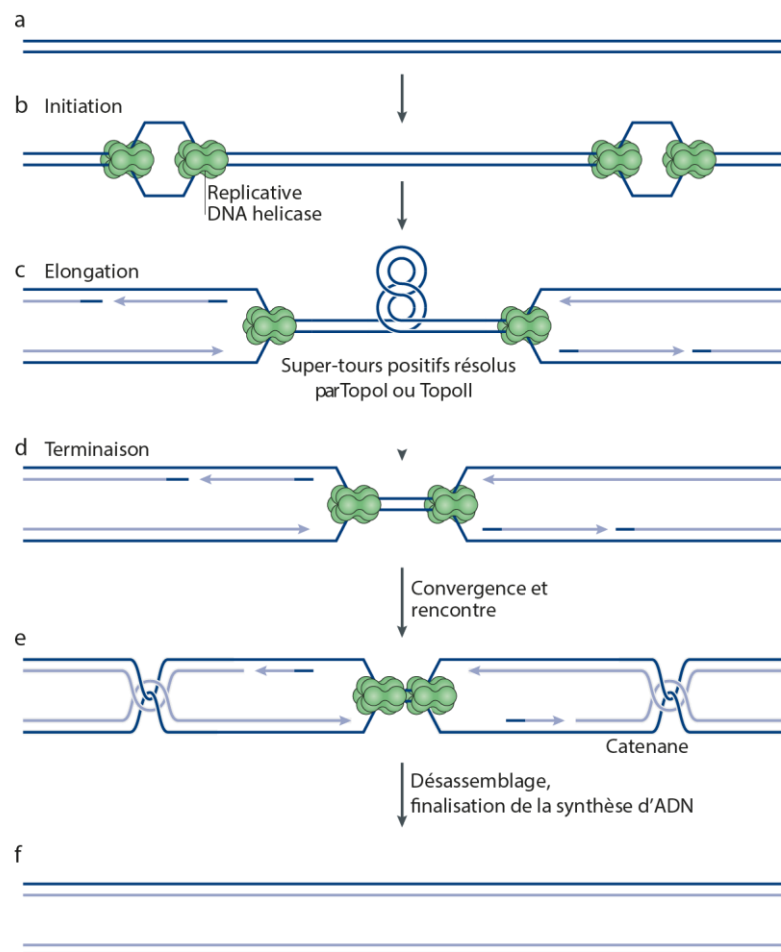
### 2.3.3 Terminaison

Contrairement aux étapes d'initiation et d'élongation, la terminaison de la réplication est un champ très peu investigué. Peu de données moléculaires ont été mises à jour, en particulier chez les eucaryotes. La réplication se termine typiquement lors de la rencontre entre deux fourches convergentes (**Figure 24**). Elle implique un achèvement local de la synthèse d'ADN et un désassemblage du réplisome permettant de prévenir un autre cycle de duplication ou l'interférence avec d'autres processus cellulaires comme la transcription. Cette terminaison s'accompagne de la résolution des tensions topologiques, c'est-à-dire des torsions de la molécule d'ADN parentale en amont de la fourche, résultant du déroulement de la double hélice. Les topoisomérases de type I ou II constituent les principaux acteurs de ce processus, en générant respectivement une coupure simple ou double brin. La relaxation des torsions peut s'opérer également par la rotation des fourches de réplication en cours d'élongation. Les molécules d'ADN nouvellement synthétisées s'enroulent ainsi l'une autour de l'autre, générant des structures appelées caténanes. La résolution de ces structures par l'action de la topoisomérase de type II (étape de décaténation) permet la séparation des chromatides sœurs (Baxter et Diffley, *Mol Cell*, 2008).

Chez les bactéries, la réplication se termine de manière programmée au niveau de régions spécialisées constituées de sites appelés *Ter* (pour revue : Dewar et Walter, *Nature Rev*, 2017). L'interaction spécifique des protéines Tus (*Terminus Utilization Substance*) avec ces sites forme une barrière polarisée, en empêchant la progression de la fourche dans une direction

donnée. Les sites *Ter* sont orientés de manière symétrique de sorte à ce qu'une fourche provenant d'une direction donnée, progresse à travers les cinq premiers sites *Ter* mais s'immobilise au niveau des cinq autres sites, et vice-versa.

Chez les eucaryotes, de telles barrières programmées existent de manière localisée au niveau du génome. La section 3.1.2 de ce chapitre leur est spécifiquement. En règle générale, la convergence des fourches se distribue de manière aléatoire sur le génome. Sa localisation dépend du moment d'activation des origines et de la vitesse de progression des fourches.



**Figure 24: Modèle de la terminaison de la réplication chez les eucaryotes**

La progression des fourches convergentes génère des tensions topologiques (appelés ici super-tours) au niveau de l'ADN non répliqué. Celles-ci sont résolues par les topoisomérases (a-c). Les fourches de réplication convergentes se rencontrent (d). Il s'en suit le désassemblage des hélicases, la maturation des fragments d'Okazaki et la décaténation (e-f). Image modifiée de Dewar et Walter, *Nat Rev*, 2017.

## **2.4 Régulation de l'activation des origines de réplication**

Une origine de réplication est généralement définie comme étant la région génomique au niveau de laquelle est initié le processus de réplication. Le nombre d'origines varie en fonction des espèces, allant d'une seule dans le génome bactérien, à plusieurs centaines dans celui des eucaryotes. Cette disparité s'explique par la différence de taille des génomes à dupliquer et la présence de multiples molécules d'ADN. Qu'il s'agisse d'un organisme procaryote ou eucaryote, l'origine de réplication inclut néanmoins deux éléments distincts : i) une région généralement pauvre en nucléosomes et avec laquelle interagit le complexe de pré-réplication (pre-RC), ii) le site d'initiation de la réplication par la DNA Pol, situé en aval.

Les origines de réplication ont été très bien caractérisées et cartographiées chez *S. cerevisiae*. Nommées ARS (*Autonomously Replicating Sequence*) pour leur capacité à induire la réplication autonome d'un plasmide extrachromosomal, ce sont des régions relativement courtes (100 bp environ) disséminées dans le génome, riches en AT, et contenant une séquence consensus de 11 à 17 bp qui est essentielle à l'activité de l'origine (Newlon et Theis, *Curr Opin in Gen & Dev*, 1993). Chez *S. pombe*, les origines de réplication sont plus larges (500 bp environ), et se regroupent plus fréquemment en *clusters*, localisés préférentiellement dans les régions intergéniques à proximité des promoteurs. Elles ont une composition très riche en AT, qui se caractérise par une distribution généralement asymétrique des nucléotides A et T (Dai *et al.*, *PNAS*, 2004). Aucune séquence consensus n'a pu être mise en évidence à ce jour. Chez les métazoaires, les origines de réplication sont encore moins bien caractérisées. Elles s'étaleraient sur des distances plus grandes (0,5 à 50kb chez les mammifères), et auraient tendance à se localiser dans les régions riches en G, tels que les îlots CpG ou les structures G-quadruplexes (Besnard *et al.*, *Nat Struct. Mol. Biol*, 2012 ; Cayrou *et al.*, *Cell Cycle*, 2014).

Les origines de réplication autorisées (ou *licensed*) ne sont pas toutes activées en phase S. Au vu de leur nombre, cela pourrait autrement conduire à un épuisement en facteurs de réplication. On distingue les origines constitutives, des origines dormantes. Les premières sont activées à chaque cycle cellulaire, tandis que les autres constituent un réservoir d'origines potentiellement sollicitées en cas de problèmes au cours de la réplication (Woodward *et al.*, *J Cell Biol*, 2006 ; Doksani *et al.*, *Cell*, 2009 ; Brambati *et al.*, *NAR*, 2018).

L'un des principaux challenges de la cellule, est d'assurer une unique réplication de son génome durant le cycle cellulaire. Le contrôle temporel de la phase d'autorisation des origines

joue un rôle crucial pour éviter l'instabilité génomique associée aux phénomènes de re-réplication. Il existe plusieurs mécanismes moléculaires redondants visant à prévenir un nouvel assemblage du complexe pre-RC après le démarrage de la réplication : i) l'inactivation des composants du pre-RC par des modifications post-traductionnelles (Nguyen et al., *Curr. Biol*, 2000 ; Saha et al., *J Cell Sci*, 2006) ; ii) la dégradation des composants du pre-RC (Méndez et al., *Mol Cell*, 2002 ; Li et al., *J Biol Chem*, 2003) ; iii) la séquestration du facteur de chargement Cdt1 via l'interaction avec la protéine Geminin chez les métazoaires (Wohlschlegel et al., *Science*, 2000 ; Tada et al., *Nat Cell Biol*, 2001).

## **2.5 Contexte chromatinien de la réplication**

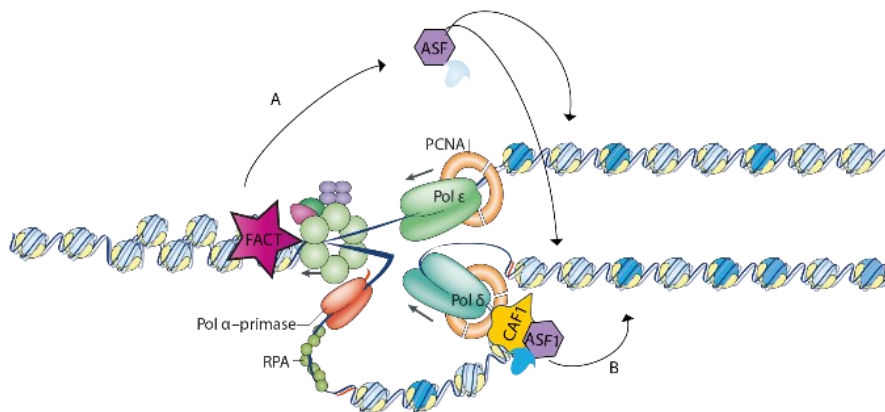
La progression de la fourche implique l'éviction ou le déplacement mécanique des nucléosomes en amont. Le réassemblage des nucléosomes après le passage de la fourche est nécessaire à la transmission des marques épigénétiques et à la préservation du type de chromatine de la région répliquée. Ce réassemblage utilise à la fois des histones néosynthétisées et un recyclage des nucléosomes préexistants. C'est la déposition des histones H3-H4 qui est la mieux caractérisée à ce jour (**Figure 25**). La reconstitution de la chromatine est couplée à la réplication et met en jeu différents chaperons d'histones dont je vais brièvement décrire les fonctions. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas totalement résolus.

Le complexe chaperon FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*) favoriserait l'éviction des nucléosomes selon un mode d'action qui n'est pas encore élucidé mais qui engagerait probablement une coopération avec des composants du replisome. Par exemple, des interactions avec Mcm2-7 (Tan et al., *EMBO J*, 2006 ; Tan et al., *J Biomed Sci*, 2010 ; Han et al., *Genes Dev*, 2010) ont été mises en évidence chez *S. cerevisiae* et l'Homme, de même qu'avec la DNA Pol  $\alpha$  chez *S. cerevisiae* (Wittmeyer et al., *Mol Cell Biol*, 1997 ; Wittmeyer et al., *Biochemistry*, 1999 ; Formosa et al., *EMBO J*, 2001). D'autre part, des complexes de remodelage de la chromatine seraient également requis pour faciliter la progression de la fourche de réplication, tels que SWI/SNF (*Switching deficient/Sucrose-Non-Fermenting*), Imitation Switch (ISWI) et INO80 (*Inositol requiring 80* ; [Flanagan et al., *Nucleic Acids Res*, 1999 ; Collins et al., *Nat Genet*, 2002 ; Vincent et al., *Nat Struct Mol Bio*, 2008]).

Le recyclage des histones parentales est encore assez peu caractérisé. Une étude récente a montré que l'hélicase Mcm2, qui a la capacité d'interagir avec les histones H3-H4, serait

impliquée dans la répartition équilibrée de ces histones entre les brins précoce et retardé (Petryk *et al.*, *Science*, 2018). Le chaperon d'histone Asf1 (*Anti-Silencing Function 1*) interagit aussi avec les histones H3-H4 dans le cadre d'un complexe incluant Mcm2-7. L'hypothèse actuelle est que ce complexe joue le rôle d'intermédiaire dans le transfert des histones parentales (Groth *et al.*, *Science*, 2007).

La déposition des histones H3-H4 néosynthétisées en aval de la fourche est assurée par le chaperon CAF-1 (*Chromatin assembly factor 1* ; (Verreault *et al.*, *Cell*, 1996 ; Shibahara *et al.*, *Cell*, 1999)). Celui-ci est recruté au niveau de la fourche de réplication par l'intermédiaire de son interaction avec PCNA (Shibahara et Stillman, *Cell*, 1991 ; Moggs *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2000 ; Zhang *et al.*, *Nature*, 2000). Il est assisté par le chaperon Rtt106 chez *S. cerevisiae* (Huang *et al.*, *PNAS*, 2005 ; Fazly *et al.*, *J Biol Chem.* 2012 ; Su *et al.*, *Nature*, 2012) et par Asf1 chez d'autres espèces eucaryotes (Tyker *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2001 ; Wallace *et al.*, *NAR*, 2012). Par ailleurs, l'acétylation des histones H3 et H4 néosynthétisées a été montrée comme requise pour leur déposition (Sobel *et al.*, *PNAS*, 1995 ; Ai X et Parthun, *Mol Cell*, 2004).



**Figure 25: Modèle de couplage entre la progression de la fourche de réplication et le réassemblage de la chromatine**

Le modèle concerne plus particulièrement la déposition des histones H3-H4 (en bleu). A : Le complexe FACT permet l'éviction des histones préexistants (en bleu clair) en amont de la fourche de réplication. Ces histones sont transférées en aval de la fourche et réparties entre les deux nouvelles doubles hélices. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces processus sont encore peu caractérisés mais le chaperon d'histone Asf1 serait, entre autres, impliqué. B : Les histones néosynthétisées (en bleu foncé) sont déposées en aval de la fourche par le complexe CAF-1, assisté entre autres, d'Asf1. Image modifiée de García-Muse *et al.*, *Nature Rev Mol Cell*, 2016 en s'inspirant de Tabancay et Forsburg, *Current Topics in Dev Bio*, 2006.

### **3 Mécanismes de prises en charge des fourches de réplication bloquées**

Un des objectifs de ma thèse a consisté à investiguer l'impact du RNAi sur le redémarrage des fourches de réplication bloquées. Il est donc important de revenir sur les challenges auxquels doit faire face la progression de la fourche de réplication, et qui sont à l'origine de stress réplicatifs. Je mettrai notamment l'accent sur les barrières de la réplication (RFBs pour *Replication Fork Barriers*) car l'une d'entre elle a été détournée dans le cadre d'un système expérimental me permettant de répondre à mon objectif. D'autre part, j'aborderai les mécanismes assurant la maintenance des unités de rDNAs car cet aspect a été traité au cours de ma thèse. Pour finir, je présenterai les mécanismes connus de prise en charge des fourches de réplifications entravées, dont le rôle joué par la HR.

#### **3.1 Les challenges de la réplication**

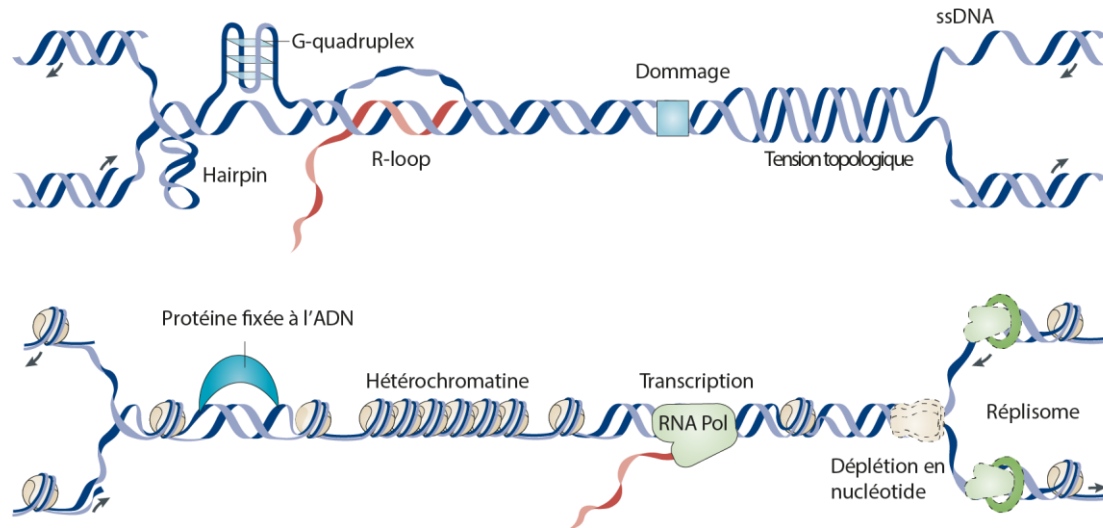
##### **3.1.1 Le Stress réplicatif**

Le stress réplicatif peut se définir, de façon assez large, comme tout évènement affectant la dynamique de réplication de façon locale ou sur l'ensemble du génome. Il se traduit à l'échelle moléculaire comme un ralentissement ou un blocage des fourches de réplication. Les fourches bloquées sont des structures fragiles, pouvant induire la formation de cassures de l'ADN, ou des réarrangements de type GCR, si elles ne sont pas rapidement redémarrées. La fidélité de la réplication et la ségrégation des chromosomes peuvent être compromises en conséquence, et résulter en des défauts mitotiques. En somme, le stress réplicatif est une source majeure d'instabilité génomique. Maintenu à un niveau chronique par la dérégulation des voies oncogéniques, il contribue fortement au développement tumoral (Gaillard *et al.*, *Nat Rev Cancer*, 2015 ; Bakhoun *et al.*, *Nature*, 2018).

Le stress réplicatif est causé par une variété d'évènements d'origine endogène ou exogène. Il peut être lié à une carence en facteurs de réplication, ou à des dérégulations dans la signalisation des dommages ou les systèmes de contrôle/qualité de l'ADN. Il peut aussi être provoqué par des obstacles physiques entravant la progression de la fourche de réplication (**Figure 26**). Ces obstacles peuvent exister naturellement au niveau du génome ou être générées



par des lésions de l'ADN (Lambert et Carr, *Chromosoma*, 2013). Ces obstacles sont à l'origine des « Replication Fork Barriers » dont la définition est développée dans la section suivante.



**Figure 26 : Les types d'obstacles à l'origine des barrières de la réplication**

Il existe différents types d'obstacles à la progression de la fourche de réplication qui peuvent être liés, par exemple, à la nature de la région répliquée ou à la présence de lésion. Les sites au niveau desquels sont présents ces obstacles, constituent des barrières de la réplication (RFBs, *Replication Fork Barrier*) Image modifiée de Gaillard *et al.*, *Nat Rev*, 2015.




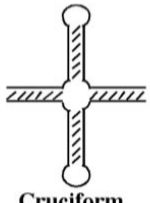
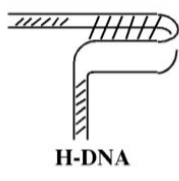
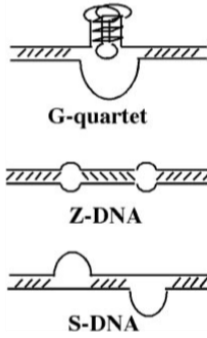
### 3.1.2 Les barrières de la réplication

Les barrières de la réplication (RFBs pour *Replication Fork Barriers*) se réfèrent aux sites au niveau desquels la progression de la fourche de réplication est ralentie ou arrêtée de manière non aléatoire. Il en existe différents types qui peuvent être liés à la nature de certaines régions génomiques ou bien associés à des phénomènes accidentels (présence de lésions d'ADN) ou programmés. Selon les cas, les RFBs peuvent nuire à la stabilité du génome ou au contraire la protéger. Des mécanismes spécialisés ont évolué pour assurer la continuité de la réplication au niveau de ces RFBs.



### 3.1.2.1 Les barrières de la réplication intrinsèques

De manière générale, les régions connues pour être naturellement plus difficiles à répliquer que d'autres sont celles contenant des éléments répétés. Par exemple, les courtes répétitions directes (ou micro-homologies), favorisent des glissements des DNA polymérase, entraînant la délétion des courtes séquences flanquées par ces micro-homologies (Fortune *et al.*, *J Biol Chem*, 2005). D'autre part, les éléments répétés ont tendance à former des structures secondaires de différents types selon leur organisation (**Figure 27**). En général, de telles structures impliquant de l'ADN double brin sont thermodynamiquement peu stables, d'autant plus dans le contexte de la réplication lors duquel ces structures peuvent être résolues *via* l'action des topoisomérases (Mirkin et Mirkin, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007). En revanche, celles impliquant de l'ADN simple brin sont plus favorisées. Du fait du déroulement de sa réplication, le brin retardé est moins sujet à la protection par les protéines de type RPA et donc plus susceptible d'être soumis à la formation de structures secondaires. Celles-ci peuvent interférer avec la progression de la DNA Pol  $\delta$ , et bloquer l'ensemble de la fourche puisque la progression des polymérase  $\delta$  et  $\epsilon$  est couplée. Du fait de leur nature répétitive, des mésappariements locaux formant une boucle au niveau du brin matrice ou du brin néosynthétisé, peuvent survenir (McMurray, *Nat Rev Genet*, 2010). Le redémarrage est alors plus enclin à générer des erreurs de réplifications en ré-initiant la réplication à une séquence incorrecte. Ce phénomène, s'il est généré au niveau de régions contenant une répétition d'unités en tandem comme les microsatellites ou les rDNAs, peut être à l'origine de l'expansion (gain) ou de la contraction (perte) des unités répétées (McMurray, *Nat Rev Genet*, 2010 ; Kobayashi, *Cell Mol Life Sci*, 2011). Dans le cas des microsatellites, une telle plasticité de leur taille peut avoir des conséquences délétères. Ainsi, diverses maladies ont été associées à une large expansion de certains microsatellites, comme le syndrome de l'X fragile ou l'ataxie de Friedreich (pour revue : Brouwer *et al.*, *Bioessays*, 2009).

Organisation des séquences répétées	 Répétition inversée	 Répétition miroir (R) <sub>n</sub> /(Y) <sub>n</sub>	 Répétition tandem directe G-quadruplexe Z-DNA: (RY) <sub>n</sub> /(YR) <sub>n</sub>
Repliement secondaire	 Cruciform	 H-DNA	 G-quartet Z-DNA S-DNA

**Figure 27: Exemples de structures génomiques secondaires formées en fonction de l'organisation des séquences répétées.**

Les éléments répétés ont tendance à former différents types de repliements secondaires selon leur organisation et peuvent ainsi constituer des barrières intrinsèques de la réplication. Image modifiée de Mirkin et Mirkin, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007.

Outre les régions répétées, certains loci ont été identifiés comme étant des RFBs intrinsèques. Les sites qualifiés de fragiles ont été l'une des premières catégories identifiées chez l'Homme. Il s'agit de loci ayant tendance à subir des DSBs de façon récurrente. Ils sont repérables par l'observation de cassures ou de segments manquants au niveau des chromosomes métaphasiques préparés à partir de cellules traitées avec un inhibiteur de la réplication (Glover *et al.*, *Human Genet*, 1984). Ils sont subdivisés en sites fragiles rares (RFS, pour *Rare Fragile Sites*) ou communs dits (CFS, pour *Commun Fragile Sites*), respectivement selon qu'ils soient présents dans moins de 5% ou dans l'ensemble de la population (Durkin et Glover, *Annu Rev Genet*, 2007). Les sites appartenant aux deux catégories sont enrichis en AT et associés à une réplication tardive. Les RFS sont héréditaires et leurs cassures sont associées à une expansion de microsatellites (Sutherland, *Cytogene Gen Res*, 2003). Les CFS représentent la catégorie la plus importante en termes numérique. La cause de leur l'instabilité n'est pas encore très bien appréhendée mais elle semblerait liée à une faible efficacité et une faible densité en origines de réplication (Letessier *et al.*, *Nature*, 2011 ; Ozeri-Galai *et al.*, *Mol Cell*, 2011 ; revue Debatisse et Rosselli, *Gen Chrom and Cancer*, 2018).

Les zones de ralentissement de la réplication (RSZ pour *Replication Slow Zones*) constituent un autre exemple de RFBs intrinsèques. Elles ont été identifiées chez *S. cerevisiae* en condition sauvage et sont sujettes à des cassures chez des cellules n'exprimant plus Mec1 (homologue d'ATR chez les mammifères ; Cha et Kleckner, *Science*, 2002). Les données actuelles suggèrent que le ralentissement est en partie dû à un déficit en nucléotides. Mec1 participerait à faciliter la progression lente des fourches de réplication au niveau de ces zones en régulant positivement la synthèse de nucléotides et en activant les « checkpoints » responsables de la stabilisation des fourches.

D'autres RFBs intrinsèques ont été mises en lumière par diverses stratégies chez *S. cerevisiae*, notamment en analysant la distribution spatiale de  $\gamma$ -H2A (équivalent de  $\gamma$ -H2AX chez les mammifères ; Szilard *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2010) en condition sauvage, ou bien celle de la DNA Pol  $\epsilon$  ou encore l'accumulation des intermédiaires de réplication chez le mutant *rrm3* (Rrm3 est une hélicase permettant de déloger les protéines non histones en amont de la fourche de réplication, (Ivessa *et al.*, *Mol Cell*, 2003 ; Torres *et al.*, *Genes Dev.* 2004 ; Azvolinsky *et al.*, *Genes Dev.* 2006 ; Azvolinsky *et al.*, *Mol Cell*, 2009). Les RFBs seraient localisées au niveau : i) de régions fortement transcrites (dont rDNA et tDNA) suggérant une instabilité causée notamment par des collisions du réplisome avec la machinerie de transcription, ou la présence d'hybrides ADN/ARN appelés *R-loop* (revue Aguilera et García-Muse, *Mol Cell*, 2012) ; ii) de loci interagissant avec des protéines non-histones comme les origines de réplication autorisées (présence du pré-RC) et les centromères (présence des kinétochores). Des approches similaires ont été employées chez *S. pombe*, et ont suggéré la présence de RFBs au niveau de certaines unités transcriptionnelles fortement actives pendant la réplication, ainsi que des régions d'hétérochromatine péri-centromériques et télomériques, suggérant un lien avec le statut chromatinien (Rozenzhak *et al.*, *PloS Genet*, 2010 ; Sabouri *et al.*, *Genes Dev.* 2012 ; Steinacher *et al.*, *Genes Dev.* 2012).

### 3.1.2.2 *Les barrières de la réplication programmées*

Les RFBs programmées font partie de la stratégie mise en place par la cellule afin d'assurer la précision et la stabilité du processus de réplication au niveau de certains endroits critiques. En général, ce type de barrière est par nature, polarisé, c'est-à-dire qu'elle orchestre la pause d'une fourche de réplication de manière unidirectionnelle : les fourches provenant

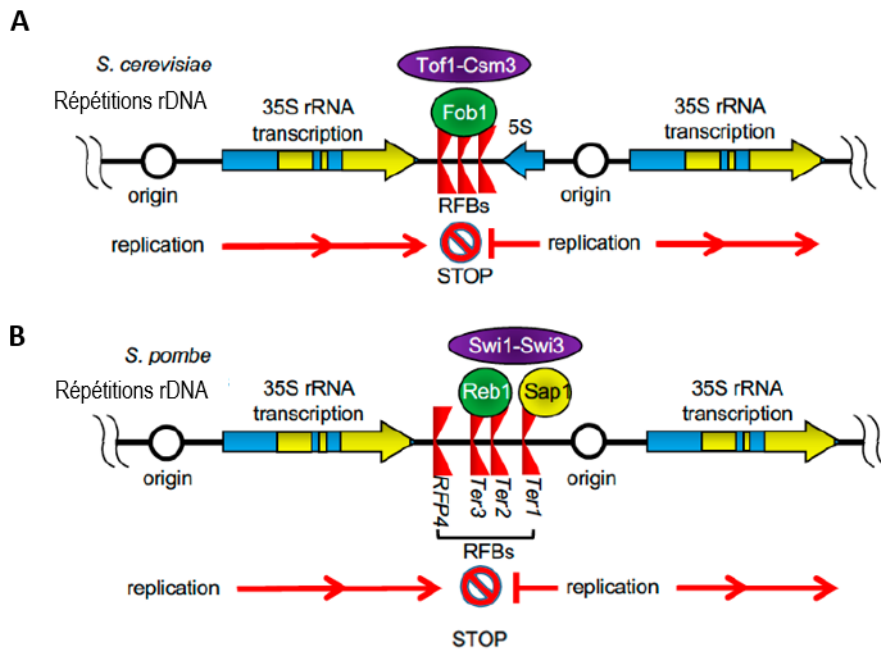
d'une direction donnée sont arrêtées, mais pas celles circulant dans la direction opposée. L'interaction spécifique entre une protéine (ou complexe) non-histone et une séquence génomique est à la base de leur activité en tant que barrières.

Je vais spécifiquement détailler le fonctionnement des barrières au niveau des rDNAs et de la barrière *RTSI*, qui ont fait l'objet d'une partie de mon projet de thèse.

### ***Les RFBs localisées au niveau des rDNAs***

La structure générale du locus des rDNAs est conservée chez les eucaryotes, de même que les séquences codantes. Seules les régions intergéniques *IGS* peuvent présenter des différences en matière de taille et de séquence. Selon l'organisme, les unités répétées en tandem s'organisent en un ou plusieurs clusters, eux-mêmes localisés sur un ou plusieurs chromosomes. Par exemple, la cellule humaine contient cinq clusters situés sur les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22. La levure *S. cerevisiae* n'en contient qu'un seul situé sur le chromosome XII, tandis que *S. pombe* en possède deux, situés chacun au niveau des extrémités subtélomériques du chromosome III.

Les ARN ribosomaux représentent la plus grande classe d'ARN produits au sein des cellules. Ils représentent environ 80% des ARN totaux chez la levure (Warner, *Trends Biochem Sci*, 1999). Les rDNAs constituent ainsi la région la plus active d'un point de vue transcriptionnel. La forte production des ribosomes (et donc celle des ARN ribosomaux) doit d'ailleurs être maintenue au moment de la réplication de l'ADN. Des conflits entre la RNA Pol et le réplisome peuvent survenir au niveau de chaque unité, ce qui rend la région des rDNAs d'autant plus fragile. Ce type d'incidents pourrait en effet, avoir des conséquences délétères pour la cellule, en générant de l'instabilité génomique et en résultant en une production d'ARN ribosomaux tronqués. Les RFBs programmées, situées dans la région intergénique au niveau de chaque unité de rDNA, promeuvent la co-directionnalité de la réplication avec la transcription du précurseur des ARN ribosomaux effectuée par la RNA Pol I. Leur activité permet ainsi de limiter les collisions entre les machineries de réplication et de transcription convergentes. Ces RFBs ont été identifiées chez les ciliées, les plantes et les métazoaires, mais ce sont chez les levures que les mécanismes moléculaires associés à ces barrières sont le mieux caractérisés (Dalgaard *et al.*, *Current Advances*, 2011).



**Figure 28 : Caractéristiques des RFBs programmées localisées au niveau des rDNA**

Chez *S. cerevisiae*, l'activité de blocage est principalement due à Fob1 (A), tandis qu'elle implique Sap1 au niveau du site Ter1 et Reb1 au niveau des sites Ter 2-3 chez *S. pombe* (B). D'autres protéines sont également mises en jeu dans chacune de ces RFB (cercle violet). Voir texte pour plus de détail. Image modifiée de Gadaleta et Noguchi, *Genes*, 2017.

Chez *S. cerevisiae*, trois sites de pauses (*RFB1-3* ou *Ter1-3*) ont été identifiés (**Figure 28A**). Le premier, *RFB1*, est le site majeur d'arrêt des fourches de réplication émanant de l'origine avoisinante et progressant dans le sens opposé à la transcription par la RNA Pol I (Brewer *et al.*, *Cell*, 1992 ; Kobayashi, *Mol Cell Biol*, 2003). La protéine Fob1 est l'élément principal, responsable de l'activité de blocage (Kobayashi et Horiuchi, *Genes Cells*, 1996 ; Mohanty et Bastia, *JBC*, 2003). L'homo-dimérisation de cette protéine lui permet d'interagir avec deux sites de pause et ainsi d'induire un enroulement de la molécule d'ADN (Kobayashi, *Mol Cell Biol*, 2003). Ceci constituerait une contrainte topologique pour l'avancée de la fourche de réplication. Les composants Csm3 et Tof1 du complexe FPC sont également requis pour stabiliser la fourche bloquée au niveau des RFBs. Des données suggèrent que ces protéines permettraient d'empêcher l'action de l'hélicase Rrm3 et ainsi de prévenir l'évacuation de Fob1 (Mohanty *et al.*, *PNAS*, 2006 ; Bastia *et al.*, *PNAS*, 2016).

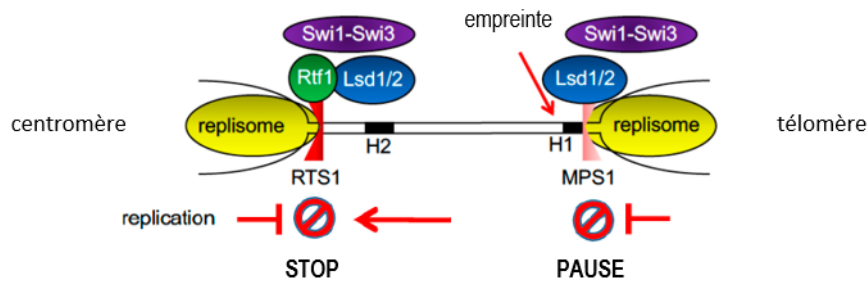
L'unité ribosomale de *S. pombe* possède quatre sites d'arrêt (*RFB1-3* ou *Ter1-3* et *RFB4*) des fourches de réplication circulant dans le sens opposé à la transcription par la RNA

Pol I (**Figure 28B**). Le blocage des fourches de réplication au niveau des sites RFB1-3 met en jeu deux facteurs protéiques différents. *RFB4* est la plus faible des barrières et les facteurs protéiques impliqués dans son activité ne sont pas encore connus. Elle n'agit pas comme une barrière de réplication quand la séquence est insérée sur un plasmide. En revanche, les analyses des intermédiaires de réplication par électrophorèse bidimensionnelle montrent que l'intensité de blocage à son niveau augmente en absence des facteurs protéiques intervenant au niveau des autres barrières (Krings et Bastia, *PNAS*, 2004). L'arrêt des fourches de réplication à son niveau a été suggéré comme étant dû à des collisions avec la machinerie de transcription. L'activité de blocage de la réplication au niveau du site *RFB1*, d'une part, et des sites *RFB2-3*, d'autre part, est respectivement due à Sap1 (Krings et Bastia, *JBC*, 2005) et Reb1 (Sanchez-Gorostiaga *et al.*, *MCB*, 2004). Reb1 peut s'homo-dimériser et induire une courbure au niveau des RFBs mais cette capacité n'est pas indispensable à l'activité de la barrière (Biswas et Bastia, *Mol Cell Biol*, 2008). De plus, Reb1 est un facteur de terminaison de la transcription par la RNA Pol I (Melekhovets *et al.*, *NAR*, 1997 ; Zhao *et al.*, *NAR*, 1997). Les composants Swi3 et Swi6 du complexe FPC sont également requis pour le blocage au niveau de ces trois sites, mais pas au niveau de *RFB4* (Krings et Bastia, *PNAS*, 2004).

### ***Les RFBs localisées au niveau de la région du déterminisme sexuel chez S. pombe***

La détermination du type sexuel (M ou P) s'opère à la suite d'un événement de recombinaison se produisant au locus *mat1* au moment de la réplication (voir section 2.2.4). Ce phénomène est orchestré par deux barrières programmées, *RTS1* et *MPS1*, situées de part et d'autre du locus *mat1*, respectivement du côté proximal (centromérique) et distal (**Figure 29**). La barrière *MPS1*, dont l'activité est dépendante des facteurs Lsd1 et Lsd2 mais aussi Swi1 et Swi3 (Dalgaard et Klar, *Cell*, 2000 ; Holmes *et al.*, *Cell Rep*, 2012), induit l'arrêt transitoire des fourches de réplication se dirigeant vers le centromère. Cette mise en pause permet l'introduction d'une empreinte ribonucléique au niveau du brin retardé néosynthétisé, qui marque la cellule-fille compétente pour le changement de type sexuel (Kaykov *et al.*, *EMBO J*, 2004 ; Vengrova *et al.*, *EMBO Rep*, 2006). La barrière *RTS1* assure l'uni-directionnalité de la réplication du locus *mat1* en arrêtant les fourches circulant vers l'extrémité distale du chromosome (Dalgaard et Klar, *Genes Dev*, 2001). L'activité de la barrière est principalement due à Rtf1 mais requiert aussi Rtf2 et les facteurs Swi1 et Swi3. La séquence *RTS1* se divise en deux régions : la région A (64 bp) dite « enhancer » et la région B (446 bp) contenant quatre

motifs longs répétés (Codlin et Dalgaard, *EMBO J*, 2003). Cette dernière est essentielle pour l'activité de la barrière. La région A ne possède individuellement pas d'activité de barrière, mais permet de renforcer le blocage de fourche dépendant de la région B. Rtf1 interagit avec les motifs répétés de la région B mais aussi avec la région A. Une courbure de l'ADN serait induite par la fixation de plusieurs protéines Rtf1 au niveau de *RTS1*, et serait stabilisée par des interactions protéines-protéines entre ces mêmes molécules (Eydmann *et al.*, *Genetics*, 2008). Cela constituerait une contrainte topologique pour l'ouverture de la double hélice par les hélicases réplicatives.



**Figure 29: Caractéristiques des RFBs programmées situées au locus *mat1* de la région du déterminisme sexuel chez *S. pombe***

La barrière RTS1 arrête la progression des fourches de réplication se dirigeant vers le versant télomérique. Son activité de blocage est principalement due à la fixation de Rtf1. La barrière MPS1 arrête temporairement la progression des fourches se dirigeant vers le versant centromérique. Cette mise en pause permet l'introduction d'une empreinte ribonucléique, qui rend l'une des cellules-filles compétente pour le changement de type sexuel. Les facteurs Swi1-Swi3 et Lsd1-Lsd2 sont impliqués dans l'activité des deux barrières. H1 et H2 : domaines d'homologie mis en jeu dans le changement de type sexuel. Image modifiée de Gadaleta et Noguchi, *Genes*, 2017.

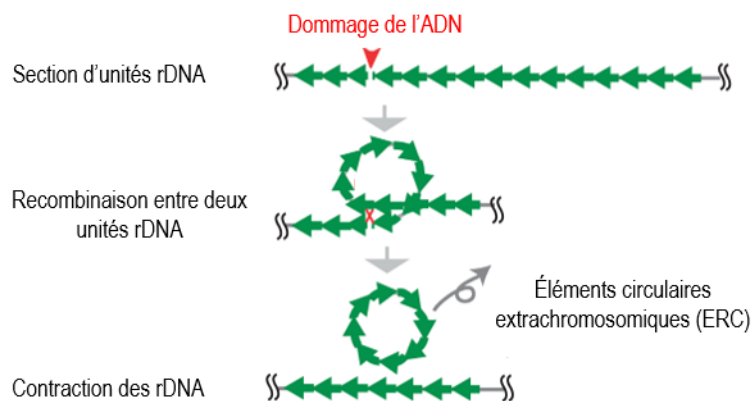
### 3.1.3 Le maintien des unités de rDNAs

J'ai testé l'implication du RNAi dans le maintien du nombre d'unités ribosomales pendant ma thèse. J'ai donc décidé de relater les connaissances actuelles autour de ce sujet dans le cadre de cette section.

Le nombre d'unités des rDNAs peut diminuer suite à un stress réplicatif (**Figure 30**). La réparation de l'unité endommagée par recombinaison homologe avec une autre unité peut entraîner la perte des copies situées entre les sites donneur et accepteur (Kobayashi, *Cell. Mol.*



*Life Sci.* 2011 ; Warmerdam *et al.*, *Cell Report*, 2016 ; Salim *et al.*, *Plos Genet*, 2017). Le nombre total d'unités au niveau du cluster des rDNAs doit être maintenu à un niveau optimal qui diffère selon chaque espèce. Cette condition est un facteur déterminant pour la stabilité du génome et pour permettre d'adapter la synthèse protéique aux besoins métaboliques de la cellule. Ce dynamisme fait des rDNAs, l'archétype de la région instable. Cette instabilité a été décrite comme étant un vecteur de senescence cellulaire (Kobayashi, *Proc Jpn Acad*, 2014). De plus, certains cancers et maladies neurologiques tels que le syndrome de Bloom ou l'ataxie-télangiectasie ont été associées à une altération du nombre de copies de rDNAs (Stults *et al.*, *Cancer Res*, 2009 ; Warmerdam et Wolthuis, *Chromosome Res*, 2019).



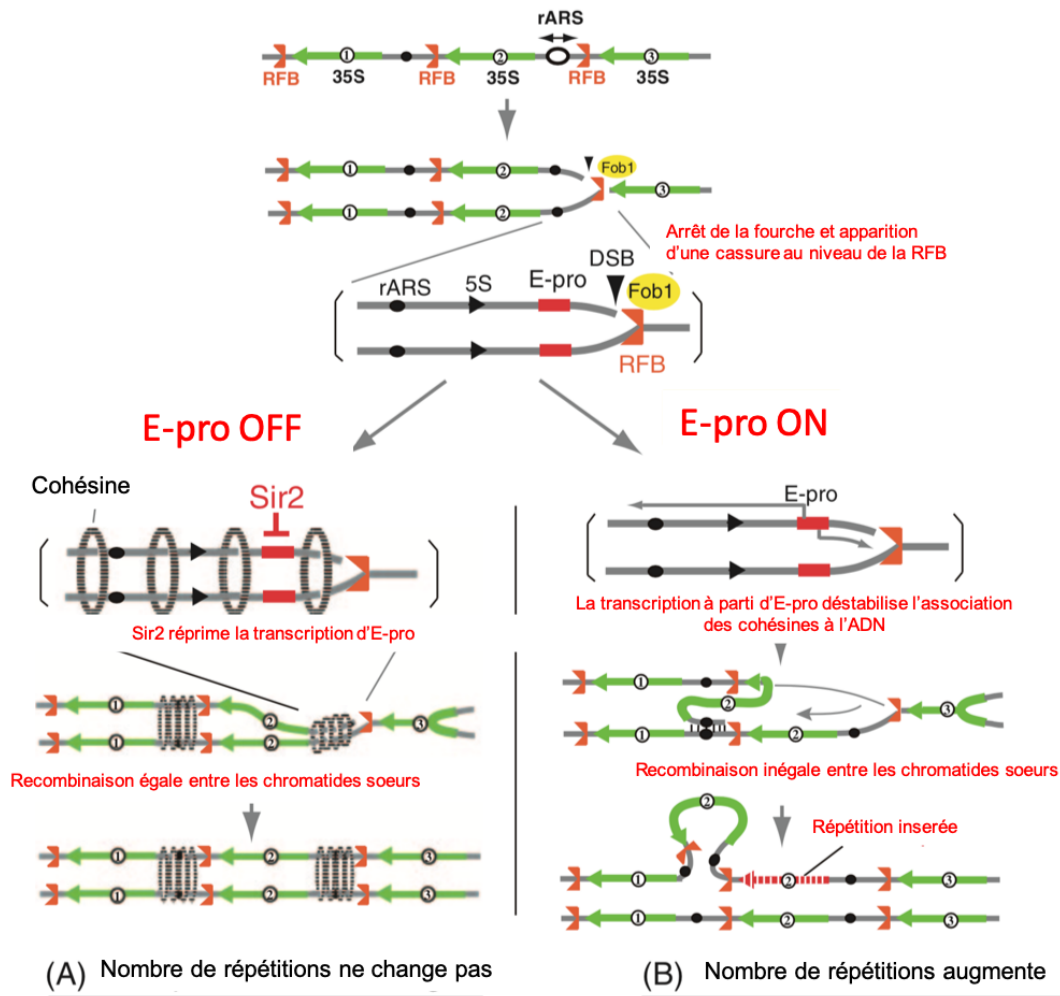
**Figure 30: Modèle de mécanisme à l'origine de la contraction des rDNA**

Suite à la survenue d'un dommage de l'ADN au niveau des rDNA, la réparation par recombinaison homologue peut aboutir à perte des unités situées entre les deux zones homologues, sous forme d'éléments circulaires extrachromosomiques (ERC). Image modifiée de la revue Kobayashi, *FEMS Yeast Res*, 2014.

La maintenance des copies de rDNAs nécessite la compensation des copies perdues par un système d'amplification de gènes, dont le mécanisme moléculaire a été élucidé chez *S. cerevisiae* (**Figure 31**). Dans ce système, l'activité des RFBs programmées jouent un rôle important dans l'initiation du processus de recombinaison. Selon le modèle proposé par les travaux de Kobayashi (Kobayashi, *Cell Mol Life Sci*, 2011 ; Kobayashi, *Proc Jpn Acad*, 2014), une DSB serait induite suite à l'arrêt de la fourche de réplication au niveau de la barrière médiée par Fob1. Le processus exact de formation de cette DSB n'est pas exactement connu mais il



serait Fob1-dépendant (Burkhalter et Sogo, *Mol Cell*, 2004). La réparation de cette DSB s'effectuerait par recombinaison homologue selon deux procédés possibles : a) soit la recombinaison utilise une copie ribosomale située au locus homologue au niveau de la chromatide sœur comme matrice, ce qui n'influencerait pas le nombre d'unités ribosomales (processus appelé recombinaison égale ou « equal sister-chromatid recombination ») ; b) soit la recombinaison utilise une copie ribosomale avoisinante au niveau de la chromatide sœur, ce qui aboutirait à une seconde réplication de certaines copies et donc à une expansion du nombre d'unités jusqu'à atteindre le niveau optimum (processus appelé recombinaison inégale « Unequal sister-chromatid recombination »). L'amplification de gènes est régulée par l'activité du promoteur cryptique E-pro. Localisé dans la région intergénique *IGS1*, ce promoteur contrôle la transcription bi-directionnelle d'ARN non codants, et sa répression est dépendante de Sir2. L'activation du promoteur stimule la dissociation des cohésines qui connectent normalement les chromatides sœurs au niveau des régions *IGS*. Cela aurait pour conséquence de favoriser le processus de recombinaison inégale (Kobayashi et Ganley, *Science*, 2005). L'amplification de gènes implique l'existence d'un mécanisme senseur du nombre d'unités de rDNAs, qui permettrait de réguler l'activité répressive de Sir2. Ce mécanisme n'est pas encore connu, mais l'hypothèse a été faite qu'il serait lié à la régulation de l'expression *SIR2* (Kobayashi, *Cell Mol Life Sci*, 2011). Des données indiquant qu'un mutant *sir2* présente un nombre anormalement élevé d'unités ribosomales, permettent d'appuyer cette hypothèse (Kobayashi, *Cell*, 2004).



**Figure 31 : Modèle de mécanisme à l'origine de l'amplification des unités de rDNA**

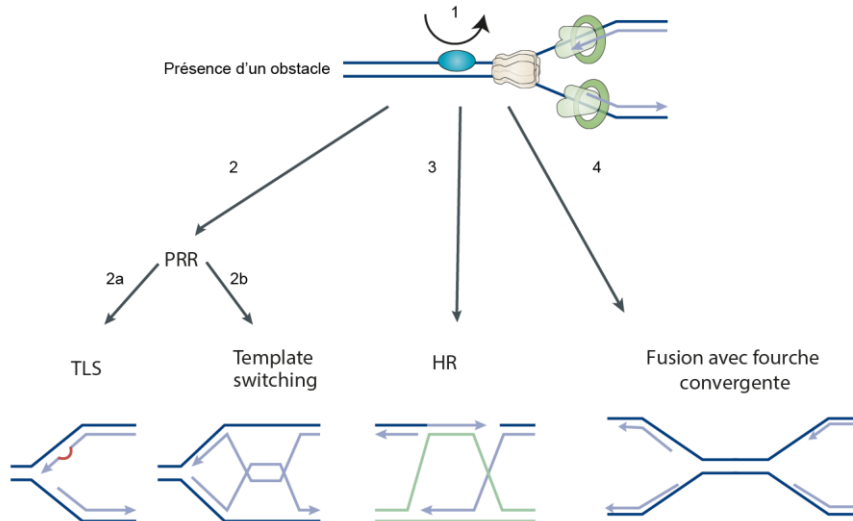
- A)** Modèle de recombinaison égale. En situation normale, Sir2 réprime l'activité du promoteur E-pro, localisé au niveau de la région intergénique *IGS1* (condition E-pro OFF). Les cohésines sont associées à l'ADN et connectent les chromatides sœurs. En cas de survenue d'une DSB, la réparation par recombinaison homologue utilise une copie de rDNA localisée au même niveau sur le chromatide sœur comme matrice. Le processus n'altère pas le nombre de répétitions de rDNA.
- B)** Modèle de recombinaison inégale. Dans une situation où le nombre d'unités de rDNA est réduit, la répression du promoteur E-pro est levée (condition E-pro ON). La transcription bi-directionnelle entraîne la dissociation des cohésines de la région *IGS1*. La réparation d'une DSB peut s'opérer en utilisant une copie de rDNA avoisinante localisée sur le chromatide sœur. Ce processus aboutit à une expansion du nombre d'unités ribosomales.

Image modifiée de Kobayashi, *FEMS Yeast Res*, 2014.

### **3.2 Les stratégies de prise en charge des fourches arrêtées**

Étant donné la grande variété d'obstacles présents dans la cellule (dont certains sont d'origine naturelle) pouvant interférer avec le déroulement opéré par les hélicases, les arrêts de la fourche de réplication sont fréquents. Les fourches arrêtées représentent une menace pour l'intégrité du génome, en particulier à cause des ADN simples brins présents à leur niveau. Les hélicases peuvent d'ailleurs poursuivre la séparation des brins parentaux accentuant l'accumulation des ADN simples brins. Ces derniers sont vulnérables aux processus de recombinaisons inappropriées et aux cassures chromosomiques pouvant aboutir à des GCR.

La cellule possède trois grandes lignes de défense pour assurer l'achèvement de la réplication (**Figure 32**). La première stratégie consiste à éliminer l'obstacle afin d'empêcher l'arrêt de la fourche. Au cours de la réplication, certaines hélicases, comme Rrm3 chez *S. cerevisiae* (Pfh1 chez *S. pombe*), permettent l'évacuation de complexes non histones interagissant avec l'ADN. S'il s'agit d'une lésion de l'ADN, sa prise en charge peut s'effectuer de manière préventive avant la phase S, par différents systèmes de réparation de l'ADN. Si ces lésions, persistent au niveau du brin parental, le réplisome peut avoir des difficultés à incorporer le bon nucléotide opposé à la base endommagée. Dans ce cas, le réplisome peut tolérer ces obstacles et les contourner ou les « sauter » pour poursuivre la réplication. Ce mécanisme est plus facilement réalisable au niveau du brin retardé étant donné la genèse programmée de nouvelles amorces (Cortez, *Mol Cell*, 2019). Cette stratégie résulte en des SSBs qui vont être résolus par deux voies alternatives post-réplcatives. La première voie utilise un mécanisme de recombinaison appelé « Template switch », utilisant l'autre brin néosynthétisé intègre comme matrice, et aboutissant à une correction fidèle. La deuxième voie consiste à utiliser les polymérases alternatives TLS pour combler le segment manquant (Lange *et al.*, *Nat Rev*, 2011). Cette option est généralement mutagène car ce type de polymérase ne possède d'activité *proofreading* et est donc considérée comme peu fidèle.



**Figure 32: Les stratégies de prise en charge d'une fourches de réplication lors de la rencontre avec un obstacle**

Deux stratégies existent afin de conserver les fourches de réplication dans un état fonctionnel et de garantir leur progression : soit l'obstacle est éliminé (1), soit il est contourné (2). Dans ce dernier cas, la zone obstruée est répliquée dans un second temps selon deux mécanismes PRR (pour *Post-Replicative Repair*) possibles : l'utilisation de polymérases alternatives TLS (2a) ou le mécanisme recombinaison « Template switch », utilisant l'autre brin néosynthétisé comme matrice. Dans le cas où la fourche devient dysfonctionnelle, elle est redémarrée par des mécanismes de réparation de type recombinaison homologue (HR pour *Homologous Recombination* ; (3)) ou sauvée par la fusion avec une fourche convergente (4). Image modifiée de Gaillard *et al.*, *Nature Rev*, 2015.

Les mécanismes décrits ci-dessus ne sont toujours pas suffisants pour prévenir l'arrêt de la fourche au niveau d'une RFBs. La cellule doit mettre en place une autre stratégie pour poursuivre la réplication. Si un arrêt se produit, l'activation du *checkpoint* intra-S permet de stabiliser la fourche dans le but de préserver son intégrité et sa compétence fonctionnelle à reprendre rapidement la réplication (Lopes *et al.*, *Nature*, 2001 ; Chanoux *et al.*, *JBC*, 2008 ; Segurado et Diffley, *Genes Dev*, 2008 ; revue Segurado et Tercero, *Biol Cell*, 2009). On parle dans ce cas de fourche mise en pause ou *stalled fork*, qui peut se remettre en route une fois l'obstacle levé. Des études récentes mettent en évidence le rôle de certains facteurs de la HR dans la protection des fourches bloquées. Leurs fonctions moléculaires sont encore peu caractérisées. Il semblerait néanmoins qu'un filament de RAD51 se formerait, serait stabilisé par BRCA2 et participerait à la protection des brins néosynthétisés contre l'attaque des

nucléases. La formation de ce filament ne favoriserait pas l'échange de brin en vue d'un redémarrage de la fourche. Cela suggère une fonction indépendante de la capacité d'orchestrer la recombinaison pour ces facteurs (Petermann *et al.*, *Mol Cell*, 2010 ; Schlacher *et al.*, *Cell*, 2011 ; Schlacher *et al.*, *Cancer Cell*, 2012).

Toutes les fourches ne parviennent pas à être stabilisées avec succès. L'activation du *checkpoint* intra-S nécessite l'accumulation de ssDNA, qui n'est pas toujours possible selon le type de RFBs, comme au niveau d'un pontage intra-brin (Sogo *et al.*, *Science*, 2002). De plus, la compétence de réplication peut pâtir de la prolongation de l'état pause. En conséquence, la fourche devient dysfonctionnelle, le blocage irréversible et la reprise de la réplication nécessite une assistance. On parle dans ce cas de fourche effondrée ou *collapsed fork*. Cette configuration peut s'accompagner d'une perte de certains facteurs du réplisome mais ce n'est peut-être pas toujours le cas. Des données suggèrent que l'intégrité du réplisome reste intacte, de même que son association avec la chromatine (Piccoli *et al.*, *Mol Cell*, 2012). Le sauvetage de ce type de fourche peut s'effectuer selon deux processus en compétition. La première option repose sur la fusion avec une fourche convergente (**Figure 32**). Le réservoir d'origines de réplication autorisées a son importance dans ce cas de figure. Une origine peut en effet être allumée pour générer une fourche et participer à ce sauvetage (Woodward *et al.*, *J Cell Biol*, 2006 ; Doksani *et al.*, *Cell*, 2009 ; Brambati *et al.*, *NAR*, 2018). Cette possibilité peut être néanmoins limitée, en particulier dans des régions pauvres en origines de réplication, ou qui subissent une réplication unidirectionnelle (par exemple la région télomérique), ou encore qui présentent deux fourches convergentes bloquées. La seconde option, fait appel à un redémarrage de la réplication impliquant des processus de réparation, notamment la HR. Cet aspect sera traité plus précisément dans la section suivante.

Le blocage de la fourche à l'état fonctionnel ou dysfonctionnel peut s'accompagner ou non de sa réversion. Il s'agit d'un remodelage passif ou bien catalysé par des enzymes (hélicases/translocases) aboutissant à la ré-hybridation des brins parentaux et l'hybridation des brins néosynthétisés (pour revue Quinet *et al.*, *Mol Cell*, 2017). Il en résulte une structure à 4 branches rappelant la jonction de *Holliday* et appelée « chicken foot » du fait de sa ressemblance avec une patte de poule. Le rôle fonctionnel de cette conformation nécessite davantage d'investigation, néanmoins plusieurs propositions ont été émises (Lange *et al.*, *Nat Rev*, 2011 ; Ait-Saada *et al.*, *DNA Repair*, 2018). Premièrement, cette structure pourrait être une voie de contournement et de tolérance de dommages (Higgins *et al.*, *J Mol Biol*, 1976). Deuxièmement, la ré-hybridation des brins parentaux pourraient fournir une opportunité aux mécanismes de

réparation de l'ADN, d'exciser une lésion présente sur l'un des brins. Troisièmement, elle pourrait participer à la stratégie de stabilisation de la fourche en attendant le sauvetage par une fourche convergente. Quatrièmement, la fourche inversée pourrait constituer un prérequis ou une étape intermédiaire dans le redémarrage de la fourche par HR.

### **3.3. Le rôle de la HR dans la réparation des fourches arrêtées**

L'un des principaux résultats de mes travaux de recherche, fut de montrer l'implication du RNAi dans le redémarrage par HR d'une fourche de réplication bloquée. J'invite donc le lecteur à porter une attention particulière à cette section, qui décrit les connaissances actuelles concernant rôle de la HR dans la réparation des fourches en arrêt.

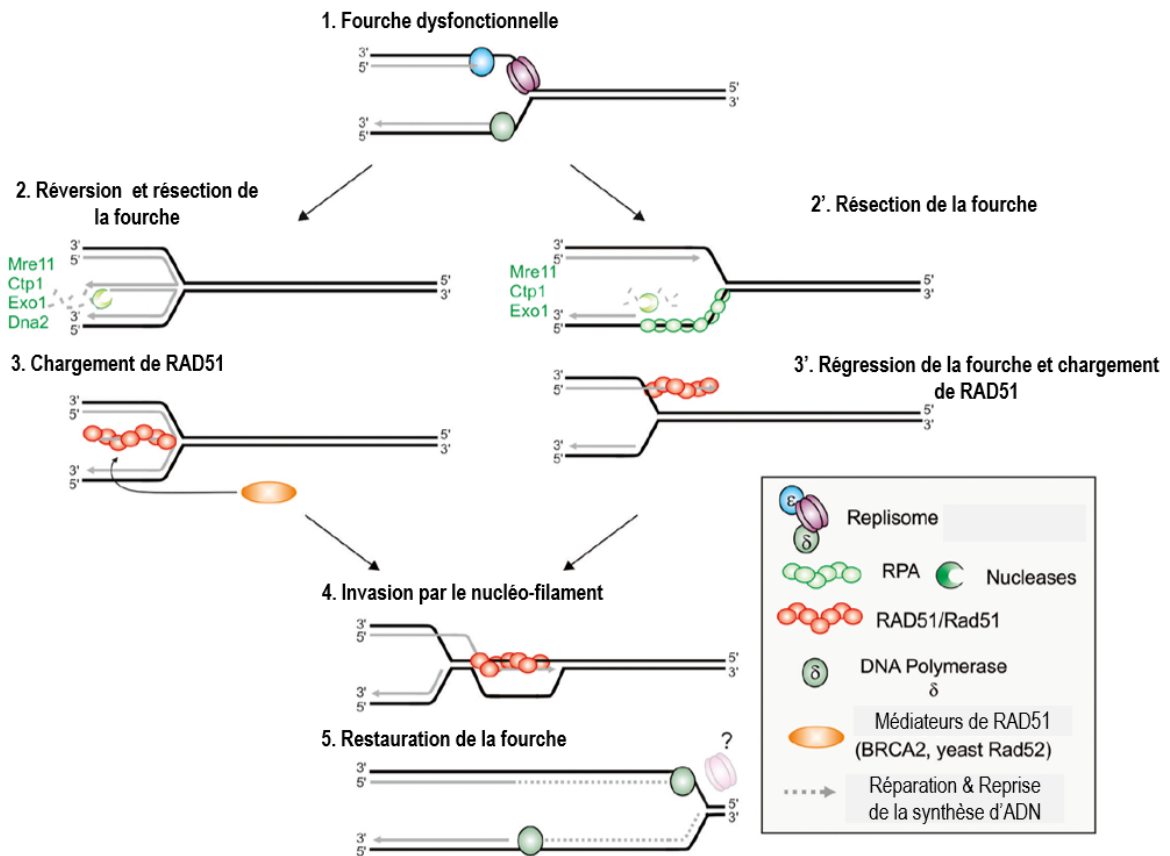
Les processus de redémarrage des fourches dysfonctionnelles impliquant des mécanismes de recombinaison sont connus sous le nom de RDR (*Recombination Dependent Replication*). Ils aboutissent à la réactivation, c'est-à-dire au rechargement d'un nouveau réplisome ou des facteurs perdus au moment du blocage de fourche.

Le redémarrage peut s'opérer au niveau d'une fourche cassée suite à son blocage ou arrêtée au niveau d'une cassure déjà présente. Ce redémarrage fait intervenir le mécanisme du BIR (**Figure 22**) selon un procédé de synthèse conservative de l'ADN et possiblement mutagène (Smith *et al.*, *Nature*, 2007 ; Deem *et al.*, *Plos One*, 2011 ; Saini *et al.*, *Nature*, 2013).

Le redémarrage par la HR peut également s'opérer au niveau de fourches dysfonctionnelles indépendamment de la formation d'une DSB (Lambert *et al.*, *Cell*, 2005). L'ensemble des travaux menés par Sarah Lambert et ses collaborateurs chez la levure fissipare, ont permis d'apporter des données moléculaires pour comprendre ce mécanisme. Ces études se basent sur l'exploitation contrôlée d'une RFB naturelle, à savoir la barrière *RTS1*, qui a été intégrée au niveau d'un autre locus, à une relative distance des origines de réplication. Dans ce système, le redémarrage s'effectue à partir d'un ssDNA généré au niveau de la fourche suite à un processus de résection. Ce redémarrage est dépendant de facteurs de recombinaison, notamment Rad51 et Rad52, qui vont promouvoir l'invasion du ssDNA qui servira de matrice (Lambert *et al.*, *Cell*, 2005 ; Mizuno *et al.*, *Genes Dev*, 2009 ; Lambert *et al.*, *Mol Cell*, 2010). Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'initiation du redémarrage (**Figure 33**). L'un envisage une réversion de fourche suite au blocage, qui fournirait un point d'entrée aux nucléases responsables de la résection. Ce modèle sera repris pour discuter du positionnement

de la fonction du RNAi après la présentation de mes travaux de recherche (Cf. partie Discussion et Perspectives). L'autre modèle envisage une régression de la fourche (ou « marche arrière ») sans remodelage de sa structure, mais laissant apparaître le brin précoce néosynthétisé ciblé par les protéines de recombinaison (**Figure 33**). Ce phénomène s'accompagnerait d'une résection initiée au niveau du brin retardé. Il a été montré que la résection s'opère en deux étapes, comme lors de la réparation d'une DSB : i) une dégradation limitée de 100 à 150 bp effectuée par le complexe MRN et Ctp1, puis ii) une dégradation extensive accomplie par Exo1, s'étendant sur environ 1kb. De plus, ce processus serait régulé par l'hétérodimère Ku70/Ku80, connu pour être impliqué dans la jonction d'extrémités non-homologues générées par une DSB. Cet hétérodimère jouerait ici un rôle dans la régulation du processus de résection dans le but d'assurer son déroulement en deux étapes. Il constituerait une ligne de défense contre les effets délétères d'une dégradation trop extensive par Exo1 (Silva *et al.*, *Nat Com*, 2017). L'implication de Ku appuie l'hypothèse d'un événement de réversion de fourche, qui pourrait fournir une extrémité double brin propice à la fixation de cet hétérodimère. Une fois réactivée, la réplication se fait de manière semi-conservative, impliquant la synthèse des brins précoce et retardé par la DNA Pol  $\delta$  (Miyabe *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Il a été montré que le réplisome formé est plus mutagénique qu'un réplisome canonique. Il est plus enclin à des glissements de la polymérase notamment au niveau des régions flanquées par de la micro-homologie (Iraqi *et al.*, *Plos Genet*, 2012), et à la réversion de l'orientation de la réplication (appelée *U-turn*) entre des séquences répétées inversées et pouvant générer des GCR (Mizuno *et al.*, *Nature*, 2013).





**Figure 33: Modèles de redémarrage des fourches de réplication par la recombinaison homologue chez *S. pombe***

Le redémarrage par HR d'une fourche qui a perdu sa compétence de réplication (1) pourrait débuter selon deux alternatives. Selon le premier modèle, la fourche réverse grâce à des hélicase telle que Dna2 (2). Puis le brin retardé néosynthétisé est dégradé par l'action conjointe de Ctp1, MRN et Exo1. L'ADN simple brin (ssDNA) généré suite à cette étape de résection fait l'objet d'une nucléation par RAD51 (3). Selon le second modèle, le redémarrage débute par la résection (2'). Il s'en suit une régression de la fourche qui rend le ssDNA accessible à Rad51 (3'). Le nucléo-filament envahit ensuite le duplex d'ADN parental en amont de la fourche de réplication, et génère une D-loop (4). Ceci aboutit *in fine* à la reprise de la réplication grâce au recrutement d'un réplisome non canonique, dans lequel la DNA Pol  $\delta$  assure la synthèse des brins précoce et retardé. Image modifiée de de Ait Saada *et al.*, *DNA Repair*, 2018.



De nombreux processus garantissent la fidélité de la réplication et la stabilité du génome. J'ai passé en revue certains de ces processus, comme les mécanismes de réparation de l'ADN et de prise en charge des fourches bloquées en lien avec un stress réplicatif.

La description classique des mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces différents processus, met particulièrement en avant la fonction et la régulation exercées par les différents facteurs protéiques ou enzymatiques. Il s'avère cependant que les ARN non codants jouent également un rôle non négligeable dans certains de ces processus. Dans le chapitre suivant, je tenterai de dresser l'état de l'art concernant la mise en évidence et la compréhension du rôle modulateur des ARN non codants (et en particulier de la voie du RNAi) dans le maintien de la stabilité génomique.

# **Chapitre III : RNAi et maintien de la stabilité du génom**

Les ncRNAs représentent la vaste majorité des transcrits dans les cellules eucaryotes. Bien qu'ils ne codent pas pour des protéines, ils revêtissent des fonctions cruciales dans divers processus biologiques. L'implication dans les mécanismes de maintien de la stabilité du génome des ncRNA et plus largement des protéines RBP avec lesquelles ils interagissent (RBP pour *RNA Binding Proteins*), fait désormais consensus. Il s'agit d'une fonction conservée d'un point de vue évolutif. Cependant, leur biogénèse suite à la survenue d'un dommage et leurs mécanismes d'action, plus particulièrement, dans la réparation de l'ADN sont encore très peu caractérisés. J'insisterai, principalement dans ce chapitre, sur le rôle direct du RNAi dans la préservation de l'intégrité génomique, étant donné que cet aspect a fait l'objet de mon projet de recherche. J'évoquerai ainsi les différents rôles biologiques qui lui sont proposés. J'attire néanmoins l'attention du lecteur sur le fait qu'il s'agit d'un champ d'investigation émergent. Par conséquent, les fonctions précises ne sont pas encore connues ou sont encore débattues.

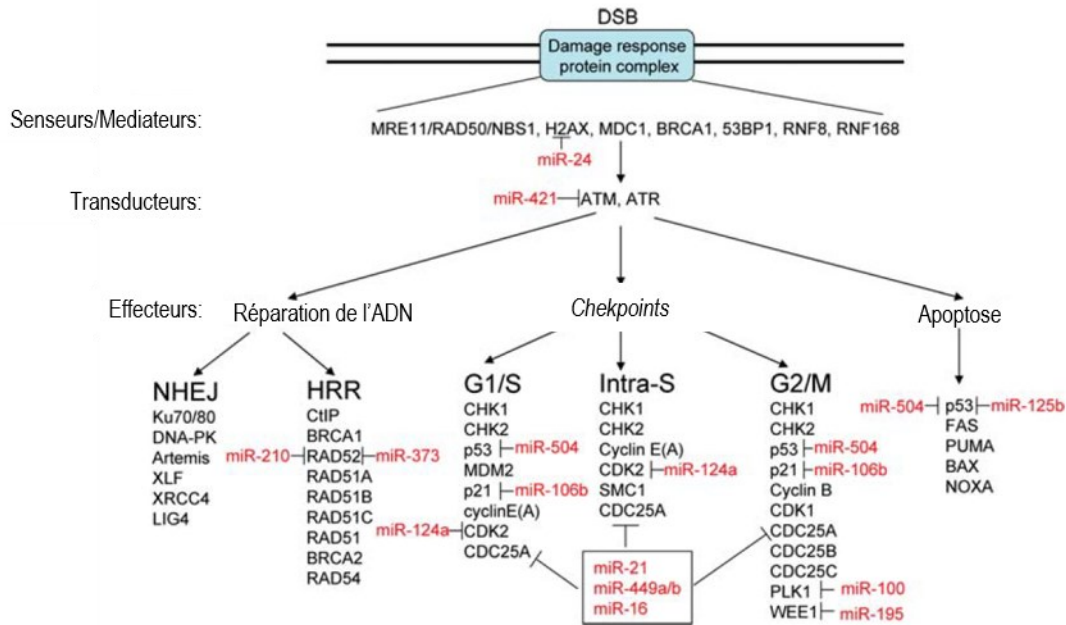
## **1 Rôle des sncRNAs dans la réponse au stress génomique**

### **1.1 L'implication de la voie des miRNAs**

La voie des miRNAs intervient dans la régulation de différents processus au sein de la cellule (*Cf.* chapitre 1 section 1). C'est la première des voies du RNAi à avoir été identifiée comme étant directement impliquée dans les processus de réponse au stress génomique (GSR). Des facteurs clés de cette réponse exercent une fonction régulatrice sur l'expression de certains miRNAs en agissant, à la fois, au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'exemple le plus probant est celui de p53. En effet, des analyses transcriptomiques ont permis d'identifier différents miRNAs dont l'expression est modulée de façon p53-dépendente lors d'un stress génotoxique (Chang *et al.*, *Mol Cell*, 2007 ; He *et al.*, *Nature*, 2007 ; Tarasov *et al.*, *Cell Cycle*, 2007 ; Braun *et al.*, *Cancer Res*, 2008). Par ailleurs, une étude a montré que p53 favorise la maturation de certains pri-miRNAs en pré-miRNAs en interagissant avec des facteurs impliqués dans cette étape (Suzuki *et al.*, *Nature*, 2009). De même, il a été mis en évidence que le facteur ATM interagit et phosphoryle KSRP qui est également impliqué dans la maturation des pri-miRNAs (Zhang *et al.*, *Mol Cell*, 2011).

Réciproquement, de nombreuses études portant sur des miRNAs spécifiques ont permis de mettre en évidence la régulation miRNAs-dépendante des facteurs clés de la GSR à savoir ATM et p53 (Hu *et al.*, *PNAS*, 2010 ; Hu *et al.*, *Mol Cell*, 2010 ; revue Hu et Gatti, *Mol Cell Biol*, 2011). Ils contribuent également à réguler d'autres facteurs impliqués dans les voies de réparations des dommages de l'ADN et dans la régulation de l'activation des checkpoints (**Figure 34**). D'autre part, de nombreuses études ont rapporté une altération du profil d'expression de certains miRNAs suite à une exposition à différents agents génotoxiques dans plusieurs profils cellulaires (Josson *et al.*, *Prostate*, 2008 ; Cha *et al.*, *Int. J. Oncol*, 2009 ; Maes *et al.*, *J Cell Biochem*, 2008 ; Pothof *et al.*, *EMBO J*, 2009). Bien qu'il existe des différences dans le profil des miRNAs affectés selon la lignée cellulaire testée, la prédiction de leurs cibles inclut beaucoup de mRNAs codant pour des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Suite à un stress génotoxique, cette modulation miRNAs-dépendante permettrait d'aboutir à un patron optimal d'expression des cibles impliquées dans la signalisation GSR et ainsi à une réponse cellulaire efficace. Cette régulation a également son importance dans certains processus physiologiques, comme celui de la différenciation cellulaire qui est généralement caractérisée par une atténuation de la réponse aux dommages de l'ADN (Nospikel et Hanawalt, *DNA Repair*, 2002). Par exemple mir-24 participe à réprimer l'expression l'histone variant H2AX dans les cellules hématopoïétiques différenciées (Lal *et al.*, *Nat Struct Mol Biol*, 2009).

Ainsi, l'ensemble des données met en avant une interconnexion entre les miRNAs et la voie GSR. Les miRNAs jouent à la fois, le rôle de modulateur et d'effecteur vis-à-vis de cette signalisation. Le constat d'une dérégulation de leur patron d'expression dans différents types de cancers, n'est donc pas étonnant (revue de Janssen et Lund, *Mol Onco*, 2012). D'ailleurs, certains miRNAs qualifiés d'oncomiR, sont admis comme étant des vecteurs importants de la tumorigenèse et sont à l'étude en tant que cibles thérapeutiques anti-cancéreuse (Taylor et Schiemann, *Mol Cell Ther*, 2014).



**Figure 34: Régulation miRNA-dépendante de la réponse au stress génotoxique**

Exemple de miRNAs ciblant des facteurs impliqués dans la signalisation des dommages. Il est à noter que d'autres cibles et d'autres miRNAs régulateurs ont été identifiés depuis. DSB : cassure double brin ; NHEJ : voie de la réparation par la jonction d'extrémités non-homologues ; HRR : voie de la recombinaison homologue. Figure modifiée de Hu et Gatti, J Mol Cell Bio, 2010.

## 1.2 Rôle des sncRNAs associés aux dommages de l'ADN

La production de sncRNAs suite à l'exposition à un stress génotoxique a été rapportée pour la première fois chez *Neurospora crassa*, il y a un peu plus de dix ans (Li *et al.*, *Nature*, 2009). Depuis, plusieurs études ont fait part de cette observation chez d'autres modèles et ont attribués différents noms à ces sncRNAs. Il semblerait donc que ce phénomène puisse constituer un processus conservé d'un point de vue évolutif. L'ensemble des études a mis en évidence l'implication des facteurs clés du RNAi dans la production de cette nouvelle classe de sncRNAs. Je vais résumer les éléments connus à ce jour dans chaque type de modèle d'étude et présenter les fonctions biologiques suggérées de ces sncRNAs et de leurs facteurs de biogénèse.

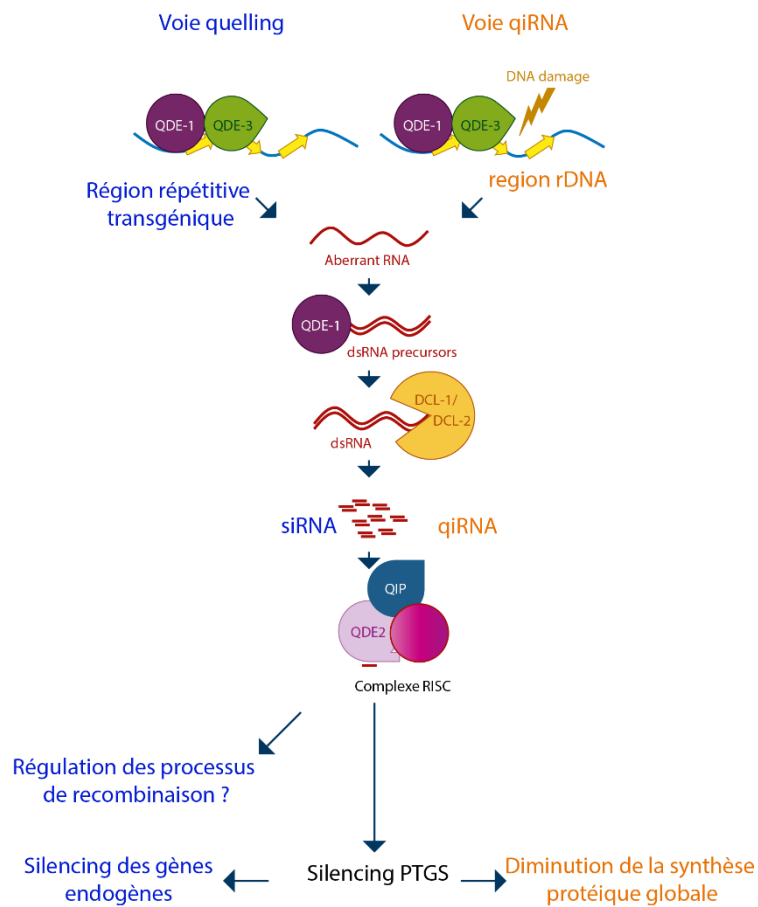
### 1.2.1 Données chez *Neurospora crassa*

*Neurospora crassa* est le modèle d'étude dans lequel le lien direct entre le RNAi et le contrôle de la stabilité génomique est le mieux caractérisé à ce jour. Deux voies du RNAi ont été mises en évidence dans ce modèle : la voie appelée « quelling » et la voie des qiRNAs (**Figure 35**). Elles sont déclenchées dans des circonstances différentes mais partagent des caractéristiques communes. Dans les deux cas, les sncRNAs sont produits à partir d'une source génomique de nature répétitive et selon un mécanisme de biogénèse similaire (Lee *et al.*, *Nature*, 2009 ; Zhang *et al.*, *Genes Dev*, 2013). La littérature actuelle chez *N. crassa* associe ces deux voies au maintien de la stabilité génomique suite à la survenue d'un stress répliatif.

La voie *quelling* a initialement été décrite comme un processus de *silencing* de type PTGS de gènes endogènes, induit par l'intégration dans le génome d'un transgène homologue présent en plusieurs copies répétées en tandem (Romano et Macino, *Mol Microbiol*, 1992 ; Cogoni *et al.*, *EMBO J*, 1996 ; Yang *et al.*, *Genes Dev*, 2015). Selon le modèle actuel (**Figure 35**), l'enzyme QDE-1 (*Quelling-Deficient-1*) est recrutée au niveau du transgène par RPA et QDE-3. Elle utilise d'abord son activité d'ARN polymérase ADN-dépendante pour produire en *cis* des transcrits « aberrants » (aRNAs) en utilisant spécifiquement un ssDNA comme matrice (Lee *et al.*, *Nature*, 2009 ; Lee *et al.*, *PLoS Biol*, 2010). Puis elle utilise son activité d'ARN polymérase ARN-dépendante pour convertir ces aRNAs en dsRNAs (Cogoni *et al.*, *Nature*, 1999 ; Nolan *et al.*, *NAR*, 2008). Le reste du processus suit alors le schéma classique de la voie du RNAi. Les dsRNAs sont clivés en duplexes de siRNAs de 25 nucléotides par les enzymes Dicer, DCL-1 et DCL-2, à l'activité redondante (Catalanotto *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2004). Ces derniers sont ensuite incorporés dans le complexe RISC dans lequel le brin passager est libéré grâce à l'action combinée de l'élément Argonaute QDE-2 et de l'exonucléase QIP (*QDE-2 Interacting Protein*). Le complexe RISC ainsi activé, conduit au *silencing* par un mécanisme PTGS des gènes homologues endogènes. L'efficacité du *silencing* corrèle avec le nombre de copies transgéniques introduites (Romano et Macino, *Mol Microbiol*, 1992 ; Yang *et al.*, *Genes Dev*, 2015), ce qui dénote de l'importance de la nature répétitive de la source transgénique dans le déclenchement du *quelling*. Une étude récente a rapporté que la production de siRNAs par la voie du *quelling*, pouvait également être induite suite à un traitement avec un agent génotoxique (Zhang *et al.*, *Genes Dev*, 2013).

Les qiRNAs (*QDE-2-interacting small RNAs*) constituent une classe de sncRNA de 21 à 23 nucléotides, dont la production est activée spécifiquement suite au traitement de *N. crassa*

par des agents génotoxiques (Lee *et al.*, *Nature*, 2009). Ils émanent du locus des rDNAs et leur biogénèse requière les facteurs principaux du *quelling* (RPA, QDE-3, QDE-1 et les protéines Dicer ; **Figure 35**). Il est proposé qu'en présence d'un stress génotoxique, les qiRNAs contribuent à diminuer la production générale des protéines selon un mécanisme PTGS. Cette hypothèse est appuyée par des données indiquant une diminution du taux de synthèse globale des protéines chez une souche *WT* après induction d'un stress génotoxique, mais pas chez des mutants n'exprimant plus certains composants de la machinerie du RNAi (Lee *et al.*, *Nature*, 2009).



**Figure 35: Les deux voies du RNAi chez *Neurospora crassa***

Les voies quelling et qiRNA sont respectivement activées par la transcription des répétitions de transgènes et de rDNA. Les transcrits aberrants (aRNA) obtenus, servent de matrice à la production d'ARN double brins (dsRNA) par QDE-1. Ces derniers sont convertis par les enzymes Dicer en siRNAs ou qiRNAs respectivement. Ces petits ARN sont pris en charge par la sous-unité QDE2 du complexe RISC, avec l'aide de QIP. Les deux voies mènent à un *silencing* de type PTGS. Dans le cas de la voie qiRNA, cette fonction contribuerait à diminuer la production protéique lors d'un stress génotoxique. Dans le cas du *quelling*, le silencing ciblerait les copies endogènes. Cette voie interviendrait également dans la régulation des processus de recombinaison lors d'un stress génotoxique, selon un mode d'action pas encore caractérisé. Image inspirée de Chang *et al.*, *Annu Rev Microbiol*, 2015.

Des données récentes ont permis de suggérer qu'un stress répliatif associé à la nature répétitive en tandem de la source génomique des sncRNAs, étaient à l'origine de leur production (Zhang *et al.*, *Genes Dev*, 2013 ; Yang *et al.*, *Genes Dev*, 2015). Premièrement, une accumulation d'intermédiaires de répliation et de recombinaison a été détectée au niveau des rDNAs en présence d'un stress génotoxique. Deuxièmement, l'induction contrôlée d'une DSB au niveau d'une répétition d'éléments transgéniques permet d'aboutir au *silencing* du transgène et à la production de siRNAs par la voie du *quelling*, et ce, uniquement dans une souche présentant un nombre de copies élevé de transgènes. Troisièmement, des facteurs de recombinaison homologue, tels que RAD51 et RAD54 sont requis pour la production des qiRNAs et le *silencing quelling*-dépendant. L'ensemble des données a permis de suggérer un modèle selon lequel, le stress répliatif survenant au niveau des régions répétées, génèrerait des évènements de recombinaison associés à la présence de ssDNA. Ces structures, permettraient de recruter QDE-3 et RPA et ainsi d'enclencher les voies du RNAi. Il est à noter que dans des conditions de pousse sans stress particulier, le locus des rDNAs est probablement protégé contre de tels évènements.

Par ailleurs, il a été observé une altération du nombre de copies de transgènes chez des mutants n'exprimant plus certains composants de la machinerie du RNAi, et soumis ou non à l'activation d'une DSB inductible (Yang *et al.*, *Genes Dev*, 2015). Cette variation du nombre de copies serait liée à des évènements de recombinaisons inappropriés ou incontrôlés, puisqu'elle n'est pas observée quand la voie du NHEJ est bloquée. Ce constat suggère que le RNAi interviendrait pour maintenir le nombre de copies transgéniques introduites dans le génome, probablement en régulant les processus de recombinaison au niveau de ces régions.

La littérature actuelle chez *N. crassa* associe ainsi le RNAi au maintien de la stabilité génomique suite à la survenue d'un stress répliatif.

### **1.2.2 Données chez la Drosophile**

La transfection de cellules de Drosophiles par des plasmides linéarisés mimant les extrémités d'une DSB induit l'apparition de sncRNAs de 21 nucléotides, appelés endo-siRNAs (Michalik *et al.*, *NAR*, 2012). Leur production implique des facteurs clés de la voie des siRNAs (Dcr-2 et Ago2) mais pas de la voie miRNAs (Dcr-1 et DROSHA), et n'est pas non plus induite par un SSB. La détermination de leur séquence par NGS (*Next Generation Sequencing*) souligne une similarité avec les séquences retrouvées au niveau du site de coupure de l'enzyme



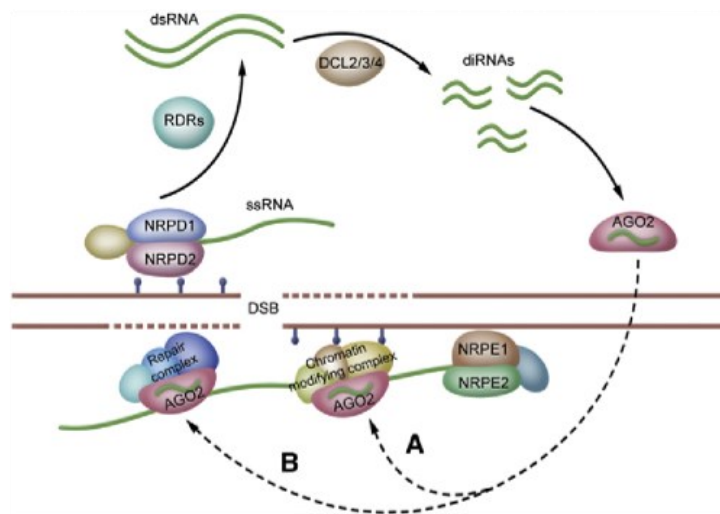
de restriction, ce qui suggère que les petits ARN sont générés à partir du site de coupure. Ces endo-siRNAs auraient la capacité de réduire au silence l'expression de transcrits ayant une séquence homologue et synthétisés à partir de plasmides co-transfectés. Ils exerceraient un *silencing* en *trans* de type PTGS. D'autre part, l'utilisation de systèmes rapporteurs dans lesquels la DSB induite est réparée par recombinaison homologue de type SSA (*Single Strand Annealing*), indique que l'efficacité de réparation n'est pas affectée par la déplétion en facteurs de la voie des siRNAs (Schmidts *et al.*, *NAR*, 2016). Il a ainsi été suggéré que la voie des endo-siRNAs ne participerait pas au processus de réparation mais pourrait contribuer à un contrôle qualité permettant d'éliminer les transcrits tronqués au niveau de la DSB.

Par ailleurs, la voie du RNAi a également été impliquée dans le maintien de l'intégrité des rDNAs. Cette affirmation est appuyée par l'observation que la déplétion de certains facteurs du RNAi est associée à un nombre surnuméraire de nucléoles et une accumulation des répétitions de rDNA sous la forme d'ERC (Peng et Karpen, *Nat Cell Bio*, 2006). D'autres observations ont été faites chez *S. pombe* et seront décrites dans la section 2.2 de ce chapitre.

### 1.2.3 Données chez les plantes

Chez *Arabidopsis thaliana*, la production de sncRNAs de 21 à 24 nucléotides a été observée suite à l'induction d'une DSB au niveau d'un système rapporteur (Wei *et al.*, *Cell*, 2012). Leur séquençage indique que ces petits ARN, appelés diRNAs (*DSB-induced small RNAs*), sont générés à partir de la transcription sens et anti-sens des séquences encadrant le site de cassure. Leur biogénèse implique certains facteurs de la voie RdDM (les protéines DICER, RNA Pol IV et V, les ARN-dependantes ARN Polymerases RDR2-6, ainsi que la PI3K ATR). De plus, ces diRNAs ont été identifiés comme étant chargés dans AGO2. L'efficacité de réparation de la cassure par le mécanisme de recombinaison homologue SSA est altérée par la déplétion des protéines Dicers, AGO2 et des RNA polymérase. Cet impact de la voie des diRNAs sur la réparation n'est pas dû à une régulation des protéines connues pour être impliquées dans la recombinaison car le niveau d'expression de celles-ci n'est pas affecté chez les mutants du RNAi. D'autre part, la déplétion des facteurs du RNAi précédemment cités n'affecte pas la formation des foci  $\gamma$ -H2AX. Ce résultat suggère que la voie des diRNAs n'est pas impliquée dans la reconnaissance initiale de la cassure mais agirait en aval de cette étape. Selon le modèle proposé par Wei et collègues (**Figure 36**), la RNA Pol IV et les RDR concourraient à générer un dsRNA à partir du ssDNA apparaissant suite à l'étape de résection

au niveau de la DSB. Celui-ci serait clivé par les enzymes Dicer et les diRNAs produits seraient chargés dans AGO2. Le complexe AGO2-diRNA faciliterait la réparation de la cassure en servant de guide dans le recrutement de complexes modifiant localement la chromatine ou de protéines directement impliquées dans la réparation et intervenant après la reconnaissance de la lésion. Au vu de l'impact de sa déplétion sur la production de diRNAs, la protéine ATR pourrait être un élément déclencheur de leur biogénèse. L'hypothèse a été faite que son activité serait requise pour le recrutement de la machinerie du RNAi au niveau de la DSB.

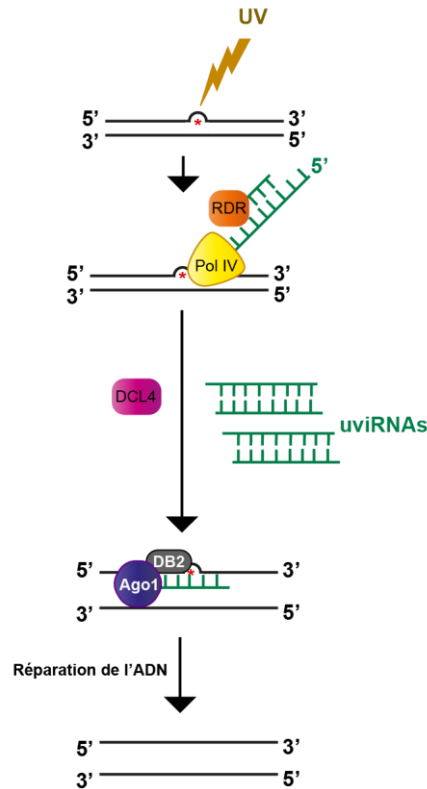


**Figure 36: Modèle d'implication des diRNAs dans la réparation d'une DSB chez Arabidopsis**

Les diRNA seraient produits en cis, au niveau du site de cassure, selon le schéma général de la voie RdDM impliquant la RNA pol V (NRPD1 et NRPD2), les ARN-dépendantes ARN Polymerases (RDR) et les protéines Dicer (DCL2-3-4). Ils seraient ensuite chargés dans AGO2 et permettraient le ciblage, par complémentarité de base, d'une ARN plateforme produite également en cis par la RNA Pol V (NRPE1 and NRPE2). Deux fonctions hypothétiques des complexes AGO2/diRNA sont envisagées : (A) ils participeraient au recrutement des complexes modificateurs de la chromatine, permettant de rendre celle-ci plus accessible aux facteurs de réparation ; B) ils participeraient directement au recrutement des facteurs impliqués dans la réparation de la DSB. Image issue de Wei *et al.*, *Cell*, 2012.

Une autre étude a analysé l'impact de la voie des diRNAs sur la réparation de la DSB induite par l'outil CRISPR au niveau d'un système rapporteur transgénique ou de locus endogènes chez *A. thaliana* et la plante du riz (Miki *et al.*, *Scientific Rep*, 2017). La cassure au niveau du système transgénique génère des diRNAs dont la production corrèle avec l'activité transcriptionnelle du transgène. En revanche, aucun diRNA n'a été détectés au niveau des locus endogènes testés. D'après ce résultat, les auteurs ont suggéré que ceci était probablement lié à la faible activité transcriptionnelle de ces régions, soulignant l'importance de cet aspect pour la production des diRNAs. Par ailleurs, certains facteurs du RNAi (AGO-2 et les RNA Pol) identifiés comme étant impliqués dans la production des diRNAs par l'étude de Wei *et al.*, ne le seraient pas dans le cadre cette étude. De plus, la déplétion de ces mêmes facteurs, ne semble pas affecter grandement l'efficacité de réparation de la DSB par HR dans le système utilisé. Cette étude de Miki *et al.*, illustre à quel point l'impact et les fonctions de la voie du RNAi dans la réparation des DSBs sont encore mal comprises.

Par ailleurs, le RNAi a été impliqué dans la réparation d'un autre type de lésion chez *A. thaliana*, à savoir, les dimères de pyrimidine provoqués par une exposition aux UV-C (Schalk *et al.*, *PNAS*, 2016). Il participerait au processus de reconnaissance de ces lésions. Une accumulation de sncRNAs de 21 nucléotides, appelés uviRNAs a été observée au niveau d'une grande proportion des sites endommagés. Leur biogénèse implique également des facteurs du RNAi (RNA POL IV, RDR2 et DCL4) mais selon une voie non canonique (la voie RdDM implique normalement DCL3 et non DCL4). La déplétion en ces facteurs rend les cellules plus sensibles aux radiations UV. Diverses expériences biochimiques ont mis en évidence : i) le chargement de AGO1 en uviRNAs ; ii) l'interaction d'AGO1 avec DDB2 (un facteur de reconnaissance des dimères de pyrimidines) stimulée par la biogénèse d'uviRNAs lors d'un stress ; iii) l'accumulation progressive de ces protéines au niveau des sites de lésions après irradiation. Il a ainsi été proposé que les uviRNAs faciliteraient la stabilisation du complexe DDB2-AGO1 au niveau du site de lésion détectée par DDB2, ce qui renforcerait ainsi le processus de reconnaissance (**Figure 37**).



**Figure 37: Modèle d'implication des uvi-RNAs dans la réparation des dimères de pyrimidine chez *A. thaliana***

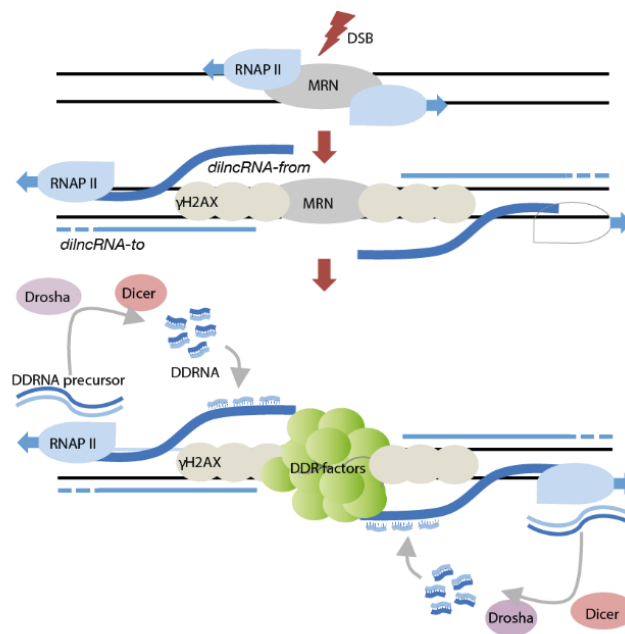
Les uviRNAs seraient produits *in cis*, à proximité du dimère de pyrimidines induits par des radiations ultraviolettes (UV). Leur biogénèse serait initiée par la production d'ARN double brins (dsRNA) suite à l'action conjointe de la RNA Pol IV (objet jaune) et de RDR2 (objet orange). Ces dsRNAs seraient convertis en uviRNAs par DCL4, qui seraient ensuite chargés dans AGO1. AGO1-uviRNAs forme un complexe avec DDB2 afin de promouvoir la reconnaissance de la lésion. AGO1-uviRNA permet de stabiliser la reconnaissance primaire du dimère de pyrimidines par DDB2, par complémentarité de séquence entre l'uviRNA et le site génomique. Le complexe DDB2-AGO1-uviRNA permettrait *in fine* de faciliter le déclenchement de la réponse au stress génotoxique. Image entièrement produite.

#### 1.2.4 Données chez les mammifères

L'étude de Francia *et al.*, a rapporté que DICER et DROSHA sont requis pour la formation et la maintenance des foyers de réponse aux dommages de l'ADN (foyers DDR pour *DNA-damage response*), en présence de différents types de stress génotoxiques infligés à des modèles cellulaires humains ou murins (Francia *et al.*, *Nature*, 2012). Cette implication de DICER dans la réponse aux dommages de l'ADN est surprenante car cette protéine est décrite

classiquement comme étant essentiellement cytoplasmique dans la littérature actuelle. Les foyers testés dans l'étude correspondent précisément aux protéines 53BP1, MDC1 ou ATM phosphorylée (pATM), qui se forment lors de la détection d'une lésion et permettent le déclenchement de la signalisation GCR. Les facteurs DICER et DROSHA seraient également requis pour l'activation des *checkpoints*. En revanche, leur inactivation n'altère pas la formation des foyers  $\gamma$ -H2AX, ce qui indique qu'ils ne seraient pas impliqués dans la détection précoce de la lésion (Francia *et al.*, *Nature*, 2012). Des observations similaires ont été rapportés par d'autres études (Wang *et al.*, *Cancer Res*, 2016 ; Gao *et al.*, *Cell Res*, 2014). Plusieurs éléments ont conduit les auteurs à impliquer la présence de sncRNAs appelées DDRNAs (DROSHA-dependent small RNAs), en tant que contributeur dans les fonctions de DICER et DROSHA (Francia *et al.*, *Nature*, 2012). Premièrement, la formation des foci DDR altérés par un traitement à la ribonucléase en présence d'un stress génotoxique, peut être restaurée : i) soit par un extrait d'ARN totaux provenant de cellules WT stressées mais pas de cellules déficientes en DICER ou DROSHA, ii) soit par l'addition de petits ARN synthétiques contenant des séquences similaires au sites de lésions. L'implication de ces DDRNAs dans la voie GCR est appuyée par des expériences de complémentations indiquant que les fonctions enzymatiques de DICER et DROSHA sont requises pour la restauration des foci DDR. La production de ces sncRNAs serait également dépendante du complexe MRN actif et de la RNA Pol II, puisque l'inhibition de l'un ou l'autre de ces éléments nuit à la restauration des foci DDR. En revanche, leur biogénèse ne dépendrait pas de facteurs clés de la voie miRNA, et il s'agirait, par conséquent, d'une voie indépendante. Récemment, la production d'un lncRNA au niveau d'un site de DSB induite de manière contrôlée dans un système transgénique, a été mis en évidence comme étant essentielle à la formation des foci DDR (Michelini *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2017). Nommé dilncRNA (pour *Damage-Induced long non-coding RNAs*), il est synthétisé par la RNA Pol II qui serait recrutée au niveau de la lésion *via* son interaction avec le complexe MRN. Selon le modèle proposé (**Figure 38**), le dilncRNA exercerait différentes fonctions. Premièrement, il est considéré comme étant le précurseur des DDRNAs. Sa production serait issue de l'activité transcriptionnelle de la RNA Pol II. Cette activité s'exercerait de façon bidirectionnelle à partir du site de lésion, et aboutirait à la formation de dsRNAs. Ces derniers serviraient ensuite à générer les DDRNAs grâce aux fonctions enzymatiques de DROSHA et DICER. L'implication de DICER reste néanmoins un point majeur qui doit être clarifié. Une étude récente a mis en évidence l'accumulation d'une forme phosphorylée de DICER après induction d'un stress génotoxique dans une lignée cellulaire humaine (Buger *et al.*, *J Cell Bio*,

2017) et l'a associée à la réparation de DSBs. Un rôle nucléaire de DICER dans la production des DDRNAs ne peut être exclu mais des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour déterminer le lieu de production. Deuxièmement, le dlincRNA servirait de plateforme de recrutement aux DDRNAs *via* appariement de base. Ce modèle fait écho à celui de la formation d'hétérochromatine RNAi-dépendante chez *S. pombe* (Cf. 3.4) Troisièmement, le dlincRNA et les DDRNAs auraient la capacité d'interagir avec la protéine de signalisation 53BP, ce qui faciliterait la formation de foci 53BP (Michelini *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2017 ; Pessina *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2019). D'autres travaux publiés par la même équipe, confirment l'implication de la voie DDRNAs dans la signalisation GCR mais mettent en évidence son rôle possible dans le recrutement secondaire des facteurs de signalisation et l'amplification du signal de détection. En effet, l'inactivation de DICER et DROSHA ou bien un traitement en présence de ribonucléase, n'affecte pas le recrutement des senseurs primaires NBS1 (membre du complexe MRN), mais bien celui de 53BP1 et MCD1 (Francia *et al.*, *J Cell Sci*, 2016). Par ailleurs, une



**Figure 38: Modèle d'implication des DDRNAs dans la signalisation d'une DSB chez les mammifères**

Après la détection de la DSB, MRN recrute la RNA Pol II qui enclenche une transcription bidirectionnelle au niveau du site de lésion. Les dlincRNA *from* et *to*, ainsi obtenus formeraient des ARN double brins, précurseurs des DDRNA suite à l'action conjuguée de DICER et DROSHA. Les DDRNA seraient recrutés au niveau des dlincRNA. L'ensemble interagirait avec la protéine de signalisation 53BP et faciliterait la formation de foci. Image issue de Michelini *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2017.

étude récente a rapporté que le dilncRNA serait plus directement impliqué dans la réparation de la cassure par HR en contribuant au recrutement des facteurs BRCA1, BRCA2, RAD51 (Alessandro *et al.*, *Nat Com*, 2018).

D'autres fonctions ont été attribuées au RNAi dans la réparation d'une DSB par HR. Des études réalisées sur des lignées cellulaires humaines, mettent en avant les rôles possibles joués par AGO2. Premièrement, AGO2 permettrait le recrutement de RAD51 au niveau de la cassure, en utilisant les diRNAs comme guide. Ce modèle est soutenu par les observations d'une interaction entre AGO2 et RAD51 et d'un recrutement AGO2-dépendant de RAD51 nécessitant également l'activité catalytique d'AGO2 (Gao *et al.*, *Cell Res*, 2014). Deuxièmement, AGO2 permettrait le recrutement des modificateurs de la chromatine MMSET et TIP60. Le changement du paysage épigénétique qui en découlerait, contribuerait à créer un état chromatinien plus favorable au recrutement des protéines impliquées dans la réparation. Ce modèle est appuyé principalement par les observations suivantes : i) l'addition de petits ARN synthétiques contenant des séquences similaires au sites de lésions permet de rétablir de nombreux éléments altérés par la déplétion de DICER et DROSHA (le recrutement des modificateurs et autres protéines de réparation et l'accumulation de marques épigénétiques caractéristiques) ; ii) interaction entre AGO1 et les modificateurs de la chromatine ; iii) le recrutement des modificateurs AGO-2 dépendants (Wang *et al.*, *Cancer Res*, 2016). L'implication de AGO1 et AGO2 dans réparation d'une DSB reste néanmoins surprenante car ces protéines sont classiquement décrites comme étant essentiellement cytoplasmiques dans la littérature actuelle.

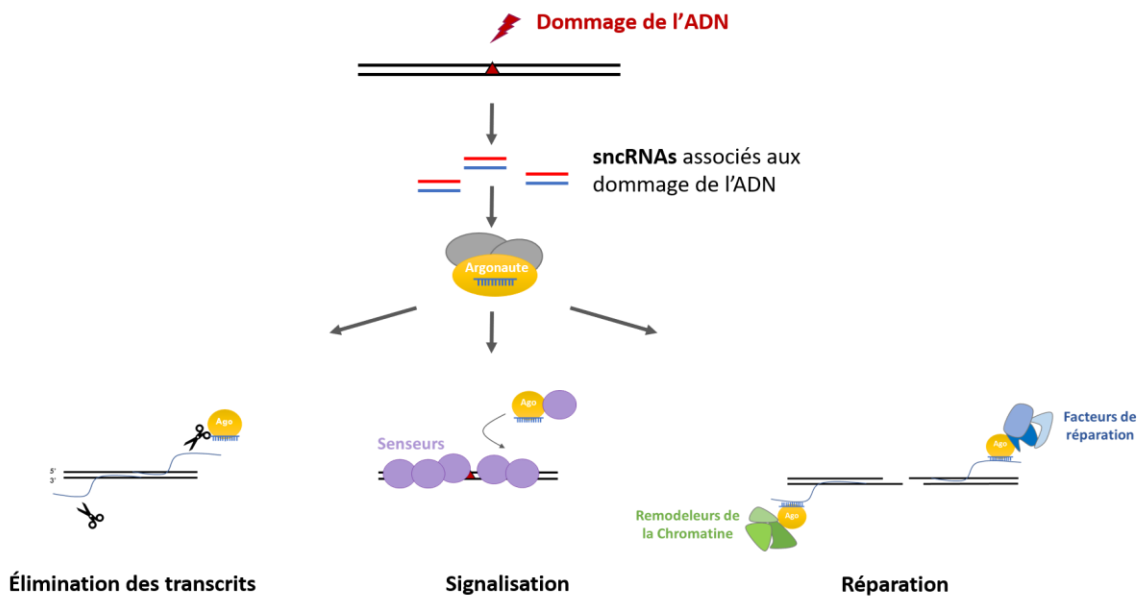
### **1.2.5 Synthèse des fonctions probables du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique**

Dans l'ensemble, les données actuelles mettent avant l'existence d'une voie RNAi non canonique, activée suite à un stress génotoxique. Les fonctions probables attribuées à cette voie dans la réponse au stress, diffèrent selon le modèle étudié. Plusieurs options sont avancées (**Figure 39**) :

- Le RNAi exercerait une fonction PTGS qui résulterait à la résorption des transcrits présents au niveau d'une DSB ;



- Le RNAi serait impliqué dans la signalisation des dommages : i) soit à un stade précoce dans le cas de dimères de pyrimidines, ii) soit un stade secondaire, ce qui contribuerait à promouvoir l'amplification du signal de détection dans le cas d'une DSB ;
- Le RNAi aurait un rôle plus direct dans la réparation des DSB par HR : i) soit en recrutant les protéines impliquées dans cette réparation, ii) soit en impliquant des facteurs de remodelage de la chromatine concourant à faciliter l'accès aux facteurs de recombinaison.



**Figure 39 : Fonctions possibles des sncRNAs associés aux dommages de l'ADN**

Lors d'un dommage à l'ADN, telle qu'une DSB, des sncRNAs (différentes nomenclatures selon les espèces: DDRNAs, diRNAs, uviRNAs, qiRNAs) sont produits *in cis* par des facteurs du RNAi. Plusieurs fonctions ont été proposées pour cette voie du RNAi : i) elle exercerait un *silencing* de type PTGS afin de résorber une transcription aberrante au niveau du site de lésion ; ii) elle favoriserait l'activation de la réponse au dommage de l'ADN en participant à la détection ou à l'amplification du signal de détection ; iii) elle participerait à la réparation en recrutant des remodeleurs de la chromatine ou des facteurs impliqués dans la réparation. Figure entièrement produite.

Il reste toutefois plusieurs zones d'ombre quant aux mécanismes d'action du RNAi. Par exemple, les facteurs du RNAi identifiés chez les plantes, comme impliqués dans la voie GCR ne concordent pas entre les études. De plus, la fonction des protéines Argonautes, un des acteurs majeurs du RNAi, n'a pas suffisamment été étudiée, de même que l'importance de leur activité



catalytique. Par ailleurs, la production induite des sncRNAs au niveau du site de lésion est contestée par certains auteurs. D'aucuns rétorquent que la transcription pervasive liée au promoteur viral dans le système rapporteur utilisé et le faible enrichissement des sncRNAs au niveau des sites de lésions, constituent des éléments rendant discutable la spécificité de production des sncRNAs (Hawley *et al.*, *Cell Death Diff*, 2017). D'autre part, la plupart des travaux mentionnés dans section précédente, sont basés sur l'exploitation d'un système inductible de DSB. Le rôle du RNAi notamment en présence d'un stress réplcatif induisant le blocage d'une fourche de réplication, n'a pas suffisamment été adressé.

## **2 Quid de la fonction du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique chez *S. pombe***

Dans mon projet de thèse, j'ai utilisé *S. pombe* en tant que modèle d'étude afin d'investiguer le rôle du RNAi dans la stabilité génomique. J'ai donc décidé de dédier une section à part entière à la description des études ayant abordé cette problématique dans le même organisme.

### **2.1 Rôle dans progression du cycle cellulaire**

Des travaux de recherche ont rapporté que les mutants *ago1Δ* et *dcr1Δ* présentaient un niveau de cytokinèse anormalement élevé (mesuré par l'indice de septation) en présence de différents types de stress génotoxiques (Carmichael *et al.*, *MBC*, 2004). Cette observation souligne un problème de régulation de la progression du cycle cellulaire en condition de stress chez ces mutants. Celui-ci a été associé à un défaut de régulation du niveau de phosphorylation de Cdc25. Cette kinase est l'élément clé de régulation du checkpoint S-M (Enoch et Nurse, *MBC*, 1990 ; Rhind et Russell, *MCB*, 1998). Son hyperphosphorylation inhibe l'entrée en mitose, notamment en présence d'un stress génotoxique. Or, cette caractéristique est altérée chez les mutants *ago1Δ* et *dcr1Δ*. Les données suggèrent ainsi qu'Ago1 et Dcr1 sont impliqués dans la régulation du checkpoint G2-M. L'hypothèse a été émise par les auteurs que cette fonction de Dcr1 et Ago1 était indépendante de la voie du RNAi impliquée dans la formation

de l'hétérochromatine, car l'altération du checkpoint G2-M s n'a pas été observée chez le mutant *rdp1Δ* (Carmichael *et al.*, *MBC*, 2004).

## 2.2 Rôle du RNAi dans la résolution des conflits entre les machineries de réplication et de transcription

Les deux premières études investiguant l'impact du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique chez cet organisme se sont principalement focalisées sur les régions péri-centromériques. Le RNAi est en effet connu pour orchestrer la formation d'hétérochromatine au niveau de ces régions chez *S. pombe*. Des études d'interactions génétiques entre certains mutants du RNAi et des mutants n'exprimant plus des protéines impliquées dans les processus de réplication et réparation de l'ADN, ont mis en évidence des épistasies (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011 ; Li *et al.*, *Cell Rep*, 2013). Ces données suggèrent que le RNAi et les protéines impliquées notamment dans la protection de la fourche de réplication, exerceraient un effet synergique permettant de maintenir l'intégrité des régions péri-centromériques.

La préservation de la spécification du type de chromatine implique que la transmission des marques épigénétiques s'opère directement après le passage de la fourche (Cf. section 2.5). La formation d'hétérochromatine RNAi-dépendante est ainsi temporellement couplée à la réplication de l'ADN. Des données d'interactions protéiques suggèrent d'ailleurs que la propagation de la marque d'hétérochromatine H3K9me<sub>2</sub> est couplée à la progression du réplisome (Li *et al.*, *Nature*, 2011), selon une connexion qui serait RNAi-dépendante (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011). La formation d'hétérochromatine est initiée par la transcription des répétitions *dh/dg* assurée par la RNA Pol II (Li *et al.*, *Plos One*, 2012 ; Djupedal, *Genes Dev*, 2005). Cette activité est à l'origine de la production du précurseur dsRNA initiant la voie du RNAi (voir section 2.4 du chapitre 1). La présence concomitante et non coordonnée de la RNA Pol II et du réplisome peut mettre en péril la stabilité génomique en cas de collisions entre ces éléments. Il a été suggéré, par les travaux de Zaratiegui *et al.*, que non seulement le RNAi orchestre la formation d'hétérochromatine, mais qu'il participe également à prévenir ou résoudre un stress répliatif causé par les collisions entre les machineries de réplication et de transcription. Plusieurs observations ont été ainsi rapportées au niveau des répétitions péri-centromériques chez le mutant *dcr1Δ* (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011): i) une accumulation de molécules d'ADN jointes, ii) un enrichissement de la protéine de

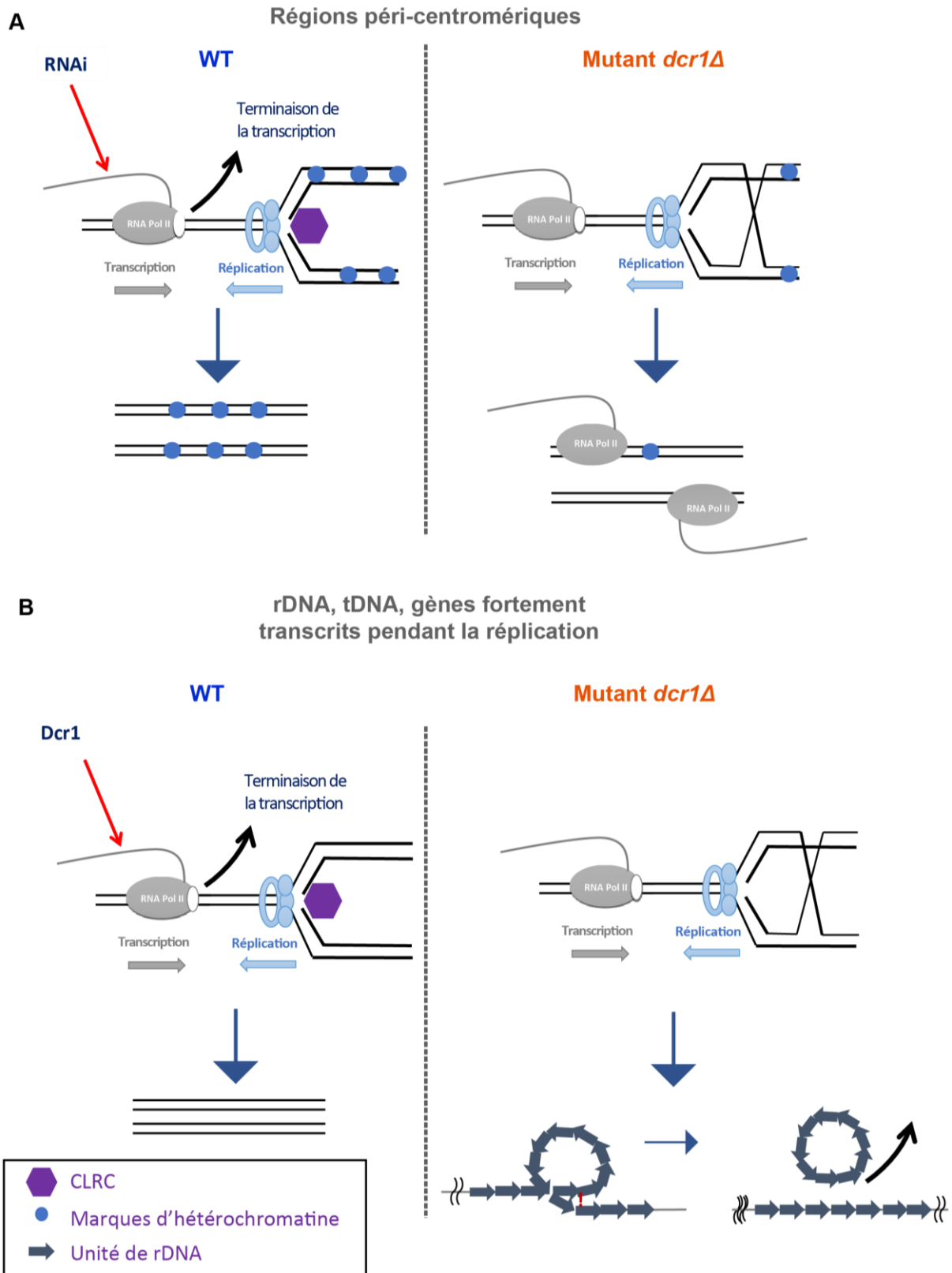
recombinaison Rad22 lors de la reprise du cycle cellulaire après une synchronisation des cellules au HU ; iii) un enrichissement de la RNA Pol II aux sites de polyadénylation (enrichissement global observé également chez le mutant *ago1Δ* ; Castel *et al.*, *Cell*, 2014) ; iii) une accumulation de longs transcrits (observé également chez les mutants *ago1Δ* and *rdp1Δ*). Ces deux dernières observations suggèrent un défaut de terminaison de la transcription par la RNA Pol II chez le mutant *dcr1Δ*, entraînant son accumulation sur la chromatine, et représentant ainsi un obstacle pour la progression du réplisome. Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel le RNAi participerait à résoudre les conflits entre le réplisome et la RNA Pol II, en facilitant la terminaison de transcription, favorisant ainsi la progression de la fourche de réplication et la déposition des marques d'hétérochromatine (**Figure 40A**). Le mécanisme suggéré s'inspire du modèle appelé « Torpedo » de terminaison de la transcription. Selon celui-ci la dégradation de l'ARN naissant par la 5'-3' exoribonucléase Rat1/Dhp1, déstabiliserait la RNA Pol II, provoquant ainsi la libération de celle-ci de la chromatine (Kim *et al.*, *Cell*, 2004 ; West *et al.*, *Nature*, 2004). Il a été spéculé que les activités enzymatiques du RNAi (activités *dicing* de Dcr1 et *slicing* de Ago1) pourraient contribuer à la dégradation de l'ARN naissant, mais cette hypothèse n'a pas été vérifiée par les auteurs. En absence du RNAi, le redémarrage de la fourche de réplication se ferait par le mécanisme de la HR et s'accompagnerait d'une altération de la maintenance des marques épigénétiques (**Figure 40A**).

L'analyse à grande échelle de l'enrichissement de la RNA Pol II, a suggéré que les conflits avec le réplisome pourraient s'opérer au niveau d'autres sites que la région péri-centromérique. Un enrichissement plus important de la RNA Pol II au niveau de l'extrémité 3' de certains gènes codant pour des protéines ainsi qu'au niveau des rDNAs et des tDNA a été observé chez le mutant *dcr1Δ* (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). La perte de pics d'enrichissement de sRNA (dont la taille fait écho aux produits issus de l'activité catalytique de Dcr1) au niveau de ces régions a également été rapporté chez ce même mutant. L'analyse discriminatoire entre la forme en pause ou en cours d'élongation de la RNA Pol II au niveau des rDNAs et des tDNA, suggère une transcription anti-sens à celle assurée canoniquement par les RNA Pol I et Pol III respectivement. Il est à noter que la fonction de cette transcription RNA Pol II-dépendante n'est pas encore très bien comprise. Il peut d'agir d'un phénomène de transcription pervasive n'ayant aucune fonction bien précise. L'ensemble des données suggère, là encore, un défaut de terminaison de la transcription en absence de Dcr1, au niveau des rDNAs et des tDNA et de certains gènes codant pour des protéines (Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

Une attention particulière a été portée à l'étude du rôle du RNAi dans le maintien de la stabilité de la région ribosomale. Plusieurs observations ont été rapportées chez le mutant *dcr1Δ* (Castel *et al.*, *Cell*, 2014): i) une diminution stable de copies de rDNAs, quantifiées par une approche de PCR quantitative (PCR pour *Polymerase Chain Reaction*), au cours de plusieurs cycles mitotiques ; ii) une diminution progressive du nombre de copies de rDNAs au cours de plusieurs cycles méiotiques ; iii) des pics d'accumulation des protéines Rad52 et Crb2, signes d'un stress répliatif ; iv) des pics d'enrichissement d'hybrides ARN:ADN, suggérés comme étant la conséquence de collisions entre la fourche de réplication et la RNA Pol II. La diminution de copies ribosomales au cours de plusieurs cycles mitotiques ou méiotiques, n'a pas été observé chez le mutant *ago1Δ*. Sur la base de ces données, les auteurs ont conclu Dcr1 est impliqué dans le maintien du nombre de copies ribosomales, en facilitant la terminaison de la transcription. Dcr1 agirait indépendamment de la voie canonique du RNAi, et ainsi, sa fonction n'impliquerait pas Ago1. En absence de Dcr1, le redémarrage de la fourche de réplication se ferait par le mécanisme de la HR et s'accompagnerait d'une perte de copies des rDNAs. Il est à noter que ces conclusions sont liées la quantification des unités ribosomales par une méthode de PCR quantitative chez les mutants du RNAi. Cette approche ne permet pas de discriminer entre les unités de rDNAs contenues dans le génome ou dans les éléments ERC. On ne peut donc pas éliminer la possibilité d'une instabilité des rDNAs associée à la production d'éléments ERC.

Contrairement à ce qui est observé au niveau de la région péri-centromérique, le niveau d'enrichissement de la marque d'hétérochromatine constitutive H3K9me<sub>2</sub> n'est pas impacté par l'absence de Dcr1, au niveau des rDNAs et des tDNAs et de certains gènes codant pour des protéines (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). De plus, l'accumulation de la RNA Pol II au niveau des rDNAs et tDNA, n'a pas été observée ni chez le mutant *ago1Δ*, ni chez une souche présentant une altération de l'activité catalytique de Dcr1. Sur la base de ces résultats, les auteurs ont suggéré que Dcr1 participerait à promouvoir la terminaison de la transcription de la RNA Pol II au niveau des rDNAs et des tDNA et de certains gènes codant pour des protéines (**Figure 40B**). Au niveau de ces sites, les composants de la voie canonique du RNAi (comme Ago1) et la formation d'hétérochromatine RNAi-dépendante ne seraient pas impliqués. De plus, cette fonction de Dcr1 n'impliquerait pas son activité catalytique dite de *dicing*. Les auteurs ont émis l'hypothèse que Dcr1 jouerait le rôle de plateforme de recrutement des facteurs responsables de la terminaison de la transcription par la RNA Pol II. Les sncRNAs observés au niveau de ces sites chez une cellule *WT* (et perdus chez le mutant *dcr1Δ*), constitueraient des produits de

dégradation formés pendant le processus de terminaison de la transcription et ne seraient pas impliqués dans ce processus. Il a été spéculé qu'ils seraient sujets à une dégradation par l'exosome, ce qui empêcherait leur chargement dans Ago1 et l'induction RNAi-dépendante de la formation d'hétérochromatine. Il est à noter que très peu d'interactions protéiques ont été apportées pour étayer l'ensemble de ce modèle. La fonction moléculaire précise de Dcr1 de modèle de terminaison de la transcription demeure donc assez peu caractérisée.



**Figure 40 : Rôle potentiel du RNAi dans la coordination des machineries de transcripton et de réplication chez *S. pombe***

- A) Au niveau des régions péri-centromériques, la réplication est couplée à la déposition des marques d'hétérochromatine assurée par le complexe CLRC. La formation d'hétérochromatine est orchestrée par le RNAi et est initiée par l'activité transcriptionnelle de la RNA Pol II. Celle-ci peut donc représenter un obstacle à la progression de la fourche de réplication. Le RNAi participerait à la résolution des éventuels conflits entre le réplisome et la RNA Pol II, en facilitant la terminaison de la transcription, ce qui aboutirait à l'éviction de la RNA Pol II. L'implication du RNAi permettrait donc de favoriser la progression de la fourche de réplication et la déposition des marques d'hétérochromatine. En absence du RNAi, et notamment de Dcr1, la propagation des marques d'hétérochromatine n'est plus assurée et la RNA Pol II n'est pas libérée de la chromatine, ce qui engendre un blocage de la fourche de réplication. Le redémarrage des fourches de réplication se ferait par recombinaison homologue.
- B) Les conflits entre la machinerie de réplication et de transcription se produiraient également au niveau de gènes fortement transcrits de manière Dcr1-dépendante au cours de la réplication, et au niveau des ADN ribosomiaux (rDNA) et des séquences codantes pour les ARN de transfert (tDNAs). Seulement l'enzyme Dcr1 (et pas Ago1) serait impliquée dans la résolution de ces fonctions en favorisant la terminaison de la transcription. Son activité *dicing* ne serait pas requise. En absence de Dicer, ces conflits non résolus constitueraient un stress réplicatif engendrant, entres autres, une contraction des rDNAs. Figure entièrement produite.

### **3 Implication des autres processus ARN-dépendants dans la réponse au stress génomique**

#### **3.1 Implication des lncRNAs**

Les lncRNAs sont connus pour être des régulateurs de divers processus biologiques. Ils interviennent également dans le maintien de la stabilité génomique et notamment dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN. De nombreux exemples de lncRNAs ont été rapportés comme étant transcrits en réponse à un stress génotoxique et permettant de contrôler l'expression de facteurs impliqués dans la GCR. Le premier exemple à avoir été identifié est celui du lncRNA<sub>CCND1</sub> dans les cellules humaines, qui dérive de la région 5' régulatrice du gène *CCND1* codant pour la Cyclin D1 (Wang *et al.*, *Nature*, 2008). Il interagit avec la protéine TLS (*Translocated in LipoSarcoma*) sur laquelle il exerce une modulation allostérique rendant la protéine active. Celle-ci peut interagir avec le complexe d'histone acétyltransférase p300/CBP et inhiber son activité au niveau du promoteur du gène *CCND1*.

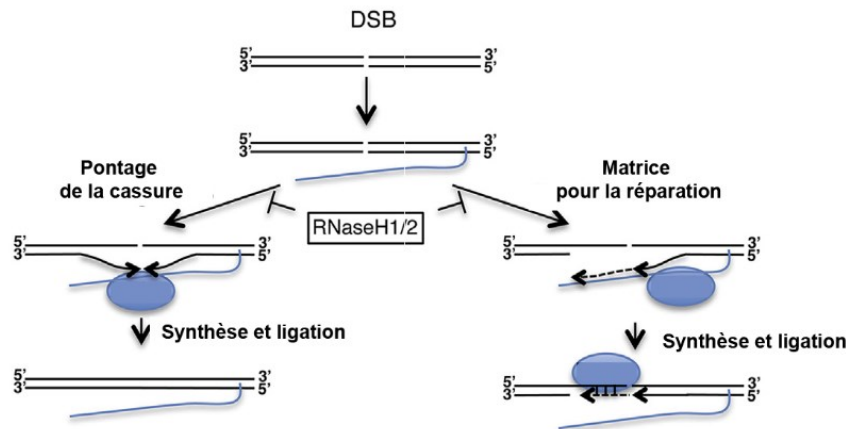
L'ensemble de la voie aboutit à la répression de l'expression du gène *CCND1*, permettant ainsi de réguler la progression du cycle cellulaire lors d'un stress génotoxique. Un autre exemple est celui de NORAD (*noncoding RNA activated by DNA damage*) qui agit en séquestrant une fraction appropriée des protéines PUMILIO. En absence de ce lncRNA, les protéines PUMILIO répriment l'expression de divers facteurs impliqués dans la réparation et la réplication de l'ADN, ce qui aboutit à une instabilité chromosomique (Lee *et al.*, *Cell*, 2016). Un autre mécanisme d'action des lncRNAs dans la voie GCR a récemment été mis en évidence. Il est illustré par l'exemple du dilncRNA qui est synthétisé au niveau d'un site de DSB (déjà évoqué dans la section 1.2.4 de ce chapitre). Ce dernier servirait de plateforme pour recruter des facteurs impliqués dans la signalisation des dommages et faciliter leur regroupement en foci par séparation de phase (Michelini *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2017 ; Pessina *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2019).

### 3.2 Rôle de l'ARN dans la réparation des DSBs

L'un des dogmes centraux de la biologie moléculaire stipule que l'information génétique passe unidirectionnellement de l'ADN à l'ARN. La circulation inverse est connue à travers l'activité des réverses transcriptases (RT), mais est considérée comme se limitant aux rétrovirus et aux rétrotransposons (Baltimore, *Cell*, 1985) ou encore à la synthèse des télomères (Autexier et Lue, *Annu Rev Biochem*, 2006). L'étude de l'activité du rétrotransposon *Ty* chez la levure *S. cerevisiae*, a révélé que le transfert de l'information de l'ARN à l'ADN ne concernait pas uniquement l'information contenue dans les rétro-éléments et qu'elle jouait un rôle dans la réparation des DSBs. En effet, des travaux ont mis en évidence la réparation possible de sites inductibles de cassure double brin par l'intégration de fragments d'ADN complémentaire (cDNA) provenant d'éléments *Ty* seul ou fusionnés à un gène rapporteur (Moore et Haber, *Nature*, 1996 ; Teng *et al.*, *Nature*, 1996). Ces données suggèrent que l'activité RT des éléments *Ty* génère des cDNA qui sont détournés par la machinerie de réparation. D'autres études réalisées dans des modèles de mammifères rapportent également l'insertion du rétrotransposon LINE (*Long interspersed element*) au niveau d'une lésion de l'ADN. Il a été proposé que la reverse transcriptase pourrait utiliser sa capacité à reconnaître une extrémité 3'OH libre au niveau d'une lésion et s'en servir comme amorce afin de synthétiser un cDNA qui serait par la suite utilisé pour la réparation de la cassure (Morrish *et al.*, *Nat Gen*, 2002 ; Morrish *et al.*, *Nature*, 2007 ; Sen, *NAR*, 2007). Les travaux plus récents



de Keskin *et al.*, ont montré qu'une cassure survenant au niveau d'un gène fortement transcrit pouvait être réparé par un cDNA dérivant d'un transcrit intact (Keskin *et al.*, *Nature*, 2014 ; Keskin et Storici, *Microna*, 2015 ; Keskin *et al.*, *RNA Biol.*, 2016). Ils se basent sur l'utilisation d'un essai génétique permettant de détecter spécifiquement la réparation d'une DSB induite au niveau d'un gène rapporteur par des événements de recombinaison initié par le transcrit de ce gène. Ces travaux ont également montré que, dans certaines conditions, l'ARN pourrait avoir un rôle encore plus direct dans la réparation des DSB, sans impliquer d'activité reverse-transcriptase. Cette conclusion s'appuie sur des données indiquant qu'en absence de RNase H, l'efficacité de réparation est améliorée et n'implique pas de cDNA (Keskin *et al.*, *Nature*, 2014). Dans le modèle proposé, la réparation en absence de RNase H, mettrait en jeu un hétéroduplex ARN : ADN qui pourrait être formé entre le transcrit et le site de lésion. Le transcrit pourrait exercer deux fonctions : soit faciliter la réparation en pontant le site de lésion, soit servir de matrice à la HR en étant associé à une activité de reverse transcriptase (**Figure 41**).



**Figure 41: Modèles de réparation d'une DSB médiée par un lncRNA**

La survenue d'une cassure activerait un processus de transcription au niveau du site de la lésion. Le transcrit (trait bleu) participerait à la réparation de la cassure selon deux procédés envisagés. Premièrement (à gauche), il pourrait servir à ponter le site de lésion pour maintenir les extrémités proches et ainsi, faciliter la réparation. Deuxièmement (à droite), il pourrait servir de matrice à la recombinaison homologe, en étant associé à une activité de reverse transcriptase. Les RNase H1/H2 inhibe le processus de réparation en éliminant le brin d'ARN dans l'hétéroduplex ADN:ARN impliquant le transcrit. La protéine bleue représente facteur lambda impliquée dans réparation. Image modifiée de Khanduja *et al.*, *Cell*, 2016.

En conclusion, l'implication du RNAi dans la préservation de la stabilité génomique, lors d'un stress génotoxique, ne fait plus de doute. En revanche, ses fonctions précises ne sont pas encore bien caractérisées ou restent encore à découvrir.

Les données actuelles suggèrent l'implication du RNAi, entre autres, dans la signalisation des dommages et la réparation des lésions de l'ADN. Ces pistes nécessitent encore plus d'investigations visant à éclaircir le mode d'action du RNAi. Cette voie agit-elle de manière directe sur les processus de réparation des lésions de l'ADN ? Quelle est la part de contribution des différents acteurs du RNAi et quels sont leurs partenaires potentiels ?

Chez la levure *S. pombe*, le modèle d'étude que j'ai utilisé au cours de ma thèse, le RNAi participerait à promouvoir la terminaison de la transcription. Il exercerait ce rôle dans le contexte d'un stress répliatif, engendré par les collisions entre la RNA Pol II et le réplisome. Là encore, le mécanisme d'action reste à élucider. La question est d'autant plus intéressante que cette fonction impliquerait uniquement l'enzyme Dcr1 (et pas Ago1) au niveau des rDNAs, notamment. Il ne peut cependant pas être exclu, que d'autres facteurs du RNAi participeraient à la stabilité génomique globale des rDNAs. Par ailleurs, on peut se demander si le RNAi pourrait agir *via* d'autres processus dans le cadre d'un stress répliatif. Par définition, un stress répliatif se réfère à une entrave à la progression de la fourche de répliation. Le RNAi est-il impliqué dans la prise en charge des fourches de répliation bloquées ? De plus, comme il existe différentes catégories d'obstacles pouvant générer un stress répliatif, l'implication du RNAi se limite-t-elle au cas des collisions entre les machineries de répliation et de transcription de l'ADN ?

# OBJECTIFS DE MON PROJET DE THÈSE

Le RNAi est un processus conservé chez la plupart des eucaryotes, surtout connu pour sa fonction de mise sous silence (ou *silencing*) de l'expression génique. Selon les espèces, le RNAi promeut, voire orchestre la formation d'hétérochromatine en induisant la déposition de marques épigénétiques répressives. Par le biais de cette fonction et vu les divers rôles protecteurs que revêt l'hétérochromatine, le RNAi concourt donc à préserver la stabilité du génome.

Plus récemment, il a été récemment découvert que le RNAi participe également au maintien de la stabilité génomique en agissant directement dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN, chez une variété d'eucaryotes. Cependant, la fonction moléculaire et les mécanismes qui sous-tendent son implication, restent très peu caractérisés.

L'équipe dans laquelle j'ai effectuée ma thèse cherche à élucider les fonctions et modes d'action du RNAi nucléaire, relatifs notamment à la préservation de la stabilité génomique, chez *S. pombe*. Les systèmes de réparation des dommages à l'ADN y sont très bien conservés. De plus, cet organisme a constitué un modèle de référence pour disséquer le rôle clé et conservé du RNAi dans la formation d'hétérochromatine au niveau des régions péri-centromériques. Dans ce modèle d'étude, le complexe RITS (pour *RNA Induced-Transcriptional Silencing*) orchestre la déposition des marques d'hétérochromatine. Son chargement en siRNA produit par Dcr1, lui permet de cibler des ARN en cours de synthèse, dits ARN « plateformes », au niveau des régions péri-centromériques. RITS y recrute ensuite les protéines nécessaires au *silencing* transcriptionnel et à la formation concomitante d'hétérochromatine.

Chez *S. pombe*, il a été découvert que le RNAi participe à la gestion d'un stress répliatif engendré par les collisions entre le réplisome et l'ARN polymérase II convergente. Ces collisions ont lieu préférentiellement au niveau des gènes fortement transcrits durant la réplication et des régions répétées difficiles à répliquer que constituent notamment les péri-centromères et les ADN ribosomaux. Le modèle proposé est qu'une partie du RNAi participerait à la résolution de ces conflits en favorisant la terminaison de la transcription, ce qui induirait l'éviction de l'ARN polymérase II et permettrait d'éliminer cet obstacle (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011 ; Castel *et al.*, *Cell*, 2014). Fait remarquable, ce mode d'action du RNAi reposerait uniquement sur l'enzyme Dcr1 au niveau des ADN ribosomaux (Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

Mon projet de thèse s'est inscrit dans la continuité des travaux initiés dans mon équipe d'accueil visant à explorer la fonction moléculaire du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique. Une première série de résultats obtenus dans l'équipe avait suggéré que d'autres

## *Objectifs du projet de thèse*

composants du RNAi et, pas seulement Dcr1, pourraient être impliqués dans cette fonction. En particulier, l'analyse de l'interactome d'un des composants du complexe RITS, a révélé plusieurs connexions physiques avec les processus de réplication/réparation de l'ADN. Le premier objectif de ma thèse a consisté à poursuivre l'étude de cette connexion entre RITS et les processus de réplication/réparation de l'ADN, par le biais d'analyse biochimiques et microscopiques (chapitre I de la partie Résultats).

Le deuxième objectif de ma thèse a visé à mieux définir l'implication du RNAi dans le maintien de la stabilité génomique au niveau des ADN ribosomaux chez *S. pombe*. L'étroite collaboration avec l'équipe du Dr. LAMBERT (Institut Curie) a permis de répondre à cet objectif (chapitre I de la partie Résultats).

Le troisième objectif de ma thèse a consisté à mieux caractériser le rôle et le mode d'action du RNAi dans les processus de réplication/réparation de l'ADN. En utilisant un système de blocage conditionnel de la fourche de réplication chez *S. pombe*, je me suis focalisée sur l'étude de l'implication du RNAi dans le redémarrage des fourches de réplication par recombinaison homologue (chapitre II de la partie Résultats). Là encore, cet objectif a fortement bénéficié de notre collaboration avec l'équipe du Dr. LAMBERT.

# RÉSULTATS

# **Chapitre I : Rôle du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome**

## 1 Contribution personnelle aux travaux mentionnés

La purification de Chp1 a été réalisée par le Dr. Benoît GILQUIN. L'identification par MS des protéines co-purifiées a été déterminée par le Dr Yohann COUTÉ (CEA). L'étude par microscopie des co-localisations entre Tas3-CFP ou mCherry-Swi6 et les candidats a été réalisée et analysée par le Dr. Cyril BOYAULT, de même que l'analyse des *Gene Ontology*. L'analyse des chromosomes en PFGE suivi des *Southern blots*, ainsi que l'analyse des intermédiaires de réplication par électrophorèse à deux dimensions, ont été effectués par le Dr. Sarah LAMBERT et l'ingénieure d'étude Karine FRÉON (Institut Curie).

J'ai grandement participé à la réalisation des tests d'interactions par « GST pull-down » qui a été mise en place par le Dr. Cyril BOYAULT. J'ai pris part à l'analyse des résultats générés par la purification de Chp1, et à la mise en forme de l'analyse comparative entre les stratégies biochimiques employées. J'ai réalisé l'étude par microscopie des co-localisations entre Tas3 et Swi6 (en condition d'expression endogène et de surexpression) et effectué l'analyse quantitative (comptage). J'ai réalisé les tests de sensibilité à l'hydroxyurée. Malheureusement, je n'ai pas pu tester d'autres drogues génotoxiques, faute d'installations adéquates dans mon institut d'accueil.

## 2 Article de recherche en préparation (en anglais) :



## Title: RNAi function in genome stability maintenance in the fission yeast

### 2.1 Introduction

The safeguard of genetic material integrity is essential for cell survival and development. Cells have evolved complex mechanisms to counteract genomic instability. In a large variety of eukaryotes, RNA interference (RNAi) plays a role in the maintenance of genome integrity. This process has emerged as an important regulator of gene expression and epigenetic modifications. Indeed, RNAi is well known to mediate sequence-specific transcriptional gene silencing which leads to the formation of heterochromatin at transposable elements and repeated sequences, located primarily at centromeres and telomeres. A defect in heterochromatin formation results in transposition, chromosome mis-segregation during mitosis or meiosis, and ectopic recombination events between repetitive regions. Moreover, the deregulation of the epigenetics mechanisms associated with heterochromatin formation is associated with the occurrence and the progression of many cancers in humans (McCarthy *et al.*, *Nat Rev Cancer*, 2011). By promoting heterochromatin formation, RNAi contributes to protect genomic stability.

Recent studies have uncovered a conserved but more direct role of RNAi in genomic stress response. A novel species of small non-coding RNAs (sncRNAs), induced upon genotoxic stress, have been identified in *N. crassa*, flies, plants and mammals (Lee *et al.*, *Nature*, 2009 ; Michalik *et al.*, *NAR*, 2012 ; Wei *et al.*, *Cell*, 2012 ; Schalk *et al.*, *PNAS*, 2016 ; Francia *et al.*, *Nature*, 2012 ; Gao *et al.*, *Cell Res*, 2014) . These sncRNAs are produced by RNAi processing enzymes and appear to be derived from the site of lesion. Different names and nomenclature have been attributed to these sncRNAs in the different reports. Potential mechanisms by which these sncRNAs could participate in DNA repair have been proposed: (i) degrade nascent transcripts from damaged site, (ii) reinforce the detection of the damage, (iii) recruit or guide DNA damage repair factors to the damaged site, (iv) recruit chromatin remodeling complexes to modify chromatin structure and facilitate the repair. Despite all of these speculations, their precise role and mode of action during DNA repair, mechanisms remain to be investigated.

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, a reference organism for studying nuclear RNAi, RNAi-mediated heterochromatin formation has been extensively studied, particularly at pericentromeric regions (Volpe *et al.*, *Science*, 2002 ; Verdel *et al.*, *Science*, 2004). The transcription of both strands of DNA repeats by the RNA polymerase II (RNAPII) results in double stranded RNAs (dsRNA) processed into small interfering RNAs (siRNAs) by the enzyme Dicer 1 (Dcr1). The siRNAs are then loaded into Ago1 (Argonaute 1) with the help of the chaperones Arb1 and Arb2, altogether forming the complex ARC (Argonaute siRNA chaperone ; Bucker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007). This step licenses Ago1 for subsequent assembly with Tas3 (Targeting subunit 3) and Chp1 (Chromodomain protein 1) to form the RITS complex (RNA Induced-Transcriptional Silencing ; Halic et Moazed, *Cell*, 2010). RITS is the main effector of the RNAi silencing function in the nucleus. By means of the siRNAs, RITS is guided back to complementary RNA platforms, also produced at pericentromeric regions. Here it recruits CLRC complex (Cryptic loci regulator) responsible for H3 lysine 9 dimethylation (H3K9me<sub>2</sub>) associated with heterochromatin silencing. The RNA-directed RNA polymerase complex (RDRC), recruited by RITS, generates double stranded RNA from the RNA platforms. This process creates a positive feedback loop that stimulates the RNAi-dependent spreading of the heterochromatin mark (Hall *et al.*, *Science*, 2002 ; Volpe *et al.*, *Science*, 2002 ; Motamedi *et al.*, *Mol Cell*, 2008).

In *S. pombe*, RNAi has also been reported to solve head-to-head collisions between replication and transcription machineries (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011 ; Castel *et al.*, *Cell*, 2014). These conflicts tend to occur at repetitive and hard-to-replicate genomic regions *eg* the pericentromeric regions and ribosomal DNA (rDNA). It was proposed that RNAi contributes to their resolution by promoting transcription termination, thereby favouring the RNA polymerase II (RNA Pol II) eviction. In the absence of RNAi, stalled replication forks at the pericentromeric regions would be restarted through homologous recombination, which results in the loss of heterochromatin marks. Noticeably at the rDNA region, the RNAi contribution to replication and transcription coordination, would solely rely on the protein Dcr1 (and not Ago1) and would not require Dcr1 RNase activity (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). The mode of action is not yet characterized.

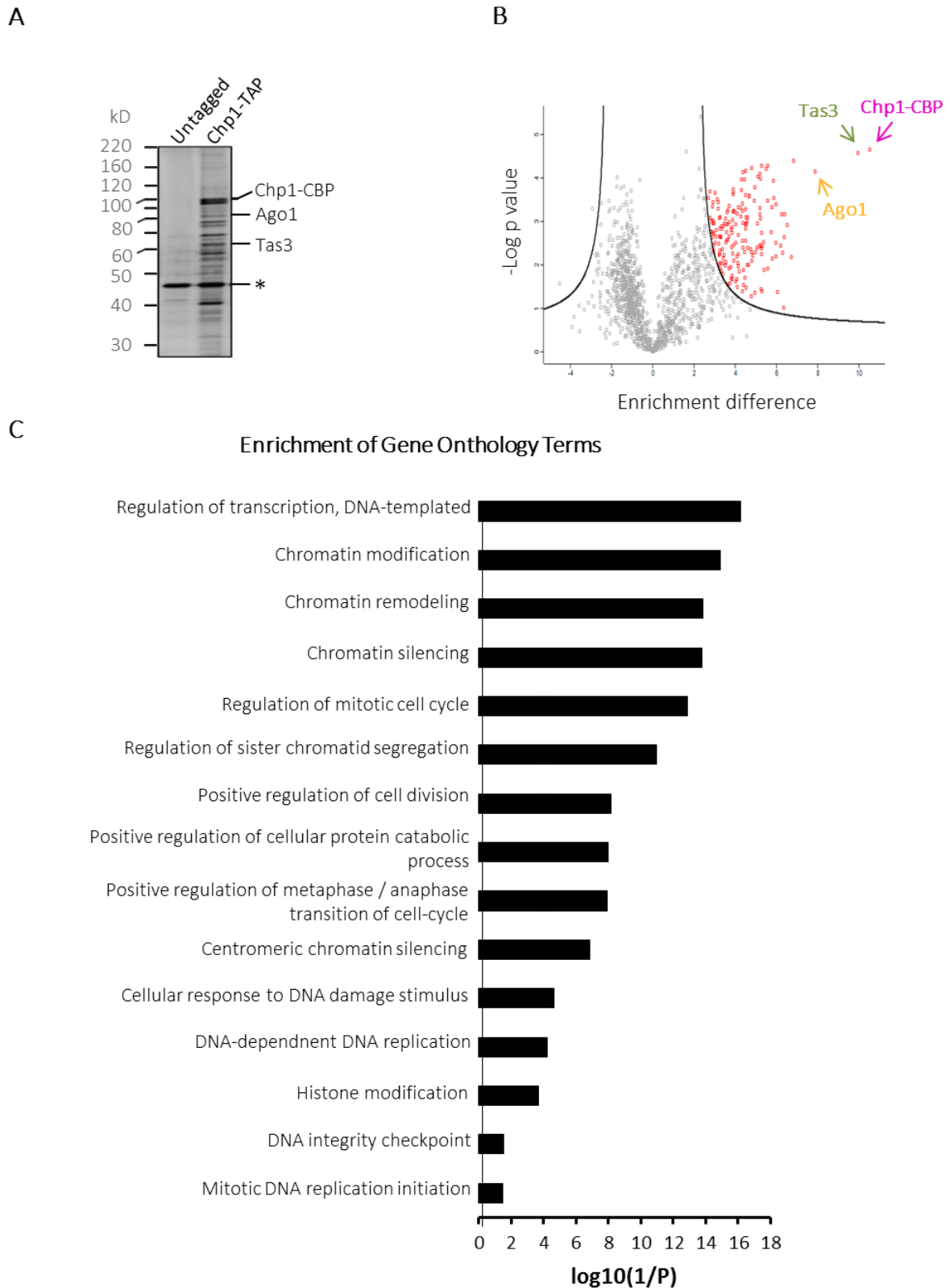
Here, we further investigate the function of RNAi in the preservation of genomic stability in *S. pombe*. Thanks to the combination of protein purification and microscopy analyses, we found physical connections between RITS and DNA replication/repair processes. Moreover, we focused on rDNA repeats and found that RITS and Dcr1, contribute together to

the rDNA homeostasis by preventing contraction events. The loading of Ago1 with siRNAs and its catalytic activity are also required for this function. In contrast, other RNAi factors indispensable for RNAi-mediated heterochromatin formation are not required. We also identified the implication of RNAi in replication fork progression at rDNA. We propose that the RNAi pathway promotes the progression of replication forks within the rDNA unit, thereby contributing to the preservation of the rDNA integrity.

## **2.2 Description des résultats**

### **Large scale purification of Chp1 reveals its physical link to proteins maintaining genome stability**

To identify in a more comprehensive manner the cellular processes implicating RNAi, we decided to uncover the protein interactome of RITS, the effector complex of nuclear RNAi. Among the three sub-units of RITS, we first focused particularly on the protein-protein interaction network of Chp1, as it is the anchor element of the complex on the chromatin and because the Chp1-TAP tagged version is functional (Verdel *et al.*, *Science*, 2004). After purification of Chp1 by using a Tandem Affinity Purification (TAP) strategy (**Figure 42A**), we identified the co-purified proteins by Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) and label-free quantification (LFQ). Chp1, Tas3 and Ago1 appear to be the most enriched (**Figure 42B**). Out of 1200 proteins identified by this strategy, 386 were found to be enriched with a reproducible and minimal 2-fold change and were considered for further analysis. The assessment of gene ontology (GO) term enrichment corresponding to genes coding for the Chp1 co-purified proteins, shows as expected, a high representation of chromatin silencing and remodeling functions (**Figure 42C**). Interestingly, it also reveals physical connections with other cellular processes. Noticeably, this analysis shed light on a strong enrichment of GO terms associated to genomic integrity maintenance processes, such as DNA replication, DNA repair and cell cycle regulation. There are also significant enrichment GO terms related to ubiquitin-dependent protein catabolism, spliceosome assembly, and ribosome biogenesis for example.



**Figure 42: The interactome of Chp1, a sub-unit of RITS, uncovers multiple physical links to chromatin silencing and genomic stability maintenance**

- A) Representative silver-stained gel of proteins co-purified with Chp1-CBP after Tandem Affinity Purification (TAP) using a highly stringent protocol. Mentioned specific bands correspond to RITS components. Asterisk shows co-eluted IgG from background. CBP: Calmodulin Binding Protein.
- B) Volcano" plotting of proteins co-purified with Chp1 in function of their enrichment (difference over the background) and the statistical significance of their enrichment (-log p-value). Each dot corresponds to the mean enrichment of one co-purified protein calculated from 3 independent TAP purifications (using at least two different biological isolates). Around 1200 proteins were identified among which 386 are statistically enriched by at least a 2-fold factor and are represented in red. Chp1, Tas3, Ago1 positions are indicated.
- C) Gene ontology analysis of the 386 co-purified proteins with Chp1-CBP as described above, performed with the web-based set of tools AmiGO2 and the PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) classification system (Mi H *et al.*, NAR, 2013). The GO terms shared by the genes in the Chp1 interactome based-list are compared to the background distribution of annotation. The bigger the  $\log_{10}(1/P)$  is, the less likely the observed annotation of the particular GO term to a group of genes occurs by chance. Only  $\log_{10}(1/P) > 1$  was considered ( $P < 3.5E-2$ ).

### **Proteins involved in genome maintenance and enriched in Chp1 purification preferentially co-localize with Tas3 and interact with Ago1, the two other subunits of RITS**

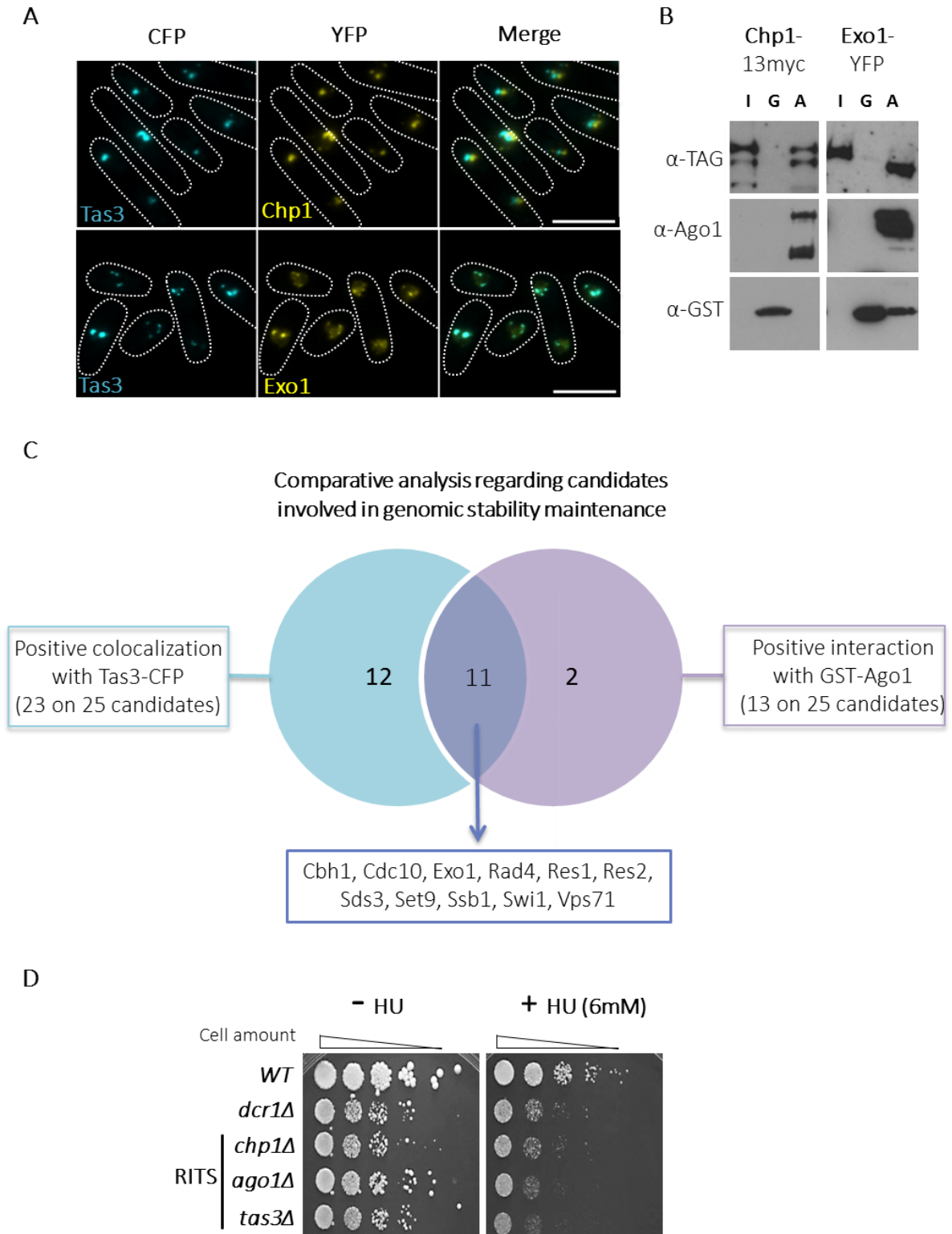
Proteins co-purifying with Chp1 may not necessarily constitute cellular interactors of RITS. To further investigate the physical connection between RITS and these proteins, we used two orthogonal approaches focusing on the other two subunits of RITS, Tas3 and Ago1, and based, respectively, on microscopy and biochemical experiments. The first approach aimed at comparing the sub-cellular localization of Tas3, which bridges Chp1 to Ago1 to form the RITS complex, with candidate proteins identified by mass spectrometry. We noticed that a significant proportion of the 386 Chp1 co-purified proteins are known to localize in a nuclear dot pattern, a property shared by RITS (Matsuyama *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2006). We then performed *in vivo* microscopy analysis using a *S. pombe* overexpressed YFP fusion library (Matsuyama *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2006). We observed that at least one nuclear dot of Tas3 co-localizes with 31 out of the 38 candidates tested (**Figure 43A and Supplementary Table 2**). These results further supported the possibility of an interaction between RITS and these proteins *in vivo*. However, these interactions might involve only Chp1 and Tas3 since both of them can associate and function independently of the canonical RNAi pathway (Petrie *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2005). We thus set up a pull-down assay to test the *in vitro* interaction between Ago1 and Chp1 co-purified proteins displaying nuclear dot localization. Twenty-three candidates were efficiently

pulled-down by the RITS sub-unit Ago1 (**Figure 43B and Supplementary Table 2**). Half of the tested candidate co-localize *in vivo* with Tas3 and interact *in vitro* with Ago1. Altogether these results identify a list of candidate proteins that may interact with the complex RITS.

Remarkably, 25 of the selected candidate proteins have been reported to be directly implicated in mechanisms responsible for genome maintenance and that encompass processes ensuring DNA replication fidelity, DNA lesion sensing, DNA damage repair, chromosome segregation fidelity during cell division as well as regulation of cell cycle phase transition. Of these candidates, 23 co-localize *in vivo* with Tas3, among which half interact also *in vitro* with Ago1 *via* GST pull-down assay (**Figure 43C**). Altogether, these biochemical approaches shed light on a connection between RNAi and genomic stability.

### **All subunits of RITS are required for genome maintenance**

Based on this first set of findings, we further characterized the functional impact of RNAi in genomic integrity, by assessing the survival of RNAi mutants upon Hydroxy Urea (HU)-induced replication fork blocks. Considering the current knowledge in *S. pombe*, *dcr1Δ* mutant was expected to present sensitivity to HU treatment. We observed that not only *dcr1Δ* mutant but also strains deleted for genes coding for one of the sub-units of RITS, Chp1, Tas3, or Ago1, presented a pronounced growth defect upon HU, as they hardly overcome this genotoxic stress compared to wild-type cells (**Figure 43D**). These data indicate that RNAi is required for the cell response to HU-stalled forks. Moreover, they show that several RNAi components, and not solely Dcr1, may be implicated in genomic stability maintenance.



**Figure 43: Medium throughput validation of Chp1 interactome reinforces the physical connexion to genome stability maintenance**

- A)** Representative images of live cell fluorescence microscopy showing examples of colocalization analysis between the overexpressed YFP fused candidates and overexpressed Tas3-CFP (RITS sub-unit). Scale bar: 5µm. The visualization was performed with an epifluorescence microscope (Zeiss AxioImager M2, oil immersion objective DICIII 63X/1.4).
- B)** Examples of interaction analysis by pull-down assay between the indicated tagged candidates and the bait Ago1 (RITS sub-unit) fused to GST. Five percent of input is showed for comparison purpose in western blot using anti-tag, anti-GST, anti-Ago1 antibodies, as indicated. I : input ; G : GST matrix ; A : GST-Ago1 matrix. GST-Ago1 bands are of different sizes due to the random degradation of the recombinant protein during the pull-down experiment.
- C)** Overlap among microscopy and GST pull-down approaches, regarding only the 25 candidates involved in genomic stability maintenance (Cf identity in Sup table 2).
- D)** Growth assay of RNAi mutants on YEA media supplemented or not with Hydroxyurea (HU) at 6 mM final concentration.



Résultats : Rôle du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome

Candidate	Ago1 Pull-Down	Tas3 Microscopy	Role in genomic stability	Purification Ranking
Cbh1	++	+	+	308
Exo1	++	+	+	209
Sds3	++	+	+	62
Vps71	++	+	+	271
Cdc10	+	+	+	36
Rad4	+	+	+	134
Res1	+	+	+	200
Res2	+	+	+	11
Ssb1/Rfa1	+	+	+	276
Set9	+	+	+	35
Swi1	+	+	+	175
Rna14	+	MM	+	306
Smc5	+	LE	+	18
Ipi3/Crb3	NA	+	+	121
Abp1/Cbp1	-	+	+	47
Eso1	-	+	+	7
Him1/Dfp1	-	+	+	152
Orc1	-	+	+	16
Pcr1/Mts2	-	+	+	211
Pdp1	-	+	+	94
Rad22/Rad52	-	+	+	13
Spt16	-	+	+	108
Swc4	-	+	+	206
Flp1/Clp1	ND	+	+	240
Sgo2	ND	+	+	61
Chp1	+	+	-	1
Clr1	-	NA	-	12
Dus3	++	+/MC	-	190
Fib1	-	NA	-	355
Hip1/Hir1	+	+	-	182
Ipi1	-	+/MM	-	77
Las1L	++	+	-	50
Prp1/Zer1	+	+	-	99
Prr1	++	NA	-	321
Rrp12	++	+	-	247
Sol1	+	+	-	262
Tas3	+	+	-	2
Ykr3/Ntr1	+	+	-	227

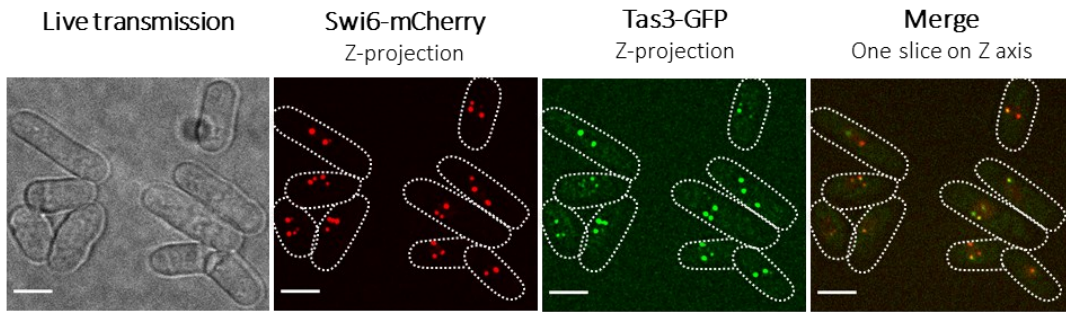
**Supplementary Table 2: Medium throughput validation of Chp1 interactome using microscopy and GST pull-down approaches**

Recap chart of the results concerning colocalization analysis by microscopy (between the overexpressed YFP fused candidates and overexpressed Tas3-CFP) and interaction assays by GST pull-down. Regarding microscopy, following keys were used: (-) when no co-localization nor juxtaposition is observed; (+) when at least one dot co-localizes or juxtapose between both recombinant proteins. Various phenotypes are documented as mislocalization of marker (MM), mislocalization of candidate (MC), and low expression of candidate (LE). Interactions assessed by pull-down strategy are estimated according to the ratio of the signal on the GST-Ago1 (GA) bait matrix over the input: (-) means no signal on the GA matrix or less than in input; (+) and (++) means respectively equal amount as or higher than in input. For both approaches, ND means not determined. NA is used when no strain was obtained to perform any of the approaches. Candidate protein are also classified according their positive (+) or negative (-) involvement in genomic stability maintenance.

### RITS localizes to heterochromatin regions *in vivo*

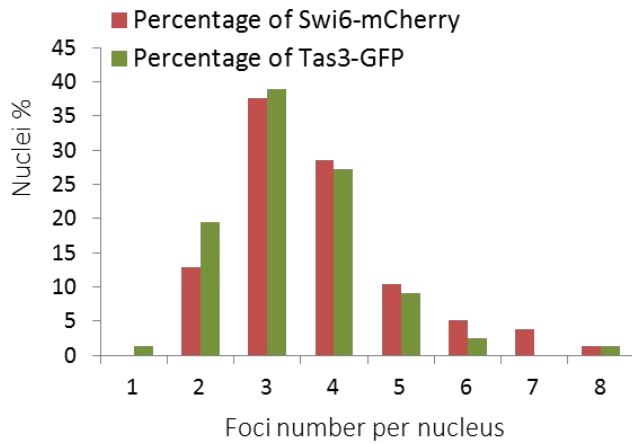
To further address the nuclear functions of RNAi, we also investigated the nuclear localization of the effector complex RITS. Together with the physical connections to processes required to maintain proper genomic stability and revealed by the RITS potential interactome analysis, we examined whether the complex could localize outside heterochromatin sites. To do so, we performed fluorescence microscopy analysis to compare the *in vivo* localization pattern between endogenously tagged Tas3 and the heterochromatin marker Swi6 (**Figure 44A**). It is known that in *S. pombe* interphase cells, Swi6 forms generally one large cluster regrouping all centromeres, several clusters of telomeres, one dot corresponding to the mating type region and another to the ribosomal DNA regions (rDNA ; [Ekwall *et al.*, *Science*, 1995 ; Nonaka *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2002 ; Sadaie *et al.*, *EMBO J*, 2004 ; Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005 ; Petrie *et al.*, *MCB*, 2005]). We observed that Tas3-GFP and Swi6-mCherry form mostly between three and four discrete foci per nucleus, consistently with previous reports (Ekwall *et al.*, *Science*, 1995 ; Sadaie *et al.*, *EMBO J*, 2004). Besides, we assessed the *in vivo* three-dimensional colocalisation between both sets of foci, by considering in the same way, partial or total overlap between two foci as a colocalization spot. All the foci co-localize between the two proteins in almost 70 % of the nuclei (**Figure 44C**), emphasizing the close connection between RNAi and heterochromatin sites. Interestingly, 8% of the total number of analyzed nuclei, possess a Tas3-GFP dot that do not colocalize with mCherry-Swi6. RITS localizes predominantly to heterochromatin but may also be found outside heterochromatin in rare cases. Based on these observations, we assumed that RITS identified partners by MS analysis shall preferentially locate to one or more heterochromatin sites. We therefore compared the sub-cellular localization between overexpressed mCherry-Swi6 and previously described co-purified Chp1 proteins that display a nuclear dot pattern (**Figure 44D and Supplementary Table 3**). We noticed that Swi6 colocalizes also *in vivo* with more than 80% of putative RITS partners, defined as proteins co-purifying with Chp1 and co-localizing with Tas3 and interacting *in vitro* with Ago1 (**Figure 44E**). Taken together these results suggest that the physical associations to genome stability processes and potentially other cellular processes identified by RITS purification and GO analysis, may preferentially take place within heterochromatin regions or in their close proximity.

A



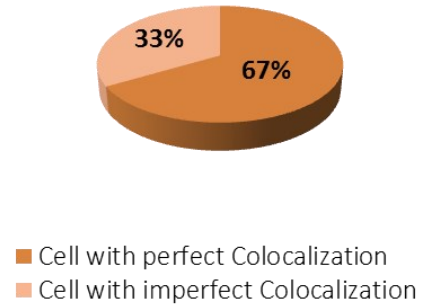
B

Swi6-mCherry and Tas3-GFP localization pattern in cell expressing both recombinant proteins

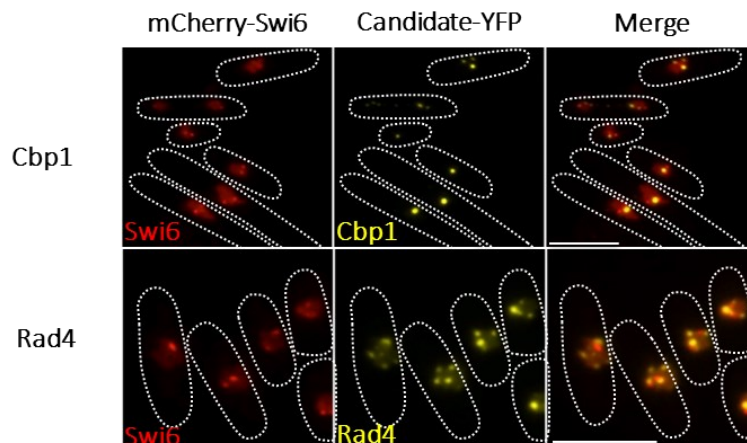


C

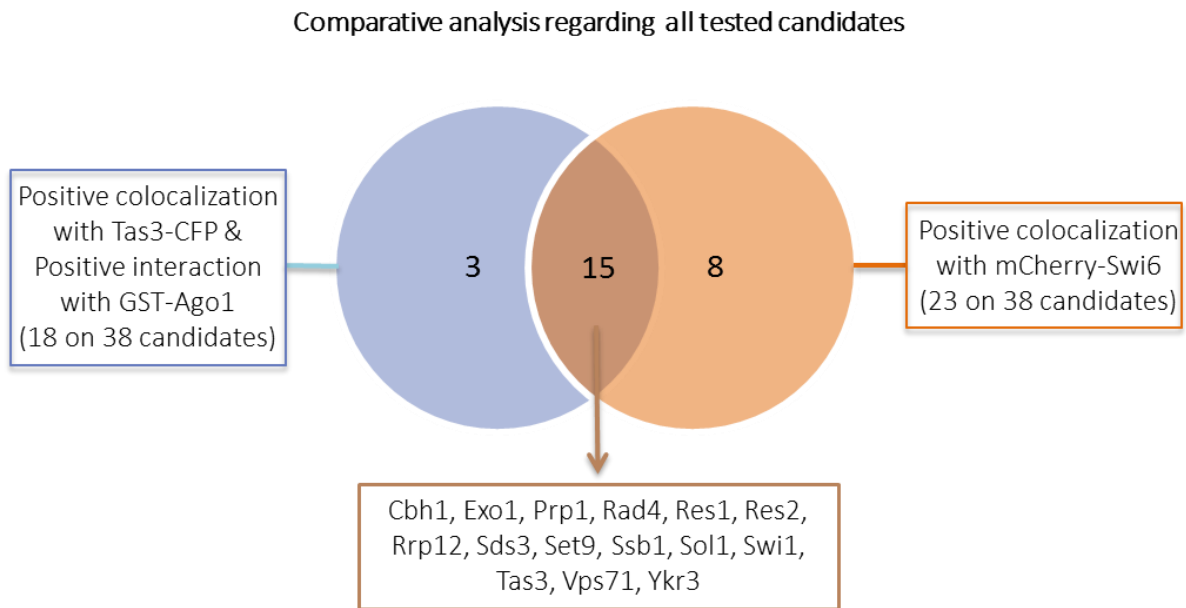
Degree of colocalization between Tas3-GFP and Swi6-mCherry foci



D



E



**Figure 44: Tas3 and Swi6 present the same localization pattern**

- A) Representative images of live cell fluorescence microscopy showing the nuclear dot localization of the endogenous tagged Tas3-GFP and Swi6-mCherry (heterochromatin marker). The images referring to mCherry and GFP signals correspond to projections of Z-stack sections according to the average signal intensity. Such posting enables to represent most of the foci existing in the nucleus. Besides, it enables to overcome the difficulty to find a slice that illustrates the average number of Tas3-GFP and Swi6-mCherry we counted per nucleus. The merge picture was extracted from the Z-stack. Scale bar: 5µm. The visualization was performed with a confocal spinning disk microscope (Andromeda, TILL-FEI)
- B) Graph representing the foci number per nucleus of Tas3-GFP and mCherry-Swi6 in nuclei expressing both endogenously tagged recombinant proteins. Count performed in 77 nuclei coming from three different biological isolates.
- C) Chart representing the classification of cells according to the degree of colocalisation between Tas3-GFP and Swi6-mCherry. The colocalisation is perfect when all the foci colocalize between both proteins in a given nucleus. It is imperfect when at least one focus does not.
- D) Representative images of live cell fluorescence microscopy showing examples of colocalization analysis between the overexpressed YFP fused candidates and overexpressed mCherry-Swi6 (heterochromatin marker). Scale bar: 5µm. The visualization was performed with an epifluorescence microscope (Zeiss AxioImager M2, oil immersion objective DICIII 63X/1.46).
- E) Overlap among Tas3 and Swi6 microscopy and GST pull-down approaches, regarding all the 38 tested candidates.

*Résultats : Rôle du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome*

Candidate	Microscopy Swi6	Role in genomic stability	Purif Ranking
Abp1/Cbp1	+	+	47
Cbh1	+	+	308
Eso1	+	+	7
Exo1	+	+	209
Pcr1/Mts2	+	+	211
Rad22/Rad52	+	+	13
Rad4	+	+	134
Res1	+	+	200
Res2	+	+	11
Ssb1/Rfa1	+	+	276
Sds3	+	+	62
Set9	+	+	35
Spt16	+	+	108
Swi1	+	+	175
Vps71	+	+	271
Him1/Dfp1	-	+	152
Orc1	-	+	16
Pdp1	-	+	94
Flp1/Clp1	MC	+	240
Cdc10	LE	+	36
Sgo2	LE	+	61
Smc5	LE	+	18
Ipi3/Crb3	NA	+	121
Rna14	NA	+	306
Swc4	NA	+	206
Chp1	ND	-	1
Clr1	NA	-	12
Dus3	-	-	190
Fib1	+	-	355
Hip1/Hir1	-	-	182
Ipi1	NA	-	77
Las1L	NA	-	50
Prp1/Zer1	+	-	99
Prr1	+	-	321
Rrp12	+	-	247
Sol1	+	-	262
Tas3	+	-	2
Ykr3/Ntr1	+	-	227

**Supplementary Table 3: Swi6 colocalization assay**

Recap chart of the results concerning colocalization analysis by microscopy, between the overexpressed YFP fused candidates and overexpressed mCherry-Swi6. Following keys were used: (-) when no co-localization nor juxtaposition is observed; (+) when at least one dot co-localize or juxtapose between both recombinant proteins. Various phenotypes are documented as mislocalization of marker (MM), mislocalization of candidate (MC), and low expression of candidate (LE). ND means not determined. NA is used when no strain was obtained to perform microscopy analysis. Candidate protein are also classified according their positive (+) or negative (-) involvement in genomic stability maintenance.

### The RNAi machinery is necessary for the maintenance of rDNA integrity

From the first series of experiments and findings, we decided to further investigate the implication of RNAi in genomic stability maintenance. We hypothesized that RITS could also be the effector complex of this function as it is for the heterochromatin formation.

The rDNA cluster is a site where both heterochromatin formation and the most active transcription in the genome take place, and it represents one of the most fragile regions of the genome. We decided to focus our investigations on this region because the contribution of RNAi in its transcriptional silencing and in maintaining its integrity are poorly characterized compared to the other major sites of heterochromatin formation, *ie* the pericentromeric, telomeric and mating type regions.

The ribosomal genes *18S*, *5.8S* and *28S*, transcribed by the RNA polymerase I (RNA Pol I), are organized into units which are tandemly repeated over 150 times at both subtelomeric regions of chromosome III in *S. pombe*. The highly repetitive nature of the rDNA cluster makes it highly liable to genome rearrangements, including contraction and expansion, and hard to replicate. Each unit comprises its own replication origin and several replication fork barriers (RFBs; **Figure 45A**) that orientate replication forks movement to prevent head-to-head clashes between RNA Pol I transcription and the DNA replication machinery (Brewer *et al.*, *Cell*, 1992 ; Kobayashi *et al.*, *Genes Dev*, 1998 ; Tsang and Carr, *DNA Repair*, 2008). Even with this organization, the rDNA region may constitute a threat to genomic integrity and is easily prone to replicative stress occurrence. Stalled replication forks can result into double strand breaks that enhance recombination and subsequent unequal sister chromatid exchanges. These events can lead to gross chromosomal rearrangements, such as duplications, deletions or translocations of rDNA units (Liu *et al.*, *Cell*, 2011). Moreover, changes in rDNA units number increase, in turn, the susceptibility to DNA damage upon a genotoxic stress, thereby accentuating the genomic instability within the rDNA repeats (Ide *et al.*, *Science*, 2010).

A previous study suggested that the rDNA region is affected by head-to-head collisions between DNA polymerase and RNA Polymerase II (RNA Pol II) in fission yeast (Castel *et al.*, *Cell*, 2014) that transcribe the antisense strand of the ribosomal genes. The resolution of these conflicts and the subsequent maintenance of rDNA units have been reported to require only Dcr1, but not Ago1. To investigate the role of RNAi in rDNA stability maintenance, we decided to first examine the maintenance of rDNA by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) followed by Southern-blots analysis to quantify the amount of rDNA units. We observed that

chromosomes I and II exhibited a similar pattern of migration in *dcr1Δ*, *ago1Δ*, *tas3Δ* and *chp1Δ* mutants compared to the *WT* (). In contrast, chromosome III migrated faster in all the mutants compared to *WT*, indicating a smaller molecular weight, typical of rDNA contraction. This phenotype is rather dramatic since it is almost as important as in the mutant *rad51Δ*, which does not express the protein Rad51, essential for rDNA stability maintenance (Kobayashi *et al.*, *Genes Dev*, 1998; Park *et al.*, *Mol Cell*, 1999 ; Torres-Rosell *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2007). To further assess whether the shortening of chromosome III is due to a loss in rDNA content, we quantified the amount of rDNA repeats by southern blot, relatively to the amount of a non-repeated control locus located on chromosome III but outside of the rDNA arrays. Importantly, we found that the chromosome III shortening is associated with a 30 to 50 % decrease of rDNA content in *dcr1Δ*, *ago1Δ*, *tas3Δ* and *chp1Δ* mutants, relatively to the *WT* cells (**Figure 45B**). This first set of results demonstrates that a set of RNAi components that includes RITS subunits, in addition to Dcr1, are required for the maintenance of rDNA unit content.

This conclusion prompted us to examine whether other major factors of the RNAi pathway, involved in Ago1 activity regulation, are also necessary for the proper maintenance of rDNA units. First, we assessed the importance of the loading of double-stranded siRNAs in Ago1 by quantifying rDNA contents in *arb1Δ* and *arb2Δ* cells, using the same method as described above. The level of rDNA repeats decreased almost by 40% in both strains, which is as important as in *ago1Δ* and *rad51Δ* mutants (**Figure 45C**). The chaperones Arb1 and Arb2 mediate Ago1 loading with siRNA duplexes produced by Dcr1 and constitute also negative regulators of Ago1 catalytic activity named “slicing” (Bucker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007). So, the result indicates that Arb1 and Arb2 are also required for the maintenance of rDNA content and suggests that Ago1 has to be loaded with siRNA duplex to avoid rDNA contraction.

In addition, we questioned the requirement of the slicing activity of Ago1, responsible for the release of the passenger siRNA strand. We proceeded to the reintroduction of an overexpressed wild type or mutated form of Ago1 into the *ago1Δ* strain (**Figure 45C**). The mutant Ago1-D580A harbors a mutation in its catalytic site, contained in its PIWI domain. This mutation impairs the slicing activity of Ago1 without affecting its ability of loading siRNA duplex (Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). First, this assay showed, that the reintroduction of the WT form is capable to recover fully the rDNA defect of the *ago1Δ* mutant at a level equivalent to the *WT* strain (**Figure 45D**), confirming that the mutant phenotype is due to an absence of Ago1 expression. Second, the reintroduction of the D580A mutant form of Ago1 does not restore normal rDNA content in by comparison to the *ago1Δ* strain expressing



the WT form (**Figure 45E**). Instead, the *ago1Δ* expressing the mutant Ago1-D580A still presents a defect in rDNA content which is similar to the control mutant strain containing the empty plasmid. These later results show that Ago1 slicer activity is necessary to the maintenance of rDNA integrity, thereby further supporting the idea that not only Ago1, but also its small RNA-dependent activity, are important for the proper stability of rDNA repeats.

These findings reveal that the RNAi pathway promotes the maintenance of rDNA units by involving not only Dcr1 but also RITS. They highlight as well, the necessity of functional Ago1 enzymatic activity.

### **The RNAi-mediated heterochromatin formation is not necessary for the maintenance of rDNA integrity in proliferating cells**

Next, we tested whether the RNAi-mediated heterochromatin formation process is involved in maintaining rDNA stability by testing the involvement of the methyltransferase Clr4 and the RDRC sub-unit Rdp1. Both of these factors are essential for the RNAi-mediated heterochromatin formation and maintenance, especially at the pericentromeric regions (Hall *et al.*, *Science*, 2002; Volpe *et al.*, *Science*, 2002; Motamedi *et al.*, *Mol Cell*, 2008). Indeed, CLRC sub-unit Clr4 deposits heterochromatin marks. Rdp1 is responsible for the production of a long dsRNA precursor, involved in the positive feedback loop reinforcing the process. Noticeably, the rDNA contents are not affected by the deletion of *clr4* nor *rdp1*, indicating that Clr4 and Rdp1 are not required for the preservation of the rDNA integrity (**Figure 45F**). This result shows that RNAi function in maintaining rDNA stability in proliferating cells does not implicate the RNAi-mediated heterochromatin formation process acting at all of the other major sites of heterochromatin.



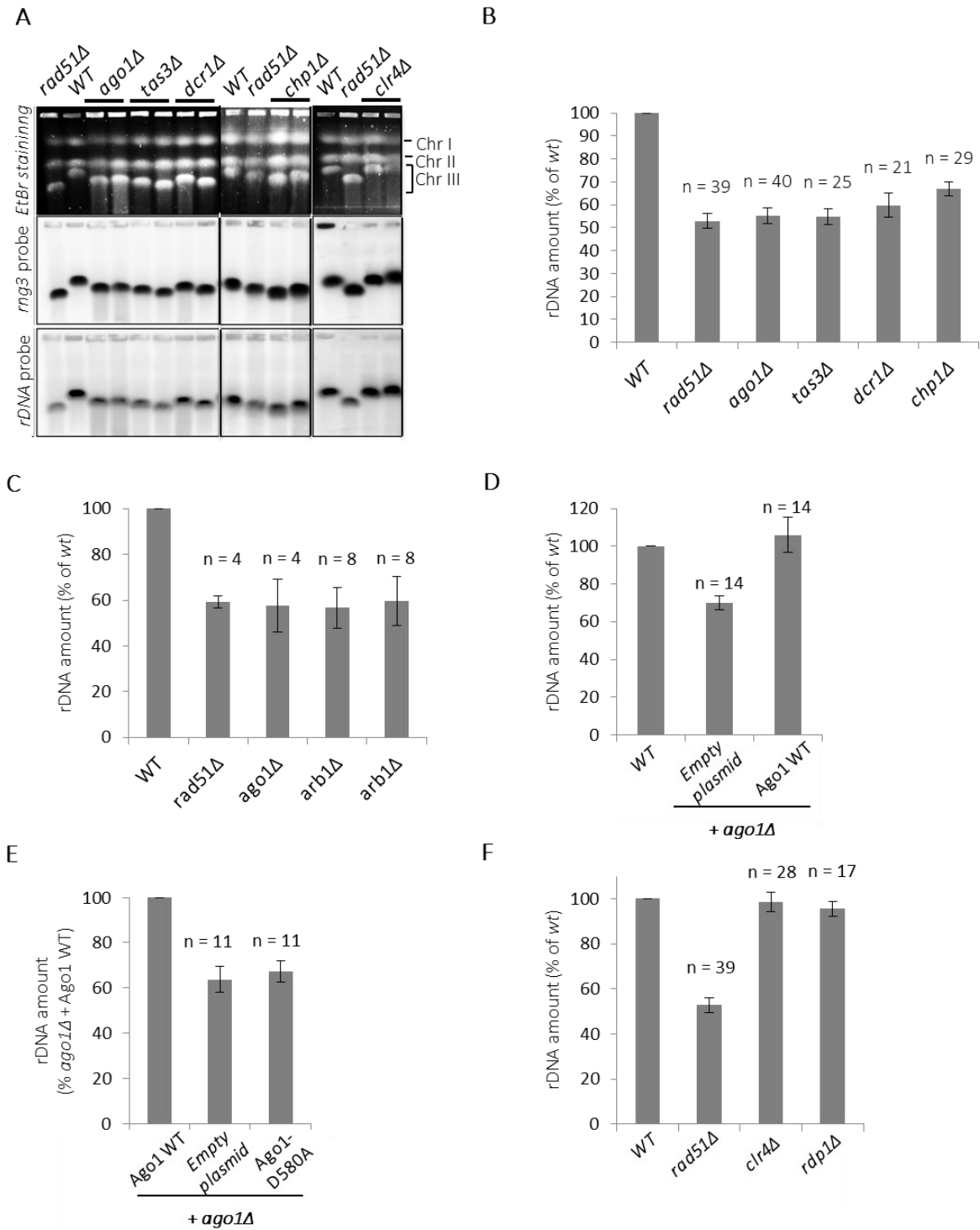


Figure 45: The RNAi machinery is required for ribosomal DNA (rDNA) integrity

- A)** Analysis of whole chromosome length by pulse field gel electrophoresis (PFGE) followed by Southern blot using specific probes directed either against the rDNA region or the *rng3* gene located on the chromosome III (outside of rDNA regions). Two biological isolates of each RNAi mutant are represented. Chr = chromosome.
- B), C) and D)** Quantification of the rDNA content in indicated RNAi mutants. The rDNA signal monitored after Southern blot was normalized to the *rng3* signal. The ratio is subsequently normalized to the *WT* for each condition. The rDNA amount in the mutants is expressed as a percentage of the *WT*. Values are means of n samples from independent biological replicates  $\pm$  95% confidence interval (CI).
- E) and F)** Quantification of the rDNA content (following the same procedure as described above) in *ago1* $\Delta$  strain after transformation of the mutant with an empty plasmid or a plasmid to overexpress either WT Ago1 or mutated Ago1-D580. The result is expressed as a percentage of the *WT*
- E)** or of the *ago1* $\Delta$  mutant complemented to overexpress WT Ago1.
- F)** Values are means of n samples from independent biological replicates  $\pm$  95% confidence interval (CI). For all of the quantifications, n means number of samples.

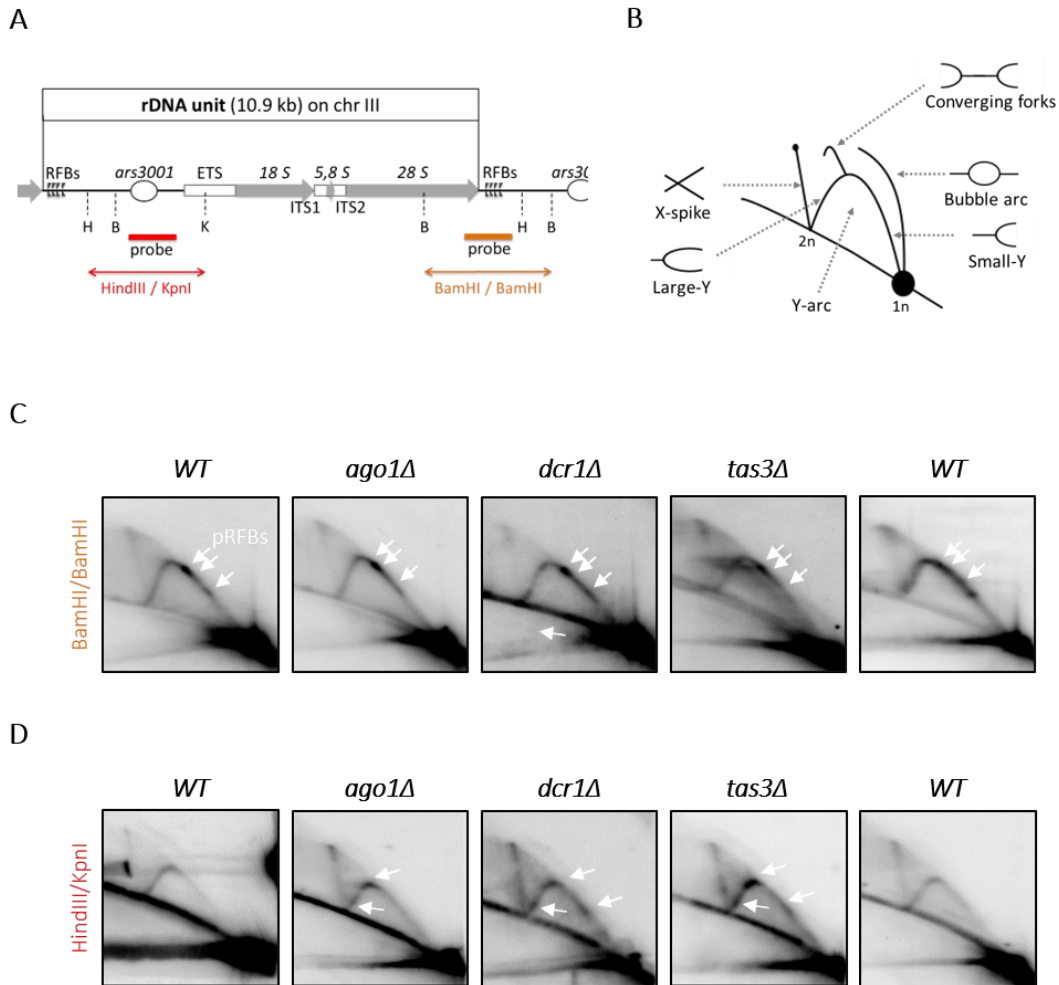
## The RNAi machinery promotes replication fork progression at rDNA

The loss of rDNA content observed in some RNAi mutants can be the result of a defective replication of ribosomal genes. A previous study reported an accumulation of Rad52 in *dcr1Δ* mutant over programmed replication pause sites and replication origins within rDNA repeats in S-phase, which suggests the presence of impeded replication forks at these loci (Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

This observation prompted us to assess the presence of replication fork pauses in RNAi mutants, within two regions of the rDNA unit encompassing either the programmed replication fork barriers (RFBs) or the replication origin (**Figure 46A and B**). The analysis of replication intermediates by bi-dimensional gel electrophoresis (2DGE) revealed the presence of two intense signals on the ascending Y-arc within the BamHI/BamHI restriction fragment, both in *WT*, *dcr1Δ*, *ago1Δ*, *tas3Δ* strains (**Figure 46C**). These Y-shaped replication intermediate signals correspond to the programmed RFBs and are of same intensity between the *WT* strain and the RNAi mutants. Besides, we did not detect further pause signals in the mutants compared to the *WT*. This observation suggests that the RNAi machinery does not have a role in the management of replication forks blocked at the programmed ribosomal RFBs.

In contrast, within the HindIII/KpnI fragment containing the replication origin, the analysis of replication intermediates revealed noticeable differences between *WT* and mutant strains (**Figure 46D**). We observed the appearance of intense signals on the ascending and descending Y-arc in all RNAi mutants but not in the *WT* strain, indicating an accumulation of arrested replication forks in absence of Dcr1 or RITS. Two signals are visible in *ago1Δ*, and three in *dcr1Δ* and *tas3Δ* cells. The common signals are located approximately at the same positions on the Y-arc. One of them has a stronger intensity and it is located at the bending point of the Y-arc in all of the mutants. The others are located either at the right or left part of the arc, corresponding respectively to a small-Y or large-Y shaped population of replication intermediates. Besides, we observed a slight increase of the X-spike signal in the RNAi mutants compared to the *WT*. These types of DNA structure are likely to correspond to joint-molecules related to homologous recombination repair. All of these observations suggest that RNAi is required for the progression of replication forks within the HindIII/KpnI ribosomal fragment.

Altogether, our latest data support the idea that the RNAi pathway is involved in the preservation of the rDNA integrity by promoting the progression of replication forks within the rDNA unit.



**Figure 46: RNAi is required for proper resolution of replication fork blocks at ribosomal DNA (rDNA)**

- A) Scheme of an rDNA unit located on the chromosome III. The thick bars correspond to the approximate position of the radioactive probes. The enzymatic restriction sites of interest are indicated: BamHI (B), HindIII (H), KpnI (K). RFB: replication fork barrier ; ETS /ITS : External or Internal transcribed spacer ; ars : autonomously-replicating sequence ; Chr : chromosome
- B) Schematic illustration representing the expected migration behavior of replication intermediates (RI) analyzed by bidimensional gel electrophoresis (2DGE). 1n or 2n means monomeric or duplicated (eg replicated) form of the analyzed genomic restriction fragment. The “Y arc” is a series of Y-shaped RI, that results from single replication forks moving through the DNA fragment at different stages of their progression. The “bubble arc” emanating from the 1n position appears only when the restriction fragment contains a replication origin that can be visualized through a specific probe. It reflects the different stages of replication progression arising from this origin. The vertical X-spike rising from the 2n position results from X-shaped DNA joint molecules corresponding to recombination intermediates. Representative images of RI analysis by 2DGE within :
- C) the BamHI/BamHI restriction fragment or
- D) the HindIII/KpnI restriction fragment in WT and RNAi mutants. The arrows indicate the replication fork pauses or the replication fork barriers (RFBs). The signals were revealed by using the appropriate probe.

**Chapitre II : Le RNAi joue  
un rôle dans le redémarrage  
de fourches de réplication  
bloquées par la formation  
d'un complexe Protéine/ADN**

## 1 Introduction & Résumé

Assurer la correcte duplication et ségrégation du matériel génétique à chaque division cellulaire est crucial pour préserver l'intégrité génomique et assurer la transmission fidèle du patrimoine génétique. La survenue d'un stress réplicatif peut mettre en péril ces processus et contribuer au développement de tumeurs (Lange *et al.*, *Nature*, 2011). Ce stress se caractérise par une progression altérée de la fourche de réplication, suite à sa rencontre avec un obstacle d'origine endogène ou exogène. Les fourches bloquées sont des structures fragiles, pouvant induire l'apparition de mutations, la formation de cassures de l'ADN, ou des réarrangements chromosomiques. Elles nécessitent une prise en charge régulée afin d'assurer une reprise optimale de la réplication. Le sauvetage de ces fourches bloquées peut mettre en jeu des mécanismes de réparation de l'ADN ou la fusion avec une fourche convergente (Lambert et Carr, *Chromosoma*, 2013).

Le RNAi possède un double rôle dans le maintien de la stabilité génomique, de la levure à l'Homme. D'une part, il participe à la formation de l'hétérochromatine dont le rôle est essentiel à la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire, et à la mise sous silence transcriptionnel de séquences répétées tels que les transposons (Lippman & Martienssen, *Nature*, 2004). D'autre part, le RNAi agirait de manière plus directe dans la réponse au stress génotoxique (Hawley *et al.*, *Cell Death and Diff*, 2017).

Dans une étude précédente, nous avons mis à jour une connexion physique entre le RNAi et les processus de réplication et de réparation de l'ADN. De plus nous avons identifié l'implication du RNAi dans la progression des fourches de réplication au niveau des unités génomiques ribosomales. Ces résultats nous ont motivé à investiguer la fonction du RNAi dans la prise en charge de fourches en arrêt.

Nos résultats préliminaires suggèrent que le RNAi contribue à faciliter la reprise de la réplication suite à une synchronisation des cellules par traitement à l'hydroxyurée. Nous avons ensuite exploité un système permettant de bloquer localement la progression d'une seule fourche de réplication. Les essais génétiques ont permis de montrer, pour la première fois, que le RNAi facilite le redémarrage par recombinaison homologue d'une fourche bloquée. Notre étude soulève un rôle possible du RNAi dans la régulation de l'étape de résection initiant le redémarrage de la fourche.

## **2 Contribution personnelle aux travaux mentionnés**

L'équipe du Dr. Sarah LAMBERT de l'Institut Curie a entièrement généré la première des résultats présentés dans ce chapitre. Pour ma part, j'ai réalisé les expériences de d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) avec l'aide de ma co-encadrante Leila Todeschini. De plus, j'ai eu l'occasion de passer six mois au sein de l'équipe du Dr. Sarah LAMBERT, à l'Institut Curie, afin de réaliser les expériences de « slippage » et d'analyse des intermédiaires de réplication par gel d'électrophorèse à deux dimensions (2DGE). Il est à noter que la révélation par sondes radioactives des signaux sur gel 2DGE a été réalisée par des membres de l'équipe du Dr. LAMBERT car je ne pouvais pas disposer de l'agrément requis durant mon séjour. De plus, des membres de son équipe ont également contribué à la reproduction de mes données obtenues *via* 2DGE.

## **3 Description des résultats obtenus (en anglais) :**

## **RNAi promotes proper management of blocked replication forks in the fission yeast**

### **The RNAi machinery promotes S phase progression**

To further characterize the contribution of RNAi to replication stress, we examined the role of RNAi in the recovery from HU-stalled forks. Strains were blocked in early S-phase by exposing exponentially growing cells to HU for 4 hours and then released into HU-free media. Then we analyzed the DNA content before HU treatment and after its release at several time points, by using two parallel methods (**Figure 47A**). Firstly, the cells were fixed, labelled with Sytox Green nucleic acid stain and subjected to flow cytometry. Secondly, their chromosomes were extracted according to a method that preserves their integrity, and separated them according to their size by pulse filled gel electrophoresis (PFGE). Following this, the overall DNA content was quantified relatively to asynchronous cells after ethidium bromide staining.

The flow cytometry analysis showed that HU treatment successfully synchronized all the strains in early S-phase (**Figure 47B**). The *WT* strain reached a G2 DNA content within 60 minutes after release whereas an extended S-phase duration was observed in all RNAi mutant. The delay was more important in *ago1Δ* and *tas3Δ* by contrast to *dcr1Δ* and *chp1Δ*. Moreover, we noticed, that even two hours after HU release, the signal corresponding to a G2 DNA content in the mutants, was still not as sharp-shaped as expected by comparison to the *WT* strain. These data indicate a role of the RNAi machinery is sustaining S-phase progression after transient fork-stalling.

Chromosome analysis by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) showed that HU treatment prevented chromosomes from migrating into the gel because of the accumulation of replication intermediates (**Figure 47C**). Sixty minutes after release, *WT* chromosomes were able to migrate into the gel and their intensity doubled 60 minutes after release, indicating that the *WT* genome was fully duplicated and replication intermediates were resolved. Consistent with an extended S-phase duration after transient fork-stalling, the chromosome duplication was not fully completed in *dcr1Δ* 90 minutes after release, and the chromosome amount was barely higher than in the asynchronous cells regarding *ago1Δ* and *tas3Δ* (**Figure 47D**).



Résultats : Le RNAi joue un rôle dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées

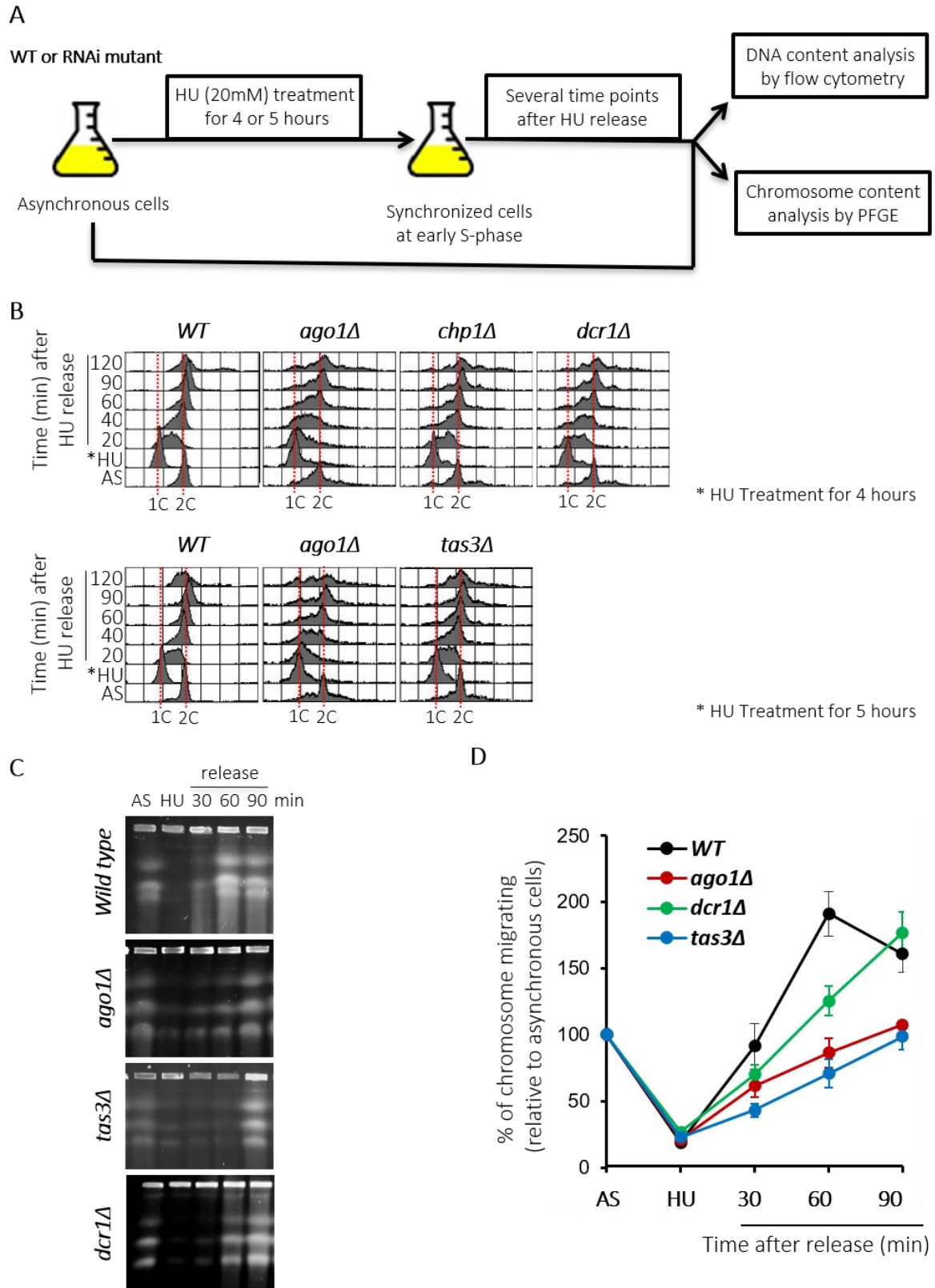


Figure 47: The RNAi machinery promote DNA replication recovery from HU treatment

- A) Scheme of the experiment procedure. *WT* or RNAi mutant cells were synchronized at early S-phase upon treatment with 20 mM of HU for 4 or 5 hours. Then, asynchronous and synchronized cells were subjected to DNA and chromosome content analysis at different time points after HU release (30, 60, 90 or 120 minutes). See text for further details.
- B) Analysis of DNA content by FACS in indicated strains and conditions after cell fixation and DNA staining with Sytox Green. 2C and 1C refers to the DNA content.
- C) Analysis of chromosome content by Pulse Field Electrophoresis followed by EtBr staining, in indicated strains and conditions.
- D) Quantification of chromosome content from indicated strains and conditions relatively to content from asynchronous cells. Values are means of at least four independent experiments  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

AS: asynchronous cells; HU: hydroxyurea.

Thus, both approaches pointed out a delayed recovery from HU-stalled forks in RNAi mutants after HU-induced cell synchronization. This first set of data suggests that Dcr1 and RITS promote the recovery of S-phase progression from HU treatment.

### **Presentation of the reporter assay, based on a unique and inducible replication fork barrier**

Our previous study revealed an essential role for RITS in promoting the progression of replication forks within a region of the ribosomal DNA (rDNA) encompassing the origin of replication. This prompted us to further investigate the molecular function of RNAi in the restart of an arrested replication fork. However, the rDNA region is not suitable to answer to our objective because: i) this region is highly repetitive; ii) each rDNA unit can be replicated and transcribed independently from each other during the cell cycle and iii) a high proportion of the units is transcriptionally silenced (French *et al.*, *Mol Cell Bio*, 2003). Thus, to assess whether RNAi could act at blocked replication forks, we used a programmed replication fork stalling assay, based on the exploitation of the natural replication fork barrier *RTS1* (*RTS1*-RFB) which is endogenously found at the mating type locus on chromosome II in *S. pombe* (Lambert *et al.*, *Cell*, 2005).

The *RTS1*-RFB was inserted on the chromosome III at a reporter gene located outside of the rDNA repeats and within a euchromatic region (**Figure 48A**). The replication fork involved in this assay arise mostly from a strong origin located 5 kb away and travel towards the telomere. The specific interaction between the protein Rtf1 and *RTS1* blocks the replication

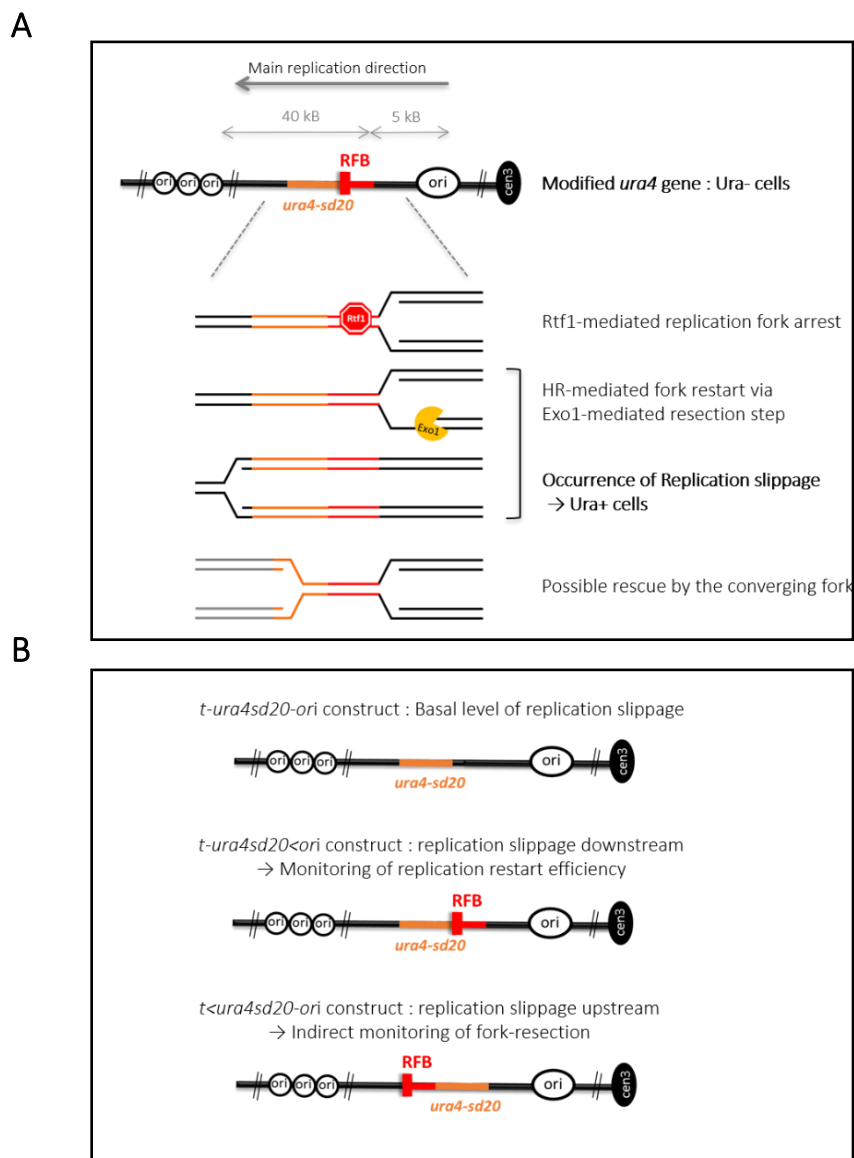
forks without causing a double strand break. Thus, within this genomic region over 90% of the forks travelling toward the telomere are blocked (Lambert *et al.*, *Mol Cell*, 2010). In this system, the expression of Rtf1 is artificially controlled through the *nmt41* promoter, which is repressed in the presence of thiamine. The polar replication block is therefore inducible and depends on the presence of thiamine, which gives rise to two types of media condition: “RFB OFF” (+ thiamine) and “RFB ON” (- thiamine). The induced arrested fork is either rescued by the progression of an opposite fork or restarted via homologous recombination (HR) a process that refers to as Recombination-Dependent Replication (RDR). This process starts by the controlled degradation of nascent strands to generate single stranded DNA (ssDNA) gaps on which RPA, Rad52 and Rad51 are loaded to direct the restart of the arrested fork. (Lambert *et al.*, *Mol Cell*, 2010 ; Mizuno *et al.*, *Genes Dev*, 2009 ; Tsang *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2014).

The resumed DNA synthesis associated to the HR-dependent restart has been shown to be more error-prone than canonical replication, especially when short tandem repeats (micro-homologies) are present (Iraqi *et al.*, *Plos One*, 2012). It is indeed liable for generating small deletions or insertions between micro-homology sites. These are indicative of replication slippage (RS) occurring via strand detachment and reattachment few nucleotides further away. This inaccurate DNA synthesis mediated by RS is a feature that has been exploited to set up a genetic reporter assay in order to score the frequency of HR-dependent fork restart (**Figure 48B**). It is based on the use of the inactivated allele of *ura4*, named *ura4sd20*, which contains a 20-nucleotide duplication flanked by 5 bp of micro-homology and which makes the cell auxotrophic for uracil. Upon the activation of the RFB, the non-processive DNA synthesis associated with HR-dependent fork restart induces RS, which results in the deletion of the 20 nt duplication and the restoration of a functional *ura4+* gene. The frequency of Ura<sup>+</sup> reversion is used as readout of the frequency at which the *ura4-sd20* allele is replicated by a restarted fork.

The *ura4-sd20* allele was inserted either downstream or upstream from the *RTS1-RFB*, giving rise to the construct *t-ura4sd20<ori* or *t<ura4sd20-ori* (t for telomere, < for the *RTS1-RFB* and its polarity). Replication fork restart at either one of these constructs has been reported to be dependent on HR factors *ie* Rad51 and Rad52 (Iraqi *et al.*, *Plos One*, 2012 ; Teixeira-Silva *et al.*, *Nat Com*, 2017). When the *ura4sd20* marker is integrated downstream of the *RTS1* barrier (*t-ura4sd20<ori* construct), the frequency of Ura<sup>+</sup> revertant strains allows the overall

Résultats : Le RNAi joue un rôle dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées

quantification of replication restart efficiency. When the marker is integrated upstream of the *RTS1* barrier (*t<ura4sd20-ori* construct), the *Ura<sup>+</sup>* revertant frequency enables to infer an indirect monitoring of fork-resection. This deduction is based on the fact that the DNA synthesis associated to HR-mediated fork restart occasionally occurs upstream from the initial site of fork arrest, as a consequence of Exo1-dependent ssDNA gap formation (Tsang *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2014). The construct *t-ura4sd20-ori* devoid of the *RTS1-RFB* was also generated to monitor the basal level of replication slippage in different genetic backgrounds.



**Figure 48: Presentation of the conditional *RTS1*–RFB system**

- A)** Scheme of *t-ura4sd20-ori* construct. The RTS1 replication fork barrier (*RTS1*-RFB, red bar) which is integrated on the centromere-proximal side of the *ura4* locus, 5 kb away from a strong replication origin (*ori*, black circles) and around 40 kb away from less strong origins on the chromosome III. “Cen3” indicates centromere position. Most of the forks generated by the strong origin, travel towards the telomere. The blockage of the replication fork is mediated in a polar manner by the RTS1-bound protein Rtf1, whose expression is inducible. Upon Rtf1 expression, more than 90% of forks travelling in the main replication direction are blocked at the barrier. These arrested forks can be resolved by a converging fork but are preferentially restarted by homologous recombination (HR). This HR-mediated process starts by the Exo1-mediated generation of a single strand DNA gap, called the resection step. HR-mediated fork-restart is associated to a non-processive DNA synthesis and prone to replication slippage within microhomology sites. The *ura4* wild type gene has been replaced by the nonfunctional *ura4-sd20* allele harboring a 20 nt duplication flanked by 5 bp of microhomology, thereby making uracil auxotroph cells. After the HR-mediated restart, the duplication is deleted via the occurrence of replication slippage, resulting in the restoration of a functional *ura4+* gene.
- B)** Diagrams of constructs containing the reporter gene *ura4-sd20*, associated or not to the *RTS1*-RFB. Each construct is used to quantify replication slippage frequency associated with mentioned conditions. See text for more details.

### The RNAi machinery promotes differentially the restart of the programmed-replication fork block at the RTS1-RFB site

We used the *RTS1*-RFB-based genetic trial to assess the effect of the single deletion of the genes *tas3*, *ago1* and *dcr1* on the HR-mediated restart of an arrested replication fork. We constructed strains harboring one of the *RTS1*-RFB related constructs for each genetic background. To obtain the true occurrence of Ura<sup>+</sup> reversion by the *RTS1*-RFB, independently of the genetic background, we subtracted the RS frequency related to the strain devoided of RFB to the RS frequency of the strain containing either the *t-ura4sd20<ori* or the *t<ura4sd20-ori* construct, upon expression of Rtf1.

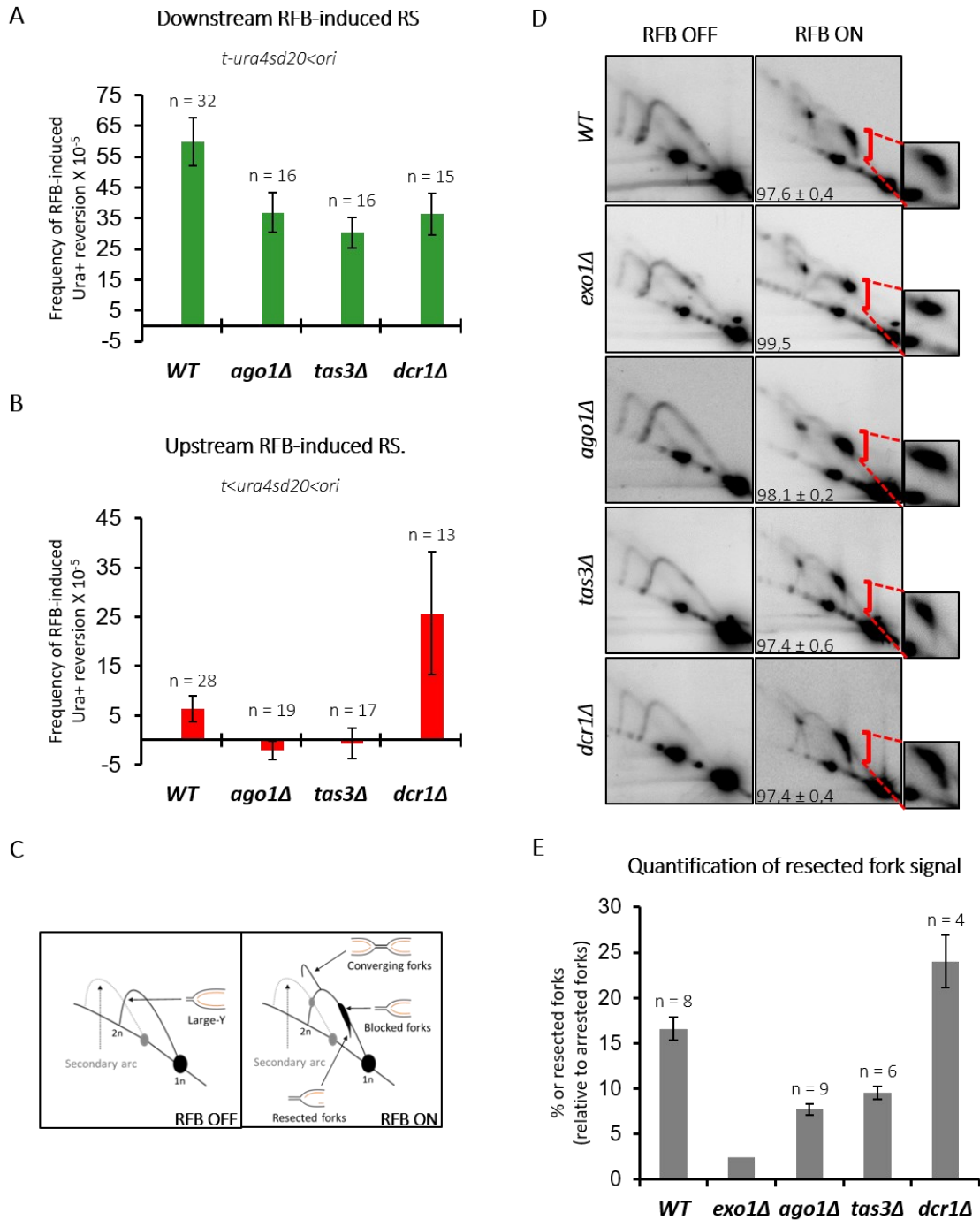
We observed that the frequency of upstream RFB-induced Ura<sup>+</sup> reversion, in all the RNAi mutants, was affected similarly with an almost 40% decrease compared to the *WT* condition (**Figure 49A**). This result indicates that at least 40% of blocked forks remain irreversibly arrested in the absence of Ago1, Tas3 or Dcr1. It suggests that these RNAi factors are involved in the HR-mediated recovery of a blocked fork at *RTS1*-RFB locus. Remarkably, the frequency of downstream RFB-induced Ura<sup>+</sup> reversion was also impaired in RNAi mutants relatively to *WT* condition, but differentially according to the genetic background (**Figure**

**49B**). The level of phenotype reversion was reduced in *tas3Δ* and *ago1Δ* whereas it was exacerbated in *dcr1Δ*. This result points out a potential defect in the fork-resection process and raises the possibility that the RNAi mutants may also exhibit different molecular functions regarding the resection step.

To further check this hypothesis, we analyzed the replication intermediates by bi-dimensional gel electrophoresis (2DGE,) using strains harboring the *t-ura4sd20<ori* construct. Upon induction of the *RTS1*-RFB, the strong signal accumulating on the Y-arc in the *WT* strain, corresponds to the arrested forks at the *RTS1* barrier (**Figure 49C and D**). A “tail” signal emanates from it and descends towards the linear arc, indicating a loss of mass and shape. This tail signal has been demonstrated to represent the replication forks undergoing the Exo1-mediated resection process (Ait-Saada *et al.*, *Mol Cell*, 2017; Teixeira-Silva *et al.*, *Nat Comm*, 2017). Consistent with this and as previously reported, the tail signal is abolished in the *exo1Δ* strain, which is deficient in the protein responsible for the extensive resection process (Ait-Saada *et al.*, *Mol Cell*, 2017; Teixeira-Silva *et al.*, *Nat Comm*, 2017). The analysis of fork-resection by 2DGE showed that the analyzed RNAi mutants exhibit a different pattern in terms of mass and shape of the tail signal (**Figure 49D**). The tail is less intense and less descending in *tas3Δ* and *ago1Δ* compared to the *WT*. On the contrary, the tail length seems to be not affected in *dcr1Δ*, but the signal is more intense at the tip. This observation can be indicative of the existence of replication forks undergoing a far more extended resection process in *dcr1Δ*. Consistently, the quantification of fork-resection indicates that the level of resected forks is decreased in *tas3Δ* and *ago1Δ*, whereas it is intensified in *dcr1Δ* by comparison to the *WT* (**Figure 49E**). This analysis of replication intermediates in RNAi mutants confirmed the antagonistic fork-resection phenotype between *tas3Δ* and *ago1Δ* versus *dcr1Δ* observed with the RTF1-RFB reporter assay.

From all of these data, we concluded that Dcr1, Ago1 and Tas3 are required to facilitate the HR-dependent restart of an arrested replication fork in the *RTS1*-RFB system, by potentially regulating the range of the resection process.





**Figure 49: Characterization of RNAi impact on genomic stability by using the RTS1-RFB system**

**A) and B)** Mean frequencies of respectively downstream and upstream RFB-induced Ura<sup>+</sup> reversion in *WT* and RNAi mutant stains containing the *ura<sup>+</sup>-sd20* reporter gene (RS: Replication Slippage). For each genetic background, the mean basal frequency of Ura<sup>+</sup> reversion monitored with the *t-ura4sd20-ori* construct devoid of RFB, has been subtracted to each value of frequency obtained with the *t-ura4sd<ori* or *t<ura4sd20<ori* construct, upon expression of Rtf1. Values are mean of n samples from at least four independent biological replicates. Bars indicate  $\pm$  95 % confidence interval (CI). n: number of values.

- C) Schematic illustration representing the expected migration behavior of replication intermediates (RI) within the AseI restriction fragment, analyzed by neutral-neutral bi-dimensional gel electrophoresis (2DGE), upon inactive (RFB OFF, left) or active (RFB ON, right) replication block. The Y arc is a series of Y-shaped RI that results from single replication forks moving through the DNA fragment at different stages of their progression. A schematic illustration of large Y-shaped fork is depicted. The secondary arc, which is indicated by grey dashed lines in both conditions, results from psoralen crosslinked DNA samples that are prone to partial AseI digestion. 1n or 2n means monomeric or duplicated (*eg* replicated) form of the analyzed genomic restriction fragment. The resected forks are referred as “tail” signal in the text.
- D) Representative images of RI within the AseI fragment analyzed by neutral-neutral 2DGE upon RFB ON and OFF conditions in indicated strains. Numbers indicate the percentage of blocked forks  $\pm$  standard error of the mean (SEM). A DNA fragment corresponding to *ura4* gene was used as probe.
- E) Percentage of fork undergoing resection in indicated strains, quantified as the ratio between the tail signal and the arrested fork signal intensities. Values (except for *exo1Δ*) are means of n samples from at least three independent biological replicates  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

### The *RTS1*-RFB system integrated at *ura4* locus does not form heterochromatin

The well-known function of RNAi machinery in *S. pombe* is to mediate transcriptional gene silencing via the formation of heterochromatin. Previous studies reported the involvement of RNAi in the resolution of conflicts between RNA polymerase II (RNA Pol II) and DNA polymerase at pericentromeric and rDNA regions (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011 ; Castel *et al.*, *Cell*, 2014). Both of these regions constitute sites of heterochromatin marks.

Thus, we decided to check the presence of heterochromatin mark H3K9me<sub>2</sub> (dimethylation of the lysine 9 at the histone 3) at different sites located upstream or downstream of the *RTS1* sequence, by performing chromatin immuno-precipitation (ChIP) experiments (**Figure 50A**). First, we determined if the thiamine used to inactivate the fork block could influence the level of H3K9me<sub>2</sub>. To test this, we used a construct devoided of the *RTS1* sequence in a WT genetic background (**Figure 50B**). We noted from preliminary results, that the enrichments analyzed at R1, R2 and R3 sites were not impacted by the media condition. These enrichments were even nearly equivalent to the level of the background (which is determined without using anti-body). Then, we compared the H3K9me<sub>2</sub> enrichment in RFB OFF and RFB ON conditions in a WT strain harboring the *t-ura4sd20<ori* construct, to determine if the activation of the block induces heterochromatin formation (**Figure 50C**). We noticed that the H3K9me<sub>2</sub> enrichment at all the sites was at the level of background in the RFB OFF condition. Moreover, we observed no impact upon replication block activation at any of



*Résultats* : Le RNAi joue un rôle dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées

the analyzed sites. By comparison to the centromeric repeats, which constitute a hotspot of heterochromatin, it is noteworthy that the level of H3K9me3 enrichment is at the level of background at the *RTSI*-RFB (**Figure 50D**). Based on these observations, we conclude that induction of the *RTSI*-RFB block does not trigger heterochromatin formation and therefore we did not further investigate the enrichment of the heterochromatin mark on the *RTSI*-RFB in RNAi mutants.

Our preliminary data indicate that the *RTSI*-RFB is probably not a site of RNAi-mediated heterochromatin formation. They also suggest that the role of RNAi in promoting HR-mediated replication fork restart the *RTSI*-RFB system is not associated with the formation of heterochromatin.

Résultats : Le RNAi joue un rôle dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées

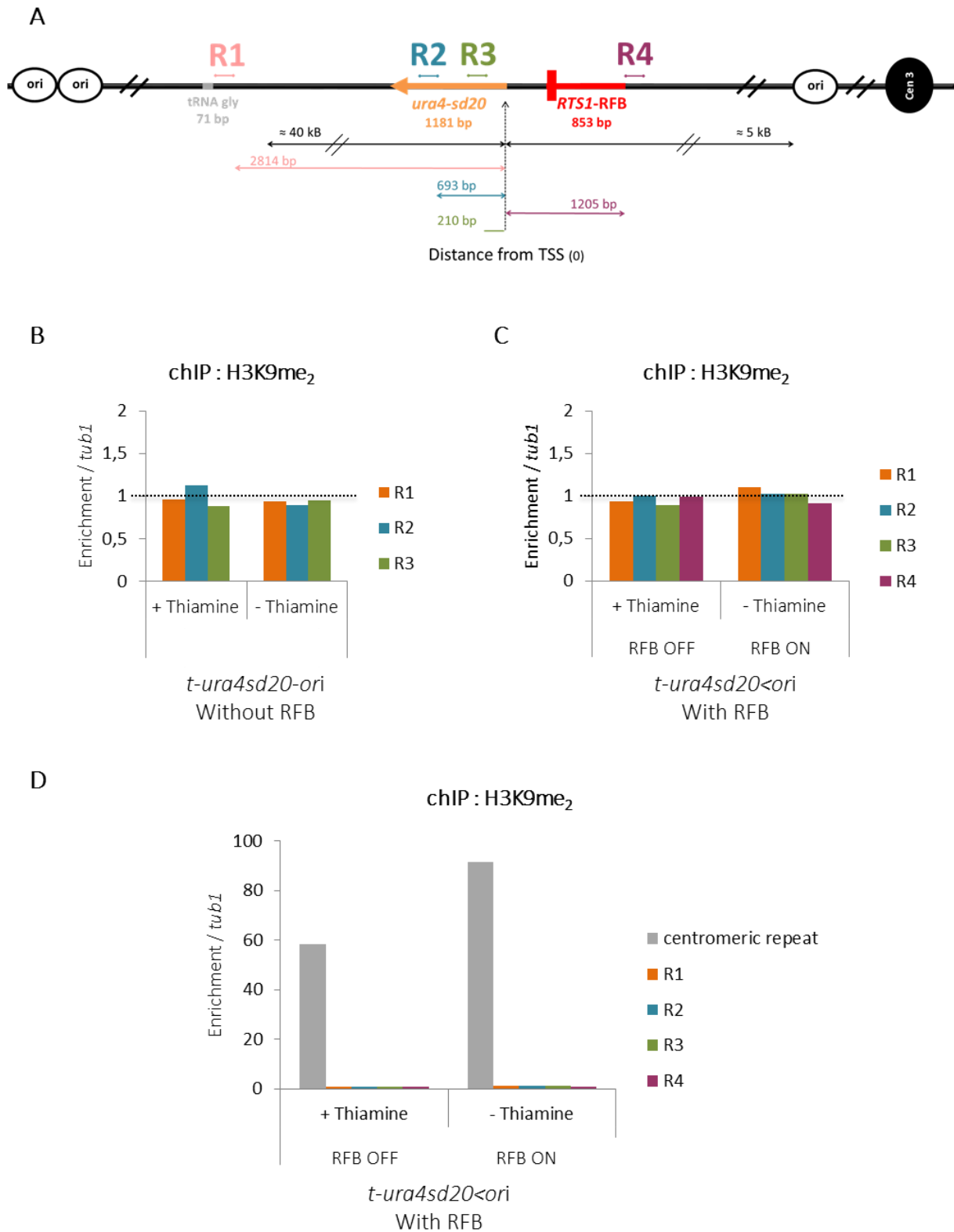


Figure 50: The *RTS1*-RFB system integrated at *ura4* locus does not form heterochromatin

- A)** Diagram of the t-ura4sd20<ori construct showing the position of the probes used for the chromatin Immuno-Precipitation analysis (chIP). The distances in bp are indicated from the transcription initiation site (TSS) of the ura4-sd20 gene.
- B) and (C)** chIP analysis of the heterochromatin mark H3K9me2 deposition at the indicated sites on the RTS1-RFB system, in WT strains harboring the t-ura4sd20-ori or the t-ura4sd20<ori construct, and in absence (Rtf1 expressed) or presence (Rtf1 repressed) of 60  $\mu$ M thiamine. The enrichments are quantified relatively to tub1. The dashed line corresponds to the H3K9me2 background enrichment which is monitored when the chIP is realized without anti-body, and which is equal to 1 for all of the conditions. There are no error bars in any of the graphs because the values come from one biological replicate for each experimental condition.
- D)** Same analysis as in (C) except that the H3K9me2 deposition at the centromeric repeats is also represented.

### The RNA Polymerase II might contribute to the restart of a blocked replication fork in a RNAi-dependent fashion

There is a duality concerning the impact of non-coding RNA in DNA repair in the current knowledge: they can represent a source of replicative stress or promote the repair. In the fission yeast, the RNA Polymerase II (RNA Pol II) that plays a role in producing ncRNAs, meets also this ambivalence. A previous study depicted the RNA pol II as an impediment of replication progression (Castel *et al.*, *Cell*, 2014) whereas another one hypothesized that it might drive the DSB repair-involved resection process (Ohle *et al.*, *Cell*, 2016). So, it was of our interest to examine the implication of the RNA Pol II on the *RTS1*-RFB system.

We questioned the role of the RNA Pol II in promoting the replication fork block. First, considering that the *ura4* gene promoter can be a source of RNA Pol II recruitment, we assessed the impact of its removal on the Rtf1-induced replication fork block in a *WT* strain and *ago1Δ* mutant. We noted that upon activation of the block, the level of arrested forks was not affected by the deletion of the *ura4* promoter respectively in both genetic backgrounds (**Figure 51A**). Besides, the tail signal seemed to harbor the same pattern in terms of shape and intensity between the two constructs in the respective genetics background. As confirmed by the signal quantification, the level of resected forks was not significantly impacted by the promoter removal in the *WT* or *ago1Δ* mutant (**Figure 51B**).

Next, we analyzed the occupancy of the RNA Pol II at different sites on the *RTS1*-RFB locus by performing ChIP experiments in RFB OFF and RFB ON conditions (**Figure 51C**).

After induction of the replication fork block in the *WT* condition, we did not observe any significant differences in RNA Pol II accumulation, nor at the sites located downstream of the barrier (A and B), nor upstream (C) (**Figure 51D**). From all of these results, we concluded that the presence of RNA Pol II is not a source of replicative stress in the case of the *RTSI*-RFB system.

To further investigate the possible involvement of the RNA Pol II in the *RTSI*-RFB system, we assessed its occupancy in single RNAi mutants *ago1Δ* and *dcr1Δ* (**Figure 51D**). At A and B sites located downstream of the *RTSI* sequence, the enrichment of RNA Pol II was of the same magnitude regardless of the RFB activity and respectively in each mutant. This observation further supports our conclusion that RNA Pol II is not involved in the Rtf1-induced blockage. However, at the C site overlapping between the *RTSI* sequence and the upstream region, we did observe a slight but significant and reproducible increase of the RNA Pol II occupancy upon block induction, in *dcr1Δ* but not in *ago1Δ*. This site is interesting because it is where the resection process starts. This opposite pattern of RNA Pol II occupancy between both RNAi echos their opposite resection defect phenotype. This suggests that the RNAPII might be involved in HR-mediated repair of a blocked replication fork. It raises the intriguing possibility that the RNAi acts on this RNA Pol II and regulates its occupancy.

Résultats : Le RNAi joue un rôle dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées

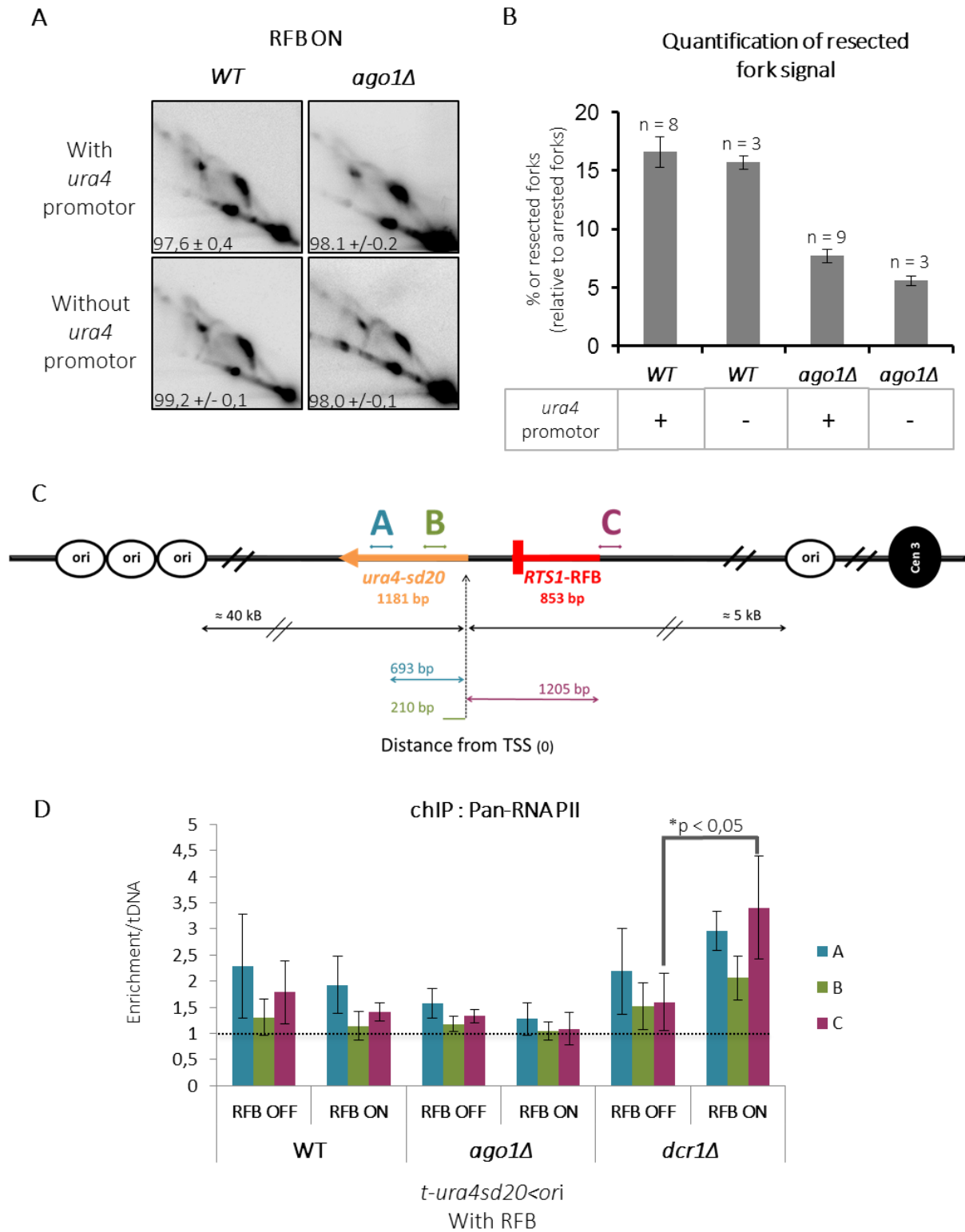


Figure 51: The RNA Pol II might be involved in the recovery of an arrested fork

*Résultats* : Le RNAi joue un rôle dans le redémarrage de fourches de réplication bloquées

- A)** Representative images of RI within the *AseI* fragment analyzed by neutral-neutral 2DGE upon RFB ON condition, in WT and *ago1Δ* strains harboring or not the *ura4* gene promoter. Numbers indicate the percentage of blocked forks  $\pm$  standard error of the mean (SEM). A DNA fragment corresponding to *ura4* gene was used as probe.
- B)** Percentage of fork undergoing resection in WT and *ago1Δ* strains harboring (+) or not (-) the *ura4* gene promoter, quantified as the ratio between the tail signal and the arrested fork signal intensities. Values are means of n samples from at least three independent biological replicates  $\pm$  standard error of the mean (SEM).
- C)** Diagram of the *t-ura4sd20<ori* construct showing the position of the probes used for the chromatin Immuno-Precipitation analysis (chIP). The distances in bp are indicated from the transcription initiation site (TSS) of the *ura4-sd20* gene.
- D)** chIP analysis of the pan-RNA polymerase II (RNA PII) localization on the RTS1-RFB system, in WT or RNAi mutant strains harboring the *t-ura4sd20<ori* construct, upon RFB OFF or ON conditions. The enrichments are quantified relatively to tDNA. The dashed line corresponds to the pan-RNA PII background enrichment which is monitored when the chIP is realized without anti-body, and which is equal to 1 for all of the conditions. Values are means of 6 samples from independent biological replicates  $\pm$  95% confidence interval (CI). Statistics were calculated by using Student Test.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans cette partie, les résultats principaux de ma thèse sont repris, puis discutés à la lumière des autres travaux de recherche publiés dans le domaine. Nos résultats ouvrent la voie à d'autres projets de recherche qui sont également présentés.

## **1 Mise en évidence d'une connexion physique entre RITS et des protéines impliquées dans le maintien de la stabilité du génome**

Le complexe RITS est l'effecteur du RNAi dans la fonction de *silencing* transcriptionnel. Il est donc envisageable qu'il occupe aussi ce statut dans le cadre des autres fonctions possibles du RNAi. Nous avons entrepris d'identifier les processus cellulaires associés au RNAi, en s'intéressant aux partenaires potentiels de RITS. Il s'agit d'une stratégie à large échelle qui n'a pas encore été employée dans la littérature actuelle traitant de la fonction du RNAi dans la stabilité du génome.

RITS est composé des protéines Ago1, Tas3 et Chp1. Nous nous sommes intéressés aux protéines co-purifiant avec la sous-unité Chp1 pour deux raisons. Premièrement la formation du complexe RITS n'est pas altérée par l'étiquetage de Chp1, en l'occurrence par l'adjonction C-terminale de l'étiquette TAP. Deuxièmement, Chp1 est le seul élément de RITS capable d'interagir directement avec la chromatine méthylée *via* son chromodomaine (Schalch *et al.*, *Mol Cell*, 2009). L'intérêt d'avoir étudié les protéines associées à cette sous-unité, est donc de révéler des processus potentiellement en lien à la fois avec le RNAi, et avec l'environnement chromatinien.

Cette stratégie a permis de révéler 386 protéines co-purifiant avec Chp1 selon un ratio d'enrichissement minimal reproductible de deux fois par rapport au bruit de fond. Nous avons décidé d'investiguer plus en détails la connexion entre RITS et 38 de ces protéines qui forment des foci nucléaires, à l'instar de chacune des sous-unités de RITS. Pour cela, nous avons à la fois comparé la localisation entre ces protéines et Tas3-CFP, et analysé leur interaction *in vitro* avec GST-Ago1 (GST « pull-down »). Nos travaux ont révélé, plus particulièrement, que 19 de ces protéines co-purifiant avec Chp1, co-localisent également avec Tas3 et interagissent *in vitro* avec Ago1. Il y a donc de fortes chances que ces protéines soient des partenaires potentiels du complexe RITS, et pas uniquement de Chp1. Pour s'en assurer, il faudrait de nouveau procéder



à ces analyses dans des mutants de RITS et déterminer si ces connexions sont perdues. Par exemple, il serait intéressant de purifier à large échelle Chp1-TAP ou de tester l'interaction avec GST-Ago1 dans un fond génétique *ago1Δ* et/ou *tas3Δ* respectivement. De même, il serait intéressant d'identifier les protéines co-purifiant avec Tas3 car cette sous-unité permet de ponter Chp1 et Ago1 au sein du complexe RITS (Verdel *et al.*, *Science*, 2004 ; Petrie *et al.*, *Mol Cell Bio*, 2005). Autrement dit, il s'agit de l'élément qui connecte indirectement Chp1 et Ago1 et qui est donc indispensable à la formation de RITS.

Nous avons conscience des limites des analyses de microscopie que nous avons réalisées. Premièrement, nous avons généré nos conclusions en considérant, au minimum, une co-localisation impliquant un foyer de chaque candidat testé et de Tas3-CFP ou mCherry-Swi6. Deuxièmement, nous n'avons pas procédé à une prise d'images multi-plan sur l'axe Z (Z-stack) pour chaque analyse comparative. Troisièmement, les analyses de microscopie ont été réalisées dans des conditions de surexpression, à la fois des candidats testés, mais aussi de Tas3-CFP ou mCherry-Swi6. Ce choix a été motivé par l'existence d'une banque de souches *S. pombe* surexprimant des versions chimériques des candidats co-purifiant avec Chp1 (Matsuyama *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2006), et nous permettant ainsi de procéder, avec plus de facilité, à un plus grand nombre d'analyses. Nous avons observé que la surexpression de Tas3-CFP (mais aussi de mCherry-Swi6) altérait parfois la localisation de certains candidats testés. Ceci suggère des interactions génétiques potentielles qu'il faudrait plus investiguer à l'avenir. Nous avons également observé que la surexpression de la forme chimérique de Tas3 (exemple Tas3-YFP) produisait plus de foci que l'expression à un niveau endogène. L'ensemble de ces analyses reste donc qualitatif. Elles nous permettent uniquement d'estimer une possible co-localisation réelle entre Tas3 (ou Swi6) et les protéines testées. Il faudrait reproduire ces analyses dans des conditions d'expression endogène des protéines testées. De même, les analyses de GST *pull-down* ont été réalisées dans des conditions *in vitro* et en utilisant des extraits cellulaires dans lesquels les candidats testés étaient surexprimés. Nous avons veillé à ne considérer uniquement que les interactions pour lesquelles l'enrichissement sur la matrice GST-Ago1 était important. De plus, les interactions mises en évidence ne sont pas forcément des interactions directes entre le candidat et Ago1. En effet, elles peuvent se faire par l'intermédiaire d'autres protéines ou complexes, non identifiables par la technique du GST *pull-down*. Il faudrait, par exemple, recourir à la technique du double hybride pour déterminer si les interactions déterminées sont directes. Il faudrait également vérifier si ces interactions sont maintenues dans des conditions d'expression endogène et *in vivo* à la fois des candidats testés, mais aussi d'Ago1.

De façon intéressante, 11 protéines (soit 60%) sur les 19 « validées » par microscopie et GST *pull-down*, sont impliquées dans des processus de maintien de la stabilité du génome : signalisation des dommages et réparation de l'ADN (Exo1, Ssb1, Vps71, Set9 ; [Cotta-Ramusino *et al.*, *Mol Cell*, 2005 ; Parker *et al.*, *Mol Cell Biol*, 1997 ; Hou *et al.*, *J Biol Chem*, 2010 ; Sander *et al.*, *Cell*, 2004]), réplication et ségrégation des chromosomes (Abp1/Cbp1, Rad4, Swi1 ; [Baum *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2000 ; Fukuura *et al.*, *Mol Biol Cell*, 2011 ; David *et al.*, *PNAS*, 2009]), contrôle de la progression du cycle cellulaire (Cdc10, Res1, Res2 ; [Pai *et al.*, *Cell Rep*, 2017]) et organisation de la chromatine (Sds3 ; [Biswas *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2008 ; Zilio *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2014]). L'ensemble de ces protéines possèdent un foyer co-localisant avec un foyer de mCherry-Swi6. Il est possible que l'association entre RITS et ces protéines se tiennent au niveau de l'hétérochromatine.

L'ensemble de ces analyses biochimiques et microscopiques a mis en évidence, pour la première fois, une connexion physique entre le RNAi et des processus impliqués directement dans le maintien de la stabilité génomique. Dans la suite de nos travaux, nous avons décidé d'explorer l'implication du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome.

Nous gardons à l'esprit que l'analyse des ontologies des gènes codant pour les 386 protéines co-purifiant avec Chp1, de façon statistiquement significative, a révélé des connexions avec d'autres processus cellulaires : catabolisme protéique ubiquitine-dépendant, biogénèse des ribosomes, assemblage du spliceosome. Il serait intéressant de déterminer, dans le cadre de nouvelles études, si cette connexion physique avec Chp1, est le reflet d'une implication plus générale du RNAi dans ces différents processus.

## **2 Le RNAi promeut la progression du cycle cellulaire et le maintien général de la stabilité du génome**

A contre-courant de la littérature actuelle chez *S. pombe*, nous avons étudié à la fois l'impact de Dcr1 et de RITS, les éléments clés de la voie RNAi, sur la viabilité cellulaire et sur la progression de la duplication de l'ADN en présence d'un stress répliatif. Nous montrons que Dcr1 et les composants de RITS sont requis pour favoriser la survie des cellules dans un milieu contenant de l'hydroxyurée (HU). Cette drogue conduit à un ralentissement de la vitesse de

progression des fourches de réplication *via* la déplétion du pool de nucléotide en phase S. De façon complémentaire, Dcr1 et RITS sont également requis pour favoriser la reprise de la réplication de l'ADN, après synchronisation des cellules en début de phase S par traitement au HU. Ces données seront bientôt complétées par l'étude de la viabilité des mutants du RNAi en présence d'autres drogues afin de déterminer si RITS et Dcr1 sont également requis pour favoriser la survie cellulaire en présence de différents types de dommages à l'ADN, telles que les cassures doubles brin (induites par la bléomycine, la camptothécine) ou l'alkylation de bases (induite par le methyl metanesulfonate). Nous pourrions analyser également l'impact de la délétion d'autres facteurs du RNAi, tels que Rdp1 et Clr4 dans le but de déterminer si respectivement, l'amplification de la production des siRNAs et la déposition de la marque d'hétérochromatine sont également nécessaires pour maintenir la survie cellulaire et permettre la progression de la phase S.

Nos résultats font écho à d'autres données déjà publiées indiquant que : i) Chp1 et Dcr1 exercent chacun un effet synergique avec Mrc1 (facteur de protection de la fourche de réplication) ou Cds1 (*checkpoint* intra-S) permettant de favoriser la survie cellulaire en présence de HU (Li *et al.*, *Cell Rep*, 2013) ; ii) la réplication du centromère est retardée chez les mutants du RNAi dont *dcr1Δ* (Li *et al.*, *Plos One*, 2013) ; iii) Ago1 et Dcr1 seraient impliqués dans la régulation de l'activité de Cdc2, qui conditionne le passage en mitose (Carmichael *et al.*, *MBC*, 2004).

Nos données combinées à celles de la littérature nous permettent ainsi d'émettre l'hypothèse que le RNAi serait impliqué dans le passage et la progression de la phase S. De façon intéressante, tous les composants du complexe MBF (Cdc10, Res1, Res2 ; MBF pour *MluI cell-cycle box (MCB) binding factor*) co-purifient avec Chp1, se co-localisent avec Tas3 et interagissent avec Ago1 par GST *pull-down*. Ce complexe contrôle l'entrée en phase S, en régulant l'expression de facteurs impliqués notamment dans le *licensing* des origines de réplication (Pai *et al.*, *Cell Rep*, 2017). Il serait intéressant de déterminer si le RNAi régule l'activité du complexe MBF.

### 3 Le RNAi participe à préserver la stabilité des rDNAs

#### 3.1 RITS et Dcr1 sont tous les deux impliqués dans le maintien du nombre d'unités ribosomales

Les ADN ribosomiaux (rDNAs) codant pour les ARN 18S, 5.8S et 28S, s'organisent en une unité fonctionnelle, dotée de sa propre origine de réplication et d'un promoteur spécifique de la RNA Pol I. Cette unité se répète en tandem environ 150 fois au niveau de chaque région située en position subtélomérique au niveau du chromosome III chez *S. pombe*. La nature répétitive des rDNAs et sa forte activité transcriptionnelle durant la réplication en font une région génomique fragile. Il existe des barrières de réplication (RFBs) programmées, situées dans la région intergénique de chaque unité de rDNA, qui permettent de limiter les collisions entre les machineries de réplication et de transcription convergentes. Les rDNAs constituent malgré tout une région génétiquement instable, en particulier lors d'un stress réplcatif. Si ce stress n'est pas pris en charge, il peut être à l'origine d'une variation du nombre d'unités ribosomales et de réarrangements chromosomiques (GCR).

Chez *S. pombe*, il a été rapporté que des stress réplcatifs, liés à des conflits entre le réplisome et la RNA Pol II, se produiraient au niveau des rDNAs (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). Ces conflits seraient responsables de la contraction des rDNAs (perte d'unités ribosomales) s'ils ne sont pas résolus. La RNA Pol II serait à l'origine d'une transcription anti-sens, à celle assurée canoniquement par la RNA Pol I, et probablement pervasive. Il a été proposé qu'uniquement Dcr1 participerait à la résolution de ces conflits affectant les rDNAs, en favorisant la terminaison de la transcription (Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

Nous avons étudié l'implication du RNAi dans la préservation de la stabilité des rDNAs. Nous avons mis en évidence une contraction des rDNAs, se traduisant par une perte de 30 à 50% du contenu total en rDNA, chez les mutants *dcr1Δ*, *ago1Δ*, *tas3Δ* et *chp1Δ*, par rapport à une souche *WT*. Nos travaux suggèrent ainsi qu'à la fois Dcr1 et RITS, sont requis pour préserver le nombre d'unités ribosomales. Nos données sont en apparence en contradiction avec les travaux de Castel *et al.*, qui impliquent uniquement Dcr1 et excluent formellement l'implication d'Ago1 dans cette fonction. Nous expliquons cette potentielle

contradiction par l'utilisation d'approches expérimentales différentes visant à analyser le contenu en rDNA. Dans notre étude, nous avons employé la méthodologie classique permettant d'identifier les réarrangements complexes nommés GCR (pour *Gross Chromosomal Rearrangements*), dont font partie les contractions ou expansions d'unités répétées. Nous avons ainsi séparé les chromosomes en préservant leur structure par le biais d'une électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Puis nous avons quantifié, par *Southern Blot*, le contenu en rDNA par rapport à celui d'une région génomique localisée en dehors des rDNAs. Cette méthode nous a permis de corréliser la diminution de la taille du chromosome III à celle de la taille de la région comprenant les unités de rDNA. Castel *et al.*, de leur côté, ont quantifié les rDNAs 18 S et 28S par une approche de PCR (qPCR). Une diminution de 30% du contenu de ces rDNAs a été observée chez le mutant *dcr1Δ* mais pas *ago1Δ*, en comparaison à la condition *WT*. J'ai moi-même reproduit ces résultats en utilisant la même technique (avec les mêmes amorces), à la différence près que j'ai observé une diminution de 40% des rDNAs analysés chez le mutant *dcr1Δ*. J'ai également analysé le mutant *tas3Δ* et observé une diminution de près de 25% des rDNAs 18S et 28S, par rapport à une souche *WT*. Il est important de mentionner que j'ai réalisé ces analyses en utilisant des aliquots des extractions génomiques ayant servis également à la quantification des rDNAs par *Southern Blot*. Autrement dit, la même extraction génomique issue d'une souche *ago1Δ* est à l'origine de deux quantifications différentes du contenu en rDNA selon l'approche expérimentale employée. Nous expliquons ces différences de résultats par la production d'unités ribosomales sous forme d'éléments circulaires extrachromosomiques (ERC pour *Extra-chromosomal rDNA Circles*) chez ce mutant. Ces ERC peuvent être générés par les événements de recombinaison, accompagnant la contraction des rDNAs. Ils sont inclus dans le contenu global en rDNA quantifié par l'approche de qPCR. En revanche, ils sont éliminés du gel d'électrophorèse après PFGE (du fait de leur petite taille, en comparaison de celle des chromosomes) et ne peuvent donc pas être quantifiés par *Southern Blot*. Il faudra tester cette hypothèse en quantifiant et comparant spécifiquement la production de ces ERC chez les mutants *dcr1Δ*, *ago1Δ*, *tas3Δ* et *chp1Δ*. Comme l'ensemble de ces mutants présente un phénotype de contraction des rDNAs, il est attendu qu'ils produisent également des ERC. Chez la drosophile, il a d'ailleurs été observé que la déplétion de certains facteurs du RNAi est associée à une accumulation d'ERC (Peng et Karpen, *Nat Cell Bio*, 2006). La question subsidiaire serait alors de déterminer s'il y a une gestion différentielle des ERC en fonction des mutants chez *S. pombe*. Il s'agira de comprendre, par exemple, pourquoi ces ERC

seraient maintenus chez le mutant *ago1Δ*, mais éliminés chez le mutant *dcr1Δ*. Par ailleurs, il a été rapporté dans les mutants *dcr1Δ*, *ago1Δ* et *chp1Δ* une augmentation d'événements de recombinaisons mitotiques au niveau des rDNAs, évaluée par la fréquence de délétion de gènes rapporteurs insérés au niveau de ces régions (Cam *et al.*, *Nature*, 2005). Cette observation fait écho au phénotype de contraction des rDNAs que nous avons observé chez ces mutants et qui peut être engendré par des événements de recombinaison.

Pour compléter ces travaux et investiguer plus en détails l'implication de RITS et Dcr1, il faudrait déterminer si ces facteurs se localisent au niveau des rDNAs. Une analyse à large échelle de la distribution d'Ago1 a déjà révélé la localisation de cette protéine au niveau des régions intergéniques des unités de rDNAs (Cam *et al.*, *Nature*, 2005). Nos analyses par microscopie suggèrent que Tas3, et donc par extension RITS, pourrait effectivement se localiser au niveau du nucléole. Nous pourrions, en plus, déterminer si sa distribution change en présence d'un stress génotoxique.

### **3.2 Le chargement d'ARN et l'activité enzymatique d'Ago1 sont requises pour la fonction d'Ago1 dans le maintien des unités ribosomales**

Le chargement d'Ago1 en duplex de petits ARN est une condition pour permettre la formation du complexe RITS. Ce chargement s'effectue à l'aide des chaperonnes Arb1 et Arb2 (*Argonaute Binding Protein 1-2*). Ce complexe est requis pour la prise en charge par Ago1 non seulement des duplexes de siRNAs produits par Dcr1, mais également des *primal* RNAs (priRNAs) dont la production est Dcr1-indépendante (Halic et Moazed, *Cell*, 2010 ; Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Il permet aussi de réguler négativement l'activité *slicing* d'Ago1, qui conduit à la libération du brin passager (Bucker *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2007). Cette régulation empêcherait Ago1 de cibler les ARN présents dans la cellule de manière non contrôlée. Ainsi, l'activité *slicing* d'Ago1 ne serait possible qu'une fois la protéine faisant partie du complexe RITS.

Nos données indiquent que les mutants *arb1Δ* et *arb2Δ* présentent aussi une contraction des rDNAs. Elles suggèrent que le chargement d'Ago1 en duplex de petits ARN est nécessaire à l'implication d'Ago1 dans le maintien du nombre d'unités ribosomales. De plus, nous avons montré que la réintroduction d'une forme sauvage d'Ago1 permet de compenser efficacement

la perte du contenu en rDNA caractérisant normalement la souche *ago1Δ*. Cela plaide en faveur du fait que le phénotype observé chez le mutant serait directement lié à l'absence d'Ago1. En revanche, la réintroduction de la forme mutée Ago1-D580A ne permet pas d'aboutir à cette compensation. Ce mutant possède un site catalytique inactif, ce qui nous a ainsi permis de suggérer que l'activité *slicing* d'Ago1 est requise pour permettre à cette enzyme d'assurer sa fonction dans le maintien du nombre d'unités ribosomales. Quelques commentaires sont à apporter concernant ces tests de complémentation. Premièrement, nous avons observé que le mutant *ago1Δ* possédant le plasmide vide, présentait une contraction des rDNAs moins prononcée que le simple mutant *ago1Δ* (une perte d'environ 30% contre 40% respectivement en contenu de rDNA). Nous pensons que cette différence s'explique par l'utilisation de milieu de culture différent : milieu minimum pour les expériences de complémentation, contre milieu riche pour les autres analyses. Il est possible que les besoins métaboliques de la cellule varient en fonction du type de milieu et influencent en partie le nombre d'unités ribosomales. Deuxièmement, nous avons procédé à ces tests de complémentation en introduisant des plasmides permettant de surexprimer Ago1 WT ou mutée dans la souche *ago1Δ*. Nous envisageons de reproduire ces tests dans des conditions d'expression endogène des protéines en intégrant directement les constructions dans le génome de *S. pombe*.

La présence d'Ago1 au niveau des régions intergéniques situées entre les unités ribosomales a été rapportée, de même que la présence de siRNAs associés à Ago1 et dérivant de ces régions (Cam *et al.*, *Nature*, 2005). Cette dernière donnée est corroborée par le séquençage des petits ARN associés aux protéines Ago1 dans une souche *WT* révélant qu'une portion de ces petits ARN est originaire des rDNAs (Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Nos travaux montrant l'implication de RITS et de l'activité *slicing* d'Ago1 dans le maintien de la stabilité des rDNAs, apportent une signification biologique possible à ces observations.

D'autres données, en revanche, rapportent que l'activité catalytique dite *dicing* de Dcr1, assurant la production des duplexes de siRNAs, ne serait pas requise pour l'implication de cette enzyme dans la préservation du nombre d'unités ribosomales (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). À la lumière de notre discussion concernant la méthodologie de quantification du contenu en rDNA, il serait intéressant d'analyser ce mutant en utilisant l'approche classique du PFGE (suivi d'un Southern Blot. Si néanmoins l'absence de contraction des rDNAs se confirme, il faudra envisager l'hypothèse que la voie des priRNAs intervient dans le maintien de la stabilité des rDNAs. Pour rappel, la particularité de cette voie, est que la production de ces priRNAs est indépendante de Dcr1. Les précurseurs de ces priRNAs seraient d'abord clivés en produits



simple brin plus courts et de différentes tailles par une nucléase encore inconnue, puis ils seraient pris en charge par Ago1 *via* le complexe ARC. La nucléase Triman, nouvellement identifiée, serait alors spécifiquement recrutée sur ces priRNAs associés à Ago1 et les exciserait jusqu'à leur taille finale de 22 à 23 nucléotides (Halic et Moazed, *Cell*, 2010 ; Marasovic *et al.*, *Mol Cell*, 2013). Point intéressant, le séquençage des petits ARN associés aux protéines Ago1 dans un mutant *dcrl1Δ*, indique qu'ils proviendraient en très grande majorité des rDNAs (Holoach *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Il serait intéressant de déterminer si Triman est également impliquée dans la maintenance du nombre d'unités de rDNAs.

### **3.3 La méthyltransférase Clr4 n'est pas requise pour le maintien des unités ribosomales**

Chez *S. cerevisiae*, 50% des unités seraient réprimées selon un procédé impliquant l'histone désacétylase Sir2 (Gasser et, Cockell, *Gene*, 2001 ; French *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2003). Ce *silencing* transcriptionnel a été impliqué dans le maintien du nombre de copies ribosomales et dans la régulation du nombre d'origines de réplication actives au niveau des rDNAs (Pasero *et al.*, *Genes Dev*, 2002 ; Kobayashi, *Cell Mol Life Sci*, 2011). La levure *S. pombe* présente des marques d'hétérochromatine H3K9me<sub>2</sub> au niveau des rDNAs (Cam *et al.*, *Nature*, 2005). Cependant, on ne connaît pas encore la fonction exacte de cette hétérochromatine, ni quelle proportion d'unités ribosomales sont réprimées dans cet organisme. De plus, les mécanismes moléculaires responsables de la formation d'hétérochromatine au niveau des rDNAs sont assez peu caractérisés. L'exploitation du phénomène PEV a mis en évidence l'implication du RNAi dans le *silencing* d'un gène rapporteur inséré au niveau des rDNAs (Thon et Verhein-Hansen, *Genetics*, 2000 ; Shankaranarayana *et al.*, *Curr Bio*, 2003 ; Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005). En revanche, l'implication de cette voie dans le *silencing* des unités de rDNAs, chez les cellules en phase végétative, n'a pas encore été clairement établie.

La déposition de la marque H3K9me<sub>2</sub> est assurée par le complexe CLRC chez *S. pombe*. Ce complexe est composé entre autres de Clr4, la seule méthyltransférase de la lysine 9 de l'histone H3 connue dans cet organisme. Notre étude a indiqué que la stabilité et le contenu en rDNA n'était pas affecté par l'absence de Clr4. Il semblerait donc que le processus de déposition de la marque d'hétérochromatine ne soit pas requis pour préserver le nombre d'unités ribosomales. Il faudrait également vérifier si la délétion des autres éléments du



complexe CLRC n'engendre aucun effet sur le contenu en rDNA. L'étude de Castel *et al* rapporte un élément en accord avec notre suggestion : la contraction des rDNAs observée chez le mutant *dcr1Δ* n'est pas corrélée à la perte de la marque répressive H3K9me<sub>2</sub>. En effet, il a été observé que l'enrichissement de la marque H3K9me<sub>2</sub> au niveau des rDNAs n'était pas altéré par l'absence de Dcr1. Cet enrichissement était en revanche, diminué comme attendu, au niveau des régions péri-centromériques (Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

Par ailleurs, une analyse à large échelle du profil de distribution de certains facteurs du RNAi dans le génome, a révélé des observations surprenantes. La localisation d'Ago1 et des siRNAs d'une part et celle de Swi6 et de la marque H3K9me<sub>2</sub> de l'autre, semblent être antinomiques à l'échelle de l'unité ribosomale. Les premiers sont principalement enrichis au niveau des régions intergéniques, tandis que les autres se retrouvent au niveau des régions codantes pour les ARN ribosomaux (Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005). Dans l'ensemble, nos données et celles de la littérature renforcent l'idée que le RNAi pourrait exercer une fonction au niveau des rDNAs, qui n'est pas liée à la déposition de la marque répressive H3K9me<sub>2</sub>. Cette fonction pourrait être de favoriser la progression des fourches de réplication. Nous reviendrons sur cet aspect dans les sections suivantes. Il est à noter que la fonction associée à la présence des marques d'hétérochromatine reste encore un mystère à investiguer.

### **3.4 L'amplification de la production des siRNAs par Rdp1 ne semble pas être requise par le RNAi pour assurer sa fonction vis-à-vis de la stabilité des rDNAs**

L'ARN polymérase dépendante de l'ARN, Rdp1, exerce une fonction indispensable à la formation d'hétérochromatine au niveau des régions péri-centromériques (Hall *et al.*, *Science*, 2002 ; Volpe *et al.*, *Science*, 2002 ; Motamedi *et al.*, *Mol Cell*, 2008). Elle fait partie du complexe RDRC, qui est recruté par RITS sur ces régions. Rdp1 assure la synthèse d'un ARN double brin (dsRNA) en utilisant l'ARN plateforme comme matrice. Ce dsRNA sert de précurseur à la synthèse des siRNAs par Dcr1. La fonction de Rdp1 s'inscrit ainsi dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle positif. Elle aboutit à amplifier le recrutement siRNA-dépendent de RITS et à la propagation *in fine* des marques épigénétiques répressives. De part l'existence de voies parallèles RNAi-indépendantes qui y orchestrent également la formation d'hétérochromatine, la fonction de Rdp1 n'est pas primordiale au niveau des régions

subtélomériques et de la région du déterminisme sexuel (Hall *et al.*, *Science*, 2002 ; Volpe *et al.*, *Science*, 2002 ; Cam *et al.*, *Nat Gen*, 2005).

Nos analyses ont indiqué que Rdp1 n'était pas requise pour le maintien du contenu en rDNA. Ce résultat est concordant avec l'observation selon laquelle cette protéine ne semble pas se localiser de manière endogène au niveau des rDNAs (Cam *et al.*, *Nature*, 2005). Combinées avec les résultats concernant Clr4, nos données suggèrent que la préservation de la stabilité des rDNAs ne requièrent pas l'ensemble des facteurs du RNAi normalement nécessaires à sa fonction dans le *silencing* transcriptionnel. Il s'agit d'un processus RNAi-dépendant qui fonctionne différemment de celui impliqué dans la formation d'hétérochromatine.

Deux possibilités peuvent être envisagées afin d'expliquer l'absence de contraction des rDNAs chez le mutant *rdp1Δ* : (i) soit cette souche possède un niveau suffisant de siRNAs permettant au RNAi d'accomplir sa fonction moléculaire dans le maintien des unités ribosomales ; (ii) soit l'action du RNAi passe par la voie des priRNAs, dont la biogénèse ne requière pas Rdp1 (Halic et Moazed, *Cell*, 2010). Le séquençage des petits ARN associés aux protéines Ago1 dans un mutant *rdp1Δ*, indique qu'ils proviendraient en très grande majorité des rDNAs (Holoch *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Cela vient en appui de la seconde hypothèse et renforce l'intérêt de tester l'implication de la nucléase Triman dans la maintenance du nombre d'unités de rDNAs.

Par ailleurs, l'absence d'impact de Rdp1, fait écho à des données générées chez les plantes, en lien avec la réparation d'une DSB expérimentalement induite. Il a en effet été observé que la délétion de RDR2 ou RDR6 (homologues de Rdp1 chez *A. thaliana*) provoquait la diminution de la production des diRNAs mais n'avait pas d'effet sur l'efficacité de réparation de la DSB (Wei *et al.*, *Cell*, 2012). S'il n'est pas exclu que ce constat soit attribué à la redondance fonctionnelle entre RDR2 et RDR6, il n'en est pas de même chez *S. pombe* car aucune d'autre ARN polymérase dépendante de l'ARN n'a été identifiée dans ce modèle. De plus, il a été proposé chez *S. pombe*, que l'implication d'Ago1 et Dcr1 dans la régulation du passage en mitose, se ferait dans une voie indépendante de Rdp1. Les phénotypes associés à la dérégulation de ce processus ont en effet été observés chez les mutants *ago1Δ* et *dcr1Δ* mais pas chez le mutant *rdp1Δ* (Carmichael *et al.*, *MBC*, 2004). Cela incite d'autant plus à tester l'hypothèse selon laquelle Rdp1 (contrairement à Ago1 et Dcr1) ne serait pas requis pour favoriser la reprise de la réplication de l'ADN, après synchronisation des cellules en début de phase S par traitement au HU. L'ensemble de ces données, combinées à nos résultats appuient

l'idée que le mode d'action du RNAi pour favoriser les processus de stabilité du génome est différent de celui aboutissant à la formation d'hétérochromatine.

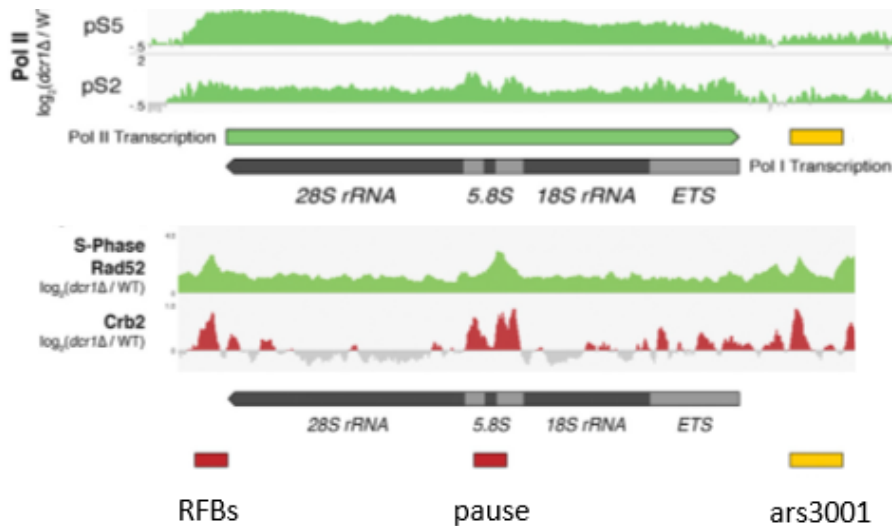
Nous émettons l'hypothèse que l'amplification de la production des petits ARN ne constitue pas un élément important pour permettre au RNAi d'exercer sa(s) fonction(s) moléculaire(s) dans les processus plus directs de maintien de la stabilité génomique. Cette amplification serait requise pour faciliter la fonction du RNAi dans certaines conditions spatiotemporelles. Ainsi, s'agissant de la formation d'hétérochromatine RNAi-dépendante au niveau des régions péri-centromériques, l'implication de Rdp1 est nécessaire car la marque H3K9me<sub>2</sub> doit être déposée et maintenue sur plusieurs milliers de bases. En revanche, l'implication de Rdp1 ne serait pas nécessaire dans le cadre de la régulation du checkpoint cellulaire ou dans les processus de réparation, car il s'agit de phénomènes rapides et/ou ciblant une région plus petite du génome. Cette hypothèse pourrait être éprouvée en testant l'implication ou non de Rdp1 dans le redémarrage d'une fourche bloquée dans le système *RTSI* (voir les sections ultérieures concernant ce système), dont la durée du processus a été estimée à environ 20 minutes (Ait-Saada *et al.*, *Mol Cell*, 2017).

### **3.5 Le RNAi participe à préserver le contenu en rDNA en favorisant la progression des fourches de réplication à l'échelle de l'unité ribosomale**

L'occurrence d'un stress répliatif se traduit par le ralentissement ou le blocage de la progression des fourches de réplication. Les fourches bloquées représentent une menace pour l'intégrité du génome, si elles ne sont pas rapidement redémarrées. L'ADN simple brin présent à leur niveau est en effet, vulnérable aux processus de recombinaisons inappropriées et aux cassures pouvant générer des réarrangements chromosomiques. Un stress répliatif peut être causé par différentes sources d'obstacles.

L'étude de Castel *et al.*, suggère qu'en absence de Dcr1, le locus des rDNAs serait plus sujet à un stress répliatif lié à des collisions entre le réplisome et la RNA Pol II. Ces conflits auraient lieu plus précisément au niveau des régions codantes pour les ARN ribosomiaux (**Figure 52**). Comme l'accumulation de RNA Pol II n'a pas été observée chez un mutant *ago1Δ*, il semblerait que ces conflits n'auraient pas lieu ou ne nécessiterait pas l'implication d'Ago1 pour leur résolution. Le phénotype de contraction des rDNAs, observé entre autres chez le

mutant *ago1Δ*, suggère cependant la présence de stress réplcatif qui ne serait pas forcément lié à la RNA Pol II. Nos analyses des intermédiaires de réplication à l'échelle de l'unité ribosomale apportent des éléments de réponse.



**Figure 52: Profils de distribution de diverses protéines au niveau de l'unité ribosomale, analysés chez le mutant *dcr1Δ* dans les travaux publiés de Castel *et al.*, *Cell*, 2014**

Profils d'accumulation de la forme en pause (pS5) ou en cours d'élongation (pS2) de la RNA Pol II, de Rad52 et de Crb2, chez le mutant *dcr1Δ* relativement à la condition *WT*. Les rectangles jaunes représentent l'origine de réplication *ars3001*. Les rectangles rouges représentent respectivement les barrières programmées de la réplication (RFBs) et un site de pause identifié par Castel *et al* au niveau de la séquence codante pour l'ARN 5.8. Les flèches indiquent la direction de la transcription assurée par la RNA Pol II (vert) ou Pol I (gris). Images issues de la publication de Castel *et al.*, *Cell*, 2014.

### 3.6 RITS et Dcr1 sont impliqués dans la progression des fourches à proximité de l'origine de réplication de l'unité ribosomale

Nous avons observé l'accumulation d'intermédiaires de réplication au niveau d'une région comprenant l'origine de réplication, chez les mutants *dcr1Δ*, *ago1Δ* et *tas3Δ*, en comparaison à une souche *WT*. Ce profil est indicatif de la présence de fourches arrêtées au niveau cette région, chez les mutants du RNAi. Il corrèle avec l'accumulation de Crb2 et Rad52 au niveau de l'origine de réplication, qui a également été rapportée chez le mutant *dcr1Δ* (Figure 52, Castel *et al.*, *Cell*, 2014). Ces deux protéines sont respectivement impliquées dans

la signalisation et la prise en charge des fourches bloquées. Nos observations suggèrent qu'à la fois Dcr1 et RITS favorisent la progression des fourches de réplication au niveau d'un segment intergénique comprenant l'origine de réplication. Nous gardons à l'esprit que les protéines Tas3 et Chp1 peuvent former un complexe distinct du complexe RITS. Il faudrait donc déterminer si le mutant *chp1Δ* phénotype les mutants du RNAi testés afin de renforcer notre conclusion concernant l'implication de RITS. La source à l'origine du stress réplicatif au niveau de cette région n'est pas encore connue mais il semblerait qu'elle ne soit pas liée à des problèmes de conflits avec la RNA Pol II. En effet, il n'a pas été observé de fort enrichissement de la RNA Pol II au niveau de l'origine de réplication par rapport aux régions codantes (**Figure 52**, Castel *et al.*, *Cell*, 2014).

L'implication du RNAi dans la progression des fourches de réplication au niveau de l'origine peut expliquer en partie le phénotype de contraction des rDNAs observé chez les mutants. La fonction moléculaire précise du RNAi nécessite encore des investigations. Il est possible que le RNAi intervienne pour retirer l'obstacle à l'origine de l'arrêt des fourches. Cette option rappellerait la fonction proposée du RNAi dans la résolution des conflits entre les machineries de transcription et de réplication (Zaratiegui *et al.*, *Nature*, 2011 ; Castel *et al.*, *Cell*, 2014). On peut également imaginer que le RNAi participe à la prise en charge des fourches bloquées, soit en permettant leur stabilisation ou bien en intervenant dans les processus de redémarrage. Afin d'explorer cette option, il serait par exemple intéressant : (i) d'analyser l'effet de doubles mutants RNAi/Mrc1 et RNAi/Rad52 sur la contraction des rDNAs ; (ii) de comparer la localisation de RITS et Rad52 au niveau des rDNAs. Il faudrait aussi déterminer si les activités *slicing* et *dicing*, détenues respectivement par Ago1 et Dcr1, sont également requises pour favoriser la progression de la réplication.

### **3.7 RITS et Dcr1 ne sont pas impliqués dans l'efficacité de blocage des barrières programmées des rDNAs**

Nous avons également analysé le profil des intermédiaires de réplication au niveau d'une région intergénique comprenant les RFBs programmées. Ces barrières ont pour but de bloquer la progression des fourches de réplication qui se dirigent de manière frontale à la transcription du précurseur des ARN ribosomiaux effectuée par la RNA Pol I. Elles permettent donc de limiter les collisions entre les machineries de réplication et de transcription

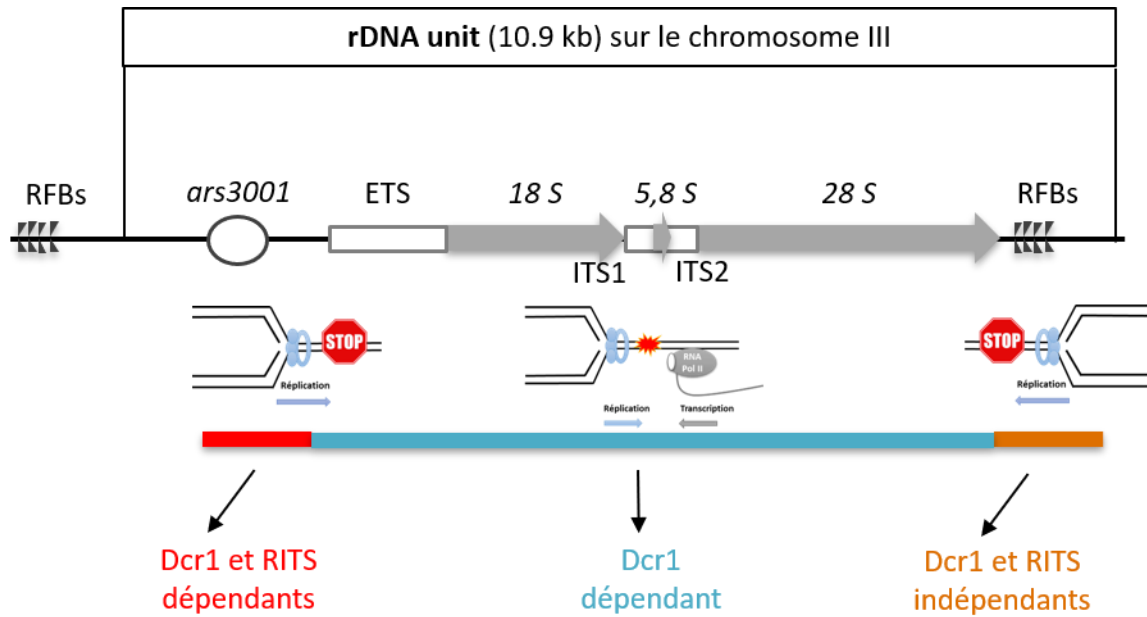
convergentes, et ainsi de promouvoir la co-directionnalité de ces processus. Chez *S. pombe*, les sites d'arrêt sont au nombre de quatre (*RFB1-4*). L'activité de blocage de la réplication au niveau du site *RFB1* et des sites *RFB2-3* est principalement et respectivement due à la fixation de Sap1 et Reb1 (Krings et Bastia, *JBC*, 2005 ; Sanchez-Gorostiaga *et al.*, *MCB*, 2004). *RFB4* est la plus faible des barrières et les facteurs protéiques impliqués dans son activité ne sont pas encore connus. Dans le cadre de nos analyses, nous avons révélé les intermédiaires de réplication en utilisant la même sonde qu'une précédente étude (Coulon *et al.*, *Mol Bio Cell*, 2006). Nous avons également observé que l'arrêt des fourches au site *RFB4* se distingue très faiblement par rapport aux autres sites.

Nous n'avons pas observé de différence dans l'intensité des signaux correspondants aux RFBs entre les conditions WT et les mutants *dcr1Δ*, *ago1Δ* et *tas3Δ*. Nous n'avons pas non plus observé de site de pause supplémentaire chez les mutants du RNAi analysés. Ces données suggèrent que le segment intergénique comprenant les barrières programmées ne semble pas sujet à un stress répliatif supplémentaire en absence du RNAi. Le RNAi ne semble pas participer à la gestion des blocages de fourche au niveau des RFBs programmées. L'instabilité des rDNAs observée dans ces mutants du RNAi ne semble donc pas due à une perte d'efficacité des barrières programmées qui favoriserait les collisions entre le réplisome et la RNA Pol I. Cette absence d'effet est surprenante au vu de certains résultats préliminaires que nous avons obtenus (et non présentés dans cette étude) ou qui ont été publiés dans d'autres études Cam *et al.*, *Nature*, 2005 ; Roche *et al.*, *Science*, 2016). Nous avons en effet mis en évidence : (i) une interaction physique entre Ago1 et Reb1 en utilisant l'approche *in vitro* de GST pull-down ; (ii) une épistasie de *reb1Δ* sur les mutants du RNAi en étudiant la survie cellulaire sur un milieu contenant un agent génotoxique. Une étude a également rapporté un défaut de viabilité plus prononcé des doubles mutant *dcr1Δreb1Δ* par rapport aux simples mutants respectifs en phase végétative (Roche *et al.*, *Science*, 2016). D'autre part, la présence de siRNAs associés à RITS a été rapporté comme dérivant de la région intergénique entre les RFBs et la séquence codante pour l'ARN 28S (Cam *et al.*, *Nature*, 2005). Il serait intéressant de déterminer si l'absence d'implication du RNAi dans la progression des fourches de réplication au niveau des RFBs programmées se traduit par une absence d'interaction génétique avec Reb1 en analysant le contenu en rDNA.

### **3.8 Régionalisation de l'implication du RNAi à l'échelle de l'unité ribosomale**

De par sa nature hautement répétitive, le locus des rDNAs est une région instable et difficile à répliquer. Les barrières de réplication présentes au niveau de chaque unité ribosomale constituent un challenge connu pour la progression de la fourche de réplication. D'après l'étude de Castel *et al.*, l'avancée de la fourche de réplication au niveau de région codante pour les ARN ribosomaux peut également être éprouvée par l'activité transcriptionnelle de la RNA Pol II, qui progresse de façon convergente. Notre étude a révélé qu'une portion de la région intergénique comprenant l'origine de réplication, représente aussi une zone où la progression de la réplication peut être mise à mal (**Figure 53**). Ces deux dernières régions ont été mises en évidence chez des mutants du RNAi. Le stress réplcatif existant à leur niveau peut expliquer le phénotype de contraction des rDNAs observé chez certains mutant du RNAi.

Nos données, combinées à celles de la littérature révèle une régionalisation de l'implication des facteurs du RNAi dans la progression des fourches au niveau de l'unité ribosomale (**Figure 53**). Au niveau des régions codantes pour les ARN ribosomaux (incluant également l'ETS), seulement Dcr1 serait impliquée dans la résolution des conflits entre le réplisome et la RNA Pol II (Castel *et al.*, *Cell*, 2014). La protéine concourrait à favoriser l'éviction de la RNA Pol II, selon une fonction moléculaire qui n'impliquerait pas son activité catalytique *dicing*. Notre étude suggère deux éléments. Premièrement, Dcr1 et RITS favoriseraient la progression des fourches à proximité de l'origine de réplication, en exerçant une fonction encore indéterminée. Deuxièmement, ces facteurs ne seraient pas impliqués dans la prise en charge des fourches arrêtées au niveau des RFBs programmées.



**Figure 53: Implication des facteurs du RNAi dans la progression des fourches de réplication au niveau de l'unité ribosomale**

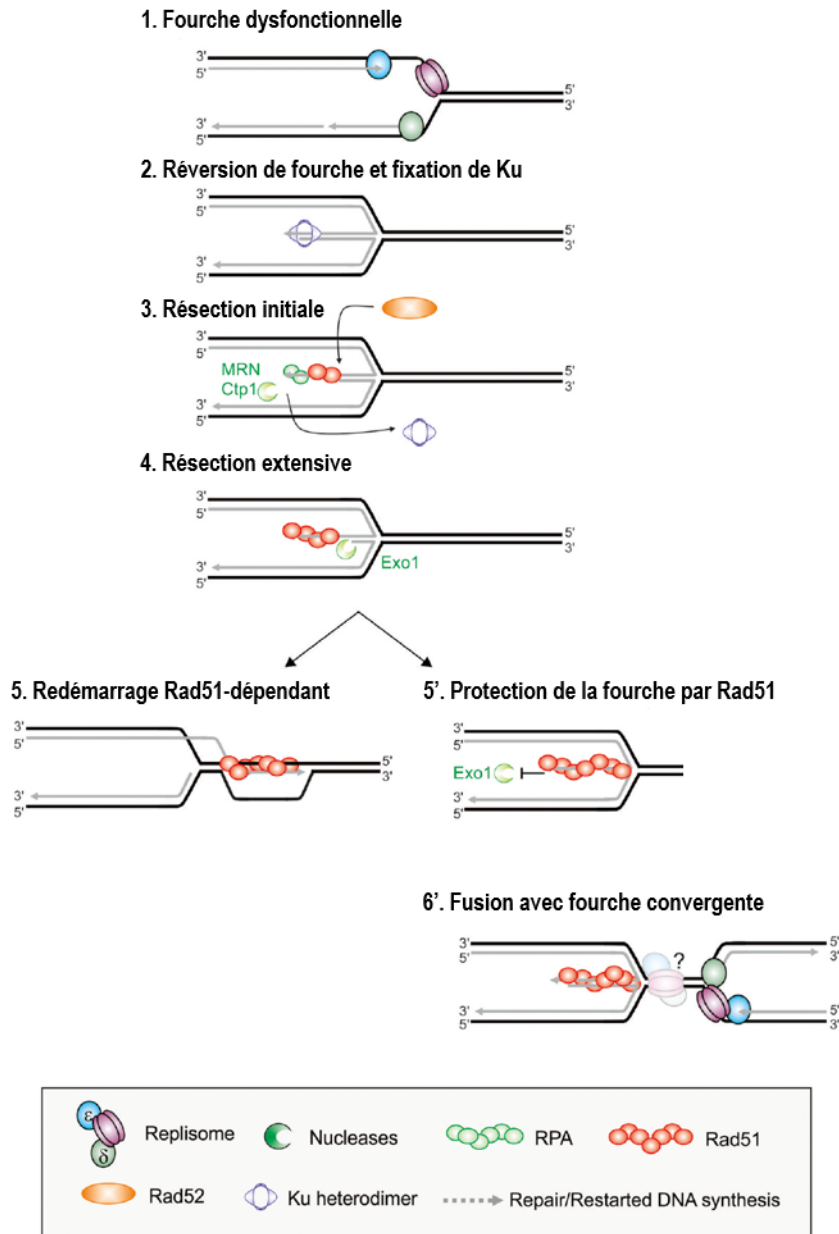
D'après les travaux de Castel et al., seulement Dcr1 serait impliqué dans la résolution des conflits entre les machineries de réplication et de transcription par la RNA Pol II. Notre étude suggère que Dcr1 et RITS favoriseraient la progression des fourches de réplication au niveau de l'origine de réplication. Elle suggère également que ces facteurs du RNAi ne seraient pas impliqués dans le blocage des fourches au niveau des barrières programmées (RFBs). ETS /ITS : *External/Internal transcribed spacer*.



## 4 Le RNAi promeut le redémarrage par HR d'une fourche bloquée

### 4.1 RITS et Dcr1 participeraient à la régulation du processus de résection

L'exploitation de la barrière *RTSI*, existante au niveau de la région du déterminisme sexuel, nous a permis de mieux explorer la fonction de Dcr1, Ago1 et Tas3, dans la prise en charge d'une fourche de réplication bloquée. Cette barrière a été insérée au niveau d'un gène rapporteur et en dehors de son locus endogène dans le but de permettre le blocage conditionnel d'une fourche de réplication dans une cellule donnée. L'activité de blocage est principalement due à l'interaction spécifique de Rtf1 sur la séquence *RTSI*. Le redémarrage de la fourche de réplication s'opère par recombinaison homologue et indépendamment de la formation d'une DSB (Figure 3). Ce mécanisme débute vraisemblablement par une réversion de fourche permettant de fournir un point d'entrée aux nucléases responsables de la résection. Il s'en suit une résection initiée au niveau du brin retardé et se déroulant en deux étapes coordonnées par l'hétérodimère Ku70/Ku80 (Silva *et al.*, *Nat Com*, 2017) : i) une dégradation limitée de 100 à 150 bp effectuée par le complexe MRN et Ctp1, puis ii) une dégradation extensive s'étendant sur environ 1kb et accomplie par Exo1. Ce redémarrage est dépendant de facteurs de recombinaison, notamment Rad51 et Rad52, qui vont promouvoir l'invasion du ssDNA qui servira de matrice (Lambert *et al.*, *Cell*, 2005 ; Mizuno *et al.*, *Genes Dev*, 2009 ; Lambert *et al.*, *Mol Cell*, 2010 ; Iraqui *et al.*, *Plos Genet*, 2012). Une fois réactivée, la réplication se fait de manière semi-conservative, impliquant la synthèse des brins précoce et retardé par la DNA Pol  $\delta$  (Miyabe *et al.*, *Nat Struct Mol Bio*, 2015). Rad51 exerce également une fonction de protection de la fourche qui est indépendante de sa fonction dans le redémarrage. Cette protéine permet de protéger le simple brin d'ADN contre la résection extensive par Exo1 (**Figure 54**), maintenant ainsi la fourche dans une configuration favorable pour la fusion avec une fourche convergente. Cette option dépend du timing d'arrivée de la fourche convergente. Dans le cas du système *RTSI*, les origines de réplication pouvant générer une fourche convergente, sont très éloignées du site de blocage. Le redémarrage par la recombinaison homologue est ainsi l'option favorisée.



**Figure 54: Modèle de redémarrage par recombinaison homologue d'une fourche arrêtée**

Suite à son blocage (1), la fourche de réplication subit un processus de réversion qui fournit un extrémité double brin, propice à la fixation de l'hétérodimère Ku70/Ku80 (2). Ce facteur orchestre le déroulement de la résection en deux étapes : une dégradation initiale, effectuée par Ctp1 et le complexe MRN (3), suivie d'une dégradation extensive réalisée par exo1 (4). L'ADN simple brin généré est protégé par RPA, avant de former un nucléo-filament avec Rad51 (4). Il s'en suit deux options possibles : soit le nucléo-filament envahit le duplex en amont de la fourche aboutissant *in fine* à la réactivation de la réplication (5) ; soit la fourche est protégée par Rad51 (5') et maintenue dans une conformation propice à la fusion avec une fourche convergente (6'). Image modifiée de Ait-Saada *et al.*, *DNA Repair*, 2018.

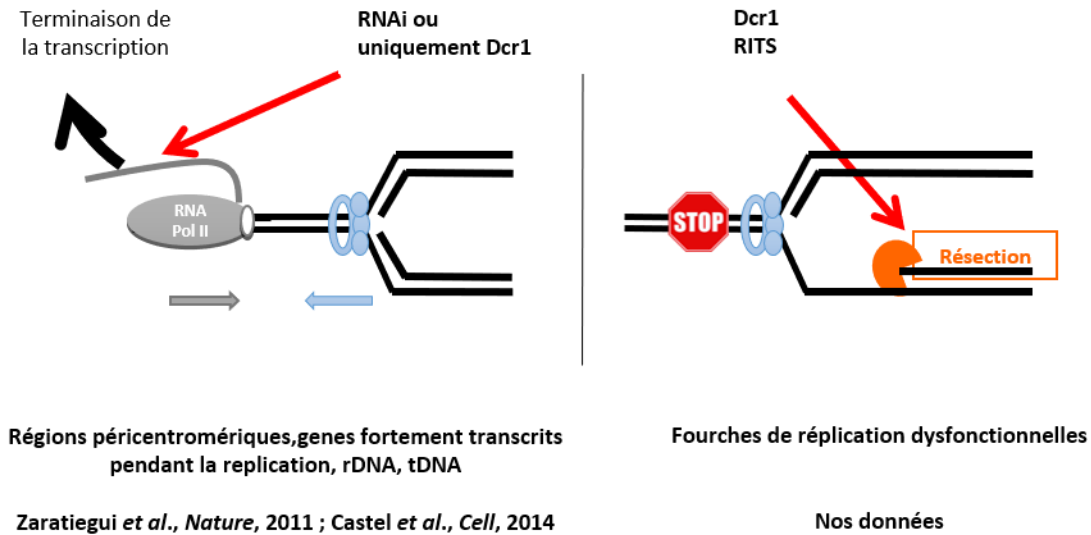
Nos travaux mettent en évidence, pour la première fois, l'implication du RNAi dans le processus de recombinaison homologue permettant le redémarrage d'une fourche de réplication bloquée (**Figure 55**). Les résultats des essais génétiques exploitant le phénomène de glissement de polymérase, suggèrent une diminution de l'efficacité de redémarrage de la fourche bloquée chez les mutants *dcr1Δ*, *ago1Δ* et *tas3Δ*. Cette diminution n'est cependant, pas aussi drastique que celle qui a été rapportée chez les mutants *rad51Δ* et *rad52Δ* (Iraqi *et al.*, *Plos Genet*, 2012 ; Silva *et al.*, *Nat Com*, 2017), ce qui suggère que le RNAi joue un rôle facilitateur mais non essentiel dans le redémarrage de la fourche. Le système de blocage *RTSI* a été inséré en dehors de la région des rDNAs. Cela indique donc que le rôle du RNAi dans la promotion de la progression des fourches de réplication ne s'applique pas uniquement à cette région mais peut être généralisé à l'ensemble du génome. De plus, l'activité de barrière *RTSI* est due à la fixation spécifique d'une protéine sur la séquence *RTSI*. Elle ne met pas en jeu de RNA polymérase. Ceci renforce l'idée que le rôle du RNAi ne se limiterait pas à la résolution des conflits entre les machineries de réplication et de transcription, mais pourrait intervenir dans la gestion de l'ensemble des fourches de réplication bloquées (Figure 4). Autre remarque, les mutants du RNAi testés dans cette étude n'ont pas d'impact sur l'efficacité de blocage de la barrière programmable *RTSI*. En ce sens, cela rejoint l'absence d'effet de ces mêmes mutants, constatée sur l'efficacité du blocage de la réplication par les barrières programmées au niveau des rDNAs.

Les résultats des essais génétiques indiquent également que l'étape de résection est affectée chez l'ensemble des mutants testés. Ils suggèrent que le RNAi promeut l'efficacité de la résection (**Figure 55**). Une conclusion opposée avait été avancée dans le cadre d'une étude portant sur le rôle de la voie des diRNAs dans la réparation de DSBs généralisées dans un modèle de lignée humaine (Gao *et al.*, *Cell Res*, 2014). Cette étude n'impliquait ni Ago2, ni Dicer dans le processus de résection, car leur déplétion respective n'avait pas d'impact sur le nombre foci de RPA ou Mre11 par cellule, après traitement à la camptothécine (agent inducteur de DSBs). La possibilité que le RNAi influe le processus de résection au niveau d'une fourche bloquée mais pas au niveau d'une DSB, ne peut pas être exclue. En revanche dans cette étude, le recrutement plus direct de RPA et Mre11 au niveau d'un site de cassure n'a pas été analysé. La formation de foci ne reflète pas directement un processus de recrutement, d'autant plus si ce dernier n'est que temporaire. L'avantage du test que nous avons employé est qu'il est plus ciblé car il permet de suivre un événement causé par le redémarrage *via* HR d'une fourche bloquée.

De façon intéressante, l'essai génétique, combiné à l'analyse des intermédiaires de réplication, ont mis en évidence un phénotype de résection antagoniste entre les mutants du

RNAi. Par rapport à la condition *WT*, la dégradation semble être plus extensive chez la souche *dcr1Δ* (phénotype d'hyper-résection), mais au contraire plus limitée chez les souches *ago1Δ* et *tas3Δ* (phénotypes d'hypo-résection). Nos résultats suggèrent donc qu'Ago1, Tas3 et Dcr1 régulent l'étape de résection en exerçant un effet antagoniste sur ce processus : Dcr1 semble limiter la résection tandis qu'Ago1 et Tas3 (et potentiellement RITS) semblent la favoriser (Figure 4). La souche *chp1Δ* doit être testée en vue de savoir si elle phénocopie le défaut de résection observé chez les mutants *ago1Δ* et *tas3Δ*. Nos analyses laissent à penser que c'est l'étendue de la résection qui est différenciellement affectée chez les mutants. Afin de s'assurer de ce point, il faudrait analyser l'enrichissement en ssDNA et le recrutement de RPA (qui reconnaît le ssDNA) au niveau de la barrière *RTS1* chez les mutants du RNAi. Il faudrait également confirmer l'effet différentiel de RITS et Dcr1 sur la résection en utilisant d'autres systèmes rapporteurs. Nous pourrions par exemple utiliser le système de réparation d'une cassure double brin par la recombinaison de type *Single-Strand Annealing*, développé par Wason *et al.*, et qui implique également une étape de résection (Wason *et al.*, *Gene*, 2011).

Nos travaux soulèvent plusieurs interrogations. La première d'entre elles est de déterminer à quel niveau Dcr1 et RITS agissent l'un vis-à-vis de l'autre. L'analyse du phénotype de résection du double mutant *ago1Δdcr1Δ* pourra apporter des éléments de réponse. Nous pourrions également tester si la surexpression d'Ago1 permet de sauver le phénotype d'hyper-résection observé chez *dcr1Δ* et inversement. La deuxième question est de déterminer si le RNAi agit sur l'étape initiale ou extensive de la résection. Nous envisageons pour cela, de déterminer s'il existe des interactions génétiques entre RITS/Dcr1 et les nucléases responsables de la résection, ainsi que l'hétérodimère Ku70/Ku80. Une autre perspective est d'évaluer l'implication du versant enzymatique du RNAi sur le processus de résection. Il s'agit précisément d'analyser l'effet de l'absence de Rdp1 et des chaperonnes Arb1 et Arb2, ainsi que la perte des activités *slicing* d'Ago1 et *dicing* de Dcr1 sur l'efficacité de redémarrage et l'activité de résection. Enfin, il faudrait investiguer le recrutement de RITS et Dcr1 à la barrière *RTS1*, afin de déterminer si l'effet du RNAi est direct.



**Figure 55: Modèle proposé pour expliquer l'implication du RNAi dans la gestion des fourches de réplication arrêtées chez *S. pombe***

Le modèle actuel suggère que le RNAi est impliqué dans la résolution des conflits entre les machineries de réplication et de transcription. Il promouvoirait la terminaison de la transcription. Seulement Dcr1 serait impliquée dans cette fonction au niveau des gènes fortement transcrits pendant la réplication, la région des rDNA, et des tDNA. Nos données obtenues grâce à l'exploitation de la barrière RTS1 suggèrent : (1) RITS et Dcr1 sont impliqués la gestion des fourches de réplication arrêtées ; (2) leur rôle ne se limite pas à la résolution des conflits entre les machineries de réplication et de transcription ; (3) RITS et Dcr1 favorise le redémarrage par recombinaison homologue de la fourche de réplication ; (4) Il participerait probablement à la régulation de l'étape de résection.

## 4.2 La fonction moléculaire du RNAi dans le redémarrage de la fourche ne semble pas être liée à la formation d'hétérochromatine

La barrière RTS1 a été insérée au locus du gène *ura4*, qui n'est pas connu pour subir un silencing de type transcriptionnel. Nos résultats préliminaires indiquent une absence de marque d'hétérochromatine H3K9me<sub>2</sub> au niveau de la barrière dans différentes fonds génétiques *WT*. De plus, la déposition de marque d'hétérochromatine n'a pas été observée suite à l'activation du blocage dans une souche *WT*. Ces données, qui doivent être reproduites, suggèrent que l'implication du RNAi dans le redémarrage de la fourche bloquée, ne serait pas associée à la formation d'hétérochromatine. Elles pourraient être confirmées en vérifiant l'absence d'impact de la délétion de *Clr4* sur l'efficacité de redémarrage. Une étude portant sur le rôle de la voie

des diRNAs dans la réparation d'une DSB expérimentalement induite chez un modèle de plantes, fait écho à ces données préliminaires. Dans ce modèle, la voie des siRNAs permet d'induire la méthylation de novo des cytosines (voie RdDM). Il a été observé que la délétion des méthyltransférases DRM1 ou DRM2 n'affectait pas l'efficacité de réparation de la cassure (Wei *et al.*, *Cell*, 2012). Il avait alors été suggéré que l'implication de la voie des diRNAs dans la réparation de la DSB ne se faisait pas *via* l'induction d'un processus de *silencing* transcriptionnel tel que la méthylation de l'ADN.

### 4.3 La RNA Pol II pourrait être impliquée dans le redémarrage de la fourche bloquée

Des études précédentes menées chez *S. pombe* et chez des modèles mammifères ont rapporté que la RNA Pol II est recrutée au niveau du site d'une cassure expérimentalement induite (Ohle *et al.*, *Cell*, 2016 ; Michelini *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2017). Il a été fait l'hypothèse que la RNA Pol II pourrait être impliquée dans la réparation de la DSB.

Nous avons également analysé la présence de la RNA Pol II au niveau du système *RTSI* chez le WT et les mutants *ago1Δ* et *dcr1Δ*. Nous avons observé qu'au niveau de sites situés en aval de la séquence *RTSI*, son enrichissement n'était pas impacté par l'état d'activation de la barrière dans l'ensemble des fonds génétique testés. En revanche, nous avons observé, uniquement chez le mutant *dcr1Δ*, un enrichissement plus important de la RNA Pol II sur un site situé en amont de la séquence *RTSI* et suite à l'activation de la barrière. La particularité du site en question est qu'il est situé là où le processus de résection se produit. De plus, les souches *ago1Δ* et *dcr1Δ* présentent de nouveau un phénotype différent. Ces observations soulèvent la question de savoir si la présence de la RNA Pol II sur le système de blocage *RTSI* est corrélée à l'étendue du processus de résection. Cela peut être testé en comparant les profils de distribution de la RNA Pol II et du complexe RPA qui reconnaît le ssDNA généré suite à l'étape de résection. Par ailleurs, l'étude de l'enrichissement de la RNA Pol II doit être reproduite en augmentant le nombre de sites analysés en amont et en aval de la barrière. Il faudrait également intégrer des souches contrôles connues pour présenter un phénotype d'hypo-résection comme *exo1Δ* ou d'hyper-résection comme *rad3Δ* et *rad52Δ*. (Iraqi *et al.*, *Plos Genet*, 2012 ; Ait-Saada *et al.*, *Mol Cell*, 2017 ; Silva *et al.*, *Nat Com*, 2017 ; Tsang *et al.*, *J Cell Sci*, 2014).

L'augmentation de l'enrichissement de la RNA Pol II observée chez le mutant *dcr1Δ* est reproductible mais reste néanmoins modérée par rapport au niveau du bruit de fond. En partant de l'hypothèse que le recrutement de la RNA Pol II est associé au processus de résection, nous pouvons avancer trois arguments expliquant ce faible enrichissement. Premièrement, nous avons analysé une population de cellules asynchrones en croissance logarithmique et dont la vaste majorité (70%) est en phase G2. Or, le blocage de la fourche de réplication a lieu pendant la phase S et ne concerne donc qu'une faible portion des cellules. Deuxièmement, le redémarrage par la HR survient dans les 20 minutes qui suivent le blocage de la fourche de réplication. Ce temps est très court et rend difficile l'appréciation d'un recrutement potentiellement dynamique d'une protéine donnée. Troisièmement, l'analyse et la quantification des intermédiaires de réplication (Cf. chapitre 2 des résultats, **Figure 49E**) montrent que les fourches expérimentant le processus de résection et potentiellement concernées par le recrutement de la RNA Pol II, ne représentent qu'une sous-population des fourches bloquées. La synchronisation des cellules en phase S pourrait permettre d'augmenter le niveau de cellules expérimentant le blocage de la fourche au niveau du système *RTS1* à un temps donné, et donc probablement d'améliorer le niveau d'enrichissement de la RNA Pol II. Un traitement des cellules à l'hydroxyurée risquerait de perturber le blocage conditionnel de la fourche par *Rtf1* car cette drogue provoque le ralentissement de l'ensemble des fourches de réplication. Il faudrait plutôt recourir à des fonds génétiques permettant la synchronisation thermosensible de toutes les cellules en début de phase S.

Nos résultats préliminaires incitent à poursuivre les investigations afin de déterminer si la RNA Pol II est impliquée dans la réparation de la fourche bloquée. Une étude menée chez les mammifères a indiqué que l'inhibition de l'activité de la RNA Pol II affectait la formation des foci composés des facteurs de reconnaissance des DSBs (Michelini *et al.*, *Nat Cell Bio*, 2017). Dans le même ordre d'idées, nous pourrions tester l'hypothèse que l'activité transcriptionnelle de la RNA Pol II est requise pour l'efficacité du redémarrage dans le système *RTS1*. De plus, il faudrait vérifier si la présence de la RNA Pol II s'accompagne de la biogénèse d'un ARN au niveau de la barrière. Il serait également intéressant d'analyser, de manière discriminée, l'enrichissement de la RNA Pol II en pause ou en cours d'élongation.

Plusieurs théories peuvent être faites si la présence d'un transcrit RNA Pol II au niveau de la barrière se confirme. Nos données indiquent que *Dcr1* et potentiellement *RITS* sont impliqués dans la reprise de la réplication. On peut donc imaginer, qu'à l'instar de la formation d'hétérochromatine RNAi-dépendante, un ARN servant de plateforme de recrutement soit



produit. Cependant, nous avons constaté que la RNA Pol II semble différentiellement enrichie en amont de la séquence *RTS1* et en condition de barrière active, entre les mutants *ago1Δ* et *dcrl1Δ*. Cela suggère que la présence de la RNA Pol II sur le système *RTS1* ne serait pas opportuniste mais potentiellement régulée par ces facteurs. Des études supplémentaires sont nécessaires pour approfondir ce point. D'autre part, cette observation pousse à investiguer si la RNA Pol II est impliquée plus précisément dans le processus de résection. Une étude récente chez *S. pombe* a d'ailleurs suggéré cette éventualité (Ohle *et al.*, *Cell*, 2016). Elle a mis en évidence le recrutement de la RNA Pol II de part et d'autre d'un site de DSB et l'implication possible d'hybrides ADN / ARN dans la régulation du processus de résection (Ohle *et al.*, *Cell*, 2016). L'activité transcriptionnelle de la RNA Pol II pourrait aboutir à la formation de ces hybrides et ainsi contribuer à réguler la résection.

#### **4.4 Perspective : le RNAi participerait-il au recrutement des facteurs impliqués dans le redémarrage des fourches de réplication arrêtées ?**

Nous avons identifiés par *GST pull-down*, des interactions physiques *in vitro* entre Ago1 et des éléments du réplisome (notamment Swi1, Mcm4) ou des facteurs impliqués dans la HR (Exo1 et Ssb1, sous-unité de RPA). Ces données soutiennent l'implication du RNAi dans les processus de réplication et de réparation des fourches arrêtées. Il faudra cependant vérifier si ces interactions physiques existent *in vivo* et si elles sont influencées ou régulées par l'induction d'un stress réplcatif. La principale question, est de déterminer si le RNAi influence le recrutement des facteurs de HR à la fourche bloquée. Pour cela, nous prévoyions d'analyser l'enrichissement sur la barrière *RTS1* des facteurs clés impliqués dans le redémarrage (RPA, MRN, Ku, Exo1, protéines Rad, etc) après l'induction du blocage chez les mutants du RNAi.

#### **4.5 Perspective : les hybrides ARN/ADN sont-ils impliqués dans le redémarrage d'une fourche bloquée et leur présence est-elle régulée par le RNAi ?**

La littérature est dense concernant le rôle des hybrides ARN/ADN en tant que facteurs de stress réplcatif (pour revue : Santos-Pereira et Aguilera, *Nat Rev Genet*, 2015). Des études



récentes laissent néanmoins à penser que ces hybrides pourraient également jouer un rôle dans les processus de réparation. Chez *S. pombe*, une étude a suggéré que ces hybrides pourraient participer à la régulation du processus de résection (Ohle *et al.*, *Cell*, 2016). Ils contrôleraient la vitesse et la distance de résection, et entreraient en compétition avec le complexe RPA pour la fixation sur le ssDNA. L'implication de ces hybrides reste encore débattue car leur accumulation n'a pas systématiquement été observée suite à l'induction d'une DSB dans différents systèmes rapporteurs (Zhao *et al.*, *EMBO Rep*, 2018). De plus, il a été montré que les mutants qui n'exprimaient plus les deux RNAses chargées de l'émination des ces hybrides, étaient faiblement sensibles à la présence de drogues génotoxiques induisant des DSBs multiples dans le génome (Zhao *et al.*, *EMBO Rep*, 2018). Cette observation suggère que les hybrides ARN/ADN ne seraient pas essentiels à l'efficacité de réparation de ce type de cassures.

Nos travaux, et en particulier nos résultats préliminaires traitant de l'enrichissement de la RNA Pol II sur le système *RTS1*, alimentent la perspective intéressante de déterminer si des hybrides ARN/ADN se forment au niveau de la fourche bloquée dans le système *RTS1*. Le ssDNA généré suite à la résection, pourrait en effet constituer une matrice plus accessible à l'activité de RNA Pol II permettant d'aboutir à leur formation. Il faudrait investiguer si leur présence potentielle nuit au redémarrage de la fourche ou au contraire la facilite en participant au processus de résection comme le suggère l'étude de Ohle *et al.* Ces aspects sont actuellement traités par nos collaborateurs (l'équipe du Dr LAMBERT). Quelque soit le type d'implication de ces hybrides ARN/ADN, il sera alors intéressant de considérer l'hypothèse que la fonction moléculaire du RNAi dans le redémarrage de la fourche est associée à la régulation de leur présence. Cette perspective est d'autant plus attrayante qu'une étude récente menée chez les mammifères a rapporté la présence DROSHA-dépendante d'hybrides ARN/ADN et leur implication dans l'efficacité de réparation d'une DSB par HR (Lu *et al.*, *Nat Com*, 2018).

#### **4.6 Perspective : le RNAi participerait-il à faciliter le remodelage de la chromatine au niveau de la barrière ?**

Le déroulement des processus de réplication et de réparation de l'ADN nécessite un accès dégagé à la double hélice. Cette condition est assurée par les facteurs de remodelage de la chromatine qui assurent le glissement ou l'éviction de nucléosomes à un locus donné. Fun30 (pour *Function Unknown Now 30*) est un facteur de remodelage de la chromatine appartenant

à la famille SNF2 ATPase. Fun30 chez *S. cerevisiae* et son homologue SMARCAD1 chez les mammifères sont impliquées directement dans la réparation des DSBs par HR (Chen *et al.*, *Nature*, 2012 ; Costelloe *et al.*, *Nature*, 2012 ; Eapen *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2012). Fun30 promeut la résection extensive par Exo1 et Sgs1 à travers un mécanisme direct et impliquant son activité ATPase. Il fragilise les interactions ADN-histones dans le nucléosome, augmentant ainsi l'accessibilité des nucléases à la chromatine (Costelloe *et al.*, *Nature*, 2012). Sa fonction ne passe ni par la régulation de la transcription des gènes impliqués dans ce processus, ni par le changement de la position des nucléosomes (Chen *et al.*, *Nature*, 2012 ; Costelloe *et al.*, *Nature*, 2012).

La levure *S. pombe* dispose de trois homologues de Fun30, à savoir Fft1, Fft2 et Fft3. Des travaux récents menés par nos collaborateurs ont identifié deux rôles découplés de Fft3 au niveau de la fourche bloquée dans le système RTS1 (Ait-Saada *et al.*, *Life Sci Alliance*, 2019). Premièrement, il est requis pour le redémarrage efficace de la fourche par la HR, et ce, indépendamment de son activité ATPase. Deuxièmement, il promeut la résection de la fourche (comme Ago1 et Tas3), selon un mode d'action impliquant son activité ATPase et donc probablement *via* sa fonction de remodelage des nucléosomes. Les autres homologues, Fft1 et Fft2, ne semblent pas impliqués dans ces processus.

Nous avons identifié Fft3 en tant que partenaire potentiel de Chp1 suite à la purification de cette dernière. Nous avons également mis en évidence une interaction physique *in vivo* avec Ago1. Sur la base de ces résultats préliminaires, Fft3 constitue un point d'entrée intéressant pour déterminer si le RNAi facilite le redémarrage de la fourche en participant à l'organisation de la chromatine. Il serait intéressant de caractériser plus en détail la connexion physique potentielle entre Fft3 et RITS et d'investiguer l'existence d'une synergie vis-à-vis du processus de résection.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

## *Conclusion Générale*

Les travaux décrits dans ce manuscrit permettent collectivement de mieux définir l'implication du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome. Cette implication s'est illustrée initialement par une connexion physique, que nous avons mis en évidence, entre RITS et différents facteurs impliqués dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la fonction du RNAi dans la stabilité des rDNAs. Nous montrons que le RNAi joue un rôle dans la maintenance des nombreuses copies de rDNAs, et prévient ainsi des réarrangements chromosomiques majeurs. Contrairement à ce qui aurait pu être interprété, ce rôle ne repose pas uniquement sur Dcr1, mais implique également le complexe RITS. En revanche, cette fonction ne requière pas certains facteurs du RNAi, normalement essentiels à la formation d'hétérochromatine RNAi-dépendante. D'autre part, nos données indiquent que le RNAi favoriserait la progression des fourches de réplication au niveau d'une région proche des origines de réplication.

L'exploitation d'un système de blocage conditionnel de fourches de réplication nous a également permis d'explorer l'implication du RNAi dans la prise en charge de ces fourches arrêtées. Nos données mettent en avant, pour la première fois, que le RNAi pourrait être requis pour faciliter le redémarrage de fourches de réplication en participant au processus de réparation par recombinaison homologue. Sa fonction pourrait être probablement liée à la régulation de l'étape de résection. De plus, cette fonction du RNAi ne serait pas cantonnée aux rDNAs mais pourrait s'exercer sur l'ensemble du génome. Enfin, nous avons obtenus des données préliminaires qui indiquent que l'ARN polymérase II pourrait contribuer au redémarrage des fourches de réplication bloquées.

Dans l'ensemble, nos travaux vont dans le sens d'une action directe du RNAi dans le maintien de la stabilité du génome. Ils mettent en relief, plus précisément, diverses connexions physiques confortant l'idée d'une interaction directe et étroite entre le RNAi et les processus de réplication et de réparation de l'ADN. Par ailleurs, nos résultats ont montré la contribution active du RNAi, et de son complexe RITS, dans la réponse cellulaire au stress réplicatif pouvant conduire à une instabilité du génome. Ces aspects ne sont que très peu explorés dans les études actuelles. Nos travaux démontrent ainsi l'importance du RNAi dans la résolution de blocages de fourche de réplication qui ne sont pas générés par des collisions entre la RNA polymérase et le réplisome. Ils ouvrent ainsi la voie à d'autres études qui pourront disséquer plus en détail l'implication du RNAi dans la prise en charge d'une fourche de réplication bloquée et son lien direct avec les processus de réplication et de réparation d'ADN.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

# 1 Matériel biologique et condition de culture

## 1.1 Souches utilisées lors de cette étude

Toutes les souches de levures utilisées dans le cadre de mon projet de thèse sont listées dans le Tableau 4. Elles ont été obtenues selon différentes modalités : i) suite à une transformation de souche de levure à l'acétate de lithium ii) suite à un croisement aléatoire entre deux souches de levures, iii) fournies par une autre équipe de recherche, iiiii) issues d'une banque commerciale.

	Identifiants des Souches	Genotype	Source		
GST Pull-down	SPV693	h90 leu1-32::nmt1-Rna14 -YFP-flag-his-leu1+	Banque commerciale (Matsuyama et al., Nat.Biotechnol., 2006)		
	SPV696	h90 leu1-32::nmt1-Ykr3/Ntr1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV705	h90 leu1-32::nmt1-Spt16-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV838	h90 leu1-32::nmt1-Hip1/Hir1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV642	h90 leu1-32::nmt1-Las1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV831	h90 leu1-32::nmt1-Sol1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV834	h90 leu1-32::nmt1-Chp1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV744	h90 leu1-32::nmt1-Tas3 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV587	h90 leu1-32::nmt1-Sds3-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV639	h90 leu1-32::nmt1-Ipi1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV649	h90 leu1-32::nmt1-Rad22 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV688	h90 leu1-32::nmt1-Rad4 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV737	h90 leu1-32::nmt1-Cdc10 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV769	h90 leu1-32::nmt1-Res2 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV810	h90 leu1-32::nmt1-Swc4 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV832	h90 leu1-32::nmt1-Prp1/Zer1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV837	h90 leu1-32::nmt1-Swi1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV865	h90 leu1-32::nmt1-Orc1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV618	h90 leu1-32::nmt1-Pdp1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV647	h90 leu1-32::nmt1-Set9 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV674	h90 leu1-32::nmt1-Dus3 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV730	h90 leu1-32::nmt1-Abp1/Cbp1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV670	h90 leu1-32::nmt1-Him1/Dfp1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV603	h90 leu1-32::nmt1-Ya36/Icp5-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV664	h90 leu1-32::nmt1-Cbh1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV580	h90 leu1-32::nmt1-Iec1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV563	h90 leu1-32::nmt1-Vps71-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV557	h90 leu1-32::nmt1-Pcr1/Mts2-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV847	h90 leu1-32::nmt1-Clr1 -YFP-flag-his-leu1+			
	SPV863	h90 leu1-32::nmt1-Exo1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV856	h90 leu1-32::nmt1-Rrp12-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV710	h90 leu1-32::nmt1-Smc5-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV777	h90 leu1-32::nmt1-Eso1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV796	h90 leu1-32::nmt1-Res1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV821	h90 leu1-32::nmt1-Ssb1/Rfa1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV724	h90 leu1-32::nmt1-Fib1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV782	h90 leu1-32::nmt1-Prr1-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV768	h90 leu1-32::nmt1-Utp4-YFP-flag-his-leu1+			
	SPV1356	h- leu1-32 ade 6-M210 ura4-D18 his 3-Dr chp1 :: 13myc - nat		Cette étude	
	Tests de viabilité + PFGE	SPV8		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+	Études ultérieures
		SPV873		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ chp1 :: hph	
		SPV874		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ chp1 :: hph	
		SPV875		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ chp1 :: hph	
		SPV885		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ dcr1 :: hph	
		SPV886		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ dcr1 :: hph	
		SPV887		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ dcr1 :: hph	
		SPV1733		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ clr4::nat	
SPV1734		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ clr4::nat			
SPV1735		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ clr4::nat			
SPV1886		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ ago1 :: HPH			
SPV1887		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ ago1 :: HPH			
SPV1888		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ ago1 :: HPH			
SPV2971		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ tas3 :: hph			
SPV2972		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ tas3 :: hph			
SPV2973		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ tas3 :: hph			
SPV1736		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ rdp1::nat			
SPV1737		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ rdp1::nat			
SPV1738		h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ Δ rdp1::nat			
SPV1939		h90 leu1-32 ade6-M216 ura4 :: fbp1-lacZ Δ ago1 :: HPH pREP P3 nmt1			
SPV1788		H90 leu1-32 ade6-M216 ura4::fbp1-lacZ Δ ago1 :: HPH +pREP-nmt1-FLAG-ago1			
SPV1794		H90 leu1-32 ade6-M216 ura4::fbp1-lacZ Δ ago1 :: HPH +pREP-nmt1-FLAG-ago1D580A			

## Matériel et méthodes

	Identifiants des Souches	Genotype	Source
Purification TAP	SPV13	h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ chp1::TAP-kan	Cette étude
	SPV4207	h90 leu1-32::nmt1-Rna14 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4223	h90 leu1-32::nmt1-Ykr3/Ntr1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2369	h90 leu1-32::nmt1-Spt16-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2372	h90 leu1-32::nmt1-Hip1/Hir1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2375	h90 leu1-32::nmt1-Las1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2378	h90 leu1-32::nmt1-Sol1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2435	h90 leu1-32::nmt1-Chp1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2451	h90 leu1-32::nmt1-Tas3 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2865	h90 leu1-32::nmt1-Sds3-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2867	h90 leu1-32::nmt1-Ipl1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2869	h90 leu1-32::nmt1-Rad22 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2871	h90 leu1-32::nmt1-Ipi3/Crb3 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2873	h90 leu1-32::nmt1-Rad4 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2894	h90 leu1-32::nmt1-Cdc10 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2897	h90 leu1-32::nmt1-Res2 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2881	h90 leu1-32::nmt1-Swc4 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2883	h90 leu1-32::nmt1-Prp1/Zer1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2885	h90 leu1-32::nmt1-Swi1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV2887	h90 leu1-32::nmt1-Orc1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4192	h90 leu1-32::nmt1-Pdp1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4195	h90 leu1-32::nmt1-Set9 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4198	h90 leu1-32::nmt1-Dus3 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4201	h90 leu1-32::nmt1-Abp1/Cbp1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4204	h90 leu1-32::nmt1-Him1/Dfp1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4208	h90 leu1-32::nmt1-Ya36/lcp5-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4211	h90 leu1-32::nmt1-Cbh1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4214	h90 leu1-32::nmt1-lec1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4217	h90 leu1-32::nmt1-Vps71-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4220	h90 leu1-32::nmt1-Pcr1/Mts2-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4227	h90 leu1-32::nmt1-Flp1/Clp1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4230	h90 leu1-32::nmt1-Exo1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4233	h90 leu1-32::nmt1-Sgo2-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4236	h90 leu1-32::nmt1-Rrp12-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4260	h90 leu1-32::nmt1-Smc5-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4263	h90 leu1-32::nmt1-Eso1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4266	h90 leu1-32::nmt1-Res1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV4269	h90 leu1-32::nmt1-Ssb1/Rfa1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-Tas3 -CFP-flag-his-Kan-his -	
	SPV3624	h90 leu1-32::nmt1-Ykr3/Ntr1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -	
	SPV3612	h90 leu1-32::nmt1-Spt16-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -	
SPV3615	h90 leu1-32::nmt1-Hip1/Hir1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3613	h90 leu1-32::nmt1-Sol1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3597	h90 leu1-32::nmt1-Tas3 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3609	h90 leu1-32::nmt1-Sds3-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3591	h90 leu1-32::nmt1-Rad22 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3594	h90 leu1-32::nmt1-Rad4 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3611	h90 leu1-32::nmt1-Cdc10 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3637	h90 leu1-32::nmt1-Res2 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3606	h90 leu1-32::nmt1-Prp1/Zer1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3614	h90 leu1-32::nmt1-Swi1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3616	h90 leu1-32::nmt1-Orc1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3628	h90 leu1-32::nmt1-Pdp1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3622	h90 leu1-32::nmt1-Set9 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3623	h90 leu1-32::nmt1-Dus3 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3610	h90 leu1-32::nmt1-Abp1/Cbp1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3636	h90 leu1-32::nmt1-Him1/Dfp1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3621	h90 leu1-32::nmt1-Ya36/lcp5-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4171	h90 leu1-32::nmt1-Cbh1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3620	h90 leu1-32::nmt1-lec1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4159	h90 leu1-32::nmt1-Vps71-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3625	h90 leu1-32::nmt1-Pcr1/Mts2-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3627	h90 leu1-32::nmt1-Clr1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4183	h90 leu1-32::nmt1-Flp1/Clp1 -YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4162	h90 leu1-32::nmt1-Exo1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3603	h90 leu1-32::nmt1-Sgo2-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4180	h90 leu1-32::nmt1-Rrp12-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4153	h90 leu1-32::nmt1-Smc5-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4156	h90 leu1-32::nmt1-Eso1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3635	h90 leu1-32::nmt1-Res1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3600	h90 leu1-32::nmt1-Ssb1/Rfa1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4174	h90 leu1-32::nmt1-Fib1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV4177	h90 leu1-32::nmt1-Prr1-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3626	h90 leu1-32::nmt1-Utp4-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mcherry-SPAC664.01c-Kan-his -		
SPV3595	h90 leu1-32::nmt1-Tas3-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mCherry-Swi6-Kan-his		
SPV3598	h90 leu1-32::nmt1-Tas3-YFP-flag-his-leu1+ his::nmt1-mCherry-Swi6-Kan-his		
SPV5390	h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ tas3::GFP-NAT swi6::mCherry-Kan		
SPV5391	h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ tas3::GFP-NAT swi6::mCherry-Kan		
SPV5392	h+ leu1-32 ori1 ade 6-216 ura4-D18 lmr :: ura4+ tas3::GFP-NAT swi6::mCherry-Kan		

Analyse de microscopie

Cette étude

	Identifiants des Souches	Genotype		
Test génétiques "slippage" et gels 2DGE	SPV4992	h- rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori	Equipe du Dr LAMBERT, Institut Curie	
	SPV4993	h+ rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV5016	h- rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV5017	h+ rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV5018	h- rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4994	h+ rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4962	h- ago1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4963	h+ ago1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV5036	h- ago1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV5037	h+ ago1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV4965	h- ago1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4966	h+ ago1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4988	h+ tas3::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV5041	h+ tas3::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV5042	h- tas3::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV4989	h+ tas3::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4990	h- tas3::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4967	h+ dcr1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV4969	h- dcr1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV5039	h+ dcr1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV5040	h+ dcr1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20<ori		
	SPV4986	h- dcr1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
	SPV4987	h- dcr1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4sd20-ori		
		h- smt0 exo1::NAT rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 t-ura4<ori		
	SPV1478/-79	h- ago1::hygro rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 RTS1::ura4(-prm)		
	SPV4971 (SL 1422)	h- WT rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 RTS1::ura4(-prm)		
	SPV4972 (SL 1424)	h- WT rtf1 nmt41::sup35 ade6-704 leu1-32 RTS1::ura4(-prm)		Cette étude

Tableau 4: Liste des souches utilisées dans cette étude

## 1.2 Conditions de culture de *S. pombe*

La levure *S. pombe* est cultivée en milieu liquide à 30°C et sous agitation à 180 rpm. En milieu solide, elle est incubée à 30°C ou 32°C.

### 1.2.1 Composition classique des milieux de culture liquides et solides

*Milieux riches:*

-YEA (Yeast Extract supplemented with Adenin): 5 g/L yeast extract (BD), 30 g/L dextrose (BD), 0.225 g/L adenine (Sigma).

-Milieu sélectif : YEA + 100 à 200 µg/mL d'antibiotique (Hygromycine B, Roche ; Généticine G418, Roche ; Nouréothricine ClonNAT, Werner Bioagents) ou 1 g/L d'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA, Toronto Research Chemicals) ajoutés après autoclave.

-avec drogues génotoxiques : YEA + 6 mM HU (Invitrogen)

*Milieux synthétiques minimums :*

- EMMc (*Edinburgh Minimum Medium complete*) : 12.4 g/L EMM No dextrose (MP Biomedicals), 20 g/L dextrose, 0.225 g/L adenine, 0.225 g/L uracile, 0.225 g/L lysine, 0.225 g/L leucine (Sigma). Il est à noter que seuls certains acides aminés ou bases peuvent être ajoutés pour répondre au besoin des conditions d'expérimentation.



- « EMM without dextrose » : 3 g/L potassium hydrogen phthalate, 2.2 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g/L NH<sub>4</sub>CL, 20 mL/L sels, 1 mL/L vitamines, 0.1 mL/L minéraux. Il est à noter que la source de nitrogène est apportée par le chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>CL).

-SPAS (*Sporulation Agar Supplement*) ou milieu Solide d'induction de la différenciation sexuelle : 10 g/L dextrose, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mL vitamines (4.2 µM acide pantothénique ; 81,2µM acide nicotinique ; 55 µM myo-inositol ; 40.8 nM biotin), 45 mg/l adenine, histidine, leucine, uracil and lysine hydrochloride (1/5 des concentration en YEA).

#### *Milieus solides*

Pour les milieux solides riches, 2% p/v final d'agar (Bacto Agar, BD) sont ajoutés avant autoclavage. Pour les milieux synthétiques solides, une quantité finale d'agar de 2% p/v (EMMc) ou de 3% p/v (SPAS) est autoclavée séparément dans la moitié du volume d'eau requis avant d'être ajoutée au même volume de milieu synthétique concentré 2 fois et préalablement stérilisé par filtration (filtres à pores de 0,22µm de diamètre). Cette façon de procéder permet de limiter la dégradation par l'autoclavage des vitamines du milieu. Les antibiotiques à une concentration de 100 à 200 µg/L sont ajoutés dans les milieux sélectifs avant de couler les boîtes. Le processus d'autoclavage est réalisé pendant 20 min à 120 °C.

### **1.2.2 Conditions de culture spécifiques aux expérimentations mettant en jeu l'induction de la barrière *RTS1-RFB***

Pour le type d'expérience mentionnée ci-dessus, nous avons tenu à utiliser les mêmes conditions de culture que l'équipe de Sarah LAMBERT, avec qui nous avons fortement collaboré et qui nous a initiés à ces expérimentations.

#### *1.2.2.1 Composition des milieux de culture liquides et solides*

- Milieu riche YE (Yeast Extract) : non supplémenté par de l'adénine à l'inverse du YEA
- Milieu synthétique minimum EMM-G : 27.14 g/L EMM No nitrogen (MP Biomedicals), 5 g/L glutamate (L-glutamic acid monosodium salt hydrate- Sigma).
- EMMc : la composition diffère de celle mentionnée à la page précédente par l'absence de NH<sub>4</sub>CL et la présence de 20 g/L de dextrose.

Les milieux solides sont produits selon procédé classique mentionné dans la section 1.2.1.

1.2.2.2 Condition d'induction de la barrière RTS1-RFB

Les souches contenant la barrière *RTS1-RFB* insérée au niveau du chromosome III ainsi que le gène *rtf1* sous le contrôle du promoteur *nmt41*, sont maintenues dans du milieu YE contenant naturellement de la thiamine, dans le cadre du stockage à -80°C ou d'une culture sur milieu solide préalable à toute expérimentation.

Lors des expérimentations nécessitant un contrôle de l'induction de la barrière, les cellules sont mises en culture liquide dans de l'EMM-G supplémenté en acide aminés (adénine, uracile, leucine et lysine) contenant ou non de la thiamine à une concentration finale de 60 µM, permettant respectivement de réprimer ou d'induire la barrière par le contrôle de l'expression de la protéine Rtf1. Cette dernière atteint son maximum d'expression 16h après élimination de la thiamine Les expériences sont effectuées 24h après l'induction de la barrière.

1.3 Plasmides utilisés

Identifiant	Nom du plasmide	Descripton et commentaires	Origine
PAN 45	pFA6a GFP(S65T) hph	étiquetage Cter	Cette étude
PAN 57	pJRI-3XL	dérivé de pREP, promoteur nmt1	Cette étude
PAN 118	pHIS3KCFH1c	promoteur nmt1, étiquetage Cter CFP + Flag + His6	Cette étude
PAN 122	pDUALYFH1	YFP Flag His integration à leu -	Matsuyama, 2006
PAN 133	pREP Flag Ago1 WT	promoteur nmt1, 3xFLAG-ago1	Holoch, 2015
PAN 135	pREP Flag Ago1 D580A	promoteur nmt1, 3xFLAG-ago1D580A	Holoch, 2015
PAN 140	pFA6 mCherry KAN	étiquetage Cter	H. Snaith, 2005 (pKS390)

Tableau 5: Liste des plasmides utilisés.

1.4 Amorces utilisées

Identifiant	Séquence	Description	Utilisation	
PV_174	TACCCATTGAGCAGGTAT	act1 sens	chIP anti-RNA Pol II (contrôles)	
PV_175	CTTCTCACGGTTGGATTTGG	act1 anti-sens		
PV_176	GTACTGGCCCATACCGTGAT	tub1 sens		
PV_177	CGAATGGAAAGCAGAGAAAGC	tub1 anti-sens		
PV_180	AAAAGCGAACCTTCAAGCAAA	mei4 sens		
PV_181	TTGCATCGTTTGAAGACTTCG	mei4 anti-sens		
PV_182	TGCAAGAGGAAACTCAAAGG	ssm4 sens		
PV_183	TTCTCTCCCACTTGTTTGA	ssm4 anti-sens		
PV_1877	TTTTTGACTGTGCTTTGA	tDNA (situé à la barrière des centromères) sens		chIP anti-H3K9me2 (contrôles)
PV_1878	ATTTCGCTAGCGAAAGCA	tDNA (situé à la barrière des centromères) anti-sens		
PV_2013	CAATCACGACGGATCGTACA	nam1 sens		
PV_2014	GTTGAATTGCCAGCGTATC	nam1 anti-sens		
PV_2373	TCCACTGTTAGCCGGTATTC	R1 sens	chIP anti-RNA Pol II	
PV_2374	TCCGATGGCAACGATTCAATTA	R1 anti-sens		
PV_2375	CGACCAGCTCCATAGACTCC	R2/A sens		
PV_2376	TGGTCGTCGATTTCTAAACC	R2/A anti-sens		
PV_2377	GGCCACCACTTTTCTACCA	R3/B sens		
PV_2378	GGAAATTGTTGGCTTTGATGG	R3/B anti-sens		
PV_2381	CAAAACCAACCCCACTACC	R4/C sens		
PV_2382	TCCATGTGCTTCTTTTGTCA	R4/C anti-sens		
PV_1785	GCAGAGTGC ACATGGTGAG CAAGGGCGAG GAG	amorce sens, étiquetage de swi6 en 5'		construction de souches
PV_1786	CAGCGGATCTTATTATTATT TCAAGGAAACGTTAAAGTG	amorce anti-sens, étiquetage de swi6 en 5'		
PV_1860	CTGTTAATCG AAAACATTGAA GAATAAAGGA AGAGGAATCC TGC	amorce sens, mutagenèse du promoteur nmt1		
PV_1861	CCAAGATTC CTCTTCTTT ATTCTCAAT GTTTCGATTA ACAG	amorce anti-sens, mutagenèse du promoteur nmt1		
PV_2424	TAAACAGGAAGAAGACTTGTCTAGATTTCGAGGCAAAATTTGA	amorce sens, étiquetage de toz3 en 3'		
PV_2441	CAAGGTTACTAGAAATACATCATGAAAAATGACATAGCTAACTTA	amorce anti-sens, étiquetage de toz3 en 3'		
PV_2497	CGGTGCAATCTCATCATCTCTAGTACTACCAATAAAAAATGT	amorce sens, étiquetage de swi6 en 3'		
PV_2498	TACTACGACAGGGACTCTGA TAAAAACAAATACGTCAGAAAAAAG	amorce anti-sens, étiquetage de swi6 en 3'		
ura4 prm disrupt F	CCTTGTTATAATACCCCTCGCC	amorce sens, délétion du promoteur de ura4		
ura4 prm disrupt R	TCTTTA CAAAAGTAAGAATTTCTGTAATAAGCCCTTAATGCCCCCTG	amorce anti-sens, délétion du promoteur de ura4		

Tableau 6: Listes des amorces utilisées

## 2 Construction de souches

### 2.1 Stratégie d'introduction d'une séquence d'ADN dans le génome de *S. pombe*

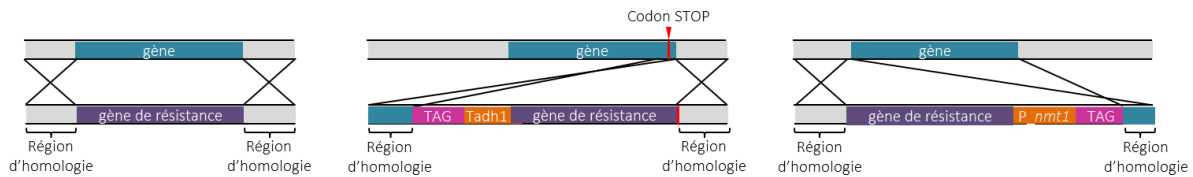
La transformation des cellules de levures *S. pombe* a été réalisée en suivant la méthode décrite dans la publication de Bahler *et al.* (*Yeast* vol. 14, 1998, pages 943-951). Les cellules de levures sont transformées par l'introduction d'une séquence d'ADN dite cassette *via* un choc thermique en présence d'acétate de lithium. L'intégration de cette séquence au sein du génome se fait par recombinaison homologue. Cette cassette contient à ses extrémités 80 à 200 nt homologues à la région du génome bordant le lieu d'insertion, dite région acceptrice, ce qui favorise ainsi l'intégration de la séquence à un locus spécifique. Les levures ainsi transformées (ou transformants) sont ensuite sélectionnées grâce à l'expression du gène de résistance à un antibiotique contenu dans la cassette et qui permet la pousse des cellules sur un milieu contenant l'antibiotique. La cassette d'ADN peut être insérée en remplacement d'un gène codant par exemple pour un acide aminé dans une souche de levure auxotrophe pour celui-ci. Dans ce cas, seuls les transformants ayant perdu cette auxotrophie seront sélectionnés sur un milieu ne contenant pas l'acide aminé en question.

### 2.2 Préparation du matériel ADN à introduire dans le génome de *S. pombe*

#### 2.2.1 Préparation de la cassette d'ADN linéaire

La cassette d'ADN se compose en général, d'un gène de résistance à un antibiotique (accompagné du promoteur et du terminateur de celui-ci) de manière à permettre la sélection des transformants dans le cas d'une délétion de séquence. Dans le cas d'une modification apportée à un gène sauvage, tel que l'ajout d'une étiquette (ou TAG), la cassette contient également la séquence codante de cette étiquette. Cette séquence codante est associée soit en amont avec le promoteur *nmt1* (*no message in thiamine*, Maundrell, 1990) soit en aval au

terminateur du gène *adh1* (annoté Tadh1) de *S. cerevisiae* (Wach et al., 1997) dans le cadre respectivement d'une adjonction en 5' ou 3' du gène sauvage cible de *S. pombe* (**Figure 56**). Il est à noter que le promoteur *nmt1* existe sous trois formes selon la force d'expression : *P3\_nmt1* (promoteur sauvage de forte expression) *P41\_nmt1* (promoteur d'expression 10 fois inférieur au promoteur *nmt1* sauvage) ou *P81\_nmt1* (promoteur d'expression 100 fois inférieur au promoteur *nmt1* sauvage). De plus, dans le cadre d'un étiquetage à l'extrémité 3', la cassette est insérée avant le codon stop du gène cible afin d'assurer une fusion traductionnelle.



**Figure 56: Les différents types de transformation de *S. pombe* basée sur la recombinaison homologue**

La transformation peut aboutir à : la délétion du gène cible (gauche), à l'ajout d'une étiquette à l'extrémité 3' (milieu) ou 5' (droite) du gène cible. Elle se base sur la recombinaison homologue entre la cassette introduite et le génome de la levure. La partie supérieure et inférieure de chaque image schématise respectivement la région acceptrice du génome et la cassette d'ADN.

La cassette d'ADN est amplifiée par des réactions de PCR à partir d'un plasmide bactérien à l'aide d'un couple d'oligomères longs (100 nt) ou amorces qui contiennent 20 nt homologues à une région du plasmide et 80 nt homologues du côté 3' pour l'une des deux amorces et 5' pour l'autre, au site accepteur dans le génome de la levure.

Afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN à transformer, au moins dix réactions de PCR dans un volume final de 50  $\mu$ L sont réalisées, selon les conditions préconisées par le fournisseur de l'ADN polymérase utilisée. (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Le critère principal qui a conditionné le choix de l'ADN polymérase dans le cadre de mes expérimentations, a été le niveau de fidélité ou de précision décrit par le fournisseur et avec lequel l'enzyme synthétise de l'ADN à partir d'une matrice. Ce niveau de fidélité se réfère au taux de nucléotides incorrects incorporé par la polymérase. Ainsi, une ADN polymérase d'haute-fidélité est généralement utilisée (type *Phusion high-fidelity DNA polymerase* (NEB) ou *PlatinumTaqPolymerase* (Invitrogen)) dans le cadre de l'étiquetage d'un gène sauvage

menant à l'expression d'une protéine recombinante. En plus de l'ADN polymérase, de la matrice ADN à amplifier et des amorces, le mix de PCR se compose également d'un mélange équimolaire des 4 désoxy-ribonucléotides (désoxyadénine, désoxycytosine, désoxyguanine & désoxythymine triphosphate) et des ions nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme ( $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ).

Composant	Concentration finale
Tampon 10X Invitrogen	1X
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5 mM
Mix de dNTPs (10mM de cha	0.2 mM
PlatinumTaqPolymerase (Inv	0.04 U/ $\mu$ L
Amorce 1 (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ M
Amorce 2 (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ M

**Tableau 7: Composition d'une réaction classique de PCR pour amplifier une cassette d'ADN**

La qualité de la cassette est contrôlée sur un échantillon du produit d'amplification par visualisation sous lumière ultraviolette après électrophorèse sur gel d'agarose. La migration est effectuée à 100V dans du tampon TAE 1X et dans un gel d'agarose 1 à 1.2% (p/v) et contenant 0,5  $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium.

La purification de l'amplicon peut être réalisée selon deux méthodes : i) en suivant la procédure indiquée dans un kit commercial, en l'occurrence *Nucleo spin Gel & PCR Clean-up* (740606.250 Machenery NAGEL) ou ii) par extraction au phénol-chloroforme. Dans le cadre de cette deuxième méthode, un volume de phénol-chloroformeisoamylalcool (25-24-1,[pH8], Sigma) est d'abord ajouté aux produits de la PCR. Après un mélange de 15 à 30 sec au vortex, l'ensemble est centrifugé 5 min à 16000g. La phase aqueuse supérieure est récupérée et lavée dans un volume équivalent de chloroforme. Puis 2.5 volumes d'éthanol 100%, 1/10<sup>ème</sup> du volume d'acétate de sodium 3M à pH 5.2 ainsi que 1 $\mu$ l de glycogène (20mg/ml) sont ajoutés à phase aqueuse supérieure de sorte à permettre la précipitation de l'ADN extrait. Cette étape se réalise pendant 20 min à -80°C ou au moins 2 h à -20°C. Après une centrifugation de 20min à 16000g à 4°C, le culot est lavé dans 1ml d'éthanol 75%, séché, puis mis en suspension dans 20  $\mu$ L d'eau distillée. La concentration de l'ADN est estimée par dosage spectrophotométrique au Nanodrop. Ce dosage permet également d'apprécier la qualité de la purification selon deux indicateurs. La contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques est évaluée par le ratio entre les absorbances à 260 nm (acides nucléiques) et 280 nm (acide nucléiques).

La purification est généralement considérée comme acceptable si ce ratio est compris entre 1.8 et 2.0 (attention ce ratio peut varier significativement en fonction du pH et de la force ionique). La présence de contaminants tel que le phénol) est révélée si le ratio entre les absorbances à 260 nm (acides nucléiques) et 230 nm (contaminants) est inférieure à la gamme 2.0 et 2.2.

### 2.2.2 Préparation de la cassette d'ADN circulaire (plasmide)

La levure peut également être transformée directement par un plasmide. Dans ce cas, celui-ci contient non seulement un gène de résistance à un antibiotique (en général, résistance à l'ampicilline) permettant la sélection des bactéries transformées, mais également un gène sélection permettant celle des levures transformées. Ce dernier code généralement pour une enzyme participant au cycle de synthèse d'un acide aminé. La levure alors sujette à la transformation doit initialement être auxotrophe pour l'acide aminé en question de telle sorte à ce que l'introduction du plasmide permette de compléter sa défaillance.

Les plasmides introduits dans la levure, de même que ceux servant de matrice à l'amplification d'une cassette d'ADN linéaire, sont amplifiés par transformation dans des bactéries *E. coli* compétentes (bactéries *E. coli* TOP10 Chimiquement Compétentes, ThermoFisher). Un volume de 25 µL de bactéries est incubé en présence de 1 ng de plasmide, sur glace pendant 20 min puis soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42°C avant de le remettre de nouveau sur la glace pour quelques minutes (2 à 5 min). Le mélange est mis en suspension dans du milieu riche LB (*Lysogeny Broth*, Life Technologies) et incubé à 37°C pendant 1 h. Les bactéries sont étalées sur du milieu riche LB contenant l'antibiotique de sélection puis mise à incuber 12 à 24 h à 37°C. Au moins 3 colonies indépendantes de bactérie sont mises en culture liquide pendant au moins 12h. Le plasmide d'intérêt est extrait et purifié via l'utilisation d'un kit commercial indiquant la marche à suivre (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, Qiagen réf : 27106).

## 2.3 Transformation de *S. pombe*

Une culture de 50 mL de *S. pombe* à une DO<sub>600</sub> entre 0.2 à 0.5 est centrifugée 5 min à 5000g à température ambiante (RT). Les cellules sont lavées dans de l'eau stérile puis mises en suspension dans du tampon LiOAc (Tampon TE 1X [pH=7.5] ; LiOAc 0.1M [pH=7.0]). Un volume de 100 µL de cellules est ajouté à 10 à 20 µg d'ADN transformant et à 24 µg d'ADN

de sperme de saumon (protection contre nucléases) préalablement dénaturé à 65°C. L'ensemble est incubé 10 min à température ambiante. Un volume de 260 µL de tampon PEG (Tampon TE 1X [pH=7.5] ; LiOAc 0.1M [pH=7.0] ; PEG40% (p/v)) est ajouté aux cellules et l'ensemble est incubé 45 à 60 min à 32°C. Un volume de 43 µL de DMSO est ajouté avant un choc thermique réalisé à 42°C pendant 5 min. Les cellules sont ensuite centrifugées 2 min à 1800g, lavées et remises en suspension dans 500 µL d'eau stérile. La totalité des cellules est d'abord étalée sur boîte YEA et incubé 24h à 30°C. S'en suit une réplique sur des boîtes YEA contenant l'agent de sélection et une incubation 2 à 3 jours à 30°C. Ce mode de culture solide en deux étapes permet de favoriser la survie des levures déjà fragilisées par le protocole de transformation.

Dans le cas d'une transformation de levures par un plasmide, le même protocole est suivi mais en utilisant 100 ng de matériel génétique. De plus, à l'issue de la transformation, les cellules sont directement déposées sur du milieu minimum EMMc dépourvu de l'acide aminé pour lequel la levure présente initialement une auxotrophie.

## **2.4 Sélection des transformants positifs**

La sélection est réalisée par géotypage PCR dans un volume final de 20 µL. Une fraction de colonies ayant poussé sur milieu sélectif subit une lyse alcaline aboutissant à la destruction de la paroi et des membranes cellulaires. Cette réaction est réalisée par un réchauffement de 10 min à 95°C dans une solution de NaOH 0.04M. À l'issue de cette étape, un volume de 1 µL issu du surnageant contenant l'ADN libéré des cellules, est utilisé pour réaliser les réactions de PCR dans un volume final de 25 µL (**Tableau 8**). Comme la fidélité de la synthèse d'ADN n'est pas un critère indispensable, nous utilisons généralement la polymérase contenue dans le kit commercial *BiomixRed* du fournisseur Bioline. Le programme classique de la PCR débute par une étape de dénaturation de 5 min à 95°C, suivi de 35 cycles d'amplification comprenant trois étapes successives : dénaturation de 2 min à 95°C, hybridation de 45 sec à 60°C et élongation à 72°C pendant un temps ajustable selon la taille attendue de l'amplicon. L'analyse du géotypage PCR est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de BET.

En moyenne, une dizaine de colonies sont testées pour vérifier : 1) l'absence de la séquence sauvage d'origine et 2) la bonne insertion de la cassette d'ADN au niveau du site accepteur d'intérêt. Dans le cas de l'insertion d'une étiquette en fusion avec un gène d'intérêt,



l'expression de la protéine recombinante est vérifiée par *Western Blot* dans les clones validés par le génotypage PCR. Pour chaque transformation par une cassette d'ADN donnée, au minimum 3 clones indépendants et dont le génotype a été vérifié, sont sujets à un stockage à -80°C dans du milieu riche contenant 25% p/v final de glycérol. Il est à noter que le stock glycérol est réalisé dans du milieu EMMc ne contenant pas l'acide aminé apportant la complémentation clé dans le cas d'une transformation de levure par un plasmide.

Composant	Concentration finale
BioMix Red 2X (Bioline Bio-25006)	44% v/v
Amorce 1 (100 µM)	1 µM
Amorce 2 (100 µM)	1 µM
Eau	Compléter jusqu'au volume final

**Tableau 8: Composition d'une réaction classique de PCR pour identifier des transformants**

Remarques : le mix commercial contient du Mg<sup>2+</sup> à une concentration finale de 2.5 mM ainsi que la Taq polymérase. Le volume final est de 25 µL par réaction.

## 2.5 Obtention de nouvelles souches par croisement aléatoire ou « random spore »

Une quantité de 10<sup>7</sup> cellules d'haplo type opposé (h<sup>+</sup> et h<sup>-</sup>) sont mélangées avant d'être lavées trois fois dans de l'eau stérile (centrifugation de 2 min à 3000 rpm). Les cellules sont resuspendues dans 10 µL d'eau stérile. Une goutte de 3 µL de ce mélange est déposée sur milieu de sporulation SPAS. Les souches parentales sont également déposées séparément en tant que contrôle négatif de sporulation. Un croisement entre deux souches sauvages d'haplo type opposé est utilisé en tant que contrôle positif de sporulation. L'ensemble est incubé pendant 2 jours à 30°C pour induire la conjugaison des souches et l'obtention de spores. Une petite quantité de matériel biologique (mélange d'asques et de cellules n'ayant pas conjugué) est reprise dans de l'eau stérile et incubées en présence de 20 mg/mL de cyclohélicase (*Helix pomatia* C8274-250 Sigma) pendant 5h à 32°C pour digérer la paroi des asques ainsi que les cellules n'ayant pas conjugué. La digestion est contrôlée par microscopie. L'ensemble est ensuite lavé une première fois dans du SDS 1% puis deux fois dans de l'eau stérile. Après dénombrement sur cellule de Malassez, 100 spores sont étalées sur milieu YEA sélectif (en général un antibiotique) et incubé



2 à 3 jours à 30°C. La sélection des génotypes recherchés s'effectue par pousse successive sur les milieux sélectifs contenant les gènes de résistance introduits dans les souches parentales et/ou par génotypage PCR. Pour chaque croisement, au minimum 3 clones indépendants et dont le génotype a été vérifié, sont sujets à un stockage à -80°C dans du milieu riche contenant 25% p/v final de glycérol.

### **3 Test en gouttes**

Le test en goutte permet de tester la sensibilité de certains mutants à différents agents génotoxiques, connus pour perturber la réplication de l'ADN ou induire des dommages de l'ADN. Des doses croissantes de drogues sont incluses dans le milieu solide YEA. La drogue utilisée a été l'hydroxyurée (HU). Il s'agit d'un inhibiteur de la ribonucléotide réductase qui est l'enzyme clé de la transformation des quatre ribonucléotides en désoxyribonucléotides essentiels à la synthèse de l'ADN. Le HU conduit à une déplétion du pool de nucléotides, menant à un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication. L'utilisation de cette drogue permet ainsi de bloquer la progression du cycle en début de phase S. En raison d'une absence d'équipements assurant la sécurité de l'utilisateur pendant la réalisation de tests en goutte, l'utilisation d'autres drogues génotoxiques et dangereuses tels que l'agent alkylant méthanesulfonate de méthyle (MMS), n'a pu être réalisée.

Un test au Thiabendazole (TBZ) à une concentration finale de 10 µM a été réalisé en routine pour tester l'absence de réversion phénotypique des mutants du RNAi. Le TBZ induit une dépolymérisation des microtubules et perturbe ainsi la formation du fuseau mitotique et l'intégrité centromérique. Les cellules dont l'hétérochromatine péri-centromérique est déstabilisée y sont très sensibles, comme c'est le cas des mutants du RNAi.

Les tests sont effectués à partir de 5mL de culture de levures en milieu YEA à une  $DO_{600nm}$  inférieure à 2. Une quantité de  $10^7$  cellules est prélevée et remise en suspension avec un volume de milieu YEA adéquat de sorte à ce que le volume final atteigne 1 mL. On réalise ensuite 5 dilutions en cascade d'un facteur 10 en milieu YEA dans une plaque 96 puits stérile. Les cellules sont déposées sur milieu YEA contenant la drogue adéquate et incubées à 30°C pendant 2 à 3 jours. En guise de contrôle, la même quantité de cellules est déposée sur milieu non sélectif pour vérifier d'éventuels défauts de pousse non liés aux agents de sélection.

## 4 Analyse des interactions protéiques

### 4.1 Purification par affinité en tandem de complexes protéiques (méthode TAP)

#### 4.1.1 Principe

La méthode TAP (*Tandem Affinity Purification*) est une technique de purification en deux étapes à large échelle et en condition native d'une protéine d'intérêt portant l'étiquette TAP et possiblement produite à niveau proche de son niveau naturel dans l'organisme d'intérêt. Elle est généralement combinée à l'identification des protéines co-purifiées par spectrométrie de masse (TAP-MS). L'étiquette TAP se compose de deux domaines d'affinité séparés par le site de clivage par la protéase TEV (*Tabacco Etch Virus*) : la protéine A reconnaissant le fragment Fc des immunoglobulines (IgG) et le peptide CBP (*Calmodulin-binding peptide*) d'interaction avec la calmoduline et qui est généralement fusionné à l'extrémité C-terminale de la protéine d'intérêt. La méthode TAP repose sur une double purification par affinité de la protéine chimérique *via* son étiquette. La protéine et ses partenaires potentiels sont d'abord immuno-précipités sur des billes couplées aux IgG. Le complexe est ensuite libéré en ajoutant la protéase TEV, dont l'action de clivage aboutit également à rendre le peptide CBP accessible. Enfin, le complexe est de nouveau purifié par passage sur une colonne de billes fonctionnalisées avec la calmoduline. Le complexe est finalement obtenu par élution en condition non dénaturante. Il est à noter que la méthode TAP est également réalisée en parallèle sur une souche dans laquelle la protéine d'intérêt n'est pas étiquetée, et ce, afin d'évaluer l'enrichissement des protéines co-purifiées.

L'ensemble des purifications TAP mentionnées dans mes travaux de thèse ont été réalisées par le Dr. Benoît GILQUIN. Cette méthode a été appliquée pour examiner l'interactome de Chp1, l'une des sous-unités de RITS, issue d'une souche sauvage. La séquence codante pour l'étiquette a été ajoutée à l'extrémité 3' du gène *chp1* sauvage dans le cadre d'une fusion traductionnelle. L'expression de la protéine chimérique résultante est sous contrôle du promoteur endogène. Afin de ne s'intéresser qu'aux interactions protéine-protéine et d'éliminer celles qui pourraient être indirectement induites par des molécules d'ADN ou d'ARN, les extraits cellulaires provenant de souches sauvages exprimant soit la protéine native Chp1 ou la

protéine chimérique Chp1-TAP, ont été traités par des nucléase (Benzonase, 70664-3, Novagen) avant les étapes de purification.

#### 4.1.2 Préparation des culots de levures

La culture des cellules s'effectue en fermenteur (Labfor-3, Infors), avec un suivi régulier des constantes (pH, oxygène, ajout de nutriments, agitation) *via* le logiciel Iris (Labfor). Les cellules sont, dans un premier temps, mises en culture dans 1L de milieu YES (milieu riche composé de 5g/L d'extrait de levure (BD), 30 g/L dextrose (BD), 0.225 g/L adénine (Sigma) 45mg/L leucine ; 45 mg/L adénine ; 45 mg/L uracile ; 45 mg/L histidine ; 45 mg/L lysine (Sigma)) jusqu'à atteindre la phase de saturation ( $DO_{600nm} \geq 15$  et vérification par observation des cellules sous microscope). Après 15h de culture en saturation, du milieu YES 10X est ajouté goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'un volume de 3.6 L de culture de levure ayant  $DO_{600nm}$  entre 60 et 70. Cet ajout de milieu combiné à la pousse en fermenteur, permet de relancer la pousse logarithmique des cellules. Celles-ci sont alors centrifugées à 5000g pendant 15 min. Le culot est alors congelé instantanément dans de l'azote liquide, cassé manuellement en petits morceaux pour être ensuite pesé et conservés à  $-80^{\circ}C$ .

#### 4.1.3 Lyse des cellules

L'ensemble des étapes s'effectue en chambre froide ( $4^{\circ}C$ ). Une quantité de 70g de cellules congelées réduites en poudre par mixage est mélangée à 110  $\mu$ L de tampon de lyse froid (HEPES-NaOH 50mM [pH=7.5],  $MgCl_2$  5mM,  $\beta$ -glycérophosphate 20mM, glycérol 10% (p/v), EDTA 1mM, EGTA 1mM, NaF 50mM,  $Na_3VO_4$  0.1mM, NP-40 0.2% (p/v), NaCl 150mM, LABP 1 $\mu$ g (mélange d'anti-protéases), Benzamidine 1mM, PMSF 1mM). Après l'ajout de 400  $\mu$ L de billes de verre froides (0,5mm de diamètre, Retsch), les cellules subissent une lyse mécanique ou broyage dans un *beadbeater* (Biospec) suivant 5 à 7 cycles de 30 sec d'agitation à puissance maximale et séparés de 1 min de refroidissement sur glace. Le lysat est récupéré à l'aide d'une pipette puis transféré dans 2 Falcon de 50mL. Le lysat est centrifugé 10 min à 5000g à  $4^{\circ}C$  afin de récupérer le surnageant contenant les protéines solubles et des fragments d'ADN de petite taille ( $\approx 1kbp$ ).

#### 4.1.4 Préparation des complexes protéiques

Les extraits protéiques incubent pendant 2 h à 4°C et sous agitation orbitale (13rpm) avec 500µL de billes sépharose couplées aux IgG (6 Fast Flow, GE Healthcare) et préalablement lavées trois fois au tampon de lyse. Les IgG permettent de reconnaître la protéine A constitutive de l'étiquette TAP. Les billes sont ensuite transférées dans des colonnes de 5mL (BioRad), qui ont été préalablement lavées trois fois avec 1mL d'H<sub>2</sub>O. Les billes de sépharose sont lavées trois fois avec 1mL de tampon de lyse et 1mL de Tampon TEV-C (Tris-HCL 20mM [pH8], NaCl 150mM, NP-40 0.1% (p/v), MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 0.5mM, DTT 1mM, glycérol 5% (p/v)). Les colonnes contenant les billes incubent en présence d'1mL de tampon TEV-C auquel est ajouté 40µL de Protéase TEV-His, et ce pendant 1h à température ambiante. Le but de cette étape est d'induire le clivage de l'étiquette TAP par la protéase TEV, et ainsi la libération des complexes protéiques associés à la protéine d'intérêt qui est désormais fusionnée qu'à l'élément CBP. Pendant cette étape, les échantillons sont aussi traités avec 250U de benzonase (Millipore) afin de ne conserver que les interactions protéine-protéine et d'éliminer celles qui pourraient être médiées par les interactions protéine-ADN/ARN. La qualité de la digestion des acides nucléiques est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% et en présence de BET (pendant 30 min à 100V). L'éluât est ensuite transféré dans une colonne de 10mL (BioRad) contenant 6mL de tampon CAM-B buffer (Tris-HCL 20mM [pH8], NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Imidazole 1mM, β-mercaptoéthanol 10mM, glycérol 5%(p/v)). À l'issue de trois lavages stringents dans du tampon TEV-C 300 (tampon TEV-C du NaCl à 300 mM final) des billes sépharose, ces deuxièmes colonnes sont incubées pendant la nuit (ou pendant minimum 4h) à 4°C en présence de 400 µL de billes couplées à la calmoduline (GE Healthcare). Celles-ci ont été préalablement lavées trois fois avec le tampon CAM-B buffer. Cette étape permet une seconde purification de la protéine d'intérêt *via* l'élément CBP restant de l'étiquette TAP. La qualité de la purification a été contrôlée en collectant des aliquots à chaque étape et en les analysant par *Western Blot* dirigé contre l'étiquette TAP.

#### 4.1.5 Éluition des complexes protéiques

L'éluition des complexes est réalisée par l'ajout de concentrations croissantes d'EGTA (chélateur de calcium) et de NaCl dans le but de fragiliser les interactions faibles et ainsi de déstabiliser l'interaction entre la CBP et la calmoduline couplée aux billes. À la suite de trois

lavages des colonnes avec 1mL de tampon CAM-B supplémenté en NP-40 0.05% (p/v), quatre séries d'élution sont réalisées à l'aide du tampon CAM-E (Tris-HCL 10mM [pH8], NP-40 0.02% (p/v), MgCl<sub>2</sub> 1mM, Imidazole 1mM, β-mercaptoéthanol 10mM, glycérol 5% (p/v)) de la manière suivante : 1) une première élution (E1) avec 200 µL de tampon CAM-E 150-4 (NaCl 150mM, EGTA 4mM), 2) deux éluions successives (E2-E3) avec 700 µL de tampon CAM-E 150-4, 3) deux éluions successives (E4-E5) avec 700µl de CAM-E 150-20 (NaCl 150mM, EGTA 20mM), 4) une dernière élution avec 350µl de CAM-E 500-20 (NaCl 500mM, EGTA 20mM). Les protéines contenues dans les quatre éluats sont séparées par électrophorèse en condition dénaturante sur un gel d'acrylamide à 8% (v/v). Celui-ci est ensuite coloré au nitrate d'argent (*SilverQuest SilverStaining Kit*, Life Technologies), en vue de révéler les protéines et vérifier leur intégrité.

#### **4.1.6 Analyse des échantillons par LC-MS-MS**

Les protéines incluses dans les échantillons issus des purifications TAP réalisées à partir de souches sauvages exprimant soit la protéine native Chp1 (souche contrôle), soit la protéine chimérique Chp1-TAP, ont été identifiées et quantifiées par chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS). L'ensemble de ces analyses ont été réalisées par nos collaborateurs (équipe EdyP, Institut de Biosciences et Biotechnologie de Grenoble BIG, CEA Grenoble).

L'enrichissement des protéines co-purifiant avec Chp1-TAP a été déterminé relativement à l'extrait provenant de la souche contrôle. Afin de garantir la robustesse et la reproductibilité des résultats, nous avons réalisé trois séries de purifications TAP (sur trois séries de cultures différentes de levures) incluant à chaque fois deux répliquats techniques. Au total, six purifications (incluant la souche contrôle) ont donc été analysées. Il est à noter que la dernière série de purification a été réalisée un an après les précédentes. De plus, dans le cadre de nos analyses, nous avons uniquement considéré les protéines pour lesquelles au moins trois peptides ont été identifiés et caractérisés selon les critères suivants. Premièrement, chacun de ces peptides devaient être enrichi d'au moins un facteur 2 par rapport à l'extrait contrôle. Deuxièmement, cet enrichissement devait être reproductible dans chaque répliquat biologique et technique.

#### 4.1.7 Détermination des « Gene Ontology »

Par ontologie d'un gène (*Gene Ontology*, GO), on entend les fonctions moléculaires et processus biologiques qui lui sont rattachés. L'analyse bio-informatique des GO associées aux gènes codant pour les protéines co-purifiant avec Chp1-TAP a été réalisée par le Dr. Cyril BOYAULT, en utilisant l'outil AmiGO2 (<http://amigo2.geneontology.org/amigo>) et le système de classification PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, Mi H *et al.*, *NAR*, 2013). Cette analyse repose sur le calcul de la probabilité de voir un nombre  $x$  de gènes (parmi ceux de la liste analysée) associés à un terme GO donné par rapport au nombre total de gènes connus comme étant associés à ce terme GO dans le modèle d'étude. Plus cette probabilité est proche de zéro, moins cela signifie que l'association entre les gènes analysés et le terme GO est aléatoire.

## 4.2 « GST Pull-Down »

### 4.2.1 Principe

La technique du « GST pull-down » permet d'identifier une interaction protéique *in vitro* entre une protéine appât fusionnée à la GST et une protéine d'intérêt. L'extrait biologique contenant la protéine d'intérêt est incubé en présence d'une colonne constituée de billes d'agarose conjuguées à la protéine de fusion GST-appât (colonne « appât »). Les protéines interagissant avec la protéine sont ainsi capturées sur la colonne « appât ». Une incubation de l'extrait protéique en présence d'une colonne constituée de billes d'agarose conjuguées uniquement à la GST, est également réalisée pour déterminer le niveau de fixation aspécifique de la protéine d'intérêt sur la GST (colonne « contrôle »). Afin d'analyser uniquement les interactions protéine-protéine, les extraits biologiques sont traités avec des nucléases avant incubation. Les interactions sont analysées par *Western blot* dirigé contre la protéine d'intérêt.

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai utilisé la technique du « GST Pull-down » afin d'analyser l'interaction entre la protéine appât Ago1 (sous-unité de du complexe RITS) et une quarantaine de protéines étiquetées et identifiées dans l'interactome potentiel de Chp1.

#### 4.2.2 Production des protéines GST et GST-Ago1 par *Escherichia Coli*

Les bactéries compétentes *E.coli* de la souche BL21 ont été transformées par 10 ng de plasmides pGEX-4T-1 ou pGEX-6P-1 codant respectivement pour l'enzyme GST (Glutathion S Transférase) ou la protéine de fusion GST-Ago1 (Buker et al. 2007). Les bactéries sont mises en culture liquide jusqu'en phase stationnaire, dans du milieu LB supplémenté à 50 µg/mL final d'ampicilline (A0166 Sigma), à 37°C et sous agitation de 140 rpm. Elles sont ensuiteensemencées à une densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,2 et de nouveau remises en culture selon les mêmes conditions. Quand la DO<sub>600</sub> atteint 0,4 - 0,5, la production de la GST est induite en présence 1mM final d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, I6758 Sigma Aldrich) pendant 3h à 37°C. Celle de la GST-Ago1 est induite quand DO<sub>600</sub> atteint 0,7 - 0,8, en présence de 0,1 mM final d'IPTG pendant 24h à 20°C. Cette différence de traitement est liée à la différence de taille des protéines d'intérêt. La GST-Ago1 (110 kDa) ayant une taille importante, elle est plus difficile à produire par les bactéries et risquerait fortement de s'agréger. La solution pour pallier à ce problème est de diminuer la température de culture afin d'abaisser le métabolisme ainsi optimiser le repliement correct de la protéine recombinante. Après une centrifugation de 8000 g pendant 7 min et à 4°C, les culots bactériens sont repris dans 10 mL de PBS 1X (Phosphate buffer Solution). Ils sont lavés au cours d'une seconde centrifugation, congelés dans l'azote liquide et peuvent être stockés à -20°C.

#### 4.2.3 Elaboration des colonnes GST et GST-Ago1

Pour réaliser nos tests de « pull-down », nous utilisons des colonnes qui consistent en des billes d'agarose couplées de façon covalente avec le glutathion réduit (GSH) et sur lesquelles sont accrochées les protéines recombinantes GST (colonne « contrôle ») et GST-Ago1 (colonne « appât »). L'enzyme Glutathion S Transférase (GST) catalyse physiologiquement la réaction de conjugaison nucléophile du GSH avec des composés apolaires contenant un atome électrophile (carbone, azote, soufre). La fixation des deux types de protéines sur les colonnes se base ainsi sur l'affinité très forte de la GST pour le GSH. Pour élaborer nos colonnes, nous procédons donc à l'accrochage de la GST ou de la protéine de fusion GST-Ago1 sur la matrice glutathion agarose.



*4.2.3.1 Purification des protéines GST et GST-Ago1 à partir des bactéries BL21*

L'ensemble des étapes de préparation s'effectue à 4°C. Les culots bactériens congelés sont resuspendus sur glace dans du tampon de lyse en respectant un ratio de 1/50ème entre le volume de tampon et celui du culot (100mM Hepes [pH 7,5] ; 500mM NaCl ; 5mM  $\beta$ mercapto-éthanol ; Triton 0,5% ; 100mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) ; 1mM benzamidine ; 0,01 mM LABP (leupeptin, aprotinin, bestatin, pepstatin). Les cellules sont lysées par sonication selon huit cycles de 4 secondes interrompus à chaque fois par 4 secondes de pause (sonicateur 550 disembrater, Fisher Scientific), puis centrifugées 30 min à 12000g afin de récupérer le surnageant contenant l'extrait protéique total.

*4.2.3.2 Accrochage des protéines GST et GST-Ago1 à la matrice glutathion agarose*

L'ensemble des étapes de préparation s'effectue à 4°C. La matrice glutathion agarose (G4510 sigma) est lavée trois fois dans 10 à 20 fois son volume de tampon de lyse, sous agitation douce et *via* une centrifugation de 2 min à 200g. Elle est reprise dans un volume équivalent de tampon de lyse de sorte à obtenir une matrice glutathion agarose à 50% final. Celle-ci est alors incubée avec l'extrait protéique pendant 1h30 à 4°C et sous agitation orbitale (13rpm), en considérant 300  $\mu$ L de matrice à 50% final pour l'équivalent de 500 mL de culture bactérienne. Les colonnes GST et GST-Ago1 ainsi obtenues, sont récupérées après une centrifugation de 4 min à 200g, puis lavées 4 fois dans 10 à 20 volumes de tampon de lyse. Les colonnes sont finalement reprises dans un volume équivalent de tampon de stockage (100mM Hepes [pH 7,5] ; 5mM  $\beta$ mercapto-éthanol ; 150mM NaCl ; glycerol 45% ; qsp eau ultrapure milliQ froide).

L'homogénéité des colonnes GST et GST-Ago1 a été contrôlée à la fois par une coloration au bleu de Coomassie, et par western blot dirigé contre les protéines GST et Ago1 (Anti-GST monoclonal souris dilué au 1/20000<sup>ème</sup>, référence : GST.B-14 sc-138 Santa Cruz Biotechnology ; Anti-Ago1 monoclonal lapin dilué au 1/700<sup>ème</sup>, référence : Ab5070 Abcam). Lors des expériences de « pull-down », du bruit de fond peut être occasionné par des interactions aspécifiques entre la protéine à tester et la matrice agarose et/ou la GST. On s'attend à ce que ce bruit de fond soit commun aux colonnes de GST et de GST-Ago1. Au risque d'être trop stringent, mais pour éliminer les faux positifs et nous assurer de ne sélectionner que les



interactions spécifiques d'Ago1, nous avons décidé de travailler dans des conditions d'excès molaire de GST dans la colonne GST par rapport à la colonne GST-Ago1. En raisonnant pour des volumes identiques de colonnes, cet excès se traduit par une quantité totale plus élevée de protéines GST fixées sur la colonne contrôle que de protéines fixées sur la colonne appât (ces protéines correspondant à de la GST, GST-Ago1 ou des fragments de dégradation de GST-Ago1). En respectant ce critère, nous avons choisi de diluer dix fois plus la colonne GST par rapport à la colonne GST-Ago1, dans de la résine glutathion agarose 50%. Les deux types de colonnes sont stockées à -20°C avant utilisation.

#### 4.2.4 Ago1 « Pull-Down »

Les culots correspondant à 50mL de culture *S. pombe* en phase logarithmique de croissance ( $DO_{600}$  de 0.8 à 1.2) et exprimant les protéines candidates étiquetées avec un épitope Flag ou YFP (Yellow Fluorescence Protein ; référence de la banque de souche : Matsuyama *et al.*, *Nat Biotech*, 2006), ont été collectés après centrifugation de 5 min à 800g. Après lavage dans du PBS 1X, chaque culot est resuspendu dans 400  $\mu$ L de tampon de lyse froid (100mM Hepes [pH 7,5] ; 20mM MgCl<sub>2</sub> ; 10%glycérol ; 10mM EGTA ; 0,1mM EDTA ; 0,4% NP40 ; 150mM NaCl ; 1mM PMSF ; 1mM benzamidine ; 1mM DTT ; 100 mM LABP ; 1mM Sodium Fluoride). Après l'ajout d'1ml de billes de verre froides (0,5mm de diamètre, Biospec), les cellules subissent une lyse mécanique ou broyage dans un *beadbeater* (Biospec) suivant 3 cycles de 30 secondes d'agitation à puissance maximale séparés de 2 min de refroidissement sur glace. Le fond des tubes est ensuite percé avec une aiguille de diamètre inférieur à celui des billes de verre et les lysats sont récupérés dans un nouveau tube Eppendorf par centrifugation de 5 min à 800g à 4°C. Une nouvelle centrifugation de 10 min à 5000g à 4°C est réalisée afin pour récupérer le surnageant contenant les protéines solubles et des fragments d'ADN de petite taille ( $\approx$ 1kbp). Un volume de 300  $\mu$ L d'extrait soluble est incubé en présence de 5  $\mu$ L de RNase à 0,015U/ $\mu$ L (Ribonucléase DNase free, 11119915001 Roche) et 1 $\mu$ L de DNase à 1U/ $\mu$ L (Desoxyribonuclease RNase free, D7291, Sigma) et 200 $\mu$ L de tampon de lyse supplémenté par 1mM PMSF, pendant 15 min à 4°C. Cette étape de digestion de l'ARN et de l'ADN est réalisée afin de ne garder que les interactions protéine-protéine et d'éliminer les faux positifs provenant des interactions protéine-ADN/ARN. La qualité de la digestion des acides nucléiques est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% et en présence de BET (pendant 30 min à 100V). À cette étape, 5 $\mu$ L de l'extrait protéique (= 5% du volume total) sont prélevés et

conservés sur glace afin de constituer la fraction « input » qui permettra de contrôler la taille de la protéine candidate par western blot.

La réaction de "pull-down" met en présence 180 µL de l'extrait protéique et 20µL de colonne GST ou GST-Ago1 par condition. Le mélange incube sous agitation orbitale (13 krpm) pendant 1h30 à 4°C Les colonnes sont lavées quatre fois dans 20 volumes de tampon de lyse (centrifugation de 2 min à 200g à 4°C) afin d'éliminer les interactions aspécifiques. Les protéines sont décrochées de la matrice et dénaturées par chauffage pendant 3 min à 95°C dans du tampon de charge (25% glycérol ; 312mM Tris-HCL [pH6,8] ; 10% SDS ; 25% βmercaptoéthanol ; 100mM DTT ; 0,05% bleu de bromophénol). A l'issue de cette étape, les échantillons peuvent être stockés à -20°C avant analyse du « pull-down » par western blot.

### **4.3 Western Blot**

Les extraits protéiques sont déposés sur gel d'acrylamide 6%-12% (selon la taille des protéines à analyser) dans du tampon de migration TGS 1X (Tris 3.025 g/L, glycine 14.4 g/L, SDS 1 g/L). Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) pendant 1h à 180V. Elles sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham) par électrotransfert liquide dans du TGS 0.5X contenant 20% d'éthanol. Pour prévenir la fixation non spécifique des anticorps, la membrane est saturée pendant 1h à température ambiante, dans une solution de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline : NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM) contenant du Tween20 à 0.1% (p/v) et 5% (p/v) de lait écrémé de vache en poudre. La détection des épitopes d'intérêt (**Tableau 9**) est réalisée pendant 1 h à température ambiante ou pendant 12 à 16h à 4°C, avec un volume de 5mL d'une dilution d'anticorps primaire provenant d'une souris ou d'un lapin (1% (v/v) solution de saturation, 0.1% (v/v) sérum de veau fœtal). Suite à 3 lavages de 5 min dans du PBS-NaCl, la membrane incube de nouveau 1 h à température ambiante avec une solution d'anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP (HRP : peroxydase de raifort ; Anti-souris polyclonal, P0447, Dako ; anti-lapin polyclonal, P0448 Dako) diluée au 1/5000ème dans la 1 % de solution de saturation. Suite à 3 lavages de 5 min dans du PBS-NaCl, l'activité enzymatique HRP est révélée par chimioluminescence (Kit ECL Amercham RPN2132) détectable par photographie (film

Amsham 43409). La taille des protéines détectées est estimée par un marqueur de taille co-migrant lors de l'électrophorèse (U6P\_0211 Eurogentec).

## 5 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

### 5.1 Principe

Anticorps	Dilution utilisée	Origine
anti-Ago1	1/700	Monoclonal lapin, Ab5070 Abcam
Anti-FLAG	1/2000	Monoclonal souris, F3165 Sigma
Anti-GFP	1/1000	Monoclonal souris, 11814460001 Roche
Anti-GST	1/20000	Monoclonal souris, GST.B-14 sc-138 Santa Cruz Biotechnology
Anti-mCherry	1/5000	polyclonal lapin, Ab183628 Abcam
Anti-c-myc	1/1000	Monoclonal souris 9E10, MMS-150P-200 Covance

**Tableau 9: Liste des principaux anticorps primaires utilisés dans cette étude, de leurs origines et des dilutions appropriées**

Remarque : L'anticorps anti GFP reconnaît également l'étiquette YFP.

La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) permet d'analyser l'interaction *in vivo* entre une protéine et une région d'intérêt du génome ou bien de déterminer la localisation spécifique dans le génome d'une modification d'histone. Les principales étapes sont les suivantes : 1) pontage covalent des protéines à l'ADN par un traitement au formaldéhyde, permettant ainsi de les immobiliser à l'endroit précis de leur interaction ; 2) lyse des cellules et fragmentation de la chromatine par sonication ; 3) immunoprécipitation de la protéine d'intérêt effectuée à l'aide d'un anticorps spécifique ; 4) purification de l'ADN éventuellement associé à la protéine d'intérêt ; 5) amplification sélective d'une séquence ADN par PCR pour analyser l'enrichissement de la protéine au niveau d'une localisation génomique particulière.

Les expériences de ChIP mentionnées dans ce manuscrit concernent l'immunoprécipitation de l'ADN polymérase de type II (RNA Pol II) et la di-méthylation de l'histone 3

au niveau de la lysine 9 (H3K9me<sub>2</sub>) qui constitue une marque d'hétérochromatine constitutive, dans des conditions d'activation ou non de la barrière *RTS1*.

## 5.2 Préparation et fixation des culots de culture de levures

Chaque souche de levures testée est mise en culture dans 100 mL de milieu liquide EMM-G en absence (barrière *RTS1* activé) et en présence de 60 µM thiamine (barrière *RTS1* inactive) de sorte à atteindre une DO600 de 1.3 à 1.5 en phase exponentielle de croissance au bout de 24h à 30°C. Les cultures sont fixées par un traitement au formaldéhyde 1% (p/v) final, pendant 15min sous agitation et à température ambiante. L'ajout de glycine à une concentration finale de 0,125M, suivi d'une incubation de 5min à température ambiante et sous agitation, permettent de neutraliser le formaldéhyde libre. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec 30mL de tampon TBS froid (Tris Buffered Saline : Tris-HCL pH=7.6 20mM, NaCl 150mM) et centrifugées 5 min à 800g et à 4°C. Les culots sont congelés instantanément dans de l'azote liquide et peuvent être conservés plusieurs mois à -80°C.

## 5.3 Lyse et sonication des cellules

Les culots de cellules sont resuspendus dans 400 µL de tampon de lyse froid (50mM Hepes-KOH [pH 7.5], 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium déoxycholate, 1mM PMSF, 1mM Benzamidine, 1µg/ml Leupeptine, 1µg/ml Bestatine, 1µg/ml Pepstatine, 1µg/ml Aprotinine). Après l'ajout d'1ml de billes de verre froides (0,5mm de diamètre, Biospec), les cellules subissent une lyse mécanique ou broyage dans un *beadbeater* (Biospec) suivant 3 cycles de 80 secondes d'agitation à puissance maximale séparés de 2 min de refroidissement sur glace. Le fond des tubes est ensuite percé avec une aiguille de diamètre inférieur à celui des billes de verre et les lysats sont récupérés par centrifugation de 5 min à 800g dans de nouveaux tubes Eppendorf. Chaque lysat subit huit cycles de 30 secondes de sonication à 240W dans un bain d'eau à 4°C et interrompus à chaque fois par 30 secondes de pause (Bioruptor, Diagenode). Cette étape de sonication génère des fragments d'ADN d'une taille moyenne de 150 à 600 nucléotides. Il s'en suit une centrifugation de 10 min à 16000g et

à 4°C permettant d'éliminer les débris cellulaires insolubles. À l'issue de cette étape, 20 µL du surnageant, soit 5% du volume total, sont collectés pour constituer la fraction « input » qui permet de contrôler d'une part l'homogénéité de la lyse et d'autre part, la qualité de la sonication par migration sur gel d'agarose 0.8. Le volume restant du surnageant est utilisé pour l'immunoprécipitation.

## **5.4 Immunoprécipitation**

L'immunoprécipitation des histones H3 dont la lysine 9 est diméthylée (H3K9me2) et de la RNA Pol II est réalisée respectivement avec 2µg d'anticorps anti-H3K9me2 (souris ; Abcam ; référence : ab1220 ; 1mg/ml) et anti-RNA Pol II (souris ; Abcam ; référence : ab817 ; 1mg/ml) pour 1µg de protéines totales (quantité estimée par dosage Bradford, Biorad). Le mélange est incubé 2h à 4°C sous agitation orbitale (13rpm). En parallèle, un échantillon identique pour chaque condition est incubé sans anticorps et sera utilisé pour déterminer le bruit de fond dû à la fixation résiduelle des ADN/protéines sur les billes de Sépharose. L'ajout de 20µL de billes de Sépharose couplées à la protéine A (4 Fast Flow, GE Healthcare) préalablement lavées 3 fois dans du tampon de lyse, permet d'immunoprécipiter le complexe associé à l'anticorps (*via* la reconnaissance du fragment Fc par la protéine A). Il s'en suit une série de lavages effectués pendant 5 min sous agitation douce et à température ambiante, incluant : deux lavages consécutifs dans 1ml de tampon de lyse, puis un seul dans 1ml de tampon de lavage (10mM Tris-HCl [pH8.0], 0.25M LiCl, 0.5% NP-40, 0,5% sodium déoxycholate, 1mM EDTA), et un dernier dans 1ml de tampon TE 1X (10mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA). Les protéines immunoprécipitées sont éluées de la Sépharose suite à l'ajout de 100µl de tampon d'éluion (50mM Tris-HCl [pH8.0], 10mM EDTA, 1% SDS) et d'une incubation de 20 min à 65°C. L'éluat, soit le surnageant, est récupéré après une centrifugation de 30sec à 12000g. Les billes sont de nouveau lavées avec 150µL de tampon TES (10mM Tris-Cl [pH8.0], 1mM EDTA, 0,67% SDS), et le surnageant récupéré est ajouté au précédent. Le pontage chimique au formaldéhyde est éliminé par chauffage des éluats à 65°C pendant une durée de 6 à 14h.

## 5.5 Purification de l'ADN immunoprécipité

La digestion des protéines est réalisée par l'ajout d'un volume de 200µl de tampon TE 1X contenant 100 µg de protéinase K (PCR Grade, Roche), suivi d'une incubation de 30 min à 65°C. L'ADN est alors purifié au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol selon une procédure similaire à celle décrite dans la section 2.2, mais avec l'utilisation de chlorure de lithium au lieu de l'acétate de sodium, car plus adapté aux fragments de petite taille. Les culots d'ADN sont remis en suspension dans 20µl de tampon TE 1X contenant 0.5 µg/ml de RNase (DNase free, Roche) et incubés 1h à 37°C pour digérer les ARN.

## 5.6 Analyse de l'ADN immunoprécipité par qPCR

Les régions génomiques d'intérêt sont amplifiées par PCR quantitative en utilisant l'appareil LightCycler480 (Roche). Les réactions d'amplification sont réalisées dans des plaques 96 puits et dans un volume final de 20 µL selon la composition suivante : 4µL d'une dilution au quart de l'ADN immunoprécipité, 1.2µL d'un mélange d'amorces spécifiques à 5µM chacune, 10 µL *MESA Blue Mastermix Plus SYBR* (Eurogentec) contenant la DNA Pol et les ions nécessaires à son bon fonctionnement, les dNTPs ainsi que le fluorochrome SYBR green (excitation à 492nm, émission à 516nm). Le SYBR green s'incorpore de manière non spécifique et homogène le long des ADN double brins. Son émission de fluorescence est augmentée lorsqu'il est sous forme intercalé, permettant un suivi de la quantité d'amplicons cycle après cycle (excitation et mesure de la fluorescence émise en fin de phase d'élongation après chaque cycle). Le programme de la qPCR débute par une étape de dénaturation de 10min à 95°C, suivi de 40 cycles d'amplification comprenant trois étapes successives de 15sec : dénaturation à 95°C, hybridation à 60°C et élongation à 72°C. Le programme se termine par une étape permettant d'établir la courbe de dissociation des amplicons de PCR, spécifique à chaque région amplifiée (1min 95°C ; 30sec 60°C ; 30sec 95°C). L'analyse des données s'effectue sur le programme du LightCycler480 (exor4) et a pour but d'extraire la valeur du seuil d'amplification linéaire appelé « Threshold Cycle » (Ct), correspondant au nombre minimal de cycles PCR permettant d'amplifier une région d'intérêt de manière linéaire. Pour chaque condition expérimentale, le niveau de Ct relatif à une région d'intérêt ou une région contrôle est d'abord corrigé pour s'affranchir du bruit de fond fourni par l'échantillon

initialement incubé en absence d'anticorps. Le niveau de Ct corrigé et élevé à la puissance 2 et relatif à la région d'intérêt est alors normalisé à celui de la région contrôle, afin de ne pas considérer la variabilité d'un échantillon d'ADN sur l'autre. Dans le cas de l'immunoprécipitation des histones H3 dont la lysine 9 est diméthylée (H3K9me2), la région contrôle utilisée correspond à celle codant pour la tubuline, un gène de ménage dont le niveau d'expression ne varie pas d'une condition à une autre et ne contenant pas de méthylation H3K9me2. Dans le cas de l'immunoprécipitation de la RNA Pol II, la région contrôle correspond à un gène codant pour un ARN de transfert dont la transcription implique la RNA Pol III et non la RNA Pol II.

## 6 Analyse des événements de glissements de réplication ou « replication slippage »

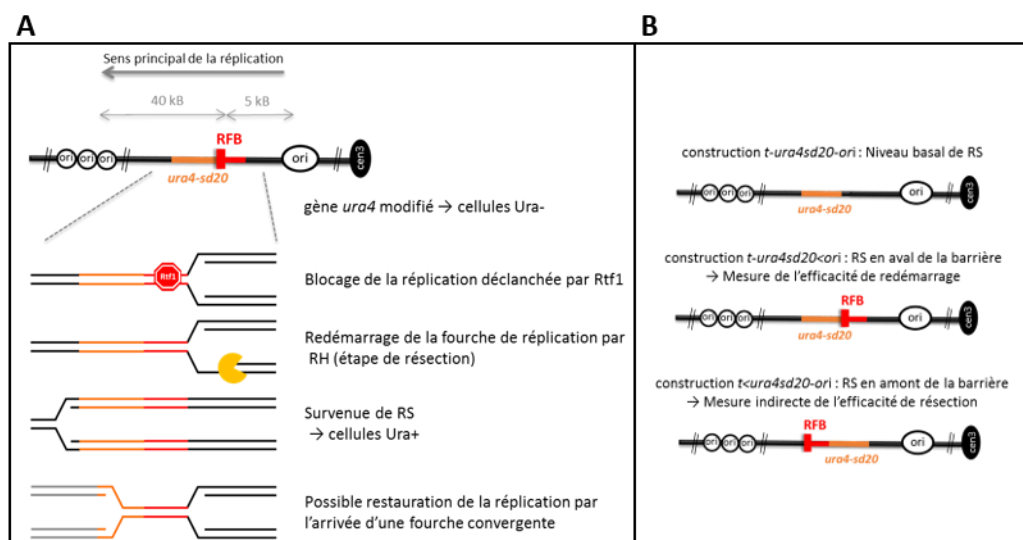
### 6.1 Principe de l'essai génétique

La reprise de la réplication par recombinaison homologue (HR), suite à un blocage de la progression de la fourche, est associée à une synthèse dysfonctionnelle d'ADN. Il en résulte des mutations et des événements de glissements de réplication ou « replication slippage » (RS ; Iraqui et al., *Plos One*, 2012). Ces derniers sont beaucoup plus susceptibles de se produire au niveau des régions flanquées par de la micro-homologie. La survenue de ces RS a permis de développer un essai génétique, dont l'objectif est de déterminer l'efficacité de redémarrage des fourches par la HR.

Cet essai se base sur l'exploitation de la barrière *RTS1-RFB* (*Replication Termination Sequence, Replication Fork Barrier*), existant naturellement au niveau de la région du mating type (chromosome II) chez *S. pombe* et introduite artificiellement au niveau du locus *ura4* sur le chromosome III. Il s'agit d'un site de pause naturel et programmé de la réplication permettant de bloquer la progression d'une fourche selon une direction donnée en fonction de l'orientation de la séquence RTS1. L'activité de RTS1-RFB est effective lorsque *Rtf1*, en interaction avec d'autres protéines, se fixe sur la séquence RTS1. Dans le système d'étude, l'activation de la barrière est inductible *via* le contrôle de l'expression de *Rtf1*. Le gène codant cette protéine est



en effet placé sous le contrôle du promoteur *nmt41* qui est répressible en présence de thiamine. Il en résulte ainsi deux états de la barrière : « RFB OFF » ou barrière inactive (présence de thiamine, *rtf1* réprimé) et « RFB ON » ou barrière active (absence de thiamine, *rtf1* exprimé). L'essai génétique se base également sur l'utilisation d'un système rapporteur permettant de suivre les événements de RS. Une forme non fonctionnelle du gène *ura4* appelée *ura4sd20*, a été intégrée à la place du gène sauvage. Cet allèle contient une duplication de 20 nt flanquée par 5 nt de micro-homologie, rendant les cellules détentrices de cet allèle auxotrophes pour l'uracile (phénotype Ura<sup>-</sup>). Suite au redémarrage des fourches de réplication par la HR, le glissement plus fréquent de l'ADN polymérase se traduit par la perte de la duplication de 20 nucléotides et la restauration d'un gène *ura4* fonctionnel (phénotype Ura<sup>+</sup> ; Iraqui et al., Plos One, 2012) ; Tsang et al., J. Cell Sci., 2014). La fréquence de réversion phénotypique (Ura<sup>-</sup> → Ura<sup>+</sup>) traduisant la survenue de RS est ainsi corrélée à la capacité de redémarrage de fourche par la HR (**Figure 57A**).



**Figure 57: Présentation du système *RTS1*-RFB**

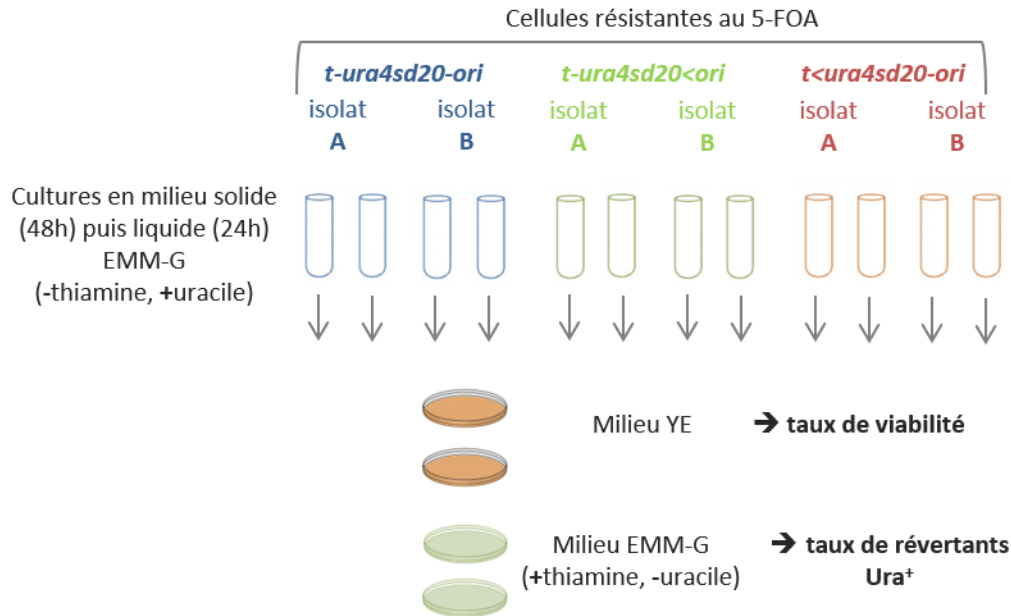
- A)** Principales étapes de la réparation après le blocage de la fourche de réplication par la protéine Rtf1. Voir texte pour plus de détails.
- B)** Schéma des différentes constructions utilisées pour le test génétique en vue d'évaluer l'efficacité du redémarrage de la fourche et de l'étape de résection. RFB : « Replication Fork Barrier ». RH : Recombinaison Homologue. RS : « Replication slippage » faisant référence au glissement de l'ADN polymérase



Le système *RTS1-RFB* au locus *ura4sd20* se décline sous plusieurs constructions en fonction de la position du gène rapporteur, ce qui permet d'analyser différents aspects du redémarrage de la fourche de réplication par HR, suite à l'activation de la barrière (**Figure 57B**). Quand l'allèle *ura4sd20* est placé en aval de la barrière *RTS1* (construction *t-ura4sd20<ori*), la fréquence des révertants phénotypiques permet la quantification globale de l'efficacité de redémarrage de la réplication par HR. Quand l'allèle est placé en amont de la barrière (construction *t<ura4sd20-ori*), la fréquence des révertants est indicative de l'efficacité de la résection de la fourche (étape primaire dans le processus de HR) suivie de son redémarrage. Afin d'apprécier l'efficacité de redémarrage de la réplication par HR dans les différents fonds génétiques, la fréquence des RS en condition de barrière active (« RFB ON ») est comparée au taux basal de RS, qui est déterminé à partir d'une construction dépourvue de la séquence *RTS1* (*t-ura4sd20-ori*).

## 6.2 Protocole expérimental

L'intégrité des résultats fournis par l'essai génétique doit être garantie par l'utilisation de souches de phénotype initial Ura<sup>-</sup>. Pour éliminer les possibles révertants de phénotype Ura<sup>+</sup>, les cellules sont d'abord sélectionnées sur du milieu solide contenant du 5-FOA. Les cellules résistantes au 5-FOA sont ensuite cultivées pendant 48 h sur un milieu solide l'EMM-G supplémenté en acide aminés (dont l'uracile) et en absence de thiamine afin d'activer la barrière *RTS1-RFB* (**Figure 58**) Elles sont ensuite inoculées dans un milieu liquide de même nature (avec uracile et sans thiamine) et cultivées pendant 24 h. Des dilutions appropriées de cellules sont ensuite déposées à la fois sur du milieu solide YE pour déterminer la viabilité de chaque souche, et sur milieu solide EMM-G supplémenté contenant de la thiamine mais dépourvu d'uracile, pour estimer le taux de révertants phénotypiques. Les colonies sont dénombrées après une incubation à 30°C durant 5 à 7 jours. La fréquence de révertants Ura<sup>+</sup> est indicative de celle des événements de RS. Elle s'exprime en nombre d'événements par 10<sup>5</sup> cellules et est calculée en prenant en compte le taux de viabilité déterminé à partir des colonies ayant poussé sur milieu YE.



**Figure 58: Schéma de la procédure expérimentale d'analyse des "replication slippage"**

Il est à noter que pour chaque type de construction, deux isolats biologiques ont été analysés. Suite à la sélection par le 5-FOA, chacun de ces isolats a donné lieu à deux cultures indépendantes en milieu solide puis liquide EMM-G supplémenté (dont uracile) dépourvu de thiamine. Une dilution appropriée de chacune de ces cultures a été déposée à la fois sur deux boîtes de milieu solide YE ou EMM-G supplémenté (-uracile, +thiamine).

## 7 Gels d'ADN bidimensionnels (2DGE)

### 7.1 Principe de la méthode

Les fragments d'ADN qui résultent d'un clivage par des enzymes de restriction de type endonucléases et issus d'une population de cellules en cours de phase S, ne sont pas tous linéaires. Ils sont de conformation différente selon qu'ils possèdent ou non une origine de réplication et selon l'état d'avancement des fourches de réplication. Si le fragment d'ADN en cours de duplication (appelé aussi intermédiaire de réplication) comprend une origine de réplication, il adoptera une structure de type « bulle ». S'il n'en possède pas, il adoptera une structure de type « Y ».

La technique des gels d'ADN bidimensionnels ou 2DGE permet de différencier les intermédiaires de réplication des molécules d'ADN linéaire et de les distinguer selon leur taille

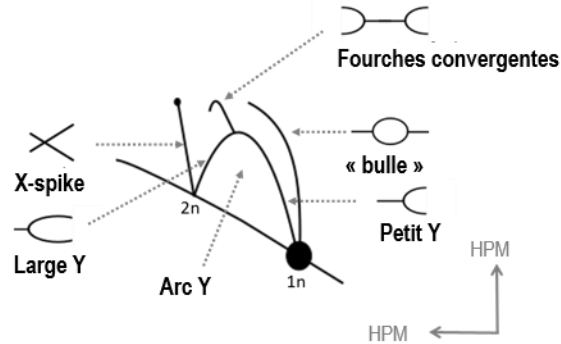
et leur conformation. Elle a été très utile pour cartographier les origines de réplication (Brewer et Fangman, *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1991) et identifier les barrières de réplication (*replication fork barrier*, RFB ; Brewer & Fangman, *Cell*, 1987 ; Linskens & Huberman, *Mol. Cell. Biol.*, 1988).

Dans les travaux présentés dans ce manuscrit, les cellules ont été traitées au tri-méthyl psoralène (TMP), un agent photoactivable qui s'intercale au niveau de l'ADN double brin. L'exposition aux UVA (365 nm) provoque une réaction de cycloaddition du TMP intercalé avec les bases thymines (T) et adénines (A), conduisant à la formation d'un monocycloadduit entre ces bases. Il en résulte une réticulation ou pontage des deux brins d'ADN, permettant ainsi de « figer » les intermédiaires de réplication. Il est à noter que l'activation du TMP diminue l'efficacité de digestion par les enzymes de restriction lorsque leurs sites de coupure sont riches en bases A et T. Il en résulte donc souvent des digestions partielles. Pour maintenir le plus possible l'intégrité des intermédiaires de réplication, les ADN génomiques sont inclus dans des « plugs » ou « blocs » d'agarose. À l'issue de plusieurs étapes détaillées dans les sections suivantes, les intermédiaires de réplifications sont enrichis et séparés selon deux électrophorèses consécutives. La première permet de les séparer en fonction de leur masse, en s'effectuant à faible voltage dans un gel d'agarose faiblement concentré (0,35-0,4%) et en absence de BET. La seconde migration se déroule selon une direction perpendiculaire à la première, dans un gel d'agarose plus concentré (0,9-1%) et en utilisant un fort voltage (200V). Elle s'effectue en présence de BET, ce qui va permettre de distinguer les fragments en fonction de leur taille mais aussi de leur structure. À l'issue de ces étapes, l'ADN est transféré sur une membrane de nylon par *Southern Blot*. Celle-ci est ensuite mise en contact avec une sonde spécifique radioactive en vue de révéler les intermédiaires de réplication issus d'une région génomique donnée.

Les expériences de 2DGE mentionnées dans ce manuscrit concernent les analyses des intermédiaires de réplication : i) au niveau des rDNAs qui ont été réalisées par le Dr LAMBERT (Institut Curie) et ii) au niveau de la barrière *RTSI*-RFB que j'ai réalisées dans le laboratoire du Dr. LAMBERT.

Le protocole ci-dessous de préparation des intermédiaires de réplication, fournit les détails techniques liés aux expérimentations que j'ai réalisées en utilisant le système *RTSI*-RFB.

## 7.2 Interprétation des signaux obtenus suite à l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE



**Figure 59: Schéma d'interprétation des signaux observés sur l'autoradiogramme suite à l'analyse des intermédiaires de réplication par 2DGE**

Se référer au texte principal pour la description des signaux. Les flèches en bas à droite du schéma indiquent le sens de migration des molécules à haut poids moléculaire (HPM).

La révélation des fragments d'ADN par autoradiographie suite à une hybridation avec la sonde appropriée, laisse apparaître plusieurs populations, comme représentées sur la (**Figure 59**) :

- Les signaux 1n et 2n correspondent respectivement aux formes linéaires monomérique et dimérique, autrement dit non répliquées et répliquées, du fragment de restriction analysé ;
- L'arc apparaissant en bas de l'autoradiogramme, et passant par les positions 1n et 2n, correspond à des molécules d'ADN qui ne sont pas en cours de réplication, et qui résultent entre autres, de digestion partielles ou aspécifiques.
- Le « bubble arc » correspond aux intermédiaires de réplication qui contiennent une origine de réplication. Ce signal reflète les différentes étapes de progression des fourches émanant de cette origine ;
- L'arc des Y ou « Y-arc » correspond à une série d'intermédiaires de réplication adoptant une structure de type « Y ». Il reflète les différentes étapes de progression d'une fourche de réplication circulant d'un bout à l'autre du fragment analysé. Le pont d'inflexion signifie que la fourche a répliqué la moitié du fragment de restriction. De part et d'autre de ce point, on caractérise les intermédiaires de réplication de type « Small-Y » ou « Large-Y » ;

- Le signal qui s'étend vers le haut de l'autoradiogramme, à partir du point d'inflexion correspond aux intermédiaires de réplication formés par des fourches convergentes.
- Le signal X-spike émanant de la position 2n, se réfère à des molécules qui ne sont pas en cours de réplication. Il correspond aux molécules d'ADN jointes qui adoptent une structure en « X », et qui peuvent résulter, par exemple, des processus de recombinaison.

### 7.3 Conditions expérimentales de cultures (système *RTS1*-RFB)

Les cellules sont d'abord mises en culture liquide dans de l'EMM-G supplémenté en acide aminés (adénine, uracile, leucine et lysine) contenant de la thiamine à une concentration finale de 60  $\mu$ M permettant de réprimer l'expression de *Rtf1*. À l'issue de deux lavages à l'eau, les cellules sont de nouveau mises en culture liquide pendant 24 h dans du milieu EMM-G supplémenté contenant ou non de 60  $\mu$ M thiamine et donnant ainsi lieu respectivement à deux types de milieu : milieu « RFB OFF » (*rtf1* réprimé) et milieu « RFB ON » (*rtf1* exprimé).

### 7.4 Pontage de l'ADN génomique

Un volume de 250 mL de culture liquide phase exponentielle de croissance ( $\approx 2.5 \times 10^9$  cellules) est traité avec 0.1% final d'azide sodium et 80 mM final d'EDTA froid (agitation vigoureuse pendant une dizaine de secondes) afin d'arrêter la croissance cellulaire. Les cellules sont ensuite collectées suite à une centrifugation de 10 min à 3000 rpm et à 4°C, lavées dans de l'eau froide, puis reprises dans 20 mL d'eau froide et transvasées dans des boîtes de pétri en verre déposées sur glace. La réticulation de l'ADN (et la fixation des intermédiaires de réplication) est effectuée par une incubation des cellules avec une concentration finale de 0,2mg/ml de TMP (contenu dans de l'éthanol) pendant 5 min à l'abri de la lumière, suivie de d'une exposition à une dose de 45kJ/m<sup>2</sup> d'UV-A (365nm, débit de 0,5kJ/m<sup>2</sup>/s) pendant 90 secondes sous agitation.

### 7.5 Préparation des sphéroblastes

Après centrifugation et lavage dans du tampon SP1 froid (1,2M sorbitol, 50mM citrate phosphate, 40mM EDTA [pH 5,6]), la paroi des cellules est digérée par 0.5 mg/mL de

zymolyase 100T (Amsbio, 120493-1) et 0.625 mg/mL de « lysing enzyme » (Sigma Aldrich, L1412) dissous dans 2 mL de tampon SP1, pendant 15 min à 37°C. Après collecte par une centrifugation d'une min à 8000 g et à 4°C, les sphéroblastes (levures dépourvues de paroi) sont mélangés à 0.5% final d'agarose « low melting » dissous dans du tampon SP1 (Incert Agarose, Lonza). L'ensemble est réparti selon une densité de  $1,5 \cdot 10^8$  cellules par aliquots de 200 µl, pour prendre masse dans moules (minimum 30 min à 4°C) et former des « blocs » ou « plugs » d'agarose. Cette immobilisation des sphéroblastes dans de l'agarose facilite leur manipulation, et permet surtout de préserver l'intégrité structurale des intermédiaires de réplication, qui pourrait être fragilisée par une manipulation en milieu liquide. Les plugs incubent sur la nuit à 55°C dans du tampon de digestion DB (1% lauryl-sarcosine, 25mM EDTA [pH 8]) contenant 1mg/ml protéinase K (Euromedex, EU0090), afin de permettre la dégradation des protéines. À l'issue de quatre lavages d'environ 1 h chacun dans du TE 50X (50mM EDTA [pH 8], 10mM Tris-HCl [pH 7,5]) à 4°C, les plugs sont conservés sur la nuit dans le même tampon à 4°C.

## **7.6 Préparation des échantillons l'ADN génomique**

Les plugs subissent de nouveau plusieurs séries de lavages : i) quatre lavages d'une heure chacun dans du tampon TE 1X froid (1mM EDTA pH8, 10mM Tris-HCl pH 7,5) à 4°C, ii) un lavage d'une heure dans le tampon de restriction 2X (NEBbuffer 3, Biolabs) à 4°C, et iii) un dernier lavage d'une heure dans le tampon de restriction 1X (NEBbuffer 3, Biolabs) à 4°C. L'ADN génomique est ensuite fragmenté en incubant les plugs, durant toute une nuit à 37°C, avec l'enzyme AseI (NEB, R0526M) en utilisant par plug, 100 µl de tampon de restriction 1X contenant 60 unités d'enzyme. Le lendemain, la même quantité d'enzyme AseI est ajoutée pour 3h à 37°C. Ces temps d'incubation très longs avec l'enzyme de restriction s'expliquent par le fait que la vitesse et la quantité de diffusion de l'enzyme au sein de l'agarose est plus limitée que dans un mélange liquide. La fragmentation de l'ADN génomique est contrôlée sur des aliquots par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% en présence de BET. Les plugs sont ensuite mis à fondre pendant 5 min à 70°C. L'agarose est ensuite digérée par ajout de 2 unités/plug de β-agarase (NEB, M0392L) pendant 1 h à 37°C. Cette étape se fait de manière concomitante avec la digestion des ARN par 20 µg/plug de RNase A (Roche, 11119915001). Suite à une

centrifugation de 2 min à 14000 rpm et à 4°C, le surnageant contenant les fragments d'ADN est récupéré et la concentration en sel est ajustée à 300 mM avec du NaCl filtré.

## **7.7 Enrichissement et purification des intermédiaires de réplication**

Les intermédiaires de réplication ont été enrichis sur des colonnes de BND-Cellulose (BND, Benzoylated Naphthoylated DEAE) qui sont préparées selon la procédure suivante. Une quantité adaptée BND-cellulose (Sigma, B6385) est dissoute à température ambiante et pendant au moins 4 h dans du tampon d'équilibration (300mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA pH 8), de sorte à pouvoir répartir le mélange final en fraction de 5 mL contenant 0.5g de BND-cellulose, dans chaque colonne de chromatographie Poly-Prep (Biorad). Après addition du mélange, les colonnes sont lavées trois fois avec 1 mL de tampon d'équilibration.

Les échantillons d'ADN sont déposés sur les colonnes, éluées avec des tampons différents en fonction de leur structure. La colonne de BND-cellulose présente une affinité plus forte pour les fragments contenant de l'ADN simple brin (dont les intermédiaires de réplication) que pour ceux contenant uniquement de l'ADN double brin. Ce type de régions sera donc élué par l'utilisation une concentration plus forte en sels et l'adjonction de caféine qui agit comme un compétiteur. La majorité de l'ADN double-brin est élué par ajout de tampon DS (0,8M NaCl, 10mM Tris-HCl [pH 7,5], 1mM EDTA) en 3 fractions d'un volume total de 3mL (0,5 ml; 2ml et 0.5ml). Les régions enrichies en ADN simple brin sont éluées par ajout de tampon SS (1M NaCl, 10mM Tris-HCl [pH 7,5], 1mM EDTA, 1,8% (p/v) caféine) en 4 fractions d'un volume total de 3mL (0.5 ml, 2X 1 ml et 0.5 ml). Un aliquot de 20 µL est prélevé à chaque fraction et l'ensemble est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% afin d'identifier les fractions contenant l'ADN enrichi en simple brin. L'ADN contenu dans celles-ci est alors précipité pendant au moins 1 h à 4°C, avec un volume d'isopropanol froid en présence de 0,2 mg/ml de glycogène (Roche, 10901393001) et 0.1 M de potassium acétate ([pH 5.2] tamponné avec l'acide acétique). Après une centrifugation de 20 min à vitesse maximale et à 4°C et séchage, les culots sont resuspendus dans 10 µL de tampon TEN (10mM NaCl, 10mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1mM EDTA) et incubent 1 h à température ambiante.

## 7.8 Séparations des intermédiaires de réplication par électrophorèse bidimensionnelle

Les échantillons sont séparés une première fois en fonction de leur masse par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.35 %, sans présence de BET et dans du tampon de migration TBE, et ce, pendant 24 h à 50 V et à température ambiante. Après coloration du gel au BET (6 µg/mL) pendant 30 min, chaque profil de migration est coupé suivant la longueur, sous exposition aux UVA (365nm). Les « bandes d'agarose » ainsi obtenues sont utilisées pour préparer le second gel d'agarose (4 bandes par gel). Elles sont disposées de sorte à ce que la migration de l'ADN se fasse dans le sens perpendiculaire à la première dimension. Les échantillons sont séparés une seconde fois en fonction de leur masse et de leur structure, par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.9 %, en présence de BET (5 µg/mL) et dans du tampon de migration TBE, et ce, pendant 9 h à 200 V et en chambre froide.

## 7.9 Réversion du pontage et *Southern Blot*

À l'issue de la deuxième électrophorèse, le pontage au TMP est réversé en exposant le gel à une dose de 5,555 kJ/m<sup>2</sup> d'UV-C (254nm) pendant 10 min (0,925 mW/cm<sup>2</sup>). Cette étape est cruciale afin que les molécules d'ADN puissent se transférer sur la membrane lors du Southern Blot. Puis le gel subit différentes incubations comme suit : i) dépurination de l'ADN dans un bain acide (HCl 0,25N) pendant 15 min, en vue de le fragmenter et de faciliter le transfert ; ii) dénaturation de l'ADN dans un bain basique (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) pendant 20 min, afin de permettre l'hybridation ultérieure des sondes ; iii) neutralisation du gel par trempage dans un tampon Tris-NaCl (1M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,4) pendant 20 min. Le transfert des ADN du gel vers une membrane de nylon (GeneScreen Plus® Hybridization, Perkin Elmer, NEF988001PK) s'effectue sur la nuit par capillarité dans une solution SSC (10X) à haute teneur en sel. Une fois le transfert fini, la membrane est équilibrée dans du SSC (2X) pendant 5 min à 10 min et rincée à l'eau distillée. L'absence de signal sur le gel indiquant que le transfert s'est bien déroulé, est vérifiée sous UV. La membrane est ensuite hybridée avec la sonde *ura4* (1kb) radio-marquée au P32 comme décrit de la manière suivante. La membrane est incubée dans un tampon commercial de pré-hybridation (ULTRAhyb™, Invitrogen, AM8669) pendant au moins 30 min à 42°C, en constante rotation. Ce tampon contient des agents de blocage et des



d'accélérateurs d'hybridation qui permettent de faire apparaître les signaux plus rapidement. La sonde marquée est ensuite rajoutée directement dans la solution de pré-hybridation et la membrane incubée toute la nuit à 42°C. La membrane est soumise à quatre lavages de 20 min à 65°C. Les deux premiers sont effectués avec une solution SSC 2X contenant 1% (v/v) de SDS et les suivants avec une solution SSC 0.1X contenant 0.1% (v/v) de SDS. Les signaux radioactifs sont exposés et détectés avec l'appareil phosphor-imager (logiciel Typhoon-trio). L'analyse des images (quantification des signaux) a été réalisée avec le logiciel ImageQuant (GE healthcare).

*Note sur la préparation de la sonde radio-marquée :*

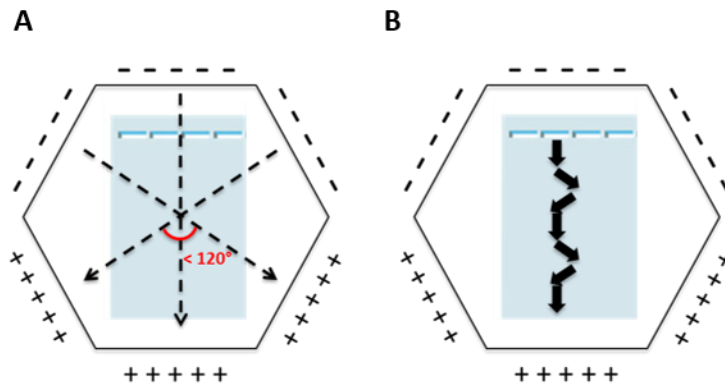
Les amorces sont synthétisées au cours d'une réaction de polymérisation permettant l'incorporation de désoxycytidines triphosphates marquées au niveau de leur groupe phosphate alpha avec du P32 ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ). Le kit « DNA labelling, Amersham Rediprime II™ DNA Labelling System » (RPN1633) est utilisé à cet effet. L'amorce sujette au marquage est diluée à une concentration de 2.5 à 25 ng dans 45  $\mu\text{L}$  de tampon TE (10 mM Tris HCl pH8.0, 1 mM EDTA) fourni. Elle est dénaturée pendant 5 min à 95°C, puis est incubée pendant 10 min à 37°C en présence de 5  $\mu\text{L}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (3000 Ci/mmol). La réaction est arrêtée par ajout de 5  $\mu\text{L}$  d'EDTA 0.2M. La sonde marquée est ensuite séparée des nucléotides radioactifs libres par filtration sur colonne G-50 MicroSpin illustra (GE Life Science, 27-5330-01) selon le protocole du fournisseur.

## **8 Électrophorèse sur gel en champ pulsé (PGFE)**

### **8.1 Principe de la méthode**

A partir de 50 kb, la mobilité d'une molécule d'ADN ne dépend plus de sa longueur. L'électrophorèse classique perd alors tout pouvoir résolutif de séparation. L'électrophorèse sur gel en champ pulsé (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) permet de résoudre ce problème, en préservant l'intégrité des grandes molécules d'ADN. Cette technique se base sur l'application d'un champ électrique périodique qui alterne entre trois orientations orthogonales

en utilisant les mêmes paramètres de voltage et de fréquence (**Figure 60**). Afin d'améliorer la résolution, il est préconisé de recourir à : (i) un gel d'agarose faiblement concentré (inférieur à 1%) ; (ii) un angle directionnel inférieur à  $120^\circ$  ; (iii) un faible de voltage en contrepartie d'un temps de migration très long (supérieur à 24h).



**Figure 60: Schéma de la migration en PFGE sur gel d'agarose**

- A) Orientations des champs électriques allant chacun de la cathode (-) vers l'anode (+). Il est préférable que l'angle global de migration soit inférieur à  $120^\circ$  afin d'améliorer la résolution séparative des molécules d'ADN.
- B) Profil de migration d'une molécule d'ADN (représentée par la flèche pleine) en fonction de la direction du champ électrique.

Dans le cadre de mon projet de thèse, l'utilisation du PFGE a permis la séparation des chromosomes de *S. pombe*, en vue d'analyser leur taille (chapitre 1 de la section résultat) ou leur contenu en ADN (chapitre 2 de la section résultat). Dans le premier cas, le PFGE a été suivi d'une expérience de *Southern Blot* afin de quantifier des séquences d'ADN d'intérêt en utilisant des sondes radioactives spécifiques. Dans le second cas, le cycle cellulaire des cellules a été synchronisé en début de phase S, par le biais d'un traitement à l'hydroxyurée (concentration finale de 20 mM) pendant 4 ou 5 h. Cette drogue a été retirée par aspiration avant procéder au PFGE, tel que décrit dans la section suivante. L'ensemble des expérimentations a été réalisée par Karine Fréon (Institut Curie, équipe du Dr. LAMBERT).

## 8.2 Protocole expérimental

Une culture de 30 mL de levure à une concentration de  $1.10^7$  cellules/mL est centrifugée 5 min à 5000g à température ambiante. Les cellules sont lavées une première fois dans 30 mL de tampon froid d'EDTA 50 mM pH8 puis dans 30 mL de tampon CSE froid (20 mM citrate/phosphate pH 5.6, 1.2 M sorbitol, 40 mM EDTA). Leurs parois cellulaires sont digérées par la lyticase à une concentration finale de 200  $\mu$ g/mL dans 5 mL de tampon CSE, et ce pendant 45 min à 25°C. Après collecte, le culot est resuspendu dans 200 à 400  $\mu$ l de tampon TSE (10 mM tris-Hcl pH 7.5, 0.9 M sorbitol, 45 mM EDTA) puis mélangé au même volume d'agarose 1% p/v contenu dans du tampon TSE. Cette immobilisation des sphéroblastes dans de l'agarose facilite leur manipulation et permet surtout de préserver l'intégrité structurelle des chromosomes, qui pourraient autrement se fragmenter lors d'une manipulation en milieu liquide. L'ensemble est réparti en aliquots de 80  $\mu$ l pour prendre masse dans des moules et former des « blocs » ou « plugs » d'agarose. Les sphéroblastes (levures dépourvues de paroi) sont ensuite digérés pendant 90 min à 55°C en incubant les *plugs* avec 0,5 mL de tampon de lyse par plug (0.25 M EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS). Il s'en suit deux étapes de lavages de 24 h chacune à 55°C (1% v/v lauryl sarcosyl, 0.5 M EDTA [pH 9.5], 0.5 mg/ml protéinase K). Les *plugs* sont finalement insérés dans les puits du gel d'agarose à 0.8% (un *plug* par puit) avant d'être soumis à électrophorèse en champ pulsé pendant 48 h, dans du tampon TAE 1X, en utilisant l'appareil Bio-Rad CHEF Mapper. La migration s'effectue selon les paramètres suivants : (i) temps de pulsation de 1800 sec, (ii) champ électrique de 2V/ cm, (iii) angle de migration de 100°, iv) à 14°C. Pour terminer, le gel d'agarose est incubé pendant 30 min dans du TAE contenant 0.5  $\mu$ g/ml de BET en vue de révéler les signaux d'ADN.

Concernant l'analyse du contenu en ADN ribosomal, les gels de migration ont été transférés sur une membrane de nylon chargée positivement (NEF988001PK, GeneScreen Plus Hybridization Transfer Membrane (30cm x3m)), puis sondé avec des sondes radioactives appropriées.

## 9 Analyse du contenu génomique nucléaire par cytométrie de flux

Les expériences mentionnées dans ce manuscrit ont été réalisées par Karine Fréon (Institut Curie, équipe du Dr. LAMBERT), en suivant le protocole décrit dans la publication scientifique de Sabatinos et Forsburg, *Methods in Molecular Biology, DNA Replication*, vol. 521, 2009.

Les cellules issues d'un volume de 1 mL de culture en phase exponentielle de croissance ont été collectées et fixées dans de l'éthanol froid à une concentration finale de 70%. Elles sont ensuite lavées deux fois dans 1mL de citrate de sodium [pH 7,5] à 50 mM, en ayant recours à une centrifugation de 5 min à 3000g et à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées pendant une nuit à 37°C en présence de 0.5 mL solution de la solution de citrate de sodium contenant 0.1 mg/mL RNase (Sigma, R5503). Les suspensions sont soniquées pendant deux cycles de 30 sec suivis de 15 sec de pause, à forte puissance et ce, afin dissocier les agrégats cellulaires (Bioruptor). La coloration d'acides nucléiques est réalisée par l'ajout de 2 µM final de Sytox Green (Invitrogen, S7020) dilué dans 0.5 mL de solution de citrate de sodium. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube approprié à l'expérimentation (ceux-ci sont conservés sur glace et protégés de la lumière). Elles sont ensuite analysées par cytométrie de flux en utilisant l'appareil FACS CALibur (BD Biosciences) et en suivant les instructions recommandées.

## 10 Microscopie sur cellules vivantes

### 10.1 Travaux de comparaison des localisations en foci nucléaires des protéines candidates étiquetées YFP avec Tas3-CFP ou mCherry-Swi6

La construction des souches ainsi que les analyses subséquentes ont été réalisées par le Dr. Cyril BOYAULT. Nous avons utilisé des souches de *S. pombe* provenant d'une banque de souches commerciale et exprimant les candidats fusionnés à l'étiquette YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). Nous les avons modifiées en leur ajoutant soit l'étiquette CFP-FLAG-

Histidine<sub>6</sub> (*Cyan Fluorescent Protein*) à l'extrémité 3' du gène *tas3*, soit l'étiquette mCherry à l'extrémité 5' du gène *swi6*.

Un volume de 5 mL de culture en phase logarithmique de croissance dans du milieu EMMc supplémenté entre autres avec de l'histidine mais dépourvu de leucine, a été centrifugé à faible vitesse (10000 rpm pendant 10 sec) puis re-suspendu dans 20 µl d'eau filtrée. Environ 5 µl sont déposés sur lame. L'observation a été réalisée à l'aide du microscope plein champ AxioImager M2 (Zeiss) couplé à la caméra CDD Orca R2 N/B (Hamamatsu). Les cellules vivantes ont été visualisées selon un plan sur plusieurs champs avec un objectif plan-Achromat DICIII 63X/1.4 à immersion (WD 190, DIC pour *Differential Interference Contrast*) et avec les filtres à épifluorescence YFP, CFP et mCherry (excitation par lampe HBO 100W). L'acquisition a été réalisée en utilisant le logiciel Axiovision. Le logiciel ICY ([icy.bioimageanalysis.org](http://icy.bioimageanalysis.org)) en combinaison avec le *plugin* Image J du logiciel FIJI (de Jerome Mutterer, CNRS, and Edda Zinck, HTW) ont été utilisés pour assembler les images représentatives de microscopie.

## 10.2 Travaux de comparaison des localisations en foci nucléaires des protéines Tas3-GFP et Swi6-mCherry

Un volume de 5 mL de culture en phase logarithmique de croissance dans du milieu EMMc supplémenté a été centrifugé à faible vitesse (10000 rpm pendant 10 sec) puis re-suspendu dans 20 µl de milieu EMM non supplémenté. Environ 5 µl sont déposés sur lame préalablement préparée (agarose 1,4% dans EMM non supplémenté et filtré). L'observation a été réalisée à l'aide du microscope confocal Spinning Disk (Andromeda, TILL-FEI) couplé à un module de photomanipulation et excitation par onde évanescente TIRF, et à la caméra EMCCD (iXion 897). L'appareil est équipé, entre autres, de de plusieurs lasers diodes et DPSS et d'un monochromateur PolychromeV (lampe Xénom 150W). Les cellules vivantes ont été visualisées avec l'objectif alpha-Plan-Achromat 63X/1.46 à immersion (Oil Korr M27, WD 0.1 mm). Une pile de 40 images (Z-stack) séparées par 250 µm de hauteur a été prise sur plusieurs champs après excitation par les lasers appropriés. L'acquisition a été réalisée en utilisant les logiciels LA et *off-line* OA.

Chaque champ a été analysé plan par plan avec le logiciel FIJI en vue de dénombrer les foyers Swi6-mCherry et Tas3-GFP. Un dénombrement automatisé a été réalisé à l'aide d'un

## *Matériel et méthodes*

outil informatique ou *plugin* créé par le Dr. Arnold FERTIN de la plateforme TIMC-IMAG, et vérifié par une analyse visuelle.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## *Références Bibliographiques*

1. Agrawal, N. et al. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 657–685 (2003).
2. Aguado, L. C. et al. Homologous recombination is an intrinsic defense against antiviral RNA interference. *PNAS* 115, E9211–E9219 (2018).
3. Aguilera, A. & García-Muse, T. R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability. *Molecular Cell* 46, 115–124 (2012).
4. Ai, X. & Parthun, M. R. The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly. *Mol. Cell* 14, 195–205 (2004).
5. Ait Saada, A., Lambert, S. A. E. & Carr, A. M. Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair* 71, 135–147 (2018).
6. Ait-Saada, A. et al. Chromatin remodeler Fft3 plays a dual role at blocked DNA replication forks. *Life Sci Alliance* 2, (2019).
7. Alberts, B. et al. DNA Replication Mechanisms. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition (2002).
8. Alfredsson-Timmings, J., Henningson, F. & Bjerling, P. The Clr4 methyltransferase determines the subnuclear localization of the mating-type region in fission yeast. *J. Cell. Sci.* 120, 1935–1943 (2007).
9. Allis, C. D. & Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* 17, 487–500 (2016).
10. Allshire, R. C., Nimmo, E. R., Ekwall, K., Javerzat, J. P. & Cranston, G. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev.* 9, 218–233 (1995).
11. Allshire, R. C. & Ekwall, K. Epigenetic Regulation of Chromatin States in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, (2015).
12. Alver, R. C., Chadha, G. S., Gillespie, P. J. & Blow, J. J. Reversal of DDK-Mediated MCM Phosphorylation by Rif1-PP1 Regulates Replication Initiation and Replisome Stability Independently of ATR/Chk1. *Cell Reports* 18, 2508–2520 (2017).
13. Anastasov, N. et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiat Oncol* 7, 206 (2012).
14. Antequera, F., Boyes, J. & Bird, A. High levels of De Novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62, 503–514 (1990).
15. Aravin, A. A., Hannon, G. J. & Brennecke, J. The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race. *Science* 318, 761–764 (2007).



16. Aravin, A. A. et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol. Cell* 31, 785–799 (2008).
17. Arcangioli, B. A site- and strand-specific DNA break confers asymmetric switching potential in fission yeast. *The EMBO Journal* 17, 4503–4510 (1998).
18. Aria, V. & Yeeles, J. T. P. Mechanism of Bidirectional Leading-Strand Synthesis Establishment at Eukaryotic DNA Replication Origins. *Molecular Cell* 73, 199–211.e10 (2019).
19. Aronica, L. et al. Study of an RNA helicase implicates small RNA–noncoding RNA interactions in programmed DNA elimination in Tetrahymena. *Genes Dev* 22, 2228–2241 (2008).
20. Aronica, L. et al. The spliceosome-associated protein Nrl1 suppresses homologous recombination-dependent R-loop formation in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 44, 1703–1717 (2016).
21. Autexier, C. & Lue, N. F. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 493–517 (2006).
22. Aylon, Y., Liefshitz, B. & Kupiec, M. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.* 23, 4868–4875 (2004).
23. Aymard, F. et al. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 21, 366–374 (2014).
24. Ayoub, N. et al. A Novel jmjC Domain Protein Modulates Heterochromatization in Fission Yeast. *Mol Cell Biol* 23, 4356–4370 (2003).
25. Azvolinsky, A., Dunaway, S., Torres, J. Z., Bessler, J. B. & Zakian, V. A. The *S. cerevisiae* Rrm3p DNA helicase moves with the replication fork and affects replication of all yeast chromosomes. *Genes Dev.* 20, 3104–3116 (2006).
26. Azvolinsky, A., Giresi, P. G., Lieb, J. D. & Zakian, V. A. Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 34, 722–734 (2009).
27. Bähler, J. et al. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943–951 (1998).
28. Bai, Y. & Symington, L. S. A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 10, 2025–2037 (1996).
29. Bakhom, S. F. et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 553, 467–472 (2018).
30. Baltimore, D. Retroviruses and Retrotransposons: The role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* 40, 481–482 (1985).

31. Barckmann, B. et al. The somatic piRNA pathway controls germline transposition over generations. *Nucleic Acids Res.* 46, 9524–9536 (2018).
32. Barnitz, J. T., Cramer, J. H., Rownd, R. H., Cooley, L. & Söll, D. Arrangement of the ribosomal RNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters* 143, 129–132 (1982).
33. Barraud, P. et al. An extended dsRBD with a novel zinc-binding motif mediates nuclear retention of fission yeast Dicer. *The EMBO journal* 30, 4223–35 (2011).
34. Barry, E. R. & Bell, S. D. DNA replication in the archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 876–887 (2006).
35. Bastia, D. et al. Phosphorylation of CMG helicase and Tof1 is required for programmed fork arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E3639-3648 (2016).
36. Bastia, D., Zzaman, S. & Mohanty, B. K. Site-Directed Mutagenesis and Yeast Reverse 2-Hybrid-Guided Selections to Investigate the Mechanism of Replication Termination. *Genetic Manipulation of DNA and Protein - Examples from Current Research* (2013) doi:10.5772/39064.
37. Baum, M. & Clarke, L. Fission yeast homologs of human CENP-B have redundant functions affecting cell growth and chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2852–2864 (2000).
38. Baxter, J. & Diffley, J. F. X. Topoisomerase II Inactivation Prevents the Completion of DNA Replication in Budding Yeast. *Molecular Cell* 30, 790–802 (2008).
39. Bayne, E. H. et al. Stc1: a critical link between RNAi and chromatin modification required for heterochromatin integrity. *Cell* 140, 666–677 (2010).
40. Beach, D. H. Cell type switching by DNA transposition in fission yeast. *Nature* 305, 682–688 (1983).
41. Behm-Ansmant, I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885–1898 (2006).
42. Behm-Ansmant, I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885–1898 (2006).
43. Beisel, C. & Paro, R. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 12, 123–135 (2011).
44. Bénard, M., Maric, C. & Pierron, G. DNA Replication-Dependent Formation of Joint DNA Molecules in *Physarum polycephalum*. *Molecular Cell* 7, 971–980 (2001).
45. Bermudez, V. P., Farina, A., Tappin, I. & Hurwitz, J. Influence of the human cohesion establishment factor Ctf4/AND-1 on DNA replication. *J. Biol. Chem.* 285, 9493–9505 (2010).

46. Bernard, P. et al. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 294, 2539–2542 (2001).
47. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363 (2001).
48. Bernstein, E. et al. Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics* 35, 215 (2003).
49. Bethea, D. et al. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *Journal of Dermatological Science* 19, 78–88 (1999).
50. Bi, X. Heterochromatin structure: Lessons from the budding yeast. *IUBMB Life* 66, 657–666 (2014).
51. Billi, A. C. Endogenous RNAi pathways in *C. elegans* (May 7, 2014), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.170.1, <http://www.wormbook.org>.
52. Bisht, K. K., Arora, S., Ahmed, S. & Singh, J. Role of heterochromatin in suppressing subtelomeric recombination in fission yeast. *Yeast* 25, 537–548 (2008).
53. Biswas, D., Takahata, S. & Stillman, D. J. Different Genetic Functions for the Rpd3(L) and Rpd3(S) Complexes Suggest Competition between NuA4 and Rpd3(S). *Molecular and Cellular Biology* 28, 4445–4458 (2008).
54. Biswas, S. & Bastia, D. Mechanistic insights into replication termination as revealed by investigations of the Reb1-Ter3 complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6844–6857 (2008).
55. Bleichert, F., Botchan, M. R. & Berger, J. M. Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Science* 355, eaah6317 (2017).
56. Bochman, M. L. & Schwacha, A. The Mcm Complex: Unwinding the Mechanism of a Replicative Helicase. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 652–683 (2009).
57. Brady, C. A. & Attardi, L. D. p53 at a glance. *J Cell Sci* 123, 2527–2532 (2010).
58. Brambati, A. et al. Dormant origins and fork protection mechanisms rescue sister forks arrested by transcription. *Nucleic Acids Res.* 46, 1227–1239 (2018).
59. Brandsma, I. & Gent, D. C. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr* 3, 9 (2012).
60. Branzei, D. & Foiani, M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 208–219 (2010).
61. Braun, C. J. et al. p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res.* 68, 10094–10104 (2008).

62. Brennecke, J. et al. An Epigenetic Role for Maternally Inherited piRNAs in Transposon Silencing. *Science* 322, 1387–1392 (2008).
63. Brewer, B. J., Lockshon, D. & Fangman, W. L. The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell* 71, 267–276 (1992).
64. Broadus, M. R. & Gould, K. L. Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Mol Biol Cell* 23, 4118–4128 (2012).
65. Brouwer, J. R., Willemsen, R. & Oostra, B. A. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays* 31, 71–83 (2009).
66. Brower-Toland, B. et al. Drosophila PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev.* 21, 2300–2311 (2007).
67. Brown, C. J. et al. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 71, 527–542 (1992).
68. Bühler, M., Haas, W., Gygi, S. P. & Moazed, D. RNAi-dependent and -independent RNA turnover mechanisms contribute to heterochromatic gene silencing. *Cell* 129, 707–721 (2007).
69. Bühler, M., Spies, N., Bartel, D. P. & Moazed, D. TRAMP-mediated RNA surveillance prevents spurious entry of RNAs into the *Schizosaccharomyces pombe* siRNA pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1015–1023 (2008).
70. Bühler, M., Verdel, A. & Moazed, D. Tethering RITS to a Nascent Transcript Initiates RNAi- and Heterochromatin-Dependent Gene Silencing. *Cell* 125, 873–886 (2006).
71. Buker, S. M. et al. Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 200–207 (2007).
72. Burger, K. et al. Nuclear phosphorylated Dicer processes double-stranded RNA in response to DNA damage. *J Cell Biol* 216, 2373–2389 (2017).
73. Burgers, P. M. J. & Kunkel, T. A. Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annu Rev Biochem* 86, 417–438 (2017).
74. Burkhalter, M. D. & Sogo, J. M. rDNA Enhancer Affects Replication Initiation and Mitotic Recombination: Fob1 Mediates Nucleolytic Processing Independently of Replication. *Molecular Cell* 15, 409–421 (2004).
75. Callegari, A. J. & Kelly, T. J. Coordination of DNA damage tolerance mechanisms with cell cycle progression in fission yeast. *Cell Cycle* 15, 261–273 (2015).
76. Cam, H. P. et al. Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nature Genetics* 37, 809–819 (2005).

77. Canzio, D. et al. Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Mol. Cell* 41, 67–81 (2011).
78. Carmell, M. A. et al. MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Developmental Cell* 12, 503–514 (2007).
79. Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. & Hannon, G. J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2733–2742 (2002).
80. Carmichael, J. B., Provost, P., Ekwall, K. & Hobman, T. C. Ago1 and Dcr1, Two Core Components of the RNA Interference Pathway, Functionally Diverge from Rdp1 in Regulating Cell Cycle Events in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 15, 1425–1435 (2004).
81. Castel, S. E. & Martienssen, R. A. RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet* 14, 100–112 (2013).
82. Castel, S. E. et al. Dicer promotes transcription termination at sites of replication stress to maintain genome stability. *Cell* 159, 572–583 (2014).
83. Catalanotto, C. et al. Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2536–2545 (2004).
84. Cayrou, C. et al. New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle* 11, 658–667 (2012).
85. Cecere, G. & Cogoni, C. Quelling targets the rDNA locus and functions in rDNA copy number control. *BMC Microbiol* 9, 44 (2009).
86. Cejka, P. et al. DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* 467, 112–116 (2010).
87. Cenik, E. S. et al. Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease. *Mol. Cell* 42, 172–184 (2011).
88. Cha, H. J. et al. Identification of ionizing radiation-responsive microRNAs in the IM9 human B lymphoblastic cell line. *International Journal of Oncology* 34, 1661–1668 (2009).
89. Cha, R. S. & Kleckner, N. ATR Homolog Mec1 Promotes Fork Progression, Thus Averting Breaks in Replication Slow Zones. *Science* 297, 602–606 (2002).
90. Chakraborty, A. et al. Classical non-homologous end-joining pathway utilizes nascent RNA for error-free double-strand break repair of transcribed genes. *Nat Commun* 7, (2016).
91. Chang, S.-S., Zhang, Z. & Liu, Y. RNA Interference Pathways in Fungi: Mechanisms and Functions. *Annu Rev Microbiol* 66, 305–323 (2012).
92. Chang, T.-C. et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell* 26, 745–752 (2007).

- 93.Chanoux, R. A. et al. ATR and H2AX Cooperate in Maintaining Genome Stability under Replication Stress. *J. Biol. Chem.* 284, 5994–6003 (2009).
- 94.Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* 47, 497–510 (2012).
- 95.Chen, E. S. et al. Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature* 451, 734–737 (2008).
- 96.Chen, H., Lisby, M. & Symington, L. S. RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Mol Cell* 50, (2013).
- 97.Chen, X. et al. The Fun30 nucleosome remodeller promotes resection of DNA double-strand break ends. *Nature* 489, 576–580 (2012).
- 98.Chen, Z., Li, S., Subramaniam, S., Shyy, J. Y.-J. & Chien, S. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annual Review of Biomedical Engineering* 19, 195–219 (2017).
- 99.Chendrimada, T. P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744 (2005).
- 100.Cheung, A. L. M. & Deng, W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front. Biosci.* 13, 2075–2090 (2008).
- 101.Chilkova, O. et al. The eukaryotic leading and lagging strand DNA polymerases are loaded onto primer-ends via separate mechanisms but have comparable processivity in the presence of PCNA. *Nucleic Acids Res.* 35, 6588–6597 (2007).
- 102.Choudhuri, S. From Waddington’s epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21, 252–274 (2011).
- 103.Chowdhury, D., Choi, Y. E. & Brault, M. E. Charity begins at home: non-coding RNA contributes to DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 181–189 (2013).
- 104.Ciccia, A. & Elledge, S. J. The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179–204 (2010).
- 105.Cleveland, D. W., Mao, Y. & Sullivan, K. F. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407–421 (2003).
- 106.Codlin, S. & Dalgaard, J. Z. Complex mechanism of site-specific DNA replication termination in fission yeast. *EMBO J* 22, 3431–3440 (2003).
- 107.Cogoni, C. et al. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The EMBO Journal* 15, 3153–3163 (1996).



108. Cogoni, C. & Macino, G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399, 166–169 (1999).
109. Coleman, T. R., Carpenter, P. B. & Dunphy, W. G. The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell* 87, 53–63 (1996).
110. Collins, N. et al. An ACF1–ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet* 32, 627–632 (2002).
111. Colmenares, S. U., Buker, S. M., Buhler, M., Dlakić, M. & Moazed, D. Coupling of Double-Stranded RNA Synthesis and siRNA Generation in Fission Yeast RNAi. *Molecular Cell* 27, 449–461 (2007).
112. Colosio, A., Frattini, C., Pellicanò, G., Villa-Hernández, S. & Bermejo, R. Nucleolytic processing of aberrant replication intermediates by an Exo1-Dna2-Sae2 axis counteracts fork collapse-driven chromosome instability. *Nucleic Acids Res* 44, 10676–10690 (2016).
113. Comings, D. E. Arrangement of chromatin in the nucleus. *Hum Genet* 53, 131–143 (1980).
114. Cooper, G. M. DNA Replication. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition (2000).
115. Cortez, D. Replication-Coupled DNA Repair. *Molecular Cell* 74, 866–876 (2019).
116. Costantino, L. & Koshland, D. Genome-wide Map of R-Loop-Induced Damage Reveals How a Subset of R-Loops Contributes to Genomic Instability. *Molecular Cell* 71, 487–497.e3 (2018).
117. Costelloe, T. et al. The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodellers promote DNA end resection. *Nature* 489, 581–584 (2012).
118. Coulon, S. et al. Rad22Rad52-dependent Repair of Ribosomal DNA Repeats Cleaved by Slx1-Slx4 Endonuclease. *Mol Biol Cell* 17, 2081–2090 (2006).
119. Counter, C. M. et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11, 1921–1929 (1992).
120. Cowieson, N. P., Partridge, J. F., Allshire, R. C. & McLaughlin, P. J. Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr. Biol.* 10, 517–525 (2000).
121. Cromie, G. & Smith, G. R. Meiotic Recombination in *Schizosaccharomyces pombe*: A Paradigm for Genetic and Molecular Analysis. *Genome dynamics and stability* 3, 195 (2008).
122. Cueille, N. et al. Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *Journal of Cell Science* 114, 2649–2664 (2001).
123. Czech, B. & Hannon, G. J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 12, 19–31 (2011).

124. Czech, B. & Hannon, G. J. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem. Sci.* 41, 324–337 (2016).
125. D'Alessandro, G. & d'Adda di Fagagna, F. Transcription and DNA Damage: Holding Hands or Crossing Swords? *Journal of Molecular Biology* 429, 3215–3229 (2017).
126. D'Alessandro, G. et al. BRCA2 controls DNA:RNA hybrid level at DSBs by mediating RNase H2 recruitment. *Nat Commun* 9, 5376 (2018).
127. d'Adda di Fagagna, F. A direct role for small non-coding RNAs in DNA damage response. *Trends in Cell Biology* 24, 171–178 (2014).
128. D'Alessandro, G. & di Fagagna, F. d'Adda. Long non-coding RNA in the control of genome stability and cancer phenotypes. *Non-coding RNA Investigation* 2, (2018).
129. Dai, J., Chuang, R.-Y. & Kelly, T. J. DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *PNAS* 102, 337–342 (2005).
130. Dalgaard, J. Z. & Klar, A. J. S. *swi1* and *swi3* Perform Imprinting, Pausing, and Termination of DNA Replication in *S. pombe*. *Cell* 102, 745–751 (2000).
131. Dalgaard, J. Z., Godfrey, E. L. & MacFarlane, R. J. Eukaryotic Replication Barriers: How, Why and Where Forks Stall. *DNA Replication - Current Advances* (2011) doi:10.5772/20383.
132. Dalgaard, J. Z. & Klar, A. J. S. A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at *mat1* in *S. pombe*. *Genes Dev* 15, 2060–2068 (2001).
133. Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. & Sogo, J. M. Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 2331–2338 (1993).
134. Dana, H. et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci* 13, 48–57 (2017).
135. Dauban, L. et al. Quantification of the dynamic behaviour of ribosomal DNA genes and nucleolus during yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Structural Biology* 208, 152–164 (2019).
136. Davidson, M. K., Shandilya, H. K., Hirota, K., Ohta, K. & Wahls, W. P. Atf1-Pcr1-M26 Complex Links Stress-activated MAPK and cAMP-dependent Protein Kinase Pathways via Chromatin Remodeling of *cgs2+*. *J Biol Chem* 279, 50857–50863 (2004).
137. Davis, A. J. & Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2, 130–143 (2013).
138. de Koning, L. Chromatin assembly factors and heterochromatin organization during cell proliferation, tumorigenesis and in quiescence. 251.



139. De Piccoli, G. et al. Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. *Mol. Cell* 45, 696–704 (2012).
140. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010–1022 (2011).
141. Debatisse, M. & Rosselli, F. A journey with common fragile sites: From S phase to telophase. *Genes, Chromosomes and Cancer* 58, 305–316 (2019).
142. Debeauchamp, J. L. et al. Chp1-Tas3 interaction is required to recruit RITS to fission yeast centromeres and for maintenance of centromeric heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2154–2166 (2008).
143. Deem, A. et al. Break-Induced Replication Is Highly Inaccurate. *PLOS Biology* 9, e1000594 (2011).
144. Dehé, P.-M. & Cooper, J. P. Fission yeast telomeres forecast the end of the crisis. *FEBS Letters* 584, 3725–3733 (2010).
145. Deshpande, G. P. et al. Screening a genome-wide *S. pombe* deletion library identifies novel genes and pathways involved in genome stability maintenance. *DNA Repair (Amst.)* 8, 672–679 (2009).
146. Dewar, J. M., Low, E., Mann, M., Räsche, M. & Walter, J. C. CRL2Lrr1 promotes unloading of the vertebrate replisome from chromatin during replication termination. *Genes Dev.* 31, 275–290 (2017).
147. Dewar, J. M. & Walter, J. C. Mechanisms of DNA replication termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 507–516 (2017).
148. Díaz-Cuervo, H. & Bueno, A. Cds1 Controls the Release of Cdc14-like Phosphatase Flp1 from the Nucleolus to Drive Full Activation of the Checkpoint Response to Replication Stress in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* 19, 2488–2499 (2008).
149. Dickey, J. S. et al. H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma* 118, 683–692 (2009).
150. Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J. & Rowley, A. Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell* 78, 303–316 (1994).
151. Dimude, J. U., Midgley-Smith, S. L., Stein, M. & Rudolph, C. J. Replication Termination: Containing Fork Fusion-Mediated Pathologies in *Escherichia coli*. *Genes (Basel)* 7, (2016).
152. Dion, V. & Gasser, S. M. Chromatin Movement in the Maintenance of Genome Stability. *Cell* 152, 1355–1364 (2013).
153. Djupedal, I. et al. Analysis of small RNA in fission yeast; centromeric siRNAs are potentially generated through a structured RNA. *EMBO J* 28, 3832–3844 (2009).

154. Djupedal, I. et al. RNA Pol II subunit Rpb7 promotes centromeric transcription and RNAi-directed chromatin silencing. *Genes Dev.* 19, 2301–2306 (2005).
155. Doksani, Y., Bermejo, R., Fiorani, S., Haber, J. E. & Foiani, M. Replicon dynamics, dormant origin firing, and terminal fork integrity after double-strand break formation. *Cell* 137, 247–258 (2009).
156. Dominska, M. & Dykxhoorn, D. M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci* 123, 1183–1189 (2010).
157. Dosil, M. Ribosome Synthesis-Unrelated Functions of the Preribosomal Factor Rrp12 in Cell Cycle Progression and the DNA Damage Response. *Molecular and Cellular Biology* 31, 2422–2438 (2011).
158. Downs, J. A. et al. Binding of Chromatin-Modifying Activities to Phosphorylated Histone H2A at DNA Damage Sites. *Molecular Cell* 16, 979–990 (2004).
159. Downs, J. A., Lowndes, N. F. & Jackson, S. P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001–1004 (2000).
160. Du, Z., Lee, J. K., Tjhen, R., Stroud, R. M. & James, T. L. Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: a conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2391–2396 (2008).
161. Durand-Dubief, M. & Ekwall, K. Heterochromatin tells CENP-A where to go. *Bioessays* 30, 526–529 (2008).
162. Durkin, S. G. & Glover, T. W. Chromosome Fragile Sites. *Annual Review of Genetics* 41, 169–192 (2007).
163. Durut, N. & Mittelsten Scheid, O. The Role of Noncoding RNAs in Double-Strand Break Repair. *Front. Plant Sci.* 10, (2019).
164. Dutta, C. et al. The DNA Replication Checkpoint Directly Regulates MBF-Dependent G1/S Transcription. *Mol Cell Biol* 28, 5977–5985 (2008).
165. Eapen, V. V., Sugawara, N., Tsabar, M., Wu, W.-H. & Haber, J. E. The *Saccharomyces cerevisiae* Chromatin Remodeler Fun30 Regulates DNA End Resection and Checkpoint Deactivation. *Molecular and Cellular Biology* 32, 4727–4740 (2012).
166. Ekwall, K. et al. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* 269, 1429–1431 (1995).
167. El-Shami, M. et al. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* 21, 2539–2544 (2007).

168. Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498 (2001).
169. Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188–200 (2001).
170. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20, 6877–6888 (2001).
171. Elgin, S. C. R. & Reuter, G. Position-Effect Variegation, Heterochromatin Formation, and Gene Silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, (2013).
172. Elkayam, E. et al. The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell* 150, 100–110 (2012).
173. Emmerth, S. et al. Nuclear retention of fission yeast dicer is a prerequisite for RNAi-mediated heterochromatin assembly. *Dev. Cell* 18, 102–113 (2010).
174. Eydmann, T. et al. Rtf1-Mediated Eukaryotic Site-Specific Replication Termination. *Genetics* 180, 27–39 (2008).
175. Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* 79, 351–379 (2010).
176. Falk, M. et al. Heterochromatin drives compartmentalization of inverted and conventional nuclei. *Nature* 1 (2019) doi:10.1038/s41586-019-1275-3.
177. Fangman, W. L. & Brewer, B. J. Activation of Replication Origins within Yeast Chromosomes. *Annual Review of Cell Biology* 7, 375–402 (1991).
178. Fantes, P. A. & Hoffman, C. S. A Brief History of *Schizosaccharomyces pombe* Research: A Perspective Over the Past 70 Years. *Genetics* 203, 621–629 (2016).
179. Fazly, A. et al. Histone chaperone Rtt106 promotes nucleosome formation using (H3-H4)<sub>2</sub> tetramers. *J. Biol. Chem.* 287, 10753–10760 (2012).
180. Fedele, M. & Fusco, A. Non-Histone Chromatin Proteins. in *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* 1299–1301 (Springer, 2006). doi:10.1007/3-540-29623-9\_2690.
181. Fernandes, J. C. R., Acuña, S. M., Aoki, J. I., Floeter-Winter, L. M. & Muxel, S. M. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Noncoding RNA* 5, (2019).
182. Ferreira, M. G. & Cooper, J. P. Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev.* 18, 2249–2254 (2004).
183. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806 (1998).

184. Fischer, T. et al. Diverse roles of HP1 proteins in heterochromatin assembly and functions in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8998–9003 (2009).
185. Fishman-Lobell, J., Rudin, N. & Haber, J. E. Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol* 12, 1292–1303 (1992).
186. Fleck, O. DNA repair. *Journal of Cell Science* 117, 515–517 (2004).
187. Fodor, B. D., Shukeir, N., Reuter, G. & Jenuwein, T. Mammalian Su(var) Genes in Chromatin Control. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 471–501 (2010).
188. Fortune, J. M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* DNA Polymerase  $\delta$  HIGH FIDELITY FOR BASE SUBSTITUTIONS BUT LOWER FIDELITY FOR SINGLE- AND MULTI-BASE DELETIONS. *J. Biol. Chem.* 280, 29980–29987 (2005).
189. Fournier, L.-A., Kumar, A. & Stirling, P. C. Chromatin as a Platform for Modulating the Replication Stress Response. *Genes (Basel)* 9, (2018).
190. Fox, M. E., Yamada, T., Ohta, K. & Smith, G. R. A family of cAMP-response-element-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 156, 59–68 (2000).
191. Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P. & Méchali, M. DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 360–374 (2015).
192. Francia, S. Non-Coding RNA: Sequence-Specific Guide for Chromatin Modification and DNA Damage Signaling. *Front Genet* 6, (2015).
193. Francia, S., Cabrini, M., Matti, V., Oldani, A. & d’Adda di Fagagna, F. DICER, DROSHA and DNA damage response RNAs are necessary for the secondary recruitment of DNA damage response factors. *J. Cell. Sci.* 129, 1468–1476 (2016).
194. Francia, S. et al. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA damage response. *Nature* 488, 231–235 (2012).
195. Franco-Zorrilla, J. M. et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* 39, 1033–1037 (2007).
196. French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M. & Beyer, A. L. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1558–1568 (2003).
197. Freudenthal, B. D., Beard, W. A., Shock, D. D. & Wilson, S. H. Observing a DNA Polymerase Choose Right from Wrong. *Cell* 154, 157–168 (2013).

- 198.Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105 (2009).
- 199.Fu, N. et al. Role of LncRNA-activated by Transforming Growth Factor Beta in the Progression of Hepatitis C Virus-related Liver Fibrosis. *Discovery Medicine* 22, 29–42 (2016).
- 200.Fukuda, K. et al. Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 270, 22527–22534 (1995).
- 201.Fukuura, M. et al. CDK promotes interactions of Sld3 and Drc1 with Cut5 for initiation of DNA replication in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 22, 2620–2633 (2011).
- 202.Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S. & Yanagida, M. Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J. Cell Biol.* 121, 961–976 (1993).
- 203.Gadaleta, M. C. & Noguchi, E. Regulation of DNA Replication through Natural Impediments in the Eukaryotic Genome. *Genes* 8, 98 (2017).
- 204.Gagnon, K. T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B. A. & Corey, D. R. RNAi Factors are Present and Active in Human Cell Nuclei. *Cell Rep* 6, 211–221 (2014).
- 205.Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* 15, 276–289 (2015).
- 206.Galupa, R. & Heard, E. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* 31, 57–66 (2015).
- 207.Gambus, A. et al. A key role for Ctf4 in coupling the MCM2-7 helicase to DNA polymerase alpha within the eukaryotic replisome. *EMBO J.* 28, 2992–3004 (2009).
- 208.Ganai, R. A. & Johansson, E. DNA Replication—A Matter of Fidelity. *Molecular Cell* 62, 745–755 (2016).
- 209.Gangloff, S. & Arcangioli, B. DNA repair and mutations during quiescence in yeast. *FEMS Yeast Research* 17, (2017).
- 210.Ganier, O., Prorok, P., Akerman, I. & Méchali, M. Metazoan DNA replication origins. *Current Opinion in Cell Biology* 58, 134–141 (2019).
- 211.Ganley, A. R. D. & Kobayashi, T. Ribosomal DNA and cellular senescence: new evidence supporting the connection between rDNA and aging. *FEMS Yeast Res* 14, 49–59 (2014).
- 212.Gao, M. et al. Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Cell Res* 24, 532–541 (2014).
- 213.Gao, Z. et al. An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 465, 106–109 (2010).

214. Garabedian, M. V. et al. The Double-Bromodomain Proteins Bdf1 and Bdf2 Modulate Chromatin Structure to Regulate S-Phase Stress Response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 190, 487–500 (2012).
215. Garbacz, M. A. et al. Evidence that DNA polymerase  $\delta$  contributes to initiating leading strand DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun* 9, 1–11 (2018).
216. García-Muse, T. & Aguilera, A. Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 553–563 (2016).
217. Garg, P., Stith, C. M., Sabouri, N., Johansson, E. & Burgers, P. M. Idling by DNA polymerase delta maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication. *Genes Dev.* 18, 2764–2773 (2004).
218. Gasser, S. M. & Cockell, M. M. The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 279, 1–16 (2001).
219. Gerace, E. L., Halic, M. & Moazed, D. The Methyltransferase Activity of Clr4Suv39h Triggers RNAi Independently of Histone H3K9 Methylation. *Molecular Cell* 39, 360–372 (2010).
220. Ghildiyal, M. & Zamore, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94–108 (2009).
221. Giannattasio, M. & Branzei, D. DNA Replication Through Strand Displacement During Lagging Strand DNA Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes* 10, 167 (2019).
222. Gioia, U. & di Fagagna, F. d’Adda. Human nuclear ARGONAUTE 2 interacts in vivo only with small RNAs and not with DNA. *Cell Cycle* 14, 2001–2002 (2015).
223. Glover, T. W., Berger, C., Coyle, J. & Echo, B. DNA polymerase  $\alpha$  inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* 67, 136–142 (1984).
224. Gómez, E. B., Nugent, R. L., Laria, S. & Forsburg, S. L. *Schizosaccharomyces pombe* Histone Acetyltransferase Mst1 (KAT5) Is an Essential Protein Required for Damage Response and Chromosome Segregation. *Genetics* 179, 757–771 (2008).
225. Gómez-Escoda, B. & Wu, P.-Y. J. Roles of CDK and DDK in Genome Duplication and Maintenance: Meiotic Singularities. *Genes (Basel)* 8, (2017).
226. Gómez-Escoda, B. & Wu, P.-Y. J. The organization of genome duplication is a critical determinant of the landscape of genome maintenance. *Genome Res.* 28, 1179–1192 (2018).
227. Gonzalez, M. & Li, F. DNA replication, RNAi and epigenetic inheritance. *Epigenetics* 7, 14–19 (2012).
228. Goto, D. B. & Nakayama, J. RNA and epigenetic silencing: Insight from fission yeast. *Dev Growth Differ* 54, 129–141 (2012).



- 229.Grallert, B. & Nurse, P. The ORC1 homolog orp1 in fission yeast plays a key role in regulating onset of S phase. *Genes Dev.* 10, 2644–2654 (1996).
- 230.Grand, R. S. et al. Chromosome conformation maps in fission yeast reveal cell cycle dependent sub nuclear structure. *Nucleic Acids Res* 42, 12585–12599 (2014).
- 231.Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. & Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631–640 (2005).
- 232.Grewal, S. I. S. & Elgin, S. C. R. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399–406 (2007).
- 233.Grewal, S. I. S. & Jia, S. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* 8, 35–46 (2007).
- 234.Gromak, N. et al. Droscha Regulates Gene Expression Independently of RNA Cleavage Function. *Cell Rep* 5, 1499–1510 (2013).
- 235.Groth, A. et al. Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* 318, 1928–1931 (2007).
- 236.Gu, S., Jin, L., Huang, Y., Zhang, F. & Kay, M. A. Slicing-Independent RISC Activation Requires the Argonaute PAZ Domain. *Current Biology* 22, 1536–1542 (2012).
- 237.Guan, L. et al. Sap1 is a replication-initiation factor essential for the assembly of pre-replicative complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 292, 6056–6075 (2017).
- 238.Gullerova, M., Moazed, D. & Proudfoot, N. J. Autoregulation of convergent RNAi genes in fission yeast. *Genes Dev* 25, 556–568 (2011).
- 239.Gullerova, M. & Proudfoot, N. J. Cohesin Complex Promotes Transcriptional Termination between Convergent Genes in *S. pombe*. *Cell* 132, 983–995 (2008).
- 240.Gullerova, M. & Proudfoot, N. J. Convergent transcription induces transcriptional gene silencing in fission yeast and mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1193–1201 (2012).
- 241.Gunawardane, L. S. et al. A Slicer-Mediated Mechanism for Repeat-Associated siRNA 5' End Formation in *Drosophila*. *Science* 315, 1587–1590 (2007).
- 242.Haag, J. R. & Pikaard, C. S. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 483–492 (2011).
- 243.Halic, M. & Moazed, D. Transposon Silencing by piRNAs. *Cell* 138, 1058–1060 (2009).
- 244.Halic, M. & Moazed, D. Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell* 140, 504–516 (2010).

- 245.Hall, I. M., Noma, K. & Grewal, S. I. S. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 193–198 (2003).
- 246.Hall, I. M. et al. Establishment and Maintenance of a Heterochromatin Domain. *Science* 297, 2232–2237 (2002).
- 247.Hamilton, A. J. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 286, 950–952 (1999).
- 248.Hamilton, E. P. et al. Structure of the germline genome of *Tetrahymena thermophila* and relationship to the massively rearranged somatic genome. *eLife* 5, e19090 (2016).
- 249.Hammond, C. M., Strømme, C. B., Huang, H., Patel, D. J. & Groth, A. Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 141–158 (2017).
- 250.Han, J. et al. Ubiquitylation of FACT by the cullin-E3 ligase Rtt101 connects FACT to DNA replication. *Genes Dev.* 24, 1485–1490 (2010).
- 251.Hanawalt, P. C. Historical Perspective on the DNA Damage Response. *DNA Repair (Amst)* 36, 2–7 (2015).
- 252.Handy, D. E., Castro, R. & Loscalzo, J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation* 123, 2145–2156 (2011).
- 253.Hansen, K. R., Ibarra, P. T. & Thon, G. Evolutionary-conserved telomere-linked helicase genes of fission yeast are repressed by silencing factors, RNAi components and the telomere-binding protein Taz1. *Nucleic Acids Res* 34, 78–88 (2006).
- 254.Hanson, S. J. & Wolfe, K. H. An Evolutionary Perspective on Yeast Mating-Type Switching. *Genetics* 206, 9–32 (2017).
- 255.Hardy, J. et al. Histone deposition plays an active role in recombination-dependent replication to balance genome 2 stability upon replication stress. *bioRxiv* 303305 (2018) doi:10.1101/303305.
- 256.Harigaya, Y. et al. Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442, 45–50 (2006).
- 257.Harigaya, Y. & Yamamoto, M. Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Res.* 15, 523–537 (2007).
- 258.Hartono, S. R. et al. The Affinity of the S9.6 Antibody for Double-Stranded RNAs Impacts the Accurate Mapping of R-Loops in Fission Yeast. *Journal of Molecular Biology* 430, 272–284 (2018).
- 259.Hauptmann, J. et al. Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 814–817 (2013).



- 260.Hawley, B. R., Lu, W.-T., Wilczynska, A. & Bushell, M. The emerging role of RNAs in DNA damage repair. *Cell Death Differ* 24, 580–587 (2017).
- 261.Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S. & Masai, H. Mrc1 marks early-firing origins and coordinates timing and efficiency of initiation in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2380–2391 (2011).
- 262.He, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130–1134 (2007).
- 263.He, X.-J. et al. NRPD4, a protein related to the RPB4 subunit of RNA polymerase II, is a component of RNA polymerases IV and V and is required for RNA-directed DNA methylation. *Genes Dev.* 23, 318–330 (2009).
- 264.He, X.-J. et al. NRPD4, a protein related to the RPB4 subunit of RNA polymerase II, is a component of RNA polymerases IV and V and is required for RNA-directed DNA methylation. *Genes Dev* 23, 318–330 (2009).
- 265.He, X.-J., Ma, Z.-Y. & Liu, Z.-W. Non-Coding RNA Transcription and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis. *Molecular Plant* 7, 1406–1414 (2014).
- 266.He, X.-J., Ma, Z.-Y. & Liu, Z.-W. Non-Coding RNA Transcription and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis. *Molecular Plant* 7, 1406–1414 (2014).
- 267.Helleday, T., Eshtad, S. & Nik-Zainal, S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet* 15, 585–598 (2014).
- 268.Heller, R. C. et al. Eukaryotic origin-dependent DNA replication in vitro reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. *Cell* 146, 80–91 (2011).
- 269.Herr, A. J., Jensen, M. B., Dalmay, T. & Baulcombe, D. C. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118–120 (2005).
- 270.Herrera-Moyano, E., Mergui, X., García-Rubio, M. L., Barroso, S. & Aguilera, A. The yeast and human FACT chromatin-reorganizing complexes solve R-loop-mediated transcription–replication conflicts. *Genes Dev* 28, 735–748 (2014).
- 271.Herrmann, G. et al. Conserved interactions of the splicing factor Ntr1/Spp382 with proteins involved in DNA double-strand break repair and telomere metabolism. *Nucleic Acids Res* 35, 2321–2332 (2007).
- 272.Higgins, N. P., Kato, K. & Strauss, B. A model for replication repair in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 101, 417–425 (1976).
- 273.Hime, G. R. & Somers, W. G. Micro-RNA mediated regulation of proliferation, self-renewal and differentiation of mammalian stem cells. *Cell Adh Migr* 3, 425–432 (2009).
- 274.Hirasawa, R. & Feil, R. Genomic imprinting and human disease. *Essays Biochem.* 48, 187–200 (2010).

- 275.Hiriart, E. et al. Mmi1 RNA surveillance machinery directs RNAi complex RITS to specific meiotic genes in fission yeast. *EMBO J.* 31, 2296–2308 (2012).
- 276.Höck, J. & Meister, G. The Argonaute protein family. *Genome Biol* 9, 210 (2008).
- 277.Hocquet, C. et al. Condensin controls cellular RNA levels through the accurate segregation of chromosomes instead of directly regulating transcription. *eLife* 7, (2018).
- 278.Hodjat, M. et al. Environmental toxicants, incidence of degenerative diseases, and therapies from the epigenetic point of view. *Arch. Toxicol.* 91, 2577–2597 (2017).
- 279.Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135–141 (2002).
- 280.Hoffman, C. S., Wood, V. & Fantes, P. A. An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* 201, 403–423 (2015).
- 281.Holmes, A. M., Kaykov, A. & Arcangioli, B. Molecular and cellular dissection of mating-type switching steps in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 303–311 (2005).
- 282.Holmes, A. et al. Lsd1 and lsd2 control programmed replication fork pauses and imprinting in fission yeast. *Cell Rep* 2, 1513–1520 (2012).
- 283.Holoch, D. & Moazed, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 16, 71–84 (2015).
- 284.Holoch, D. & Moazed, D. Small-RNA loading licenses Argonaute for assembly into a transcriptional silencing complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 328–335 (2015).
- 285.Hong, E.-J. E., Villén, J. & Moazed, D. A Cullin E3 Ubiquitin Ligase Complex Associates with Rik1 and the Clr4 Histone H3-K9 Methyltransferase and is Required for RNAi-Mediated Heterochromatin Formation. *RNA Biology* 2, 106–111 (2005).
- 286.Horn, P. J., Bastie, J.-N. & Peterson, C. L. A Rik1-associated, cullin-dependent E3 ubiquitin ligase is essential for heterochromatin formation. *Genes Dev.* 19, 1705–1714 (2005).
- 287.Hou, H. et al. Histone variant H2A.Z regulates centromere silencing and chromosome segregation in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 285, 1909–1918 (2010).
- 288.Hu, H., Du, L., Nagabayashi, G., Seeger, R. C. & Gatti, R. A. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 1506–1511 (2010).
- 289.Hu, H. & Gatti, R. A. MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *Journal of Molecular Cell Biology* 3, 151 (2011).
- 290.Hu, W. et al. Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. *Mol. Cell* 38, 689–699 (2010).

291. Huang, B., Jiang, C. & Zhang, R. Epigenetics: the language of the cell? *Epigenomics* 6, 73–88 (2014).
292. Huang, S. et al. Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13410–13415 (2005).
293. Huisinga, K. L., Brower-Toland, B. & Elgin, S. C. R. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 115, 110–122 (2006).
294. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 12, 99–110 (2011).
295. Huo, L. et al. The Rix1 (Ipi1p-2p-3p) complex is a critical determinant of DNA replication licensing independent of their roles in ribosome biogenesis. *Cell Cycle* 11, 1325–1339 (2012).
296. Hutvagner, G. & Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 22–32 (2008).
297. Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H. & Kobayashi, T. Abundance of Ribosomal RNA Gene Copies Maintains Genome Integrity. *Science* 327, 693–696 (2010).
298. Iorio, M. V. & Croce, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 4, 143–159 (2012).
299. Ira, G. et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011–1017 (2004).
300. Iraqui, I. et al. Recovery of Arrested Replication Forks by Homologous Recombination Is Error-Prone. *PLOS Genetics* 8, e1002976 (2012).
301. Irmisch, A., Ampatzidou, E., Mizuno, K., O’Connell, M. J. & Murray, J. M. Smc5/6 maintains stalled replication forks in a recombination-competent conformation. *EMBO J* 28, 144–155 (2009).
302. Irvine, D. V. et al. Argonaute Slicing Is Required for Heterochromatic Silencing and Spreading. *Science* 313, 1134–1137 (2006).
303. Isaac, S. et al. Interaction of Epe1 with the heterochromatin assembly pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 175, 1549–1560 (2007).
304. Ivanova, T. et al. The DNA damage and the DNA replication checkpoints converge at the MBF transcription factor. *Mol Biol Cell* 24, 3350–3357 (2013).
305. Ivessa, A. S. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Helicase Rrm3p Facilitates Replication Past Nonhistone Protein-DNA Complexes. *Molecular Cell* 12, 1525–1536 (2003).
306. Iyer, D. R. & Rhind, N. Replication fork slowing and stalling are distinct, checkpoint-independent consequences of replicating damaged DNA. *PLoS Genet* 13, (2017).

307. Jacobs, J. Z. et al. Arrested replication forks guide retrotransposon integration. *Science* 349, 1549–1553 (2015).
308. Jahn, L. J. et al. Dependency of Heterochromatin Domains on Replication Factors. *G3 (Bethesda)* 8, 477–489 (2017).
309. Jain, R., Iglesias, N. & Moazed, D. Distinct Functions of Argonaute Slicer in siRNA Maturation and Heterochromatin Formation. *Molecular Cell* 63, 191–205 (2016).
310. Jakočiūnas, T. et al. Subnuclear relocalization and silencing of a chromosomal region by an ectopic ribosomal DNA repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E4465–E4473 (2013).
311. Jansson, M. D. & Lund, A. H. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology* 6, 590–610 (2012).
312. Jia, S., Noma, K. & Grewal, S. I. S. RNAi-Independent Heterochromatin Nucleation by the Stress-Activated ATF/CREB Family Proteins. *Science* 304, 1971–1976 (2004).
313. Johansson, E. & Dixon, N. Replicative DNA Polymerases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012799 (2013).
314. Johansson, E., Garg, P. & Burgers, P. M. J. The Pol32 Subunit of DNA Polymerase  $\delta$  Contains Separable Domains for Processive Replication and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Binding. *J. Biol. Chem.* 279, 1907–1915 (2004).
315. John, R. M. & Rougeulle, C. Developmental Epigenetics: Phenotype and the Flexible Epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, (2018).
316. Johnson, K. A. Role of Induced Fit in Enzyme Specificity: A Molecular Forward/Reverse Switch. *J. Biol. Chem.* 283, 26297–26301 (2008).
317. Johnson, K. A. The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1041–1048 (2010).
318. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics* 16, 421–433 (2015).
319. Jonkers, I., Kwak, H. & Lis, J. T. Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *Elife* 3, e02407 (2014).
320. Joshua-Tor, L. & Hannon, G. J. Ancestral Roles of Small RNAs: An Ago-Centric Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003772 (2011).
321. Jossion, S., Sung, S.-Y., Lao, K., Chung, L. W. K. & Johnstone, P. A. S. Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. *Prostate* 68, 1599–1606 (2008).
322. Kakarougkas, A. & Jeggo, P. A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol* 87, 20130685 (2014).

323. Kannouche, P. L., Wing, J. & Lehmann, A. R. Interaction of human DNA polymerase  $\epsilon$  with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol. Cell* 14, 491–500 (2004).
324. Kanoh, J., Sadaie, M., Urano, T. & Ishikawa, F. Telomere Binding Protein Taz1 Establishes Swi6 Heterochromatin Independently of RNAi at Telomeres. *Current Biology* 15, 1808–1819 (2005).
325. Karreth, F. A. et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell* 147, 382–395 (2011).
326. Kato, H. et al. RNA Polymerase II Is Required for RNAi-Dependent Heterochromatin Assembly. *Science* 309, 467–469 (2005).
327. Kawamata, T., Seitz, H. & Tomari, Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 953–960 (2009).
328. Kawashima, S. A. et al. Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev* 21, 420–435 (2007).
329. Kaykov, A., Holmes, A. M. & Arcangioli, B. Formation, maintenance and consequences of the imprint at the mating-type locus in fission yeast. *EMBO J.* 23, 930–938 (2004).
330. Keeney, S. & Neale, M. J. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 523–525 (2006).
331. Keijzers, G. et al. The role of RecQ helicases in non-homologous end-joining. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49, 463–472 (2014).
332. Kelly, T. J. & Brown, G. W. Regulation of Chromosome Replication. *Annual Review of Biochemistry* 69, 829–880 (2000).
333. Keskin, H., Meers, C. & Storici, F. Transcript RNA supports precise repair of its own DNA gene. *RNA Biol* 13, 157–165 (2015).
334. Keskin, H. et al. Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature* 515, 436–439 (2014).
335. Keskin, H. & Storici, F. Defects in RNase H2 Stimulate DNA Break Repair by RNA Reverse Transcribed into cDNA. *Microna* 4, 109–116 (2015).
336. Khanduja, J. S., Calvo, I. A., Joh, R. I., Hill, I. T. & Motamedi, M. Nuclear Noncoding RNAs and Genome Stability. *Molecular Cell* 63, 7–20 (2016).
337. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115, 209–216 (2003).

338. Kim, H.-S. et al. An acetylated form of histone H2A.Z regulates chromosome architecture in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1286–1293 (2009).
339. Kim, S.-M. & Huberman, J. A. Regulation of replication timing in fission yeast. *EMBO J* 20, 6115–6126 (2001).
340. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139 (2009).
341. Kitano, E., Hayashi, A., Kanai, D., Shinmyozu, K. & Nakayama, J. Roles of Fission Yeast Grc3 Protein in Ribosomal RNA Processing and Heterochromatic Gene Silencing. *J Biol Chem* 286, 15391–15402 (2011).
342. Klattenhoff, C. et al. The *Drosophila* HP1 Homolog Rhino Is Required for Transposon Silencing and piRNA Production by Dual-Strand Clusters. *Cell* 138, 1137–1149 (2009).
343. Klein, H. L. et al. Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways. *Microbial Cell* 6, 1–64 (2019).
344. Klemm, S. L., Shipony, Z. & Greenleaf, W. J. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics* 20, 207 (2019).
345. Klenov, M. S. et al. Impact of nuclear Piwi elimination on chromatin state in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nucleic Acids Res* 42, 6208–6218 (2014).
346. Klinge, S., Núñez-Ramírez, R., Llorca, O. & Pellegrini, L. 3D architecture of DNA Pol alpha reveals the functional core of multi-subunit replicative polymerases. *EMBO J.* 28, 1978–1987 (2009).
347. Kloc, A. & Martienssen, R. RNAi, heterochromatin and the cell cycle. *Trends in Genetics* 24, 511–517 (2008).
348. Kloc, A., Zaratiegui, M., Nora, E. & Martienssen, R. RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication. *Curr. Biol.* 18, 490–495 (2008).
349. Kobayashi, H. & Tomari, Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 71–81 (2016).
350. Kobayashi, T., Heck, D. J., Nomura, M. & Horiuchi, T. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* 12, 3821–3830 (1998).
351. Kobayashi, T. & Horiuchi, T. A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* 1, 465–474 (1996).
352. Kobayashi, T. The Replication Fork Barrier Site Forms a Unique Structure with Fob1p and Inhibits the Replication Fork. *Mol Cell Biol* 23, 9178–9188 (2003).



353. Kobayashi, T. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol Life Sci* 68, 1395–1403 (2011).
354. Kobayashi, T. Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 90, 119–129 (2014).
355. Kobayashi, T. & Ganley, A. R. D. Recombination Regulation by Transcription-Induced Cohesin Dissociation in rDNA Repeats. *Science* 309, 1581–1584 (2005).
356. Kobayashi, T., Horiuchi, T., Tongaonkar, P., Vu, L. & Nomura, M. SIR2 Regulates Recombination between Different rDNA Repeats, but Not Recombination within Individual rRNA Genes in Yeast. *Cell* 117, 441–453 (2004).
357. Kobayashi, T. & Sasaki, M. Ribosomal DNA stability is supported by many ‘buffer genes’—introduction to the Yeast rDNA Stability Database. *FEMS Yeast Res* 17, (2017).
358. Kobor, Michael S. et al. A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-Related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin. *PLoS Biol* 2, (2004).
359. Kornberg, R. D. Structure of Chromatin. *Annual Review of Biochemistry* 46, 931–954 (1977).
360. Kostriken, R., Strathern, J. N., Klar, A. J., Hicks, J. B. & Heffron, F. A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 35, 167–174 (1983).
361. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705 (2007).
362. Kovalchuk, I. Chapter 8 - The Role of Noncoding RNAs in Genome Stability and Aging. in *Epigenetics of Aging and Longevity* (eds. Moskalev, A. & Vaiserman, A. M.) vol. 4 171–200 (Academic Press, 2018).
363. Krasner, D. S., Daley, J. M., Sung, P. & Niu, H. Interplay between Ku and Replication Protein A in the Restriction of Exo1-mediated DNA Break End Resection. *J. Biol. Chem.* 290, 18806–18816 (2015).
364. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. & Zhao, X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5795–5818 (2012).
365. Krings, G. & Bastia, D. swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14085–14090 (2004).
366. Krings, G. & Bastia, D. Sap1p Binds to Ter1 at the Ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe* and Causes Polar Replication Fork Arrest. *J. Biol. Chem.* 280, 39135–39142 (2005).

367. Kuramochi-Miyagawa, S. et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908–917 (2008).
368. Kwak, P. B. & Tomari, Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 145–151 (2012).
369. Labib, K. How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev.* 24, 1208–1219 (2010).
370. Lagache, T. et al. Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics. *Nature Communications* 9, 698 (2018).
371. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858 (2001).
372. Lal, A. et al. miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 492–498 (2009).
373. Lalev, A. I. & Nazar, R. N. Structural equivalence in the transcribed spacers of pre-rRNA transcripts in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 27, 3071–3078 (1999).
374. Lambert, S., Froget, B. & Carr, A. M. Arrested replication fork processing: Interplay between checkpoints and recombination. *DNA Repair* 6, 1042–1061 (2007).
375. Lambert, S. et al. Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol. Cell* 39, 346–359 (2010).
376. Lambert, S., Watson, A., Sheedy, D. M., Martin, B. & Carr, A. M. Gross Chromosomal Rearrangements and Elevated Recombination at an Inducible Site-Specific Replication Fork Barrier. *Cell* 121, 689–702 (2005).
377. Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921 (2001).
378. Lange, S. S., Takata, K. & Wood, R. D. DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 96–110 (2011).
379. Latham, J. A. & Dent, S. Y. R. Cross-regulation of histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 1017–1024 (2007).
380. Lau, P.-W. et al. The Molecular Architecture of Human Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 19, 436–440 (2012).
381. Lazzerini-Denchi, E. & Sfeir, A. Stop pulling my strings — what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 364–378 (2016).
382. Le Thomas, A. et al. Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes Dev.* 27, 390–399 (2013).



- 383.Lee, H.-C. et al. The DNA/RNA-dependent RNA polymerase QDE-1 generates aberrant RNA and dsRNA for RNAi in a process requiring replication protein A and a DNA helicase. *PLoS Biol.* 8, (2010).
- 384.Lee, H.-C. et al. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature* 459, 274–277 (2009).
- 385.Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854 (1993).
- 386.Lee, S. S. et al. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.* 33, 40–48 (2003).
- 387.Lee, S. et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell* 164, 69–80 (2016).
- 388.Lehmann, E., Brueckner, F. & Cramer, P. Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity. *Nature* 450, 445–449 (2007).
- 389.Leman, A. R. & Noguchi, E. Local and global functions of Timeless and Tipin in replication fork protection. *Cell Cycle* 11, 3945–3955 (2012).
- 390.Leman, A. R. & Noguchi, E. The Replication Fork: Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication. *Genes* 4, 1–32 (2013).
- 391.Letessier, A. et al. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 470, 120–123 (2011).
- 392.Leuschner, P. J. F., Ameres, S. L., Kueng, S. & Martinez, J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7, 314–320 (2006).
- 393.Li, C., Mueller, J. E., Elflin, M. & Bryk, M. Linker histone H1 represses recombination at the ribosomal DNA locus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 67, 906–919 (2008).
- 394.Li, F., Martienssen, R. & Cande, W. Z. Coordination of DNA replication and histone modification by the Rik1-Dos2 complex. *Nature* 475, 244–248 (2011).
- 395.Li, J., Santoro, R., Koberna, K. & Grummt, I. The chromatin remodeling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO J.* 24, 120–127 (2005).
- 396.Li, P.-C., Green, M. D. & Forsburg, S. L. Mutations disrupting histone methylation have different effects on replication timing in *S. pombe* centromere. *PLoS ONE* 8, e61464 (2013).
- 397.Li, P.-C. et al. Replication Fork Stability Is Essential for the Maintenance of Centromere Integrity in the Absence of Heterochromatin. *Cell Reports* 3, 638–645 (2013).

- 398.Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P. & Wu, X. The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J. Biol. Chem.* 278, 30854–30858 (2003).
- 399.Li, X. & Heyer, W.-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18, 99–113 (2008).
- 400.Limas, J. C. & Cook, J. G. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. *FEBS Letters* 593, 2853–2867 (2019).
- 401.Limbo, O. et al. Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol. Cell* 28, 134–146 (2007).
- 402.Lindstrom, D. L., Leverich, C. K., Henderson, K. A. & Gottschling, D. E. Replicative Age Induces Mitotic Recombination in the Ribosomal RNA Gene Cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 7, (2011).
- 403.Lindström, M. S. et al. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene* 37, 2351 (2018).
- 404.Linskens, M. H. & Huberman, J. A. Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 4927–4935 (1988).
- 405.Lipps, H. J., Postberg, J., Jackson, D. A., Hirasawa, R. & Feil, R. Genomic imprinting and human disease. *Essays Biochem* 48, 187–200 (2010).
- 406.Lisitskaya, L., Aravin, A. A. & Kulbachinskiy, A. DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. *Nature Communications* 9, 5165 (2018).
- 407.Liu, J. et al. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441 (2004).
- 408.Liu, P. et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell* 146, 889–903 (2011).
- 409.Liu, Q. et al. R2D2, a Bridge Between the Initiation and Effector Steps of the *Drosophila* RNAi Pathway. *Science* 301, 1921–1925 (2003).
- 410.Liu, W. H., Roemer, S. C., Port, A. M. & Churchill, M. E. A. CAF-1-induced oligomerization of histones H3/H4 and mutually exclusive interactions with Asf1 guide H3/H4 transitions among histone chaperones and DNA. *Nucleic Acids Res* 40, 11229–11239 (2012).
- 411.Liu, Y. & Lu, X. Non-coding RNAs in DNA damage response. *Am J Cancer Res* 2, 658–675 (2012).
- 412.Locovei, A. M., Spiga, M.-G., Tanaka, K., Murakami, Y. & D’Urso, G. The CENP-B homolog, Abp1, interacts with the initiation protein Cdc23 (MCM10) and is required for efficient DNA replication in fission yeast. *Cell Div* 1, 27 (2006).

- 413.Lopes, M. et al. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* 412, 557–561 (2001).
- 414.Lou, H. et al. Mrc1 and DNA polymerase epsilon function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint. *Mol. Cell* 32, 106–117 (2008).
- 415.Ltd, T. C. of B. DNA checkpoints. *J Cell Sci* 116, e1905–e1905 (2003).
- 416.Lu, W.-T. et al. Drosha drives the formation of DNA:RNA hybrids around DNA break sites to facilitate DNA repair. *Nature Communications* 9, 1–13 (2018).
- 417.Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260 (1997).
- 418.Ma, E., MacRae, I. J., Kirsch, J. F. & Doudna, J. A. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J. Mol. Biol.* 380, 237–243 (2008).
- 419.Ma, J.-B., Ye, K. & Patel, D. J. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318–322 (2004).
- 420.Ma, J.-B. et al. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature* 434, 666–670 (2005).
- 421.MacAlpine, D. M., Perlman, P. S. & Butow, R. A. The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6739–6743 (1998).
- 422.MacRae, I. J., Zhou, K. & Doudna, J. A. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 14, 934–940 (2007).
- 423.Maes, O. C., An, J., Sarojini, H., Wu, H. & Wang, E. Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 105, 824–834 (2008).
- 424.Mahaney, B. L., Meek, K. & Lees-Miller, S. P. Repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417, 639–650 (2009).
- 425.Maine, G. T., Sinha, P. & Tye, B. K. Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* 106, 365–385 (1984).
- 426.Maki, T., Ogura, N., Haber, J. E., Iwasaki, H. & Thon, G. New insights into donor directionality of mating-type switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLOS Genetics* 14, e1007424 (2018).
- 427.Malivert, L. et al. Delineation of the Xrcc4-interacting region in the globular head domain of cernunnos/XLF. *J. Biol. Chem.* 285, 26475–26483 (2010).

428. Malone, C. D. & Hannon, G. J. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* 136, 656–668 (2009).
429. Mansisidor, A. et al. Genomic Copy-Number Loss Is Rescued by Self-Limiting Production of DNA Circles. *Molecular Cell* 72, 583-593.e4 (2018).
430. Marasovic, M., Zocco, M. & Halic, M. Argonaute and Triman Generate Dicer-Independent priRNAs and Mature siRNAs to Initiate Heterochromatin Formation. *Molecular Cell* 52, 173–183 (2013).
431. Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G. & Labib, K. Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science* 346, 1253596 (2014).
432. Marina, D. B., Shankar, S., Natarajan, P., Finn, K. J. & Madhani, H. D. A conserved ncRNA-binding protein recruits silencing factors to heterochromatin through an RNAi-independent mechanism. *Genes Dev* 27, 1851–1856 (2013).
433. Marschall, L. G. & Clarke, L. A novel cis-acting centromeric DNA element affects *S. pombe* centromeric chromatin structure at a distance. *J. Cell Biol.* 128, 445–454 (1995).
434. Martienssen, R. & Moazed, D. RNAi and Heterochromatin Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, (2015).
435. Maser, R. S. & DePinho, R. A. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* 297, 565–569 (2002).
436. Matos-Perdomo, E. & Machín, F. Nucleolar and Ribosomal DNA Structure under Stress: Yeast Lessons for Aging and Cancer. *Cells* 8, 779 (2019).
437. Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. & Zamore, P. D. Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* 123, 607–620 (2005).
438. Matsumoto, S., Ogino, K., Noguchi, E., Russell, P. & Masai, H. Hsk1-Dfp1/Him1, the Cdc7-Dbf4 Kinase in *Schizosaccharomyces pombe*, Associates with Swi1, a Component of the Replication Fork Protection Complex. *J. Biol. Chem.* 280, 42536–42542 (2005).
439. Matsuyama, A. et al. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 24, 841–847 (2006).
440. Mazina, O. M., Keskin, H., Hanamshet, K., Storici, F. & Mazin, A. V. Rad52 Inverse Strand Exchange Drives RNA-Templated DNA Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell* 67, 19-29.e3 (2017).
441. McEachern, M. J., Krauskopf, A. & Blackburn, E. H. <sup>TEL</sup>omeres and Their Control. *Annual Review of Genetics* 34, 331–358 (2000).
442. McGhee, J. The *C. elegans* intestine. *WormBook* (2007) doi:10.1895/wormbook.1.133.1.

443. McIntosh, D. & Blow, J. J. Dormant Origins, the Licensing Checkpoint, and the Response to Replicative Stresses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, (2012).
444. McMurray, C. T. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat. Rev. Genet.* 11, 786–799 (2010).
445. Meers, C., Keskin, H. & Storic, F. DNA repair by RNA: Templated, or not templated, that is the question. *DNA Repair (Amst.)* 44, 17–21 (2016).
446. Mehta, A. & Haber, J. E. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016428 (2014).
447. Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. & Tuschl, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* 10, 544–550 (2004).
448. Mekhail, K. & Moazed, D. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 317–328 (2010).
449. Melekhovets, Y. F., Shwed, P. S. & Nazar, R. N. In vivo analyses of RNA polymerase I termination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 25, 5103–5109 (1997).
450. Méndez, J. et al. Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. *Mol. Cell* 9, 481–491 (2002).
451. Meselson, M. & Stahl, F. W. THE REPLICATION OF DNA IN *ESCHERICHIA COLI*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44, 671–682 (1958).
452. Mi, H. et al. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc* 14, 703–721 (2019).
453. Mi, H., Muruganujan, A. & Thomas, P. D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* 41, D377–386 (2013).
454. Michalik, K. M., Böttcher, R. & Förstemann, K. A small RNA response at DNA ends in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 40, 9596–9603 (2012).
455. Michel, A. H., Kornmann, B., Dubrana, K. & Shore, D. Spontaneous rDNA copy number variation modulates Sir2 levels and epigenetic gene silencing. *Genes Dev* 19, 1199–1210 (2005).
456. Michelini, F. et al. Damage-induced lncRNAs control the DNA damage response through interaction with DDRNAs at individual double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 19, 1400–1411 (2017).
457. Miki, D. et al. Efficient Generation of diRNAs Requires Components in the Posttranscriptional Gene Silencing Pathway. *Scientific Reports* 7, 1–11 (2017).

- 458.Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770–774 (2008).
- 459.Mirkin, E. V. & Mirkin, S. M. Replication Fork Stalling at Natural Impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 13–35 (2007).
- 460.Mishra, M. et al. The Clp1p/Flp1p phosphatase ensures completion of cytokinesis in response to minor perturbation of the cell division machinery in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science* 117, 3897–3910 (2004).
- 461.Miyabe, I. et al. Polymerase  $\delta$  replicates both strands after homologous recombination–dependent fork restart. *Nat Struct Mol Biol* 22, 932–938 (2015).
- 462.Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M. C. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* 19, 2837–2848 (2005).
- 463.Mizuguchi, T., Barrowman, J. & Grewal, S. I. S. Chromosome domain architecture and dynamic organization of the fission yeast genome. *FEBS Letters* 589, 2975–2986 (2015).
- 464.Mizuno, K., Lambert, S., Baldacci, G., Murray, J. M. & Carr, A. M. Nearby inverted repeats fuse to generate acentric and dicentric palindromic chromosomes by a replication template exchange mechanism. *Genes Dev.* 23, 2876–2886 (2009).
- 465.Mizuno, K., Miyabe, I., Schalbetter, S. A., Carr, A. M. & Murray, J. M. Recombination-restarted replication makes inverted chromosome fusions at inverted repeats. *Nature* 493, 246–249 (2013).
- 466.Moazed, D. Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell* 146, 510–518 (2011).
- 467.Mochizuki, K., Fine, N. A., Fujisawa, T. & Gorovsky, M. A. Analysis of a piwi-Related Gene Implicates Small RNAs in Genome Rearrangement in *Tetrahymena*. *Cell* 110, 689–699 (2002).
- 468.Moggs, J. G. et al. A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1206–1218 (2000).
- 469.Mohanty, B. K., Bairwa, N. K. & Bastia, D. The Tof1p-Csm3p protein complex counteracts the Rrm3p helicase to control replication termination of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 897–902 (2006).
- 470.Mohanty, B. K. & Bastia, D. Binding of the Replication Terminator Protein Fob1p to the Ter Sites of Yeast Causes Polar Fork Arrest. *J. Biol. Chem.* 279, 1932–1941 (2004).
- 471.Mohn, F., Sienski, G., Handler, D. & Brennecke, J. The Rhino-Deadlock-Cutoff Complex Licenses Noncanonical Transcription of Dual-Strand piRNA Clusters in *Drosophila*. *Cell* 157, 1364–1379 (2014).



472. Montecucco, A. & Biamonti, G. Editorial: DNA and RNA Metabolism Meet at Chromatin to Control Genome Stability. *Front. Genet.* 7, (2016).
473. Montgomery, T. A. et al. PIWI Associated siRNAs and piRNAs Specifically Require the *Caenorhabditis elegans* HEN1 Ortholog henn-1. *PLoS Genet* 8, (2012).
474. Moore, J. K. & Haber, J. E. Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. *Nature* 383, 644–646 (1996).
475. Moreno, S. P., Bailey, R., Campion, N., Herron, S. & Gambus, A. Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science* 346, 477–481 (2014).
476. Morrish, T. A. et al. Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* 446, 208–212 (2007).
477. Morrish, T. A. et al. DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nature Genetics* 31, 159–165 (2002).
478. Morrison, A. J. & Shen, X. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 373–384 (2009).
479. Mortensen, U. H., Lisby, M. & Rothstein, R. Rad52. *Curr. Biol.* 19, R676-677 (2009).
480. Motamedi, M. R. et al. HP1 Proteins Form Distinct Complexes and Mediate Heterochromatic Gene Silencing by Non-Overlapping Mechanisms. *Mol Cell* 32, 778–790 (2008).
481. Motamedi, M. R. et al. Two RNAi Complexes, RITS and RDRC, Physically Interact and Localize to Noncoding Centromeric RNAs. *Cell* 119, 789–802 (2004).
482. Murakami, H. et al. Ribonuclease Activity of Dis3 Is Required for Mitotic Progression and Provides a Possible Link between Heterochromatin and Kinetochores Function. *PLOS ONE* 2, e317 (2007).
483. Myung, K., Datta, A. & Kolodner, R. D. Suppression of Spontaneous Chromosomal Rearrangements by S Phase Checkpoint Functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 397–408 (2001).
484. Nakayama, J., Klar, A. J. S. & Grewal, S. I. S. A Chromodomain Protein, Swi6, Performs Imprinting Functions in Fission Yeast during Mitosis and Meiosis. *Cell* 101, 307–317 (2000).
485. Nakayama, J. et al. Alp13, an MRG family protein, is a component of fission yeast Clr6 histone deacetylase required for genomic integrity. *EMBO J* 22, 2776–2787 (2003).
486. Nakazawa, N. et al. Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis. *The Journal of Cell Biology* 180, 1115–1131 (2008).

487. Naqvi, A. R., Islam, Md. N., Choudhury, N. R. & Haq., Q. Mohd. R. The Fascinating World of RNA Interference. *International Journal of Biological Sciences* 97–117 (2009) doi:10.7150/ijbs.5.97.
488. Netz, D. J. A. et al. Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* 8, 125–132 (2011).
489. Newlon, C. S. & Theis, J. F. The structure and function of yeast ARS elements. *Current Opinion in Genetics & Development* 3, 752–758 (1993).
490. Nguyen, V. Q., Co, C., Irie, K. & Li, J. J. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr. Biol.* 10, 195–205 (2000).
491. Nicolas, E. et al. Distinct roles of HDAC complexes in promoter silencing, antisense suppression and DNA damage protection. *Nat Struct Mol Biol* 14, 372–380 (2007).
492. Nimonkar, A. V. et al. BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* 25, 350–362 (2011).
493. Nishida, K., Kuwano, Y., Nishikawa, T., Masuda, K. & Rokutan, K. RNA Binding Proteins and Genome Integrity. *Int J Mol Sci* 18, (2017).
494. Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. & Nurse, P. The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* 404, 625–628 (2000).
495. Noguchi, C. et al. Genetic controls of DNA damage avoidance in response to acetaldehyde in fission yeast. *Cell Cycle* 16, 45–58 (2016).
496. Noguchi, C. et al. The NuA4 acetyltransferase and histone H4 acetylation promote replication recovery after topoisomerase I-poisoning. *Epigenetics & Chromatin* 12, 24 (2019).
497. Noguchi, E., Noguchi, C., Du, L.-L. & Russell, P. Swi1 prevents replication fork collapse and controls checkpoint kinase Cds1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7861–7874 (2003).
498. Nolan, T. et al. The RNA-dependent RNA polymerase essential for post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa* interacts with replication protein A. *Nucleic Acids Res.* 36, 532–538 (2008).
499. Noma, K. et al. RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat. Genet.* 36, 1174–1180 (2004).
500. Norris, M. D. & Stewart, B. W. Sizing of single-stranded regions in double-stranded DNA by preparative benzoylated DEAE-cellulose chromatography. *FEBS Letters* 228, 223–227 (1988).
501. Nospikel, T. & Hanawalt, P. C. DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair (Amst.)* 1, 59–75 (2002).



- 502.O’Kane, C. J. & Hyland, E. M. Yeast epigenetics: the inheritance of histone modification states. *Bioscience Reports* 39, BSR20182006 (2019).
- 503.Oberdoerffer, P. RNAi screen for modifiers of homologous recombination. (2019).
- 504.Oberti, D. et al. Dicer and Hsp104 Function in a Negative Feedback Loop to Confer Robustness to Environmental Stress. *Cell Reports* 10, 47–61 (2015).
- 505.Ohle, C. et al. Transient RNA-DNA Hybrids Are Required for Efficient Double-Strand Break Repair. *Cell* 167, 1001-1013.e7 (2016).
- 506.Okazaki, K. et al. RNAi-dependent heterochromatin assembly in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* requires heat-shock molecular chaperones Hsp90 and Mas5. *Epigenetics & Chromatin* 11, 26 (2018).
- 507.Onodera, Y. et al. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120, 613–622 (2005).
- 508.Otsubo, Y. & Yamamoto, M. Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *J. Cell. Sci.* 125, 2789–2793 (2012).
- 509.Ozeri-Galai, E. et al. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Mol. Cell* 43, 122–131 (2011).
- 510.Pai, C.-C. et al. Set2 Methyltransferase Facilitates DNA Replication and Promotes Genotoxic Stress Responses through MBF-Dependent Transcription. *Cell Rep* 20, 2693–2705 (2017).
- 511.Pai, G. S., Thomas, G. H., Mahoney, W. & Migeon, B. R. Complex chromosome rearrangements: Report of a new case and literature review. *Clinical Genetics* 18, 436–444 (1980).
- 512.Paredes, S. & Maggert, K. A. Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17829–17834 (2009).
- 513.Park, P. U., Defossez, P. A. & Guarente, L. Effects of mutations in DNA repair genes on formation of ribosomal DNA circles and life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3848–3856 (1999).
- 514.Parker, J. S. How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence* 1, 3 (2010).
- 515.Parker, J. S., Roe, S. M. & Barford, D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434, 663–666 (2005).
- 516.Pasero, P., Bensimon, A. & Schwob, E. Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev* 16, 2479–2484 (2002).

- 517.Pasquinelli, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89 (2000).
- 518.Patil, V. S., Zhou, R. & Rana, T. M. Gene regulation by noncoding RNAs. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49, 16–32 (2014).
- 519.Peng, J. C. & Karpen, G. H. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat Cell Biol* 9, 25–35 (2007).
- 520.Penny, G. D., Kay, G. F., Sheardown, S. A., Rastan, S. & Brockdorff, N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131 (1996).
- 521.Peschansky, V. J. & Wahlestedt, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 9, 3–12 (2014).
- 522.Pessina, F. et al. Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nature Cell Biology* 21, 1286–1299 (2019).
- 523.Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N. & Helleday, T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol. Cell* 37, 492–502 (2010).
- 524.Peters, J.-M. & Nishiyama, T. Sister Chromatid Cohesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, (2012).
- 525.Peters, L. & Meister, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* 26, 611–623 (2007).
- 526.Petrie, V. J., Wuitschick, J. D., Givens, C. D., Kosinski, A. M. & Partridge, J. F. RNA interference (RNAi)-dependent and RNAi-independent association of the Chp1 chromodomain protein with distinct heterochromatic loci in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 25, 2331–2346 (2005).
- 527.Petryk, N. et al. MCM2 promotes symmetric inheritance of modified histones during DNA replication. *Science* 361, 1389–1392 (2018).
- 528.Petukhova, G., Van Komen, S., Vergano, S., Klein, H. & Sung, P. Yeast Rad54 promotes Rad51-dependent homologous DNA pairing via ATP hydrolysis-driven change in DNA double helix conformation. *J. Biol. Chem.* 274, 29453–29462 (1999).
- 529.Pfeiffer, P., Goedecke, W. & Obe, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289–302 (2000).
- 530.Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117, 83–94 (2004).

531. Pichugina, T. et al. A diffusion model for the coordination of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Scientific Reports* 6, 18757 (2016).
532. Pietrobon, V. et al. The chromatin assembly factor 1 promotes Rad51-dependent template switches at replication forks by counteracting D-loop disassembly by the RecQ-type helicase Rqh1. *PLoS Biol.* 12, e1001968 (2014).
533. Pike, J. A., Styles, I. B., Rappoport, J. Z. & Heath, J. K. Quantifying receptor trafficking and colocalization with confocal microscopy. *Methods* 115, 42–54 (2017).
534. Pisacane, P. & Halic, M. Tailing and degradation of Argonaute-bound small RNAs protect the genome from uncontrolled RNAi. *Nat Commun* 8, 15332 (2017).
535. Politz, J. C. R., Scalzo, D. & Groudine, M. Something silent this way forms: the functional organization of the repressive nuclear compartment. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 241–270 (2013).
536. Potenski, C. J. & Klein, H. L. How the misincorporation of ribonucleotides into genomic DNA can be both harmful and helpful to cells. *Nucleic Acids Res.* 42, 10226–10234 (2014).
537. Pothof, J. et al. MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J.* 28, 2090–2099 (2009).
538. Prado, F. & Maya, D. Regulation of Replication Fork Advance and Stability by Nucleosome Assembly. *Genes (Basel)* 8, (2017).
539. Prelich, G. & Stillman, B. Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell* 53, 117–126 (1988).
540. Price, B. D. & D'Andrea, A. D. Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks. *Cell* 152, 1344–1354 (2013).
541. Prioleau, M.-N. & MacAlpine, D. M. DNA replication origins—where do we begin? *Genes Dev.* 30, 1683–1697 (2016).
542. Probst, A. V., Dunleavy, E. & Almouzni, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 192–206 (2009).
543. Provost, P. et al. Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16648–16653 (2002).
544. Pryce, D. W., Ramayah, S., Jaendling, A. & McFarlane, R. J. Recombination at DNA replication fork barriers is not universal and is differentially regulated by Swi1. *PNAS* 106, 4770–4775 (2009).
545. pubmeddev & al, S. A., et. The pendulum of the Ku-Ku clock. - PubMed - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30177438> (2019).

546. Qin, H. et al. Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA* 16, 474–481 (2010).
547. Quinet, A., Lemaçon, D. & Vindigni, A. Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Molecular Cell* 68, 830–833 (2017).
548. Ragnathan, K., Jih, G. & Moazed, D. Epigenetics. Epigenetic inheritance uncoupled from sequence-specific recruitment. *Science* 348, 1258699 (2015).
549. Rajender, S., Avery, K. & Agarwal, A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 727, 62–71 (2011).
550. Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. & Wang, X. Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell* 123, 621–629 (2005).
551. Razin, A. & Riggs, A. DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604–610 (1980).
552. Redon, C. et al. Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep.* 4, 678–684 (2003).
553. Remus, D. et al. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* 139, 719–730 (2009).
554. Ren, B. et al. Regulation of transcriptional silencing and chromodomain protein localization at centromeric heterochromatin by histone H3 tyrosine 41 phosphorylation in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 46, 189–202 (2018).
555. Reyes-Turcu, F. E. & Grewal, S. I. Different means, same end—heterochromatin formation by RNAi and RNAi-independent RNA processing factors in fission yeast. *Current Opinion in Genetics & Development* 22, 156–163 (2012).
556. Reyes-Turcu, F. E., Zhang, K., Zofall, M., Chen, E. & Grewal, S. I. S. Defects in RNA quality control factors reveal RNAi-independent nucleation of heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1132–1138 (2011).
557. Rhoades, M. W. et al. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513–520 (2002).
558. Richmond, T. J. & Davey, C. A. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145 (2003).
559. Riera, A. et al. From structure to mechanism—understanding initiation of DNA replication. *Genes Dev.* 31, 1073–1088 (2017).
560. Rinn, J. L. et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311–1323 (2007).
561. Rivera-Mulia, J. C. & Gilbert, D. M. Replicating Large Genomes: Divide and Conquer. *Mol Cell* 62, 756–765 (2016).

562. Roche, B., Arcangioli, B. & Martienssen, R. A. RNA interference is essential for cellular quiescence. *Science* 354, (2016).
563. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868 (1998).
564. Romano, N. & Macino, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6, 3343–3353 (1992).
565. Rozenzhak, S. et al. Rad3ATR Decorates Critical Chromosomal Domains with  $\gamma$ H2A to Protect Genome Integrity during S-Phase in Fission Yeast. *PLOS Genetics* 6, e1001032 (2010).
566. Rozhkov, N. V., Hammell, M. & Hannon, G. J. Multiple roles for Piwi in silencing *Drosophila* transposons. *Genes Dev.* 27, 400–412 (2013).
567. Sabin, L. R., Delás, M. J. & Hannon, G. J. Dogma Derailed: The Many Influences of RNA on the Genome. *Molecular Cell* 49, 783–794 (2013).
568. Sabouri, N., McDonald, K. R., Webb, C. J., Cristea, I. M. & Zakian, V. A. DNA replication through hard-to-replicate sites, including both highly transcribed RNA Pol II and Pol III genes, requires the *S. pombe* Pfh1 helicase. *Genes Dev.* 26, 581–593 (2012).
569. Sadaie, M., Iida, T., Urano, T. & Nakayama, J. A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast. *EMBO J* 23, 3825–3835 (2004).
570. Sadaie, M. et al. Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6973–6988 (2008).
571. Sadaie, M., Naito, T. & Ishikawa, F. Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. *Genes Dev* 17, 2271–2282 (2003).
572. Saha, T., Ghosh, S., Vassilev, A. & DePamphilis, M. L. Ubiquitylation, phosphorylation and Orc2 modulate the subcellular location of Orc1 and prevent it from inducing apoptosis. *J. Cell. Sci.* 119, 1371–1382 (2006).
573. Saini, N. et al. Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature* 502, 389–392 (2013).
574. Saka, Y. et al. Fission yeast cut5 links nuclear chromatin and M phase regulator in the replication checkpoint control. *EMBO J* 13, 5319–5329 (1994).
575. Saka, Y., Esashi, F., Matsusaka, T., Mochida, S. & Yanagida, M. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes Dev.* 11, 3387–3400 (1997).
576. Saldivar, J. C., Cortez, D. & Cimprich, K. A. The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 622–636 (2017).

577. Sale, J. E. Competition, collaboration and coordination – determining how cells bypass DNA damage. *J Cell Sci* 125, 1633–1643 (2012).
578. Salim, D. et al. DNA replication stress restricts ribosomal DNA copy number. *PLoS Genet* 13, (2017).
579. Salomon, W. E., Jolly, S. M., Moore, M. J., Zamore, P. D. & Serebrov, V. Single-Molecule Imaging Reveals That Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides. *Cell* 162, 84–95 (2015).
580. San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry* 77, 229–257 (2008).
581. Sanchez, J. A., Kim, S.-M. & Huberman, J. A. Ribosomal DNA Replication in the Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research* 238, 220–230 (1998).
582. Sánchez-Gorostiaga, A., López-Estraño, C., Krimer, D. B., Schwartzman, J. B. & Hernández, P. Transcription termination factor reb1p causes two replication fork barriers at its cognate sites in fission yeast ribosomal DNA in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 24, 398–406 (2004).
583. Sanders, S. L. et al. Methylation of Histone H4 Lysine 20 Controls Recruitment of Crb2 to Sites of DNA Damage. *Cell* 119, 603–614 (2004).
584. Sansó, M., Gogol, M., Ayté, J., Seidel, C. & Hidalgo, E. Transcription Factors Pcr1 and Atf1 Have Distinct Roles in Stress- and Sty1-Dependent Gene Regulation. *Eukaryot Cell* 7, 826–835 (2008).
585. Santos-Pereira, J. M. & Aguilera, A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nature Reviews Genetics* 16, 583–597 (2015).
586. Sasaki, T. & Shimizu, N. Evolutionary conservation of a unique amino acid sequence in human DICER protein essential for binding to Argonaute family proteins. *Gene* 396, 312–320 (2007).
587. Savage, K. I. et al. Identification of a BRCA1-mRNA Splicing Complex Required for Efficient DNA Repair and Maintenance of Genomic Stability. *Mol Cell* 54, 445–459 (2014).
588. Sawh, A. N. & Duchaine, T. F. Turning Dicer on its head. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 365–366 (2012).
589. Schaak, J., Mao, J. & Söll, D. The 5.8S RNA gene sequence and the ribosomal repeat of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 10, 2851–2864 (1982).
590. Schalch, T. et al. High-affinity binding of Chp1 chromodomain to K9 methylated histone H3 is required to establish centromeric heterochromatin. *Mol. Cell* 34, 36–46 (2009).
591. Schalch, T., Job, G., Shanker, S., Partridge, J. F. & Joshua-Tor, L. The Chp1-Tas3 core is a multifunctional platform critical for gene silencing by RITS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1351–1357 (2011).



- 592.Schalk, C. et al. Small RNA-mediated repair of UV-induced DNA lesions by the DNA DAMAGE-BINDING PROTEIN 2 and ARGONAUTE 1. PNAS (2017) doi:10.1073/pnas.1618834114.
- 593.Schär, P. Spontaneous DNA Damage, Genome Instability, and Cancer—When DNA Replication Escapes Control. *Cell* 104, 329–332 (2001).
- 594.Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* 11, 251–263 (2011).
- 595.Schirle, N. T. & MacRae, I. J. The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336, 1037–1040 (2012).
- 596.Schlacher, K. et al. Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell* 145, 529–542 (2011).
- 597.Schlacher, K., Wu, H. & Jasin, M. A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer Cell* 22, 106–116 (2012).
- 598.Schlesinger, S., Selig, S., Bergman, Y. & Cedar, H. Allelic inactivation of rDNA loci. *Genes Dev* 23, 2437–2447 (2009).
- 599.Schmidts, I., Böttcher, R., Mirkovic-Hösle, M. & Förstemann, K. Homology directed repair is unaffected by the absence of siRNAs in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 44, 8261–8271 (2016).
- 600.Schmitz-Linneweber, C., Lampe, M.-K., Sultan, L. D. & Ostersetzer-Biran, O. Organellar maturases: A window into the evolution of the spliceosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 798–808 (2015).
- 601.Schoeftner, S. & Blasco, M. A. A ‘higher order’ of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J* 28, 2323–2336 (2009).
- 602.Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. & de Murcia, G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 517–528 (2006).
- 603.Schueler, M. G. & Sullivan, B. A. Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 301–313 (2006).
- 604.Schürmann, N., Trabuco, L. G., Bender, C., Russell, R. B. & Grimm, D. Molecular dissection of human Argonaute proteins by DNA shuffling. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 818–826 (2013).
- 605.Schvartzman, J. B., Martínez-Robles, M.-L., López, V., Hernández, P. & Krimer, D. B. 2D gels and their third-dimension potential. *Methods* 57, 170–178 (2012).

- 606.Schwartz, E. K. & Heyer, W.-D. Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* 120, 109–127 (2011).
- 607.Schwarz, D. S. et al. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* 115, 199–208 (2003).
- 608.Scott, I., Chatterjee, S., Senapati, P. & Kundu, T. K. Post-translational modifications of lysine in DNA-damage repair. *Essays Biochem* 52, 93–111 (2012).
- 609.Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 698–714 (2019).
- 610.Segurado, M. & Diffley, J. F. X. Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev.* 22, 1816–1827 (2008).
- 611.Segurado, M. & Tercero, J. A. The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biology of the Cell* 101, 617–627 (2009).
- 612.Sen, S. K., Huang, C. T., Han, K. & Batzer, M. A. Endonuclease-independent insertion provides an alternative pathway for L1 retrotransposition in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 35, 3741–3751 (2007).
- 613.Senti, K.-A. & Brennecke, J. The piRNA pathway: a fly’s perspective on the guardian of the genome. *Trends Genet.* 26, 499–509 (2010).
- 614.Shankaranarayana, G. D., Motamedi, M. R., Moazed, D. & Grewal, S. I. S. Sir2 Regulates Histone H3 Lysine 9 Methylation and Heterochromatin Assembly in Fission Yeast. *Current Biology* 13, 1240–1246 (2003).
- 615.Sharma, V. & Misteli, T. Noncoding RNAs in DNA damage and Repair. *FEBS Lett* 587, 1832–1839 (2013).
- 616.Shcherbakova, P. V. et al. Unique Error Signature of the Four-subunit Yeast DNA Polymerase  $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* 278, 43770–43780 (2003).
- 617.Sheu-Gruttadauria, J. & MacRae, I. J. Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *J Mol Biol* 429, 2619–2639 (2017).
- 618.Shibahara, K. & Stillman, B. Replication-Dependent Marking of DNA by PCNA Facilitates CAF-1-Coupled Inheritance of Chromatin. *Cell* 96, 575–585 (1999).
- 619.Shibata, A., Jeggo, P. & Löbrich, M. The pendulum of the Ku-Ku clock. *DNA Repair* 71, 164–171 (2018).
- 620.Shimada, A. et al. Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. *Genes Dev* 23, 18–23 (2009).



621. Shimmoto, M. et al. Interactions between Swi1-Swi3, Mrc1 and S phase kinase, Hsk1 may regulate cellular responses to stalled replication forks in fission yeast. *Genes Cells* 14, 669–682 (2009).
622. Siam, R., Gómez, E. B. & Forsburg, S. L. Schizosaccharomyces pombe Rad4/Cut5 Protein Modification and Chromatin Binding Changes in DNA Damage. *DNA and Cell Biology* 26, 565–575 (2007).
623. Siderakis, M. & Tarsounas, M. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res* 15, 667–679 (2007).
624. Siderakis, M. & Tarsounas, M. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res.* 15, 667–679 (2007).
625. Sienski, G., Dönertas, D. & Brennecke, J. Transcriptional Silencing of Transposons by Piwi and Maelstrom and Its Impact on Chromatin State and Gene Expression. *Cell* 151, 964–980 (2012).
626. Sigova, A., Rhind, N. & Zamore, P. D. A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in Schizosaccharomyces pombe. *Genes Dev* 18, 2359–2367 (2004).
627. Sinclair, D. A. & Guarente, L. Extrachromosomal rDNA Circles— A Cause of Aging in Yeast. *Cell* 91, 1033–1042 (1997).
628. Singh, S. K., Sabatinos, S., Forsburg, S. & Bastia, D. Regulation of replication termination by Reb1 protein-mediated action at a distance. *Cell* 142, 868–878 (2010).
629. Sinkkonen, L., Hugenschmidt, T., Filipowicz, W. & Svoboda, P. Dicer Is Associated with Ribosomal DNA Chromatin in Mammalian Cells. *PLOS ONE* 5, e12175 (2010).
630. Skoneczna, A., Kaniak, A. & Skoneczny, M. Genetic instability in budding and fission yeast—sources and mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* 39, 917–967 (2015).
631. Smialowska, A. et al. RNAi mediates post-transcriptional repression of gene expression in fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 444, 254–259 (2014).
632. Smith, C. E., Llorente, B. & Symington, L. S. Template switching during break-induced replication. *Nature* 447, 102–105 (2007).
633. Smith, Z. D. & Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* 14, 204–220 (2013).
634. Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T. & Allis, C. D. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1237–1241 (1995).

- 635.Sogo, J. M., Lopes, M. & Foiani, M. Fork Reversal and ssDNA Accumulation at Stalled Replication Forks Owing to Checkpoint Defects. *Science* 297, 599–602 (2002).
- 636.Sollier, J. et al. Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair Factors Promote R-Loop-Induced Genome Instability. *Molecular Cell* 56, 777–785 (2014).
- 637.Solovei, I., Thanisch, K. & Feodorova, Y. How to rule the nucleus: divide et impera. *Current Opinion in Cell Biology* 40, 47–59 (2016).
- 638.Song, J.-J. et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Mol Biol* 10, 1026–1032 (2003).
- 639.Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* 305, 1434–1437 (2004).
- 640.Sonkar, A., Gaurav, S. & Ahmed, S. Fission yeast Ctf1, a cleavage and polyadenylation factor subunit is required for the maintenance of genomic integrity. *Mol Genet Genomics* 292, 1027–1036 (2017).
- 641.Sonkar, A., Yadav, S. & Ahmed, S. Cleavage and polyadenylation factor, Rna14 is an essential protein required for the maintenance of genomic integrity in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 189–197 (2016).
- 642.Sontheimer, E. J. & Carthew, R. W. Molecular biology. Argonaute journeys into the heart of RISC. *Science* 305, 1409–1410 (2004).
- 643.Soria, G., Polo, S. E. & Almouzni, G. Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. *Molecular Cell* 46, 722–734 (2012).
- 644.Squatrito, M., Gorrini, C. & Amati, B. Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends in Cell Biology* 16, 433–442 (2006).
- 645.Srivastava, M. et al. Replisome Dynamics and Their Functional Relevance upon DNA Damage through the PCNA Interactome. *Cell Reports* 25, 3869–3883.e4 (2018).
- 646.Srivastava, R., Srivastava, R. & Ahn, S. H. The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 545–563 (2016).
- 647.Stankiewicz, P. & Lupski, J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics* 18, 74–82 (2002).
- 648.Steinacher, R., Osman, F., Dalgaard, J. Z., Lorenz, A. & Whitby, M. C. The DNA helicase Pfh1 promotes fork merging at replication termination sites to ensure genome stability. *Genes Dev.* 26, 594–602 (2012).
- 649.Stillman, B. Reconsidering DNA Polymerases at the Replication Fork in Eukaryotes. *Molecular Cell* 59, 139–141 (2015).

650. Stodola, J. L. & Burgers, P. M. Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond timescale. *Nat Struct Mol Biol* 23, 402–408 (2016).
651. Storici, F., Bebenek, K., Kunkel, T. A., Gordenin, D. A. & Resnick, M. A. RNA-templated DNA repair. *Nature* 447, 338–341 (2007).
652. Strålfors, A., Walfridsson, J., Bhuiyan, H. & Ekwall, K. The FUN30 Chromatin Remodeler, Fft3, Protects Centromeric and Subtelomeric Domains from Euchromatin Formation. *PLOS Genetics* 7, e1001334 (2011).
653. Struk, S. et al. Quantitative Tandem Affinity Purification, an Effective Tool to Investigate Protein Complex Composition in Plant Hormone Signaling: Strigolactones in the Spotlight. *Front Plant Sci* 9, (2018).
654. Stults, D. M. et al. Human rRNA gene clusters are recombinational hotspots in cancer. *Cancer Res.* 69, 9096–9104 (2009).
655. Su, D. et al. Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3-H4 by the chaperone Rtt106. *Nature* 483, 104–107 (2012).
656. Sugasawa, K. Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst.)* 44, 110–117 (2016).
657. Sugawara, N., Ira, G. & Haber, J. E. DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5300–5309 (2000).
658. Sugiyama, T. et al. SHREC, an effector complex for heterochromatic transcriptional silencing. *Cell* 128, 491–504 (2007).
659. Sun, G. et al. Differences in silencing of mismatched targets by sliced versus diced siRNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, 6806–6822 (2018).
660. Surani, M. A., Hayashi, K. & Hajkova, P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128, 747–762 (2007).
661. Sutherland, G. R. Rare fragile sites. *CGR* 100, 77–84 (2003).
662. Suzuki, H. I. et al. Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nature Structural & Molecular Biology* 22, 512–521 (2015).
663. Suzuki, H. I. et al. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529–533 (2009).
664. Szilard, R. K. et al. Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of  $\gamma$ -H2AX. *Nat Struct Mol Biol* 17, 299–305 (2010).
665. Tabancay, A. P. & Forsburg, S. L. Eukaryotic DNA Replication in a Chromatin Context. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 76 129–184 (Academic Press, 2006).

666. Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Méchali, M. & Blow, J. J. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat. Cell Biol.* 3, 107–113 (2001).
667. Tahbaz, N. et al. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO reports* 5, 189–194 (2004).
668. Takahashi, K. et al. A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell* 3, 819–835 (1992).
669. Takahashi, K., Yamada, H. & Yanagida, M. Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol. Biol. Cell* 5, 1145–1158 (1994).
670. Takeda, S., Nakamura, K., Taniguchi, Y. & Paull, T. T. Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Mol. Cell* 28, 351–352 (2007).
671. Tamaru, H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev* 24, 1465–1478 (2010).
672. Tan, B. C.-M., Chien, C.-T., Hirose, S. & Lee, S.-C. Functional cooperation between FACT and MCM helicase facilitates initiation of chromatin DNA replication. *EMBO J* 25, 3975–3985 (2006).
673. Tanaka, K. et al. A new cdc gene required for S phase entry of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the cdc 10+ and SWI4 gene products. *The EMBO Journal* 11, 4923–4932 (1992).
674. Tanaka, K. et al. Fission Yeast Eso1p Is Required for Establishing Sister Chromatid Cohesion during S Phase. *Mol Cell Biol* 20, 3459–3469 (2000).
675. Tang, K.-F. & Ren, H. The Role of Dicer in DNA Damage Repair. *Int J Mol Sci* 13, 16769–16778 (2012).
676. Tarasov, V. et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 6, 1586–1593 (2007).
677. Taricani, L. & Wang, T. S. F. Rad4TopBP1, a Scaffold Protein, Plays Separate Roles in DNA Damage and Replication Checkpoints and DNA Replication. *Mol Biol Cell* 17, 3456–3468 (2006).
678. Tashiro, S. et al. Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nat Commun* 7, 1–12 (2016).
679. Tashiro, S., Nishihara, Y., Kugou, K., Ohta, K. & Kanoh, J. Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. *Nucleic Acids Res* 45, 10333–10349 (2017).
680. Taylor, M. A. & Schiemann, W. P. Therapeutic opportunities for targeting microRNAs in cancer. *Mol Cell Ther* 2, (2014).

681. Teixeira-Silva, A. et al. The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nat Commun* 8, (2017).
682. Templin, T. et al. RADIATION-INDUCED MICRO-RNA EXPRESSION CHANGES IN PERIPHERAL BLOOD CELLS OF RADIOTHERAPY PATIENTS. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80, 549–557 (2011).
683. Teng, S. C., Kim, B. & Gabriel, A. Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. *Nature* 383, 641–644 (1996).
684. Tercero, J. A. & Diffley, J. F. X. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* 412, 553–557 (2001).
685. Thapar, R. Regulation of DNA Double-Strand Break Repair by Non-Coding RNAs. *Molecules* 23, 2789 (2018).
686. Thodberg, M. et al. Comprehensive profiling of the fission yeast transcription start site activity during stress and media response. *Nucleic Acids Res.* 47, 1671–1691 (2019).
687. Thon, G. & Verhein-Hansen, J. Four chromo-domain proteins of *Schizosaccharomyces pombe* differentially repress transcription at various chromosomal locations. *Genetics* 155, 551–568 (2000).
688. Thon, G. & Klar, AJS. Directionality of Fission Yeast Mating-Type Interconversion Is Controlled by the Location of the Donor Loci. *Genetics* 134, 1045–1054 (1993).
689. Thon, G. et al. The Clr7 and Clr8 Directionality Factors and the Pcu4 Cullin Mediate Heterochromatin Formation in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 171, 1583–1595 (2005).
690. Till, S. et al. A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 897–903 (2007).
691. Toda, T., Nakaseko, Y., Niwa, O. & Yanagida, M. Mapping of rRNA genes by integration of hybrid plasmids in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 8, 93–97 (1984).
692. Tolia, N. H. & Joshua-Tor, L. Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology* 3, 36–43 (2007).
693. Tomari, Y. et al. RISC Assembly Defects in the *Drosophila* RNAi Mutant *armitage*. *Cell* 116, 831–841 (2004).
694. Tormos-Pérez, M., Pérez-Hidalgo, L. & Moreno, S. Fission Yeast Cell Cycle Synchronization Methods. *Methods Mol. Biol.* 1369, 293–308 (2016).

695. Torres, J. Z., Bessler, J. B. & Zakian, V. A. Local chromatin structure at the ribosomal DNA causes replication fork pausing and genome instability in the absence of the *S. cerevisiae* DNA helicase Rrm3p. *Genes Dev* 18, 498–503 (2004).
696. Torres-Rosell, J. et al. The Smc5–Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nature Cell Biology* 9, 923–931 (2007).
697. Touat-Todeschini, L., Hiriart, E. & Verdel, A. Nucleosome positioning and transcription: fission yeast CHD remodellers make their move. *EMBO J.* 31, 4371–4372 (2012).
698. Touat-Todeschini, L. et al. Selective termination of lncRNA transcription promotes heterochromatin silencing and cell differentiation. *EMBO J.* 36, 2626–2641 (2017).
699. Trautmann, S., Rajagopalan, S. & McCollum, D. The *S. pombe* Cdc14-like Phosphatase Clp1p Regulates Chromosome Biorientation and Interacts with Aurora Kinase. *Developmental Cell* 7, 755–762 (2004).
700. Trautmann, S. et al. Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Current Biology* 11, 931–940 (2001).
701. Trewick, S. C., Minc, E., Antonelli, R., Urano, T. & Allshire, R. C. The JmjC domain protein Epe1 prevents unregulated assembly and disassembly of heterochromatin. *EMBO J* 26, 4670–4682 (2007).
702. Tsang, E. et al. The extent of error-prone replication restart by homologous recombination is controlled by Exo1 and checkpoint proteins. *J Cell Sci* 127, 2983–2994 (2014).
703. Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H. & Tomari, Y. Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1153–1158 (2011).
704. Tyler, J. K. et al. Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6574–6584 (2001).
705. Unsal-Kaçmaz, K. et al. The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3131–3142 (2007).
706. Uzawa, S. & Yanagida, M. Visualization of centromeric and nucleolar DNA in fission yeast by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Cell Science* 101, 267–275 (1992).
707. Vaishnav, A. K. et al. A status report on RNAi therapeutics. *Silence* 1, 14 (2010).
708. Vanoosthuyse, V., Prykhodzij, S. & Hardwick, K. G. Shugoshin 2 Regulates Localization of the Chromosomal Passenger Proteins in Fission Yeast Mitosis. *Mol Biol Cell* 18, 1657–1669 (2007).
709. Vengrova, S. & Dalgaard, J. Z. RNase-sensitive DNA modification(s) initiates *S. pombe* mating-type switching. *Genes Dev* 18, 794–804 (2004).



710. Vengrova, S. & Dalgaard, J. Z. The wild-type *Schizosaccharomyces pombe* *mat1* imprint consists of two ribonucleotides. *EMBO Rep.* 7, 59–65 (2006).
711. Verdell, A. Destabilizing Heterochromatin: Does Swi6/HP1 Make the Choice? *Molecular Cell* 22, 709–710 (2006).
712. Verdell, A. et al. RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex. *Science* 303, 672–676 (2004).
713. Verdell, A. & Moazed, D. RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Letters* 579, 5872–5878 (2005).
714. Verdell, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M. & Touat-Todeschini, L. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. vol. 53 (2009).
715. Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. & Stillman, B. Nucleosome Assembly by a Complex of CAF-1 and Acetylated Histones H3/H4. *Cell* 87, 95–104 (1996).
716. Vidanes, G. M., Bonilla, C. Y. & Toczyski, D. P. Complicated Tails: Histone Modifications and the DNA Damage Response. *Cell* 121, 973–976 (2005).
717. Vincent, J. A., Kwong, T. J. & Tsukiyama, T. ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 477–484 (2008).
718. Volpe, T. A. et al. Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi. *Science* 297, 1833–1837 (2002).
719. Volpe, T. & Martienssen, R. A. RNA interference and heterochromatin assembly. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a003731 (2011).
720. Volpe, T. et al. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res.* 11, 137–146 (2003).
721. Vujanovic, M. et al. Replication Fork Slowing and Reversal upon DNA Damage Require PCNA Polyubiquitination and ZRANB3 DNA Translocase Activity. *Mol. Cell* 67, 882–890.e5 (2017).
722. Wahls, W. P. & Smith, G. R. A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes & Development* 8, 1693–1702 (1994).
723. Wallgren, M. et al. G-rich telomeric and ribosomal DNA sequences from the fission yeast genome form stable G-quadruplex DNA structures in vitro and are unwound by the Pfh1 DNA helicase. *Nucleic Acids Res.* 44, 6213–6231 (2016).
724. Wan, G., Mathur, R., Hu, X., Zhang, X. & Lu, X. miRNA response to DNA damage. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 478–484 (2011).

725. Wang, H. et al. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* 31, 5377–5388 (2003).
726. Wang, J. et al. A Heterochromatin Domain Forms Gradually at a New Telomere and Is Dynamic at Stable Telomeres. *Mol Cell Biol* 38, e00393-17, /mcb/38/15/e00393-17.atom (2018).
727. Wang, J. et al. Epe1 recruits BET family bromodomain protein Bdf2 to establish heterochromatin boundaries. *Genes Dev.* 27, 1886–1902 (2013).
728. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* 43, 904–914 (2011).
729. Wang, P. et al. microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res.* 69, 8157–8165 (2009).
730. Wang, Y. et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* 461, 754–761 (2009).
731. Wang, Y. et al. Regulation of Set9-mediated H4K20 methylation by a PWWP domain protein. *Mol. Cell* 33, 428–437 (2009).
732. Warmerdam, D. O., van den Berg, J. & Medema, R. H. Breaks in the 45S rDNA Lead to Recombination-Mediated Loss of Repeats. *Cell Reports* 14, 2519–2527 (2016).
733. Warmerdam, D. O. & Wolthuis, R. M. F. Keeping ribosomal DNA intact: a repeating challenge. *Chromosome Res* 27, 57–72 (2019).
734. Warner, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 437–440 (1999).
735. Watanabe, T. et al. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science* 332, 848–852 (2011).
736. Watanabe, Y. & Yamamoto, M. *Schizosaccharomyces pombe* *pcr1+* encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol* 16, 704–711 (1996).
737. Waters, L. S. et al. Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 134–154 (2009).
738. Wee, L. M., Flores-Jasso, C. F., Salomon, W. E. & Zamore, P. D. Argonaute Divides Its RNA Guide into Domains with Distinct Functions and RNA-Binding Properties. *Cell* 151, 1055–1067 (2012).
739. Wei, J.-W., Huang, K., Yang, C. & Kang, C.-S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports* 37, 3–9 (2017).



740. Wei, W. et al. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* 149, 101–112 (2012).
741. Weinberg, D. E., Nakanishi, K., Patel, D. J. & Bartel, D. P. The inside-out mechanism of Dicers from budding yeasts. *Cell* 146, 262–276 (2011).
742. Welker, N. C. et al. Dicer's Helicase Domain Discriminates dsRNA Termini to Promote an Altered Reaction Mode. *Molecular Cell* 41, 589–599 (2011).
743. Welker, N. C. et al. Dicer's helicase domain is required for accumulation of some, but not all, *C. elegans* endogenous siRNAs. *RNA* 16, 893–903 (2010).
744. West, S. C. et al. Resolution of Recombination Intermediates: Mechanisms and Regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 80, 103–109 (2015).
745. WhatIsEpigenetics. A Super Brief and Basic Explanation of Epigenetics for Total Beginners. What is Epigenetics? <http://www.whatisepigenetics.com/what-is-epigenetics/> (2018).
746. White S.A., Allshire R.C. (2008) RNAi-Mediated Chromatin Silencing in Fission Yeast. In: Paddison P.J., Vogt P.K. (eds) *RNA Interference. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 320. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/978-3-540-75157-1\\_8](https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/978-3-540-75157-1_8)
747. Wierzbicki, A. T., Ream, T., Haag, J. R. & Pikaard, C. S. RNA Polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet* 41, 630–634 (2009).
748. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862 (1993).
749. Williams, R. S., Williams, J. S. & Tainer, J. A. Mre11–Rad50–Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 28th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem. Cell Biol.* 85, 509–520 (2007).
750. Willis, N. A. et al. Identification of S-phase DNA damage-response targets in fission yeast reveals conservation of damage-response networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E3676–E3685 (2016).
751. Wittmeyer, J., Joss, L. & Formosa, T. Spt16 and Pob3 of *Saccharomyces cerevisiae* form an essential, abundant heterodimer that is nuclear, chromatin-associated, and copurifies with DNA polymerase alpha. *Biochemistry* 38, 8961–8971 (1999).
752. Wohlschlegel, J. A. et al. Inhibition of Eukaryotic DNA Replication by Geminin Binding to Cdt1. *Science* 290, 2309–2312 (2000).

753. Woodward, A. M. et al. Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J. Cell Biol.* 173, 673–683 (2006).
754. Woolcock, K. J. et al. RNAi keeps Atf1-bound stress response genes in check at nuclear pores. *Genes Dev* 26, 683–692 (2012).
755. Wright, W. D., Shah, S. S. & Heyer, W.-D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 293, 10524–10535 (2018).
756. Wu, P.-Y. J. & Nurse, P. Establishing the Program of Origin Firing during S Phase in Fission Yeast. *Cell* 136, 852–864 (2009).
757. Wu, P.-Y. J. & Nurse, P. Replication origin selection regulates the distribution of meiotic recombination. *Mol. Cell* 53, 655–662 (2014).
758. Wu, S. Y., Lopez-Berestein, G., Calin, G. A. & Sood, A. K. RNAi Therapies: Drugging the Undruggable. *Science Translational Medicine* 6, 240ps7-240ps7 (2014).
759. Xu, Y. et al. Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 48, 723–733 (2012).
760. Xue, J. et al. Structure of the fission yeast *S. pombe* telomeric Tpz1-Poz1-Rap1 complex. *Cell Res* 27, 1503–1520 (2017).
761. Yamada, S. et al. The histone variant H2A.Z promotes initiation of meiotic recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 46, 609–620 (2018).
762. Yamada, T., Fischle, W., Sugiyama, T., Allis, C. D. & Grewal, S. I. S. The Nucleation and Maintenance of Heterochromatin by a Histone Deacetylase in Fission Yeast. *Molecular Cell* 20, 173–185 (2005).
763. Yamada, T. et al. Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *EMBO J.* 23, 1792–1803 (2004).
764. Yamada-Inagawa, T., Klar, A. J. S. & Dalgaard, J. Z. *Schizosaccharomyces pombe* Switches Mating Type by the Synthesis-Dependent Strand-Annealing Mechanism. *Genetics* 177, 255–265 (2007).
765. Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M. & Watanabe, Y. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455, 251–255 (2008).
766. Yamanaka, S. & Siomi, H. diRNA-Ago2-RAD51 complexes at double-strand break sites. *Cell Res* 24, 511–512 (2014).
767. Yanagida, M. Fission yeast cut mutations revisited: control of anaphase. *Trends in Cell Biology* 8, 144–149 (1998).
768. Yang, Q., Ye, Q. A. & Liu, Y. Mechanism of siRNA production from repetitive DNA. *Genes Dev.* 29, 526–537 (2015).

769. Yao, Y. & Dai, W. Shugoshins function as a guardian for chromosomal stability in nuclear division. *Cell Cycle* 11, 2631–2642 (2012).
770. Yasuhara, T. et al. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell* 175, 558–570.e11 (2018).
771. Ye, R. et al. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of Arabidopsis Argonaute4/siRNA complexes. *Mol. Cell* 46, 859–870 (2012).
772. Yeeles, J. T. P., Janska, A., Early, A. & Diffley, J. F. X. How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Molecular Cell* 65, 105–116 (2017).
773. Yoda, M. et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 17–23 (2010).
774. Yu, Y. et al. A proteome-wide visual screen identifies fission yeast proteins localizing to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* 12, 433–443 (2013).
775. Zaratiegui, M. et al. RNAi promotes heterochromatic silencing through replication-coupled release of RNA polII. *Nature* 479, 135–138 (2011).
776. Zaratiegui, M. et al. CENP-B preserves genome integrity at replication forks paused by retrotransposon LTR. *Nature* 469, 112–115 (2011).
777. Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16, 2–9 (2014).
778. Zhang, D. et al. The piRNA targeting rules and the resistance to piRNA silencing in endogenous genes. *Science* 359, 587–592 (2018).
779. Zhang, H., Hua, Y., Li, R. & Kong, D. Cdc24 Is Essential for Long-range End Resection in the Repair of Double-stranded DNA Breaks. *J Biol Chem* 291, 24961–24973 (2016).
780. Zhang, K., Mosch, K., Fischle, W. & Grewal, S. I. S. Roles of the Clr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 381–388 (2008).
781. Zhang, Z. et al. Homologous recombination as a mechanism to recognize repetitive DNA sequences in an RNAi pathway. *Genes Dev.* 27, 145–150 (2013).
782. Zhao, A., Guo, A., Liu, Z. & Pape, L. Molecular cloning and analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Reb1p: sequence-specific recognition of two sites in the far upstream rDNA intergenic spacer. *Nucleic Acids Res* 25, 904–910 (1997).
783. Zhao, H., Zhu, M., Limbo, O. & Russell, P. RNase H eliminates R-loops that disrupt DNA replication but is nonessential for efficient DSB repair. *EMBO Rep* 19, (2018).

- 784.Zhong, X. et al. Molecular mechanism of action of plant DRM de novo DNA methyltransferases. *Cell* 157, 1050–1060 (2014).
- 785.Zhou, B.-B. S. & Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439 (2000).
- 786.Zhou, Y. & Wang, T. S.-F. A Coordinated Temporal Interplay of Nucleosome Reorganization Factor, Sister Chromatin Cohesion Factor, and DNA Polymerase  $\alpha$  Facilitates DNA Replication. *Mol Cell Biol* 24, 9568–9579 (2004).
- 787.Zhu, M. et al. Lnc-mg is a long non-coding RNA that promotes myogenesis. *Nat Commun* 8, (2017).
- 788.Zilio, N. et al. A Novel Histone Deacetylase Complex in the Control of Transcription and Genome Stability. *Mol Cell Biol* 34, 3500–3514 (2014).
- 789.Zinchuk, V., Zinchuk, O. & Okada, T. Quantitative Colocalization Analysis of Multicolor Confocal Immunofluorescence Microscopy Images: Pushing Pixels to Explore Biological Phenomena. *Acta Histochem Cytochem* 40, 101–111 (2007).
- 790.Zofall, M. et al. RNA elimination machinery targeting meiotic mRNAs promotes facultative heterochromatin formation. *Science* 335, 96–100 (2012).
- 791.Zou, L. & Elledge, S. J. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300, 1542–1548 (2003).
- 792.Zou, L. & Nguyen, H. D. Getting a Genomic View of DNA Replication Stress. *Molecular Cell* 72, 201–203 (2018).
- 793.DNA checkpoints. *J. Cell Sci.* 116, e1905 (2003).
- 794.RNA:DNA Hybrids Initiate Quasi-Palindrome-Associated Mutations in Highly Transcribed Yeast DNA. *PLOS Genetics* 9, e1003924 (2013).
- 795.Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution* 74, 103935 (2019).
- 796.PANTHER - About. <http://www.pantherdb.org/about.jsp> (2019).
797. Chial, H. (2008) DNA sequencing technologies key to the Human Genome Project. *Nature Education* 1(1):219
798. Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D. J. & Koonin, E. V. Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11319–11324 (2000).

## *Références Bibliographiques*