



HAL
open science

Mécanismes d'élimination des ribonucléotides de l'ADN chez les Archaea

Maurane Réveil

► **To cite this version:**

Maurane Réveil. Mécanismes d'élimination des ribonucléotides de l'ADN chez les Archaea. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0010 . tel-03934802

HAL Id: tel-03934802

<https://theses.hal.science/tel-03934802v1>

Submitted on 11 Jan 2023

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 DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ÉCOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : *Microbiologie*

Par

Maurane REVEIL

Mécanismes d'élimination des ribonucléotides de l'ADN chez les *Archaea*

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 21 Février 2022

Unité de Recherche : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E)

UMR 6197, Ifremer, CNRS, UBO

Rapporteurs :

Béatrice CLOUET D'ORVAL
Directrice de recherche CNRS, CBI Toulouse

Mirjam CZJZEK
Directrice de recherche CNRS, Station Biologique de Roscoff

Composition du Jury :

Béatrice CLOUET D'ORVAL
Directrice de recherche CNRS, CBI Toulouse / *Présidente du Jury, Rapporteur*

Mirjam CZJZEK
Directrice de recherche CNRS, Station Biologique de Roscoff
/ *Rapporteur*

Didier GASPARUTTO
Directeur de recherche, CEA Grenoble / *Examineur*

Ghislaine HENNEKE
Chercheuse, Ifremer Brest / *Directrice de thèse*

Mohamed JEBBAR
Professeur, UBO Brest / *Co-directeur de thèse*

Yann MOALIC
Chercheur, UBO Brest / *Invité*

REMERCIEMENTS

Je souhaite premièrement remercier Ghislaine, ma directrice de thèse, qui m'a encadré pendant ces trois années. Merci pour ta disponibilité, ta confiance, tes conseils et ta bonne humeur permanente. Merci de m'avoir partagé tes connaissances qui m'ont permis d'avancer dans ce projet de thèse. Merci aussi à Mohamed mon co-directeur de thèse pour tes conseils et pour ton expérience de la génétique des *Archaea*. Je souhaite également remercier Yann qui m'a formé sur les manips de génétique. Merci pour ton soutien, ton aide précieuse pour obtenir les mutants et pour ton humour.

Je tiens à remercier les membres du jury Béatrice Clouet d'Orval, Mirjam Czjzek et Didier Gasparutto d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aussi aux membres de mon CSI Marc Nadal et Marc Blondel pour les échanges enrichissants et vos remarques constructives qui m'ont permis de faire progresser mon projet.

Merci à tous les membres du LM2E et du LEP pour votre accueil et votre bienveillance. Ce labo a été un environnement idéal pour passer mes 3 ans de thèse autant scientifiquement qu'humainement. Je remercie en particulier l'équipe Répli Ghislaine, Didier, Etienne, Rémi, Sébastien, Yang, Audrey, Emilie et Léa pour votre soutien et vos critiques toujours constructives et bienveillantes. Merci à Audrey pour ton enthousiasme et ton aide pour les manips finales. Je remercie également mes deux super alternantes Lucie et Blandine. Merci pour votre aide précieuse, votre joie de vivre, les gâteaux de pro de Lucie et les super montages de Blandine.

Je tiens aussi à remercier Raphaël et David ("El Doctor del Bioreactor") pour leur aide et leurs conseils lors des cultures en bioréacteur.

Lors de cette thèse j'ai eu la chance de faire un séjour scientifique dans le laboratoire d'Anders Hofer à Umea. Merci à Anders Hofer pour l'accueil, pour les échanges et pour son aide lors des nombreuses optimisations qui ont permis d'obtenir les quantifications des contenus en nucléotides. Je remercie également Ludovic Sauguet et Pierre Raia de l'Institut Pasteur pour leur collaboration et les structures des ADN polymérasés.

Merci à tous les thésards et post-docs du LM2E et du LEP pour la bonne ambiance, tous les bons moments partagés et le soutien. Merci plus spécifiquement à la team Virtual Regatta Algecco : Elodie, Marion (ma super collègue de bureau), David, Cas et Maggy sans oublier Guigui notre coach de voile. Merci aussi à Emilie, Blandine et Jordan pour les pauses café avec vue mer pendant la rédaction. Je remercie aussi Loïc et PA pour les soirées, les super podcasts, votre bonne humeur et votre humour.

Je remercie mes amis de Brest Lyndsay, Angéline, Léa, Gaëlle, PL, Clément et Lucas pour tous les bons moments partagés, votre soutien, sans oublier les soirées au Tortuga! Merci aussi aux amis de Master Pauline (ma copine de voyage), Anaïs, Alex, Clément et Gaëtan. Merci pour votre bonne humeur communicative et pour tous les fous rires (et les fameux poivrons). Merci aux copines de Périgueux Marion, Alyssa, Alice, Claire et Amélie toujours partantes pour un festival, un restau, un

match de rugby, ou un week-end breton ou parisien. Même si chacune a pris un chemin différent, merci d'être toujours là.

Je remercie également Elodie avec qui j'ai commencé cette thèse. Merci pour ton soutien pendant ces 3 années, pour les concerts, les festivals (petite pensée pour Freddy notre coq perdu dans les plaines du Boutdu), les débats sans fin, toutes nos discussions, les shi-fu-mi, les galères de manips, les fous rires interminables pendant les tournages de film de thèse... je n'aurai pas pu imaginer de meilleure "co-thésarde".

Enfin je remercie ma famille, et particulièrement mes parents et mon frère, merci pour votre soutien et vos encouragements pendant toutes ces années d'étude.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Participation à des Congrès

Conférences Jacques Monod "Instabilité du génome : lorsque l'ARN rencontre la chromatine" (Roscoff) du 16 au 20 septembre 2019

Poster "**Impact of ribonucleotides incorporation by the DNA polymerases on the genome stability of *Archaea***"

Maurane Reveil, Pierre Raia, Ludovic Sauguet, Mohamed Jebbar and Ghislaine Henneke.

Congrès EMBO virtuel "Friend or Foe : Transcription and RNA meet DNA replication and repair" du 9 au 12 mars 2021

Poster "**Removal mechanisms of embedded ribonucleotides in archaeal DNA**"

Maurane Reveil, Pierre Raia, Ludovic Sauguet, Yann Moalic, Mohamed Jebbar and Ghislaine Henneke.

Congrès Deep Sea Biology Symposium du 13 au 17 septembre 2021 (Brest)

Poster "**Removal mechanisms of embedded ribonucleotides in DNA from deep-sea archaeal microorganisms**"

Maurane Reveil, Lucie Chapel, Blandine Vourc'h, Pierre Raia, Ludovic Sauguet, Yann Moalic, Mohamed Jebbar and Ghislaine Henneke.

Congrès GdR *Archaea* du 18 au 19 octobre 2021

Communication orale "**Ribonucleotide Excision Repair pathway in deep-sea *Archaea***"

Maurane Reveil, Lucie Chapel, Blandine Vourc'h, Yann Moalic, Mohamed Jebbar, Ghislaine Henneke.

Séjour scientifique

Bourse de mobilité internationale (octobre 2019) pour l'évaluation du contenu intracellulaire en ribo- et désoxyribonucléotides triphosphates chez les *Archaea* dans l'équipe du Professeur Anders Hofer (Department of Medical Biochemistry and Biophysics) à l'Université d'Umea (Suède).

Articles en préparation

Contribution of the proofreading exonuclease activity of archaeal DNA polymerases to rNMP removal from nascent DNA strand

Maurane Reveil, Pierre Raia, Audrey Bosse, Blandine Vourc'h, Yann Moalic, Mohamed Jebbar, Ludovic Sauguet, Ghislaine Henneke

Archaeal Ribonucleotide Excision Repair is efficient to correct matched and mismatched rNMP

Maurane Reveil, Lucie Chapel, Blandine Vourc'h, Yann Moalic, Léa Vialle, Mohamed Jebbar, Ghislaine Henneke

TABLE DES MATIÈRES

I Introduction

1	La réplication de l'ADN	21
1	Initiation de la réplication : formation d'une fourche de réplication	21
1.1	Formation du complexe de pré-initiation	21
1.2	Synthèse des amorces et asymétrie d'une fourche de réplication	22
2	Elongation du brin avancé et du brin retardé : progression d'une fourche de réplication	23
3	Maturation des fragments d'Okazaki	24
2	Les ADN polymérasés	27
1	Structure des ADN polymérasés	27
2	Fonctions des ADN polymérasés	28
3	La fidélité des ADN polymérasés	28
3.1	Concentration intracellulaire des nucléotides	29
3.2	Appariement des paires de bases et site d'exclusion stérique	29
3.3	Activité exonucléase	30
4	Les ADN polymérasés de la réplication de l'ADN chez les <i>Archaea</i>	30
4.1	PriS/PriL	30
4.2	ADN polymérase B	32
4.3	ADN polymérase D	34
3	Les ribonucléotides	37
1	Bases de l'ARN	37
2	Précurseurs nucléotidiques	38
3	Domage à l'ADN le plus important	40
4	Présence des ribonucléotides dans l'ADN	41
1	Principales causes de la présence des ribonucléotides dans l'ADN	41
1.1	Incorporation des ribonucléotides par les ADN polymérasés	41
1.2	Mauvaise maturation des fragments d'Okazaki	43
1.3	Les dommages oxydatifs	43
2	Conséquences de la présence de ribonucléotides dans l'ADN	43
2.1	Rôle de signal	43
2.2	Modification de la conformation de l'ADN	44
2.3	Induction de stress réplcatif	44
5	L'élimination des ribonucléotides de l'ADN	45
1	Activité exonucléase des ADN polymérasés	45
2	Les voies de réparation des ribonucléotides	45
2.1	L'excision des ribonucléotides initiée par la RNase HII/2 (RER RNase HII/2) .	45
2.2	L'excision des ribonucléotides initiée par la Topoisomérase 1 (RER Top1) . . .	47

6	Les <i>Archaea</i>	49
1	Découverte et classification	49
2	Les <i>Archaea</i> comme modèle d'étude de la maintenance génomique	50
2.1	Modèles d'études biochimiques, l'exemple de <i>Pyrococcus abyssi</i>	50
2.2	Modèles d'études génétiques, l'exemple de <i>Thermococcus barophilus</i>	51
7	Objectifs	53
1	Importance de la fonction exonucléase des ADN polymérase dans l'élimination des ribonucléotides de l'ADN	53
2	Etude de la voie d'excision des ribonucléotides (RER) initiée par la RNase HIII	53
3	Quantification du pool de nucléotide intracellulaire de <i>Thermococcus barophilus</i> et <i>Haloferox volcanii</i>	54
II	Activité exonucléase des ADN polymérase	55
1	Présentation de l'étude	57
2	Article en préparation :	
	Contribution of the proofreading exonuclease activity of archaeal DNA polymerases to rNMP removal from nascent DNA strand	59
1	Introduction	59
2	Experimental procedures	61
3	Results	63
4	Discussion	71
5	Supplementary data	75
3	Résultats supplémentaires	81
1	Matériel et méthodes supplémentaires	81
1.1	Enzymes utilisées	81
1.2	Hybridation des amorces et des matrices	81
1.3	Réaction d'incorporation de ribonucléotides	81
2	Efficacité de l'activité exonucléase de PolB pour corriger les ribonucléotides et influence du site d'exclusion stérique	83
2.1	Influence de la concentration en magnésium sur l'efficacité de PolB	83
2.2	Influence du temps de réaction	83
2.3	Incorporation de ribonucléotides par PolBY410G	85
2.4	Discussion et Perspectives	87
3	Obtention de produits d'extension pour l'optimisation du séquençage Nanopore	92
4	Etude de l'activité exonucléase des ADN polymérase <i>in vivo</i>	95
III	Etude de la voie de réparation RER initiée par la RNase HIII	97
1	Présentation de l'étude	99

2 Article en préparation :	
Archaeal Ribonucleotide Excision Repair is efficient to correct matched and mismatched ribonucleotides	101
1 Introduction	101
2 Experimental procedures	103
3 Results	106
4 Discussion	117
5 Supplementary data	121
IV Nucleotide pool quantification of <i>Haloferax volcanii</i> and <i>Thermococcus barophilus</i> MP	127
1 Présentation de l'étude	129
2 Experimental procedures	131
1 Culture and cell collection	131
2 Nucleotide Extraction and HPLC analysis	131
3 Results	133
1 Hvo nucleotide pool quantification	133
2 Tba nucleotide pool quantification	135
4 Discussion	139
1 Comparison of nucleotide pools from HvoWT, TbaWT and their derivative RNase H mutants cells	139
2 Correlation between nucleotide pool and level of embedded ribonucleotides in the genomes of Tba, Hvo and their relative RNase H mutants	140
3 Comparison of Hvo nucleotide pool quantification with two different methods	142
4 Comparison of nucleotide pool of organisms belonging to the three domains of life	142
5 Conclusion and Perspectives	145
Annexes	153
A Milieu SME	155
B Milieu YPC	157

TABLE DES FIGURES

1	Schéma représentant la fourche de réplication des Bactéries (A), des Eucaryotes (B) et des <i>Archaea</i> (C) d'après O'Donnell et al. 2013 et Barry et al. 2006	22
2	Schéma représentant les différents modèles de la maturation des fragments d'Okazaki chez les Bactéries (A), les Eucaryotes (B) et les <i>Archaea</i> (C) adapté de Greenough et al. 2015	25
3	Classification des ADN polymérases réplicatives en fonction de la structure de leurs domaines catalytiques d'après Raia, Delarue et al. 2019.	28
4	Impact de l'activité de relecture sur le taux d'erreur des ADN polymérases réplicatives d'après McCulloch et al. 2008	30
5	Structure de la sous-unité p41 de <i>Pyrococcus horikoshii</i> d'après N. Ito et al. 2003	31
6	Structure de l'ADN polymérase B d'après Gouge et al. 2012	32
7	Structure cristallographique de l'ADN polymérase D de <i>Pyrococcus abyssi</i> d'après Raia, Carroni et al. 2019 et Sauguet et al. 2016	33
8	Modèle proposé de l'origine évolutive des ADN polymérases réplicatives des <i>Archaea</i> d'après Raia, Carroni et al. 2019	35
9	Voie de synthèse <i>de novo</i> des désoxyribonucléotides (A) et ses régulations (B), d'après Hofer et al. 2012	37
10	Quantification des nucléotides intracellulaires	39
11	Les différents types de dommages à l'ADN chez les <i>Archaea</i> , adapté de Marshall et al. 2020; White et al. 2018.	40
12	Voie de réparation RER initiée par la RNase HII dans les trois domaines du vivant d'après Heider et al. 2017	46
13	Voie de réparation RER initiée par la Topoisomérase I chez les Eucaryotes d'après Williams et al. 2016	48
14	Arbre phylogénétique représentant le domaine des <i>Archaea</i> d'après Spang et al. 2017	49
15	Méthode du pop-in pop-out chez <i>Thermococcus barophilus</i> adapté de Thiel et al. 2014 et Birien et al. 2018	52
16	PolD exonuclease activity is more efficient than PoB to correct matched embedded ribonucleotides	64
17	Both PolB and PolD exonuclease activities are efficient to correct a mismatched rNMP	67
18	Ribonucleotide incorporation by PolB and PolD compared to their exonuclease deficient versions	69
19	Influence of exonuclease activity on the mutation frequency of PolB and PolD	71
S1	Influence of PCNA and RPA on DNA pols activity	76
S2	Cleavage specificity of <i>E. coli</i> RNase HI and RNase HII depending on the substrate	77
S3	Run of 4 ribonucleotides incorporation by PolB and PolD compared to their exonuclease deficient versions detected by RNase HI treatment	78
S4	Exonuclease activity of PolB and PolD on a 3'-rC/rG or rG/rC containing substrates	79

20	Influence de la concentration en magnésium, du temps d'incubation et de l'activité exonucléase sur l'incorporation de ribonucléotides par PolB	84
21	Influence de l'activité exonucléase sur l'incorporation de ribonucléotides par PolB dans de courts ADN linéaires	86
22	Détection de l'incorporation de ribonucléotides par PolBY410G dans une courte amorce ADN linéaire par traitement enzymatique	88
23	Influence de la concentration en nucléotides sur l'incorporation de ribonucléotides par PolB dans une matrice ADN circulaire	93
24	PabRNase HIII cleavage efficiency on a matched rAMP compared to a mismatched rAMP	106
25	Enzymatic characterisation of PabFen1 5'→3' exonuclease activity	108
26	Enzymatic characterisation of PabLig1 on single matched or mismatched dAMP or rAMP and on stretch rNMPs containing substrates	110
27	RNase HIII initiated RER reconstitution with PabPolB and PabPolD	112
28	Genomic ribonucleotides embedded in TbaWT cells compared to its RER derivative mutants and their heterologous complementations	114
29	Sensitivity of RER mutants and their heterologous complementation after exposition to MMC, H ₂ O ₂ or MMS	116
30	Proposed model for archaeal RNase HIII initiated RER pathway	118
S5	Enzymatic characterisation of PabFen1 on double flap and single flap substrates . . .	121
S6	rNMP correction by RER pathway with PabPolB and PabPolD assessed by RNase HIII treatment	122
S7	Relative quantification of PolB and RNase HIII expression in TbaΔ <i>polB</i> , TbaΔ <i>rnhII</i> , TbaΔ <i>polB</i> +Pab <i>polB</i> and TbaΔ <i>rnhII</i> +Pab <i>rnhII</i> strains compared to TbaWT assessed by RT-qPCR	123
S8	Growth curves of TbaWT, TbaΔ <i>TERMP_00517</i> , TbaΔ <i>polB</i> , TbaΔ <i>rnhII</i> , TbaΔ <i>polB</i> +Pab <i>polB</i> and TbaΔ <i>rnhII</i> +Pab <i>rnhII</i> strains in TRM or TAA medium	124
31	Ribonucleotides incorporated in the genomes of wild-type Tba, Hvo and their corresponding RNase H mutants measured by Ribose-seq (article in preparation, Y. Moalic, G. Henneke and F. Storici)	130
32	DNA polymerase assay to control <i>Haloferax volcanii</i> wild-type dNTP pool quantification	133
33	Nucleotide pool quantification from wild-type Hvo cells and corresponding RNase H mutants cells	134
34	Nucleotide pool quantification from wild-type Tba cells and corresponding RNase H mutant cells	136
35	Comparison of nucleotide pools of <i>Haloferax volcanii</i> , <i>Thermococcus barophilus</i> and their derivative RNase H mutants	139
36	Comparison of nucleotide pools from wild-type <i>Haloferax volcanii</i> by two methods . .	141
37	Comparison of nucleotide pool quantification from organisms of the three domains of life by HPLC-UV	143
38	Modèle d'élimination des ribonucléotides de l'ADN chez les <i>Archaea</i> par l'activité exonucléase des ADN polymérase répliquatives et la voie RER	151

LISTE DES TABLEAUX

1	Les ADN polymérase répliquatives des Eucaryotes	23
2	Les ADN polymérase répliquatives des Bactéries	24
3	Les ADN polymérase répliquatives des <i>Archaea</i>	31
4	Taux de ribonucléotides incorporés dans le génome par les ADN polymérase répliquatives des trois domaines du vivant	42
5	Caractéristiques de croissance et taille des génomes de <i>Pyrococcus abyssi</i> et <i>Thermococcus barophilus</i> (Marteinsson et al. 1999 ; Vannier et al. 2011 ; Erauso et al. 1993 ; Cohen et al. 2003 ; Gao et al. 2012)	51
S1	Oligonucleotide sequences used in this study	75
6	Oligonucléotides utilisés pour former les différents hybrides pour les réactions d'incorporation et de dégradation	82
7	<i>Thermococcus barophilus</i> and derivative mutant strains used in this study	104
S2	Oligonucleotide sequences used in this study	125
S3	Primers used for mutant strains construction	126
S4	qPCR primers used for gene expression assessment	126
S5	Not viable mutants in our transformation conditions	126
8	Taux de ribonucléotides incorporés dans le génome et éliminés par l'activité exonucléase des ADN polymérase répliquatives des trois domaines du vivant	150

ABRÉVIATIONS

4-NQO	: 4-Nitroquinoline 1-oxide
6-MP	: 6-MéthylPurine
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
APS	: Ammonium PerSulfate
ARN	: Acide RiboNucléique
ATP, CTP, GTP, TTP	: Adénosine, Cytidine, Guanosine, Thymidine triphosphate
BER	: Base Excision Repair
Cdc6 ou 45	: Cell division cycle 6 ou 45
Cy5	: Indocarbo-cyanine 5
(d)/rNTP	: (Désoxy)/ribonucléotides triphosphates
DTT	: Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
FAM	: 6-carboxyfluorescein
Fen1	: Flap endonuclease 1
GINS	: Go-ichi-ni-san
H ₂ O ₂	: Hydrogen Peroxide
HCl	: Chlorure d'hydrogène
HPLC	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
Hvo	: <i>Haloferax volcanii</i>
I/UMP	: Inosine/Uridine Mono-Phosphate
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KCl	: Chlorure de potassium
kpb, Mpb	: kilo paires de bases, Méga paires de bases
LB	: Lysogeny Broth
Lig I/III/1	: ADN ligase I/III/1
MCM	: Minichromosome Maintenance
MgCl ₂	: Chlorure de magnésium
MMC	: Mitomycin C
MMR	: Mismatch Repair
MMS	: Methyl MethaneSulfonate
Mre11	: Meiotic Recombination 11
NaCl	: Chlorure de sodium
NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide
NaOH	: Hydroxyde de sodium
NER	: Nucleotide Excision Repair
NHEJ	: Non-Homologous End Joining
nt	: nucleotide
ORC	: Origin Recognition Complex
OB	: Oligonucleotide Binding domain

Pab	:	<i>Pyrococcus abyssi</i>
PAGE	:	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
pb / bp	:	paires de bases
PCNA	:	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDE	:	Phosphodiesterase
PHP	:	Polymerase histidinol phosphatase
Pol	:	ADN Polymérase
PPi	:	Pyrophosphate inorganique
RER	:	Ribonucleotide Excision Repair
RFC	:	Replication Factor C
RNase HI/1 ou HII/2	:	Ribonucléase HI/1 ou HII/2
RNR	:	RiboNucléotide Réductase
ROS	:	Reactive Oxygen Species
RPA	:	Replication Protein A
<i>S. cerevisiae</i>	:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Sim	:	Simvastatine
SSB	:	Single-Strand Binding
SV40	:	Simian Virus 40
Tba	:	<i>Thermococcus barophilus</i>
TBE	:	Tris Borate EDTA
TCA	:	Tri-Chloroacetic Acid
TEMED	:	Tetramethylethylenediamine
Top1	:	Topoisomérase 1
TRM	:	Thermococcales Rich Medium
TAA	:	Thermococcales Amino Acids

CHAPITRE I

Introduction

LA RÉPLICATION DE L'ADN

La découverte de la structure de la double hélice ADN et de l'appariement des bases par Watson et Crick en 1953 (Watson et al. 1953) puis l'identification et la purification de la première ADN polymérase chez *E. coli* par Kornberg ont permis de comprendre les bases de la réplication de l'ADN (Kornberg 1969). En 1994, la réplication de l'ADN a été entièrement reconstituée *in vitro* avec le système viral SV40 (Waga et al. 1994; Ishimi et al. 1988). La réplication de l'ADN est un processus conservé dans les trois domaines du vivant se déroulant en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la maturation des fragments d'Okazaki. Bien que la réplication de l'ADN soit un mécanisme conservé, de nombreuses différences dans son déroulement existent entre les trois domaines du vivant (Y. Ishino et al. 2012).

1 Initiation de la réplication : formation d'une fourche de réplication

Les Eucaryotes possèdent plusieurs chromosomes linéaires ayant chacun plusieurs origines de réplication. En général, les Bactéries ne possèdent qu'un seul chromosome circulaire dont la réplication est bi-directionnelle à partir d'une origine de réplication (Leonard et al. 2013). Chez les *Archaea*, la réplication de l'ADN se fait de façon similaire aux Bactéries : la réplication est bi-directionnelle à partir d'une ou plusieurs origines de réplication selon les espèces. Les *Euryarchaea* comme les *Pyrococcus* possèdent une seule origine de réplication (Myllykallio et al. 2000) à l'exception des *Halobacteria* qui comme les *Crenarchaea* ont plusieurs origines de réplication (Robinson et al. 2005). Les chromosomes des *Archaea* sont circulaires et la réplication de l'ADN est plus rapide que chez les Eucaryotes (Myllykallio et al. 2000; Ausiannikava et al. 2017). En revanche, les protéines impliquées dans la réplication sont proches de celles retrouvées chez les Eucaryotes (Kelman et al. 2014; S. Ishino et al. 2013).

1.1 Formation du complexe de pré-initiation

Dans les trois domaines du vivant, les protéines initiatrices appartenant à la famille AAA+ se lient aux origines de réplication. Chez les Eucaryotes, la protéine Cdc6 ou "cell division cycle 6" forme un complexe avec la sous-unité Orc1 du complexe de reconnaissance de l'origine (ORC) pour se lier à l'ADN (O'Donnell et al. 2013). Les *Archaea* possèdent également un complexe Orc1/Cdc6 avec un nombre de sous-unités différent en fonction des espèces (Barry et al. 2006). Chez les Bactéries le filament DnaA se lie à l'ATP pour former une bulle simple brin (O'Donnell et al. 2013). Les protéines initiatrices se lient à l'ADN au niveau de la fourche de réplication et permettent le chargement de l'hélicase qui permet d'ouvrir le double brin ADN en deux simples brins. Les hélicases utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour casser les liaisons hydrogène de l'ADN double brin et pour permettre la translocation de la fourche de réplication le long de l'ADN (O'Donnell et al. 2013). Le mouvement de la fourche de réplication peut être uni ou bi-directionnel. Chez les Bactéries l'hélicase est l'homohexamère DnaB (Figure 1A). Chez les Eucaryotes l'hélicase MCM ou "MiniChromosome Maintenance" est un hétéro-

hexamère qui doit interagir avec les protéines GINS (Go-Ichi-Ni-San) et Cdc45 pour être active (Figure 1B) alors que la protéine MCM des *Archaea* est un homo-hexamère qui ne nécessite pas d'interactions avec des protéines supplémentaires pour être active (O'Donnell et al. 2013 ; Barry et al. 2006 ; Ausianikava et al. 2017). Cependant, l'association de MCM des *Archaea* avec les protéines GINS et GAN permet de stimuler l'activité de MCM (Figure 1C) (Nagata et al. 2017). Des protéines de liaison à l'ADN simple brin telles que la protéine de réplication A (RPA) chez les Eucaryotes et les *Archaea* ou SSB chez les Bactéries permettent d'éliminer les structures secondaires et ainsi de faciliter l'avancée de la fourche de réplication. Ces protéines protègent également l'ADN simple brin de la dégradation par les nucléases (Kornberg et al. 2005).

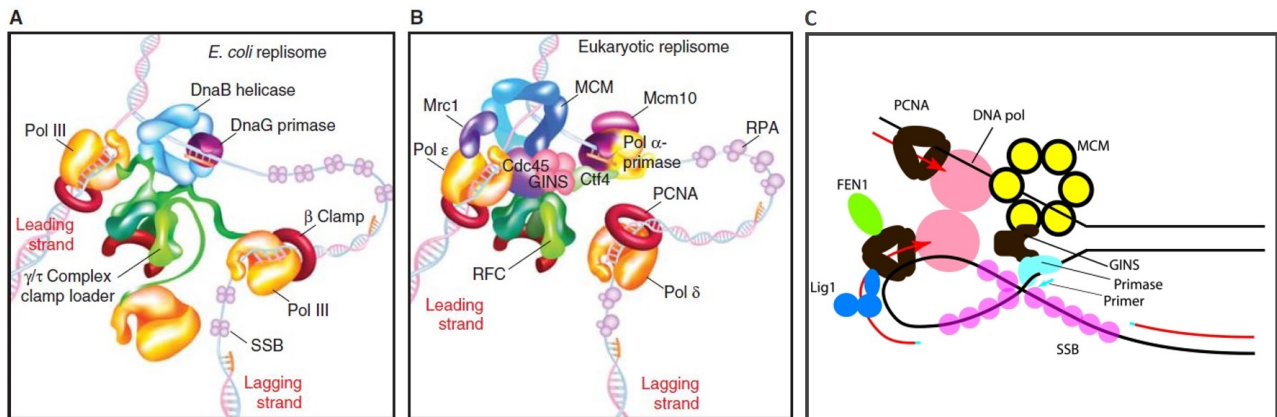


FIGURE 1: Schéma représentant la fourche de réplication des Bactéries (A), des Eucaryotes (B) et des *Archaea* (C) d'après O'Donnell et al. 2013 et Barry et al. 2006.

Représentation d'une fourche de réplication bactérienne (A), eucaryote (B) et d'*Archaea* (C). Les hélicases DnaB ou MCM permettent d'ouvrir le double brin ADN en deux simple brins, le brin avancé (leading strand) et retardé (lagging strand) sur lesquels se fixent les protéines de liaison à l'ADN simple brin SSB ou RPA. La synthèse ADN est effectuée par les primases (DnaG, Pol α -primase ou PriS/PriL) et les ADN polymérase répliquatives (Pol I, Pol III, Pol δ , Pol ϵ , PolB ou PolD).

1.2 Synthèse des amorces et asymétrie d'une fourche de réplication

La réplication des deux brins de la fourche de réplication se fait de façon simultanée. Cela implique que la synthèse d'un des deux brins se fasse de façon complémentaire au brin de polarité 3'→5' (brin retardé) malgré le fait que les ADN polymérase répliquatives synthétisent l'ADN uniquement dans le sens 5'→3'. L'équipe d'Okazaki propose un modèle dans lequel la synthèse ADN d'un des deux brins se fait de façon discontinue à partir d'un segment ARN initiateur amorçant ainsi la réplication du brin complémentaire de polarité 3'→5' (brin retardé) (R. Okazaki et al. 1968 ; T. Okazaki et al. 1969 ; Hirose et al. 1973). Ces segments ARN sont ensuite prolongés par de l'ADN et forment les fragments d'Okazaki.

Les amorces ARN initiateur sont synthétisées par une primase (O'Donnell et al. 2013). Chez *E. coli* la primase DnaG se lie à l'hélicase DnaB sur une matrice ADN simple brin en présence d'ATP pour synthétiser une amorce ARN d'environ 12 nucléotides (Figure 1A) (Kornberg et al. 2005). Chez les *Archaea* la primase PriS/PriL synthétise une amorce ARN de 9 à 16 nucléotides (Figure 1C) (Kelman et al. 2014). Chez les Eucaryotes, le complexe Pol α -primase synthétise une amorce ARN d'environ 12 nucléotides suivie d'une amorce ADN d'environ 25 nucléotides. Le complexe Pol α -primase est ensuite remplacé par l'ADN polymérase δ possédant une activité de relecture pour garantir une meilleure

fidélité de la synthèse ADN (Figure 1B) (Nethanel et al. 1990 ; Tsurimoto et al. 1991).

2 Elongation du brin avancé et du brin retardé : progression d'une fourche de réplication

La réplication du brin avancé se fait de façon continue à partir d'une seule amorce ARN-ADN dans le sens 5'→3'. La réplication du brin retardé, dans le sens inverse de l'avancée de la fourche de réplication, se fait de manière discontinue sous la forme de fragments d'Okazaki (O'Donnell et al. 2013). Ces derniers sont présents chez les Eucaryotes (Westergaard et al. 1973 ; Kaufmann et al. 1977 ; Magnusson et al. 1973), les Bactéries (O'Donnell et al. 2013) et les *Archaea* (Matsunaga et al. 2003). Ils sont longs entre 1 et 2 kb chez les Bactéries, entre 100 et 200 pb chez les Eucaryotes et font jusqu'à 120 pb chez l'*Archaea Pyrococcus abyssi* (Balakrishnan et al. 2013 ; Matsunaga et al. 2003).

	Polα / primase	Polδ	Polϵ	Polγ
Famille (Delagoutte 2012)	B	B	B	A
Essentielle	oui	oui	oui	oui
Activité polymérase	amorces ADN / primase	brin retardé	brin avancé	ADN mitochondrial
Activité exonucléase	non	3'→5'	3'→5'	3'→5'
Structure du site catalytique (Raia, Delarue et al. 2019)	Klenow-like	Klenow-like	Klenow-like	Klenow-like
Structure du site exonucléase (Raia, Delarue et al. 2019)	DnaQ-like/PDE	DnaQ-like/PDE	DnaQ-like/PDE	DnaQ-like
Taux d'incorporation de rNMPs	1/625	1/5000	1/1250	1/2200
Références	Murakami et al. 1986	Nick McElhinny et al. 2008 ; Nick McElhinny et al. 2010	Nick McElhinny et al. 2008 ; Nick McElhinny et al. 2010 ; Zlotkin et al. 1996 ; Pursell et al. 2007 ; Niranjankumari et al. 1993	Forslund et al. 2018

TABLEAU 1: Les ADN polymérases répliquatives des Eucaryotes

Chez les Eucaryotes deux ADN polymérases sont impliquées dans la réplication, Pol ϵ permet la synthèse du brin avancé (Pursell et al. 2007) et Pol δ la synthèse du brin retardé (Nick McElhinny et al. 2008) (Tableau 1). Chez les Bactéries, la polymérisation du brin avancé est effectuée par Pol III et la synthèse du brin retardé est effectuée par Pol I et Pol III (Setlow 1974 ; Kornberg et al. 2005) (Tableau 2). Chez les *Archaea*, deux familles d'ADN polymérases répliquatives ont été identifiées, les familles B et D (Raia, Delarue et al. 2019). Les *Archaea* possèdent deux ADN polymérases, PolB et PolD à l'exception des *Crenarchaea* qui ne possèdent pas PolD mais ont 3 PolB différentes (Cooper 2018). Le rôle de PolB et PolD dans la synthèse des deux brins n'est pas encore bien défini (Henneke et al. 2005) (Tableau 3).

Les deux ADN polymérases interagissent avec une protéine trimérique formant un anneau autour de l'ADN "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA) qui est chargée sur l'ADN par le facteur de réplication C (RFC) et permet d'augmenter leur processivité (Prelich et al. 1987 ; Prelich et al. 1988 ;

Nick McElhinny et al. 2008). Le PCNA des *Archaea* interagit avec PolB et PolD et stimule leur activité (Henneke et al. 2005 ; Castrec et al. 2009 ; Madru et al. 2020). L'interaction entre PolB et le PCNA se fait par un motif PIP box et PolD nécessite deux motifs PIP box pour interagir avec le PCNA (Castrec et al. 2009 ; Madru et al. 2020).

	Pol I	Pol III
Famille (Delagoutte 2012)	A	C
Essentielle	oui	oui
Activité polymérase	brin retardé	brins avancé et retardé
Activité exonucléase	5'→3' et 3'→5'	3'→5'
Structure du site catalytique (Raia, Delarue et al. 2019)	Klenow	Polβ-like
Structure du site exonucléase (Raia, Delarue et al. 2019)	DnaQ-like	DnaQ-like/PHP
Taux d'incorporation de rNMPs	?	1/2300
Références	Setlow 1974	Yao et al. 2013

TABLEAU 2: Les ADN polymérase répliquatives des Bactéries

3 Maturation des fragments d'Okazaki

Après l'étape d'élongation, la partie ARN des fragments d'Okazaki doit être éliminée avant la ligature des différents fragments ADN entre eux.

Il a été montré chez *E. coli* que la partie ARN des fragments d'Okazaki est éliminée par l'activité exonucléase de Pol I (Kurosawa et al. 1975 ; Ogawa et al. 1977). En effet, Pol I est la seule ADN polymérase connue possédant une activité exonucléase 5'→3', permettant aux Bactéries d'éliminer le fragment ARN des fragments d'Okazaki sans nucléase supplémentaire contrairement aux Eucaryotes et aux *Archaea* (Figure 2A).

Chez les Eucaryotes, trois modèles sont proposés pour la maturation des fragments d'Okazaki (Zheng et al. 2011 ; Giannattasio et al. 2019). La première voie identifiée implique le clivage de la partie ARN des fragments d'Okazaki par la ribonucléase RNase H2. RNase H2 reconnaît spécifiquement la jonction ARN-ADN des fragments d'Okazaki et fait un clivage en 5' du ribonucléotide (Murante et al. 1998). Après le clivage par RNase H2 il reste un monoribonucléotide en 5' qui doit être éliminé avant la ligature. Après le clivage par RNase H2 ce monoribonucléotide peut être éliminé par une exonucléase 5'→3' (Turchi et al. 1994) (Figure 2B).

L'ADN polymérase δ possède une activité de déplacement de brin. Cette activité de déplacement de brin est stimulée par le PCNA (Maga et al. 2001). Lors de la réplication du brin retardé, après élongation d'un fragment d'Okazaki Pol δ peut déplacer le fragment d'Okazaki suivant par son extrémité 5'. Le simple brin déplacé peut être éliminé par deux mécanismes en fonction de sa longueur. Si le simple brin flottant est court il peut être clivé par l'endonucléase Fen1 (Maga et al. 2001 ; Ayyagari et al. 2003). Fen1 est une endonucléase spécifique d'une structure et non d'une séquence ADN qui possède des résidus de liaison à l'ADN conservés chez tous ses homologues (Chapados et al. 2004). En général, dès qu'un nucléotide est déplacé par Pol δ il est aussitôt clivé par Fen1. L'interaction entre les activités polymérase et exonucléase de Pol δ permettrait de limiter le déplacement du brin par Pol δ (Garg 2004 ; Jin et al. 2003). Ces mécanismes permettent d'éviter la formation de brins flottants trop longs. Si le fragment flottant est long d'environ 30 nucléotides, RPA se fixe sur le simple brin inhibant

Fen1 et limitant le déplacement d'un fragment à une taille correspondant à celle des fragments synthétisés par le complexe Pol α -Primase. L'hélicase Dna2 forme un complexe avec RPA et le fragment simple brin flottant (Bae et al. 2001 ; Ayyagari et al. 2003). Dna2 possède une activité endonucléase lui permettant de cliver une partie ARN du simple brin déplacé par Pol δ (Bae et al. 2000 ; Bae et al. 2001 ; Kang et al. 2000). Dna2 laisse entre 5 et 10 nucléotides simple brins flottants qui peuvent être clivés par Fen1 (Bae et al. 2001 ; Ayyagari et al. 2003).

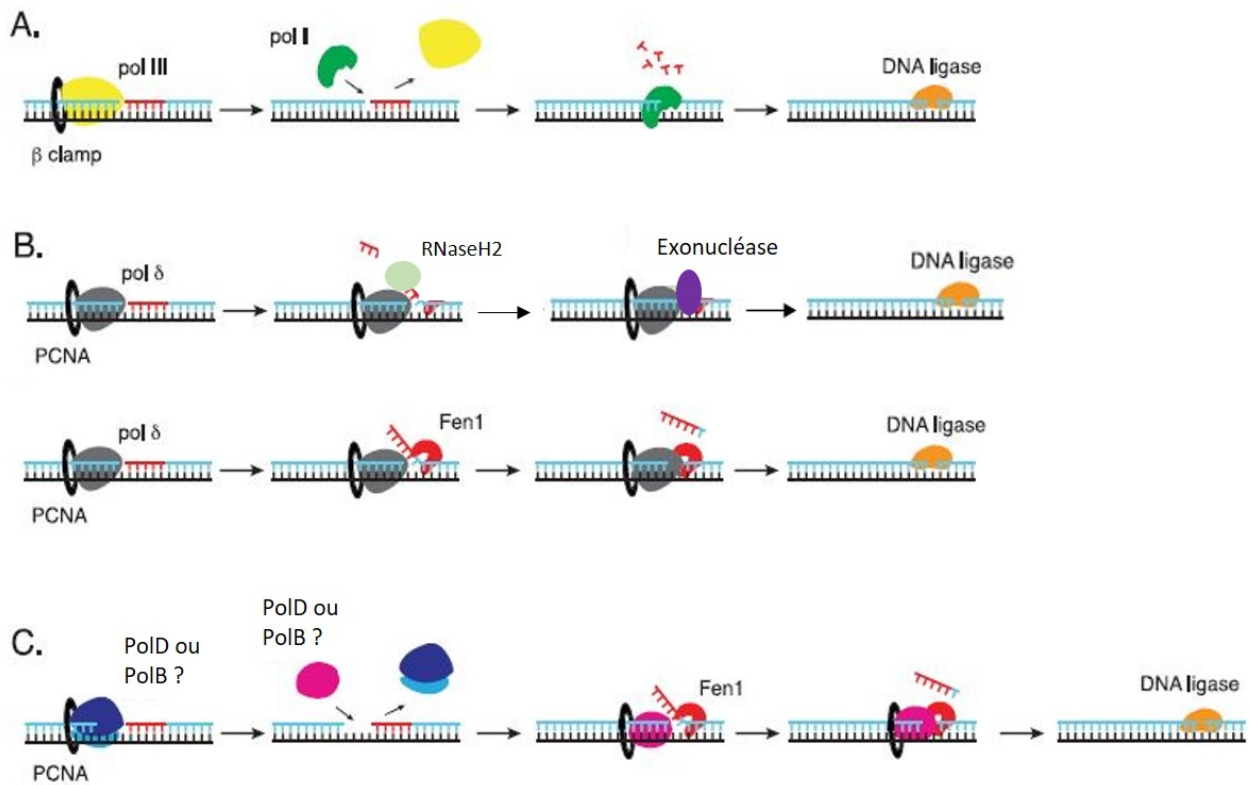


FIGURE 2: Schéma représentant les différents modèles de la maturation des fragments d'Okazaki chez les Bactéries (A), les Eucaryotes (B) et les *Archaea* (C) adapté de Greenough et al. 2015.

La partie ARN des fragments d'Okazaki est éliminée par Pol I chez les Bactéries (A) (Ogawa et al. 1977), par Fen1 ou par RNase H2 et une Exonucléase chez les Eucaryotes (B) (Ayyagari et al. 2003 ; Garg 2004), ou par Fen1 chez les *Archaea* (C) (Sato et al. 2003).

Chez les *Archaea*, les rôles de PolB et PolD ne sont pas encore bien définis. Un modèle propose que PolD arrête la synthèse du brin retardé 4 nucléotides en amont de l'extrémité 5' du fragment d'Okazaki suivant. PolB remplacerait PolD et pourrait créer une extrémité simple brin flottante grâce à son activité de déplacement de brin (Greenough et al. 2015). Cependant, dans une autre étude chez *Pyrococcus abyssi* il a été proposé que PolD remplacerait PolB qui est incapable de déplacer une amorce ARN (Henneke 2012). En présence d'une amorce ARN hybridée à une matrice ADN et des désoxyribonucléotides tri-phosphates (dNTPs) intracellulaires, le complexe PCNA-PolB est instable et est remplacé par le complexe PCNA-PolD (Rouillon et al. 2007). RNase HIII clive la liaison phosphodiester en 5' du dernier ribonucléotide du segment ARN. Le substrat créé est ensuite reconnu par Fen1 qui clive le dernier ribonucléotide (Sato et al. 2003). Chez *Thermococcus kodakarensis* la nucléase GAN pourrait remplacer Fen1 et catalyserait la même réaction dans la maturation des fragments d'Okazaki (Burkhart et al. 2017) (Figure 2C).

Lors de la reconstitution complète de la réplication avec le système SV40 en plus de l'endonucléase MF1 (maintenant appelée Fen1) une autre protéine a été identifiée comme essentielle pour la maturation des fragments d'Okazaki, l'ADN ligase I (LigI) (Waga et al. 1994). Après le clivage par Pol I chez les Bactéries ou par Fen1 chez les Eucaryotes et les *Archaea*, le substrat est reconnu par LigI chez les Eucaryotes ou Lig1 chez les Bactéries et les *Archaea* (LigI/1). LigI/1 serait recrutée au niveau de la coupure en se liant au PCNA (Levin et al. 1997; Montecucco et al. 1998) et permet de faire la liaison entre les différents fragments ADN du brin retardé (Sugimoto et al. 1968). Les ADN ligases catalysent la ligature d'une extrémité 5'-P avec une extrémité 3'-OH par la formation d'une liaison phosphodiester. Les ADN ligases eucaryotes et bactériennes catalysent la même réaction, la seule différence est le cofacteur utilisé. Les ADN ligases bactériennes sont NAD⁺ ou ATP dépendantes alors que les ADN ligases eucaryotes sont ATP dépendantes (Howes et al. 2012; Tomkinson et al. 2006). La majorité des *Archaea* possède des ADN ligases ATP-dépendantes mais certaines ont des ADN ligases NAD⁺ dépendantes (Pergolizzi et al. 2016). Le groupement adénylate du NAD⁺ ou de l'ATP est transféré sur un résidu lysine de l'ADN ligase permettant de l'activer. Ce groupement adénylate est ensuite transféré à l'extrémité 5'-P de l'ADN formant un intermédiaire 5'-AMP-ADN. La liaison phosphodiester est ensuite formée par l'attaque nucléophile du groupement 3'-OH sur le groupement 5'-P, la formation de la liaison phosphodiester est couplée à la libération d'un AMP (Lindahl et al. 1992; Çağlayan 2019).

Chez les Eucaryotes et les *Archaea*, le PCNA reste lié de façon stable sur l'ADN et permet de coordonner l'élongation et la maturation des fragments d'Okazaki en recrutant les protéines impliquées. Le PCNA lie une protéine différente à chacune de ses 3 sous-unités : Pol δ ou PolB, Fen1 et Lig I/1 (Cannone et al. 2015; Barry et al. 2006; Sporbert 2005; Levin et al. 2000; Levin et al. 1997).

LES ADN POLYMÉRASES

Dans les trois domaines du vivant, les enzymes au cœur de la réplication et de la réparation de l'ADN sont les ADN polymérases (O'Donnell et al. 2013).

1 Structure des ADN polymérases

Le site catalytique des ADN polymérases est constitué de trois domaines appelés paume, pouce et doigts. Le domaine paume comprend des acides aminés essentiels à la catalyse de la polymérisation dont un acide aspartique très conservé. Le domaine doigts reconnaît et lie les dNTPs et interagit avec la matrice simple brin en 5'. Le domaine pouce est important pour la liaison à l'ADN naissant (Delagoutte 2012).

Les ADN polymérases sont classées en 6 familles : A, B, C, D, X et Y selon leur homologie de séquence en acides aminés (J. Ito et al. 1991 ; Ohmori et al. 2001 ; Cann et al. 1999). La famille B est la plus représentée dans tous les domaines du vivant (Eucaryotes, Bactéries, *Archaea*) et chez les virus. Les Eucaryotes possèdent 16 ADN polymérases dont 4 sont répliquatives : Pol α , Pol δ , Pol ϵ pour l'ADN génomique et Pol γ pour l'ADN mitochondrial (Tableau 1). Les Bactéries possèdent 5 ADN polymérases dont 2 sont répliquatives : Pol I et Pol III (Tableau 2). Les *Archaea* possèdent 3 ADN polymérases dont 2 sont répliquatives : PolD et PolB (Tableau 3). Les ADN polymérases répliquatives des Bactéries appartiennent aux familles A et C, les ADN polymérases répliquatives des Eucaryotes appartiennent à la famille B pour l'ADN génomique et à la famille A pour l'ADN mitochondrial. Chez les *Archaea* le rôle des ADN polymérases dans la réplication n'est pas encore bien défini mais les deux ADN polymérases principales PolB et PolD appartiennent aux familles B et D respectivement à l'exception des *Crenarchaea* ne possédant que la famille B (Raia, Delarue et al. 2019).

Les ADN polymérases répliquatives peuvent être classées en 3 groupes selon la structure de leur domaine catalytique (Raia, Delarue et al. 2019). Les ADN polymérases répliquatives des familles A, B et Y ont une structure de type Klenow comme Pol I d'*E. coli* (Delarue et al. 1990). Le groupe des "Pol β -like" comprend les ADN polymérases des familles C et X (Wu et al. 2014). Le site catalytique de PolD a une structure différente de toutes les autres ADN polymérases répliquatives. L'ADN polymérase D constitue ainsi le troisième groupe de forme homologue à la superfamille "two-barrels" des ARN polymérases (Sauguet et al. 2016 ; Raia, Delarue et al. 2019) (Figure 3). Les ADN polymérases répliquatives peuvent également être classées en 3 groupes selon la structure de leur domaine exonucléase. La forme polymérase et histidinole phosphatase (PHP) qui est retrouvée chez les ADN polymérases répliquatives du groupe des "Pol β -like", la forme phosphodiesterase (PDE) retrouvée chez PolD uniquement et la forme "DnaQ-like" la plus représentée (Raia, Delarue et al. 2019).

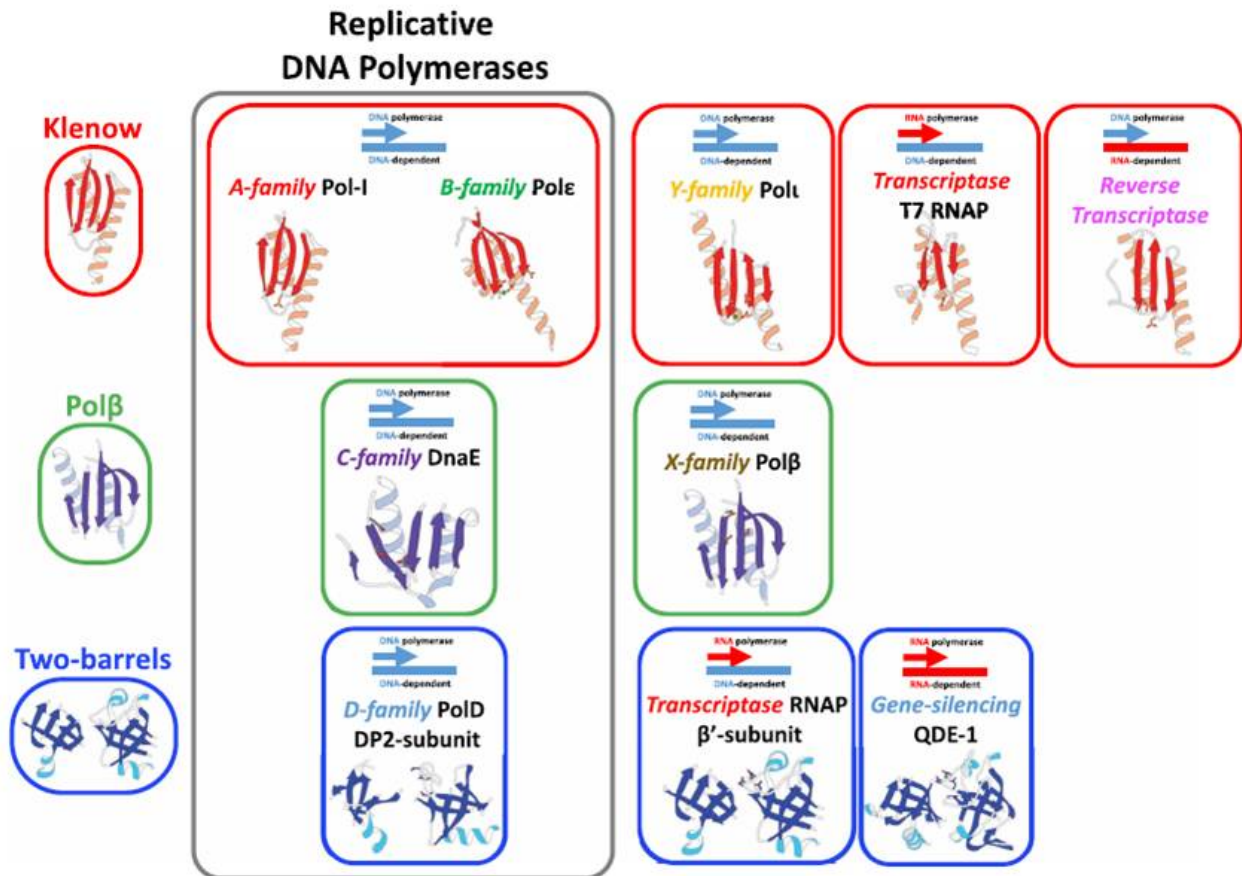


FIGURE 3: Classification des ADN polymérasés réplícatives en fonction de la structure de leurs domaines catalytiques d'après Raia, Delarue et al. 2019.

2 Fonctions des ADN polymérasés

Les ADN polymérasés effectuent la synthèse de l'ADN dans le sens 5'→3'. Contrairement au complexe primase-polymérase qui peut réaliser une synthèse *de novo*, aucune ADN polymérase réplícative n'est capable d'initier une synthèse d'ADN en l'absence d'amorce. La polymérisation est réalisée par les ADN polymérasés en plusieurs étapes. Premièrement, les ADN polymérasés interagissent avec deux composants, l'extrémité 3'-OH d'une amorce hybridée au brin matrice et un substrat, le dNTP, qui allonge cette amorce. Le dNTP correct est sélectionné selon l'appariement des bases de Watson Crick. Une attaque nucléophile du groupement 3'-OH de l'amorce sur le phosphate α du dNTP entrant permet ensuite de créer une liaison phosphodiester avec la libération d'un groupement pyrophosphate inorganique (PPi). La polymérase peut ensuite faire une translocation d'un nucléotide pour se retrouver à l'extrémité 3' et catalyser l'incorporation du dNTP suivant (Kornberg 1969 ; Joyce et al. 2004 ; Delagoutte 2012).

3 La fidélité des ADN polymérasés

Il a été montré que la fidélité de la réplícation est différente entre le brin avancé et le brin retardé (Kunkel 2009). Chez la levure le brin avancé est répliqué par Polε (Pursell et al. 2007) alors que le brin retardé est répliqué par Polα-primase et Polδ (Nick McElhinny et al. 2008). En revanche, chez *E. coli* une différence de fidélité de la réplícation est aussi observée lorsque les deux brins avancé et

retardé sont répliqués par Pol III (Fijalkowska et al. 1998). La fidélité de la réplication dépend donc de plusieurs mécanismes permettant de conférer une fidélité élevée aux ADN polymérase. Le premier facteur déterminant est la sélectivité du nucléotide correct par les ADN polymérase. Les ADN polymérase possèdent également une activité exonucléase leur permettant de corriger les erreurs incorporées et ainsi d'augmenter leur fidélité. Enfin, la réparation des mésappariements ou "Mismatch repair" (MMR) permet d'augmenter la fidélité de réplication de l'ADN post-synthèse (Figure 4) (McCulloch et al. 2008).

3.1 Concentration intracellulaire des nucléotides

Le taux des précurseurs de la synthèse de l'ADN, les quatre dNTPs intracellulaires est finement régulé pendant le cycle cellulaire. La biosynthèse des dNTPs est stimulée lors de la synthèse de l'ADN ou en réponse à un stress génotoxique. Une variation significative de leur concentration optimale lors de la réplication de l'ADN peut induire une instabilité génétique. Une concentration trop élevée en dNTPs favorise leur mauvaise incorporation et une concentration trop faible d'un dNTP favorise l'incorporation d'un autre dNTP en concentration plus élevée (Kornberg et al. 2005 ; Gon et al. 2011). Un déséquilibre des ratios de dNTPs induit également des mutations dans le génome (Kumar et al. 2011 ; Chabes et al. 2003 ; Gawel et al. 2014).

3.2 Appariement des paires de bases et site d'exclusion stérique

La géométrie des paires de bases correctement appariées est reconnue par le site actif des ADN polymérase (Kool 2002). Lors d'un mésappariement la détection d'une géométrie incorrecte entrainera une libération plus lente du groupement PPi ce qui ralentira la translocation de l'ADN polymérase et donc provoquera un ralentissement ou un arrêt de la fourche de réplication. Ce ralentissement de la polymérisation permet la correction du dNTP mésapparié en déplaçant le simple brin dans le site actif exonucléase (Batra et al. 2016 ; St Charles et al. 2015 ; Delagoutte 2012 ; Kunkel 2009).

Les ADN polymérase possèdent un site d'exclusion stérique ou "steric gate" empêchant l'entrée d'un nucléotide portant un groupement OH en 2' du ribose. Ce "steric gate" leur permet de différencier les ribonucléotides tri-phosphates (rNTPs) des dNTPs (Brown et al. 2011). Il correspond en général à un acide aminé ou un segment peptidique (Astatke et al. 1998 ; Bonnin et al. 1999 ; Cavanaugh et al. 2011 ; Donigan et al. 2014 ; G. Yang et al. 2002). Chez la levure une mutation du "steric gate" de Pol ϵ entraîne une augmentation de l'incorporation des ribonucléotides monophosphates (rNMPs) (McElhinny et al. 2010). Une étude a également montré qu'en plus du site d'exclusion stérique, un résidu polaire (Thréonine) améliorerait la capacité de discrimination des rNTPs par les ADN polymérase en empêchant les ribonucléotides d'adopter une conformation permettant une activité catalytique dans le site actif des ADN polymérase (Johnson et al. 2019). Ce filtre polaire est présent chez les ADN polymérase des familles B et Y chez les Bactéries (Johnson et al. 2019).

Récemment, une étude a évalué le taux d'erreurs des ADN polymérase en prenant en compte la mauvaise incorporation de dNMPs et de rNMPs (J. Yang et al. 2018). Le taux d'incorporation erronée des 4 rNMPs et des 3 dNMPs non appariés de plusieurs ADN polymérase ont été déterminés. De façon générale, le taux d'erreurs des ADN polymérase est augmenté lorsque la mauvaise incorporation des rNMPs et des dNMPs est prise en compte comparativement à la mauvaise incorporation des dNMPs

seule (J. Yang et al. 2018).

3.3 Activité exonucléase

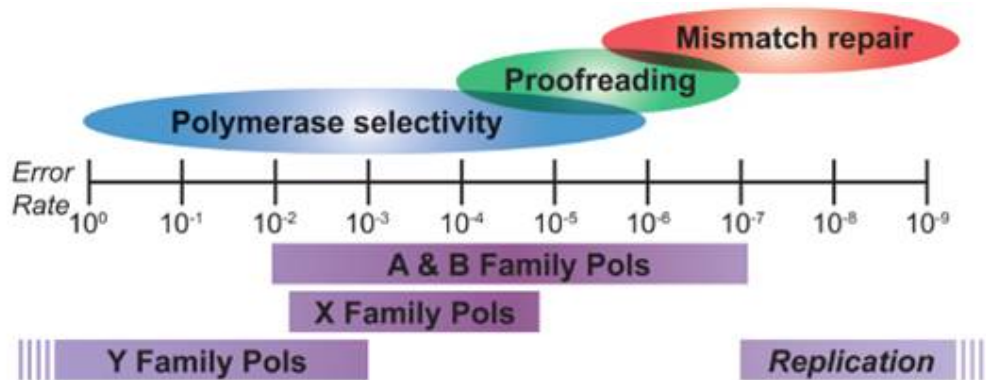


FIGURE 4: Impact de l'activité de relecture sur le taux d'erreur des ADN polymérase répliquatives d'après McCulloch et al. 2008.

Plusieurs facteurs permettent d'assurer la fidélité de la réplication de l'ADN, la sélectivité du bon dNTP qui est différente pour chaque ADN polymérase, l'activité exonucléase de relecture et la réparation des mésappariements par la voie MMR post-synthèse.

Au-delà de leur activité de synthèse de l'ADN, les ADN polymérase répliquatives possèdent également une activité exonucléase 3'→5' participant à plusieurs mécanismes de fidélité. Chez *S. cerevisiae*, l'activité exonucléase 3'→5' de Pol δ joue un rôle dans la maturation des fragments d'Okazaki, dans l'activité de relecture lors de la réplication et dans la correction des mésappariements lors de la voie de réparation des mésappariements (MMR) (Jin et al. 2005). Chez la levure, contrairement à Pol ϵ , l'activité exonucléase de Pol δ peut également corriger les erreurs incorporées par Pol α lors de la réplication (Pavlov et al. 2006). L'activité de relecture des ADN polymérase permet d'augmenter la fidélité de la réplication d'un facteur 10^2 à 10^3 selon les ADN polymérase et le type d'erreur (McCulloch et al. 2008; Kunkel 2009) (Figure 4). Cette activité de relecture peut être influencée par la concentration intracellulaire du dNTP à incorporer après le mésappariement. Une faible concentration favorisera l'activité de relecture contrairement à une forte concentration intracellulaire de ce dNTP (Kornberg et al. 2005).

4 Les ADN polymérase de la réplication de l'ADN chez les *Archaea*

Nos modèles d'études biologiques, *Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus barophilus*, possèdent 3 ADN polymérase. Deux ADN polymérase répliquatives, l'ADN polymérase B (PolB) et l'ADN polymérase D (PolD) (Henneke et al. 2005) ainsi que le complexe PriS/PriL qui joue le rôle de primase dans la réplication (Le Breton et al. 2007) (Tableau 3).

4.1 PriS/PriL

La fonction primase (ARN polymérase - ADN dépendante) des *Archaea* est homologue à celle portée par la sous-unité p48 de l'ADN primase du complexe Pol α - primase des Eucaryotes. Chez les *Archaea* le complexe PriS/PriL a une activité de primase (ARN polymérase - ADN dépendante) permettant d'amorcer la synthèse de l'ADN et une activité polymérase (ADN polymérase - ADN dépendante) permettant d'allonger des amorces ARN (Bocquier et al. 2001; Chemnitz Galal et al. 2012).

	PriS/PriL	PolB	PolD
Famille (Delagoutte 2012)		B	D
Essentielle	oui	non (sauf Crenarchaea)	oui
Activité polymérase	primase polymérase	brin avancé ?	brins avancé et retardé ?
Activité exonucléase	non	3'→5'	3'→5'
Structure du site catalytique (Raia, Delarue et al. 2019)		Klenow-like	Two barrels
Structure du site exonucléase (Raia, Delarue et al. 2019)		DnaQ-like	PDE
Taux d'incorporation de rNMPs	amorçage ARN	1/2500	1/1250
Références	Le Breton et al. 2007; Lao-Sirieix et al. 2004	Cubonova et al. 2013; Lemor et al. 2018	Cubonova et al. 2013; Greenough et al. 2014; Jokela et al. 2004

TABLEAU 3: Les ADN polymérases répliquatives des *Archaea*

Le complexe PriS/PriL initie la réplication en synthétisant de courtes amorces ARN. Il a été montré que contrairement aux Eucaryotes, la primase des *Archaea* est aussi capable de synthétiser des amorces ADN (Chemnitz Galal et al. 2012; Le Breton et al. 2007; Lao-Sirieix et al. 2004). Le complexe PriS/PriL est également capable d'allonger des amorces ADN et de répliquer des dommages (Le Breton et al. 2007; Lemor et al. 2018; Killelea et al. 2019). La sous-unité PriS est la sous-unité catalytique qui synthétise des amorces ARN et ADN (Figure 5). Elle est également capable lorsqu'elle est seule de synthétiser de longs fragments ADN. La sous-unité PriL est la sous-unité régulatrice. Lorsque le complexe PriS/PriL est formé l'activité de synthèse de courts fragments ARN de p41 est diminuée par rapport à la sous-unité p41 seule (Chemnitz Galal et al. 2012; Bocquier et al. 2001; L. Liu et al. 2001; Y. Ishino et al. 2012). D'autre part, il a été suggéré que le complexe PriS/PriL serait impliqué dans la réparation de l'ADN (Le Breton et al. 2007).

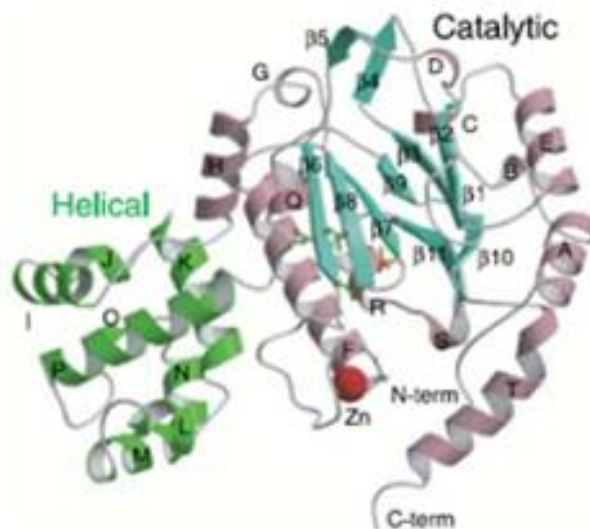


FIGURE 5: Structure de la sous-unité p41 de *Pyrococcus horikoshii* d'après N. Ito et al. 2003
Le domaine catalytique est représenté en bleu clair.

4.2 ADN polymérase B

L'ADN polymérase B est présente dans les trois domaines du vivant. La sous-unité catalytique des ADN polymérases répliquatives Eucaryotes aurait évolué à partir de PolB (Raia, Delarue et al. 2019; Tahirov et al. 2009). Les *Archaea* possèdent une à trois ADN polymérases B. Les *Crenarchaea* ont en général plusieurs PolB alors que les *Euryarchaea* n'en possèdent qu'une seule (Cooper 2018). PolB est non essentielle (Cubonova et al. 2013) sauf chez les *Crenarchaea* qui ne possèdent pas PolD (Cooper 2018). Chez les *Crenarchaea*, parmi les trois PolB, PolB1, PolB2 et PolB3, seule PolB1 est essentielle et serait la polymérase répliquative alors que PolB2 et PolB3 seraient impliquées dans la réparation (Miyabayashi et al. 2020; Bohall et al. 2021).

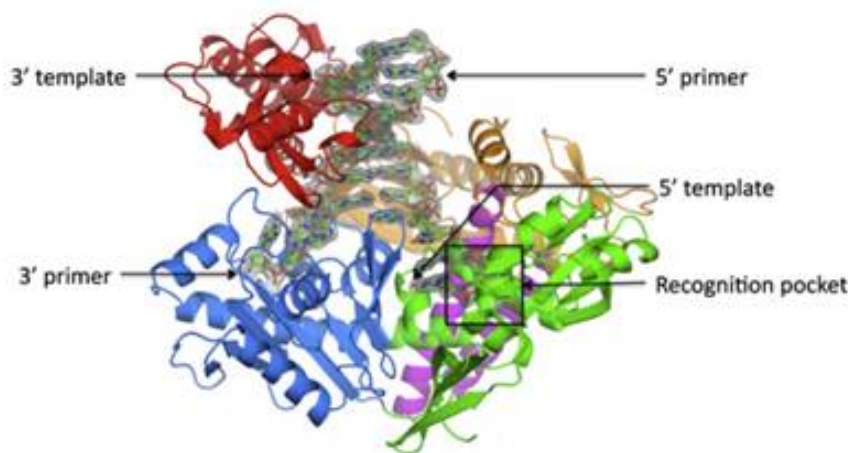


FIGURE 6: Structure de l'ADN polymérase B d'après Gouge et al. 2012.

Le domaine N-terminal est représenté en vert, le domaine exonucléase est représenté en bleu, le domaine paume est représenté en orange, le domaine doigts est représenté en rose et le domaine pouce est représenté en rouge.

PolB possède une activité polymérase $5' \rightarrow 3'$ et une activité exonucléase $3' \rightarrow 5'$ sur la même chaîne polypeptidique (Gueguen et al. 2001). Contrairement aux ADN polymérases de la famille B des Eucaryotes et des Bactéries, la PolB des *Archaea* possède une poche de reconnaissance de l'uracile dans le domaine N-terminal (Figure 6) (Wardle et al. 2008; Gouge et al. 2012). Il a été montré que PolB est capable de reconnaître l'uracile et de faire une pause 4 nucléotides en amont dans la matrice ADN (Gouge et al. 2012). Le site d'exclusion stérique de PolB lui permettant de différencier les rNTPs des dNTPs est une tyrosine, par exemple Y410 chez *Pyrococcus abyssi* ou Y409 chez *Thermococcus gorgonarius* (Cozens et al. 2012).

Chez les *Archaea*, PolB agirait au niveau du brin avancé lors de la réplication de l'ADN (Henneke et al. 2005; Gueguen et al. 2001). En effet, PolB interagit avec le PCNA, le RPA et la primase qui sont des composants de la fourche de réplication. Toutefois, étant donné son caractère non essentiel pour la survie cellulaire (Cubonova et al. 2013; Birien et al. 2018), il est également proposé que PolB intervienne dans les voies de réparation de l'ADN et à la fourche de réplication lorsque l'ADN polymérase D répliquative des deux brins deviendrait défaillante (voie secondaire).

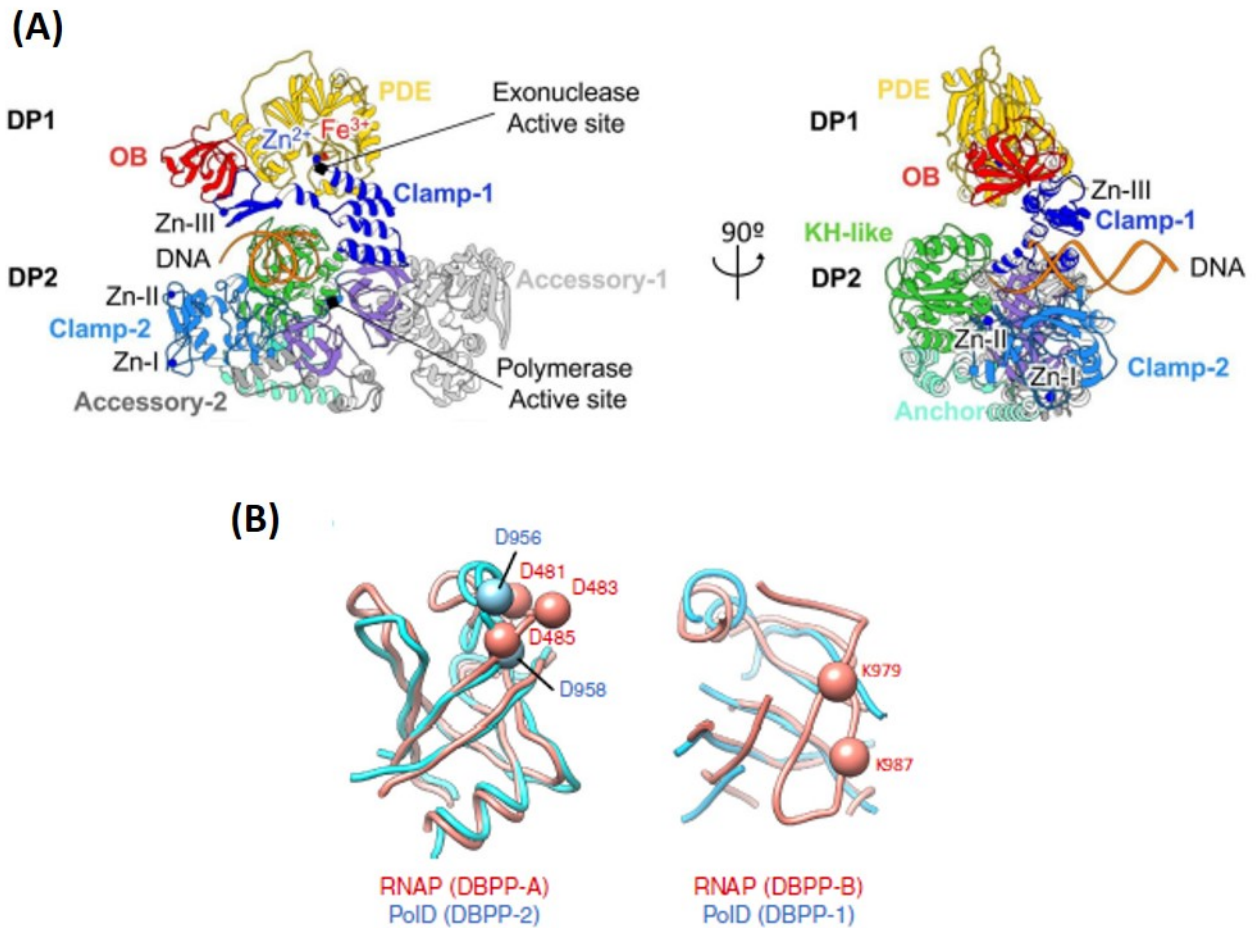


FIGURE 7: Structure cristallographique de l'ADN polymérase D de *Pyrococcus abyssi* d'après Raia, Carroni et al. 2019 et Sauguet et al. 2016.

(A) Structure cristallographique des sous-unités DP1 et DP2 de PolD. Le domaine phosphodiesterase (PDE) est représenté en jaune et le domaine liant les acides nucléiques (OB) en rouge (Raia, Carroni et al. 2019). (B) Superposition du domaine catalytique de conformation "two-barrels" de DP2 (bleu) avec l'ARN polymérase II de *S. cerevisiae* (rose) (Sauguet et al. 2016).

4.3 ADN polymérase D

L'ADN polymérase D a été découverte en 1997 et est spécifique aux *Archaea* (Uemori et al. 1997; Lujan et al. 2016). Toutes les *Archaea* à l'exception des *Crenarchaea* possèdent une ADN polymérase D (Cooper 2018). Il a été montré chez plusieurs *Archaea* notamment *Thermococcus kodakarensis*, *Thermococcus barophilus*, *Halobacterium salinarum* NRC-1 et *Methanococcus maripaludis* que PolD est la seule ADN polymérase essentielle à la vie de ces micro-organismes (Cubonova et al. 2013; Birien et al. 2018; Sarmiento et al. 2014; Berquist et al. 2007). PolD est une enzyme hétérodimérique composée de deux sous-unités. La grande sous-unité DP2 porte l'activité polymérase et la petite sous-unité DP1 possède l'activité de dégradation exonucléase de l'ADN dans le sens 3'→5' (Figure 7A) (Gueguen et al. 2001; Jokela et al. 2004). L'interaction entre les deux sous-unités est nécessaire pour les activités polymérase et exonucléase (Castrec et al. 2010; Raia, Carroni et al. 2019).

L'analyse de la structure cristallographique de PolD a permis de démontrer que la sous-unité DP2 n'a pas de similarité avec les autres ADN polymérases (Sauguet et al. 2016). Cependant, DP2 a une homologie de structure avec des ARN polymérases (Figure 7B) (Sauguet et al. 2016). La sous-unité DP1 quant à elle appartient à la superfamille des calcineurines like phosphodiesterases (Figure 7A) (Sauguet et al. 2016; Raia, Delarue et al. 2019). DP1 a une très forte similarité structurale avec la protéine Mre11 qui a une activité endonucléase et exonucléase (Sauguet et al. 2016). Les sous-unités B régulatrices des ADN polymérases répliquatives Eucaryotes auraient évolué à partir de DP1 (Figure 8) (Sauguet et al. 2016; Raia, Delarue et al. 2019; Raia, Carroni et al. 2019; Yamasaki et al. 2010; Tahirov et al. 2009). Récemment l'acide aminé H931 a été identifié comme site d'exclusion stérique de PolD chez *Pyrococcus abyssi* (Zatopek et al. 2020).

Chez les *Archaea* le rôle des ADN polymérases dans la réplication n'est pas encore bien déterminé. Il est proposé que PolD intervienne juste après la synthèse des amorces ARN par PriS/PriL lors de l'initiation. PolD poursuivrait ensuite la polymérisation de l'ADN pour générer les fragments d'Okazaki lors de l'étape d'élongation. De plus, PolD serait capable de polymériser l'ADN au niveau des brins avancé et retardé de la fourche de réplication (Henneke et al. 2005; Cubonova et al. 2013; Gueguen et al. 2001).

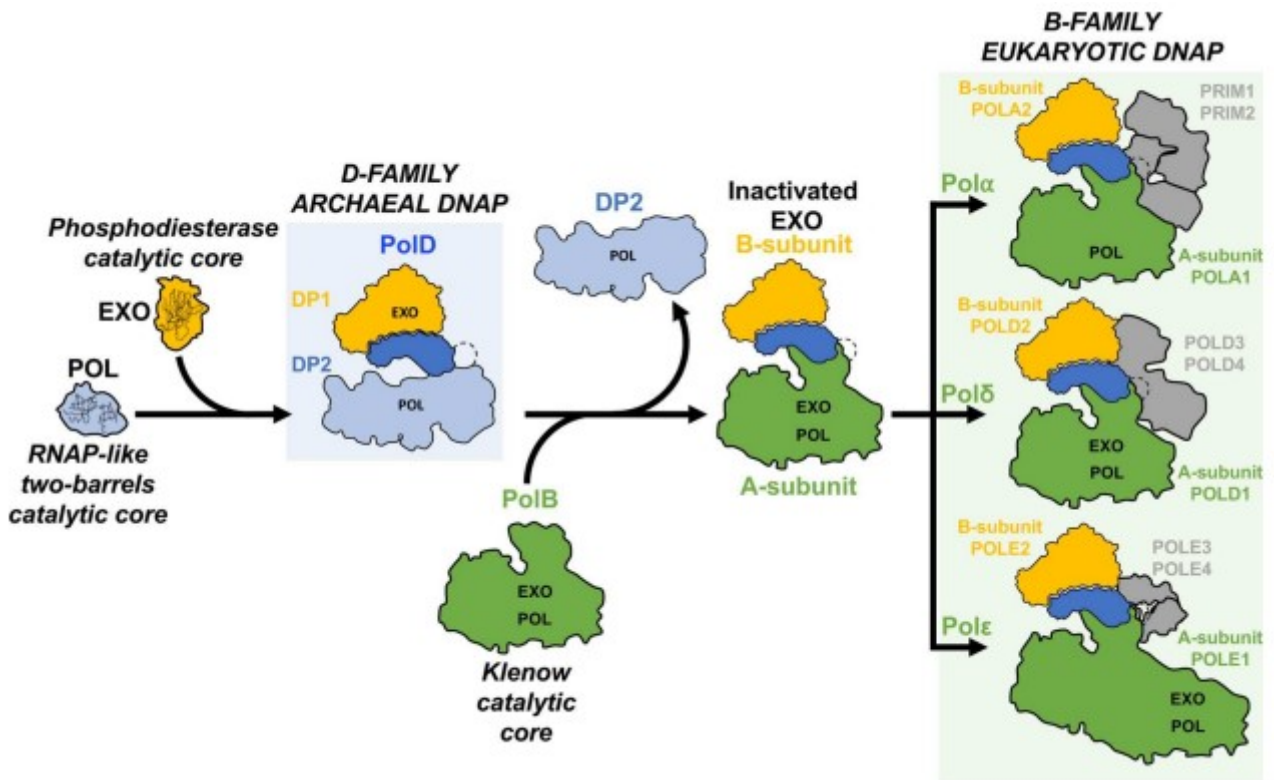


FIGURE 8: Modèle proposé de l'origine évolutive des ADN polymérase répliquatives des *Archaea* d'après Raia, Carroni et al. 2019.

Les ADN polymérase de la famille D possèdent une sous-unité DP1 portant l'activité exonucléase (EXO) et ayant une structure similaire à la famille des phosphodiésterases (en jaune), et une sous-unité DP2 portant l'activité polymérase (POL) et ayant une structure de type "two-barrels" (en bleu clair). Au cours de l'évolution, la sous-unité DP2 aurait été remplacée par un noyau catalytique de la famille B des *Archaea* de structure Klenow-like (en vert). Les ADN polymérase (DNAP) de la famille B des Eucaryotes auraient donc pour origine les familles B et D des ADN polymérase des *Archaea*.

LES RIBONUCLÉOTIDES

1 Bases de l'ARN

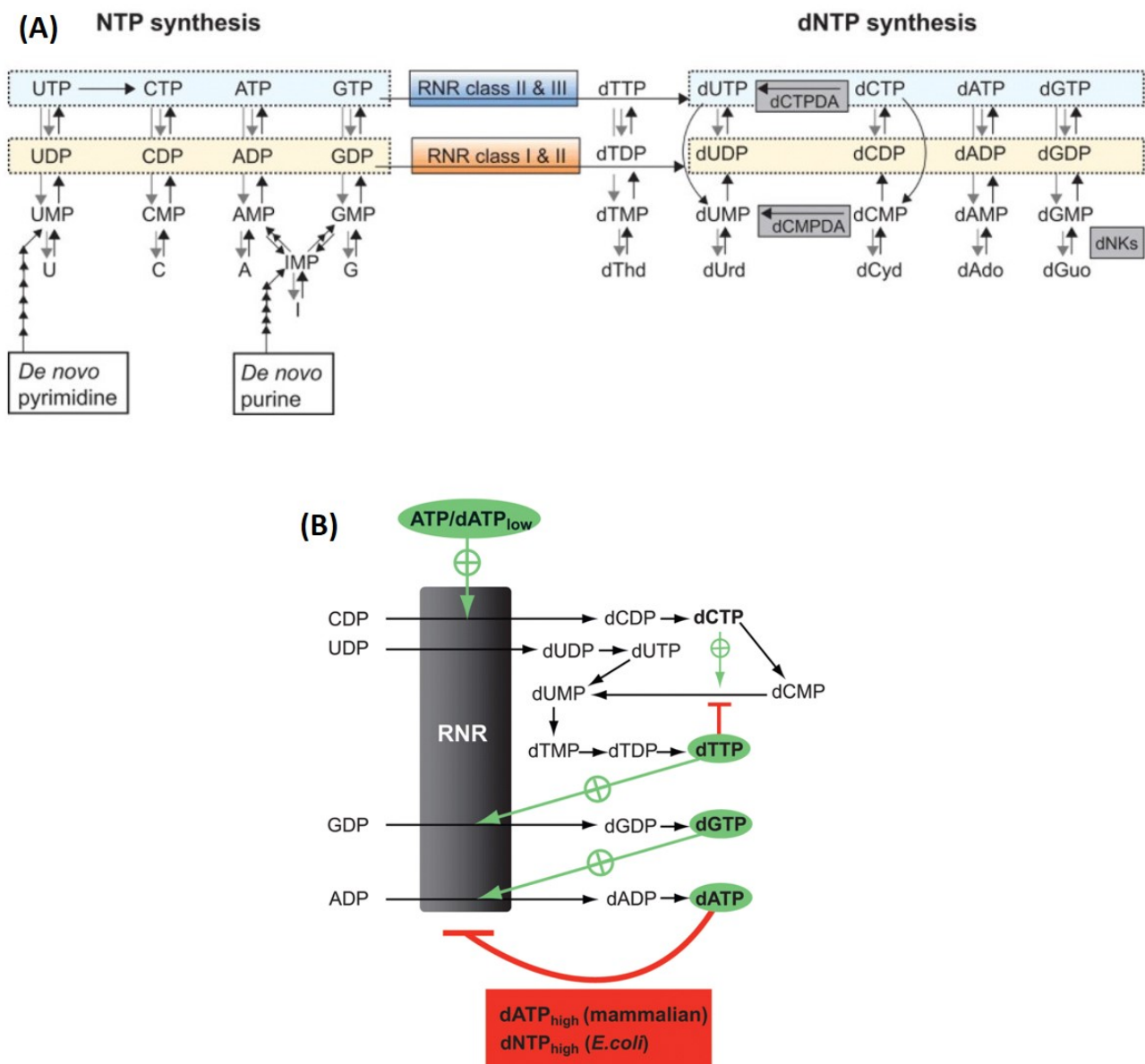


FIGURE 9: Voie de synthèse *de novo* des désoxyribonucléotides (A) et ses régulations (B), d'après Hofer et al. 2012.

(A) Schéma représentant la synthèse *de novo* des dNTPs. Les pyrimidines sont synthétisées à partir de l'UMP et les purines à partir de l'IMP. Les Ribonucléotides Réductases (RNR) de classe I, II et III catalysent la formation des désoxyribonucléotides à partir des ribonucléotides précurseurs. (B) Les RNR sont régulées par les concentrations en ATP et dATP chez les mammifères et par les concentrations en ATP, dATP, dTTP et dGTP chez *E. coli*.

Dans les trois domaines du vivant, la majorité des organismes utilisent l'ADN comme support de l'information génétique car l'ADN est une molécule intrinsèquement plus stable que l'ARN. La fragilité de l'ARN est due au fait que cette molécule est composée de rNMPs et non de dNMPs comme l'ADN. Les rNMPs diffèrent des dNMPs uniquement par leur groupement hydroxyle sur le carbone 2' du sucre. Ce groupement 2'-OH des ribonucléotides les rend environ 100 000 fois plus sensibles à l'hydrolyse que les dNMPs dans des conditions physiologiques (Li et al. 1999 ; Oivanen et al. 1998). Les rNTPs sont les précurseurs de l'ARN mais ils peuvent également être retrouvés dans l'ADN.

2 Précurseurs nucléotidiques

Dans les cellules, le contenu en ribonucléotides triphosphates (rNTPs) est largement supérieur à celui des dNTPs (de 10 à 100 fois) (Nick McElhinny et al. 2010) imposant un équilibre contrôlé en nucléotides totaux (dNTPs/rNTPs) et individuels (dATP/ATP, dGTP/GTP,...) (Hofer et al. 2012 ; Mathews 2006). Il existe deux voies de synthèse des dNTPs, la synthèse *de novo* (Figure 9A) et la voie de recyclage des produits issus de la dégradation de l'ADN (Reichard 1988). Les ribonucléotides sont les précurseurs des dNTPs dans la voie de synthèse *de novo*. La synthèse des dNTPs est un processus complexe et finement régulé impliquant de nombreuses enzymes. La voie de synthèse *de novo* fait intervenir les ribonucléotides réductases (RNR) catalysant la réduction des rNDPs en dNDPs (Reichard 1988 ; Hofer et al. 2012 ; Mathews 2006). Les purines sont synthétisées *de novo* à partir de l'Inosine Mono-Phosphate (IMP) et les pyrimidines à partir de l'Uridine Mono-Phosphate (UMP) (Figure 9A). Les RNR sont régulées par le ratio intracellulaire ATP/dATP chez les mammifères ou les concentrations intracellulaires ATP/dATP, mais aussi de dTTP et de dGTP chez *E. coli*. Lorsque la concentration intracellulaire en dATP est faible la réduction des rNDP précurseurs en dNDPs par les RNR va être stimulée. Au contraire, une forte concentration en dATP chez les mammifères ou en dATP, dTTP et dGTP chez *E. coli*, va entraîner une inhibition des RNR (Hofer et al. 2012) (Figure 9B).

Lorsque le taux de dNTPs est augmenté suite à un stress, la synthèse translationnelle et la capacité de "bypass" d'un ribonucléotide dans l'ADN de Pol δ et Pol ϵ sont augmentées (Watt et al. 2011 ; Chabes et al. 2003). Au contraire, une diminution du taux de dNTPs ralentit la fourche de réplication (Poli et al. 2012). La régulation de la concentration et des ratios de nucléotides intracellulaires est impliquée à plusieurs niveaux pour assurer la fidélité de la réplication.

La quantification des taux intracellulaires de nucléotides est donc importante dans l'étude de la maintenance génomique. Plusieurs méthodes pour quantifier les concentrations intracellulaires de nucléotides ont été développées notamment la chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV (HPLC-UV) ou par spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS) (Varik et al. 2017 ; Ranjbarian et al. 2021), ou encore la chromatographie sur couche mince (Stuer-Lauridsen et al. 1998). Ces différentes méthodes de quantification des nucléotides ont des sensibilités de détection distinctes. Le contenu intracellulaire des nucléotides d'organismes appartenant aux trois domaines du vivant a été déterminé (Figure 10).

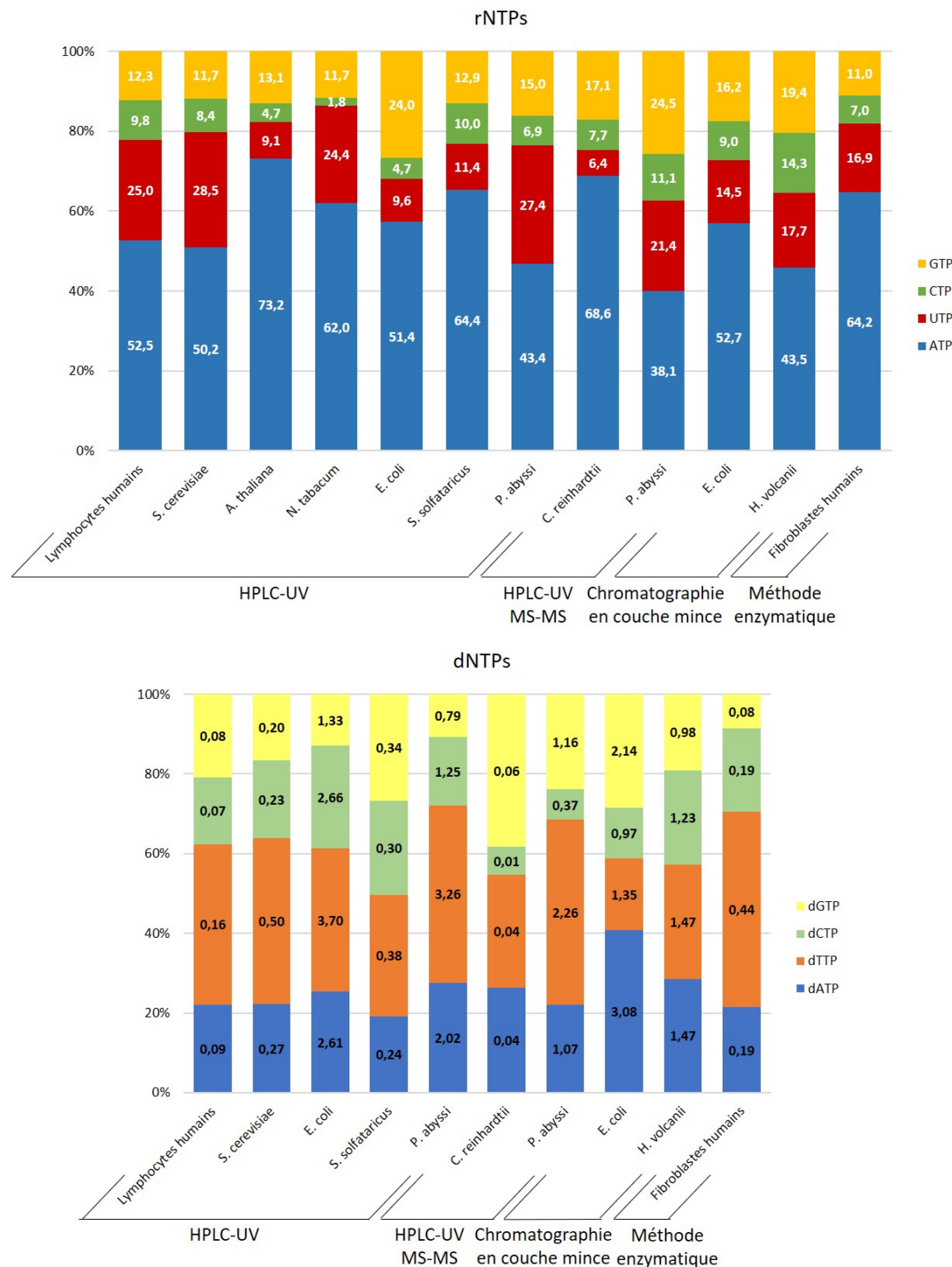


FIGURE 10: Quantification des nucléotides intracellulaires.

Ratio des nucléotides intracellulaires d'organismes Eucaryotes, les lymphocytes (Traut 1994), et fibroblastes humains (Ferraro et al. 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (Nick McElhinny et al. 2010), *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* (Riondet et al. 2005) et l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (El-Sayed et al. 2021), la Bactérie *Escherichia coli* (Buckstein et al. 2008 ; Bochner et al. 1982) et les Archaea *Sulfolobus solfataricus* (Liew et al. 2016), *Pyrococcus abyssi* (Ralec 2013 ; Lemor et al. 2018) *Haloferox volcanii* (Stuer-Lauridsen et al. 1998). Ces concentrations intracellulaires ont été déterminées par différentes méthodes, la chromatographie à haute performance couplée à une détection UV (HPLC-UV), l'HPLC-UV couplée à une détection par spectrométrie de masse (HPLC-UV-MS-MS), la chromatographie en couche mince ou une méthode enzymatique. Pour chaque organisme, les quantifications sont représentées en pourcentage de chaque nucléotide sur la totalité des nucléotides (dNTPs + rNTPs) de l'organisme.

3 Dommages à l'ADN le plus important

Il existe de nombreuses sources de dommages à l'ADN qui peuvent être endogènes comme les erreurs de réplication, les agents alkylants ou les espèces réactives de l'oxygène, mais aussi exogènes comme les radiations UV ou les dommages oxydatifs (Figure 11). Les lésions engendrées peuvent être de différents types, des cassures simple ou double brin, des modifications des bases de l'ADN, la création de sites abasiques ou encore la formation de liaisons inter- ou intra-brins. Ces lésions sont prises en charge par différentes voies de réparation, les lésions et voies de réparation correspondantes identifiées chez les *Archaea* sont présentées dans la Figure 11.

Parmi ces dommages à l'ADN il a été montré que l'incorporation de rNMPs dans l'ADN génomique représente le dommage à l'ADN le plus fréquent dans les trois domaines du vivant. En effet, il a été montré chez les mammifères, qu'une mutation de RNase H2 (délétion de la sous-unité RNase H2b), entraîne l'incorporation de plus d'un million de ribonucléotides dans le génome (Reijns et al. 2012). De plus, les ADN polymérase incorporeraient dans le génome lors de chaque cycle de réplication plus de 10 000 ribonucléotides chez la levure, plus de 2 000 chez *E. coli* et plus de 3 000 chez les *Thermococcales* (Nick McElhinny et al. 2010; Clausen et al. 2013; Lemor et al. 2018)(Tableau 4).

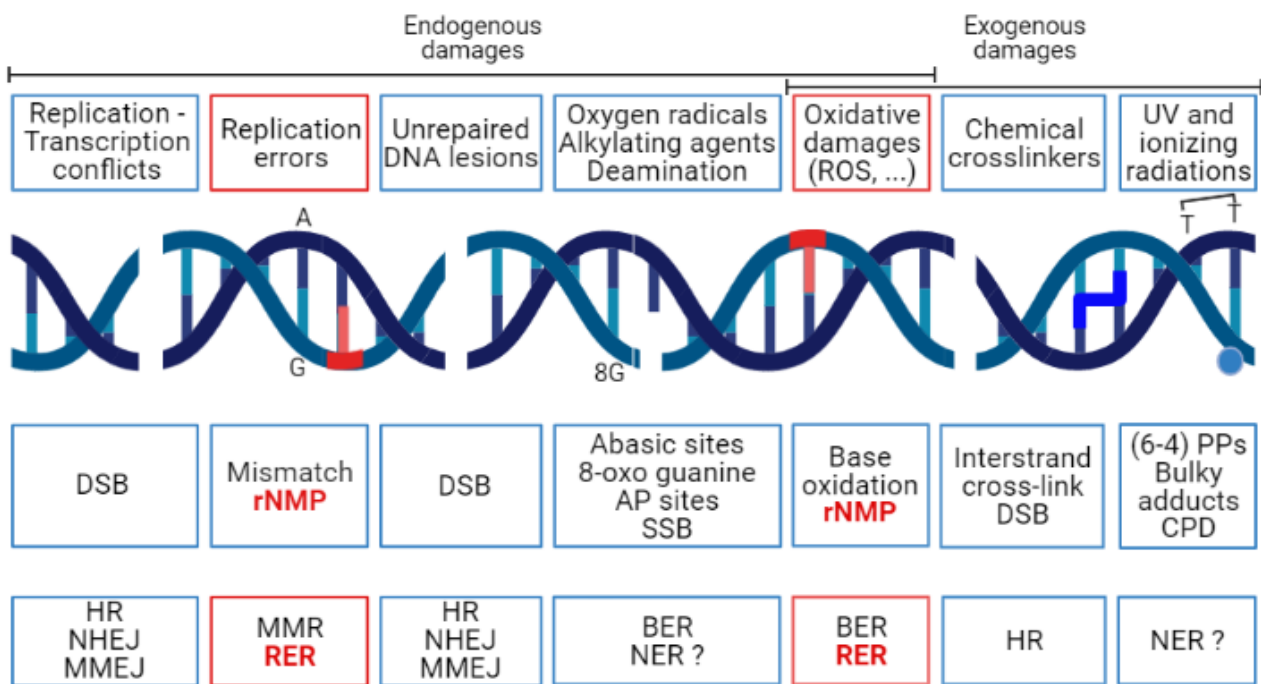


FIGURE 11: Les différents types de dommages à l'ADN chez les *Archaea*, adapté de Marshall et al. 2020 ; White et al. 2018.

Les dommages endogènes ou exogènes (première ligne), les types de dommages (deuxième ligne), le spectre des dommages engendrés (troisième ligne) et leurs voies de réparation (quatrième ligne) associés sont alignés dans la même colonne. DSB = Cassure double-brin, AP site = site apurinique/apirimidique, SSB = cassure simple-brin, 6-4 PPs = 6-4 Photoproduits, CPD = Dimères Cyclobutaniques de Pyrimidines, HR = Recombinaison Homologue, NHEJ = Jonction d'Extrêmités Non-Homologues, MMEJ = Jonction d'Extrêmités Médinée par Micro-homologie, BER = Réparation par Excision des Bases, NER = Réparation par Excision des Nucléotides, RER = Réparation par Excision des Ribonucléotides. Schéma réalisé avec BioRender.

PRÉSENCE DES RIBONUCLÉOTIDES DANS L'ADN

1 Principales causes de la présence des ribonucléotides dans l'ADN

La présence de rNMPs dans l'ADN peut avoir plusieurs origines et causer des instabilités génétiques (Klein 2017; Williams et al. 2014; Cerritelli et al. 2016; Caldecott 2014; Potenski et al. 2014). Trois principales causes de la présence de rNMPs dans l'ADN ont été identifiées : un défaut de maturation des fragments d'Okazaki, leur formation suite à un dommage oxydatif ou leur incorporation par les ADN polymérases.

1.1 Incorporation des ribonucléotides par les ADN polymérases

Bien que les ADN polymérases aient une sélectivité élevée pour les dNTPs comparativement aux rNTPs, une des principales cause de la présence de rNMPs dans l'ADN est leur incorporation par erreur par les ADN polymérases lors de la réplication dans les trois domaines du vivant (Göksenin et al. 2012; Lemor et al. 2018; Nick McElhinny et al. 2010; Clausen et al. 2013; McDonald et al. 2012; Gosavi et al. 2012; Moon et al. 2017; Cavanaugh et al. 2010; Kasiviswanathan et al. 2011). Le taux de rNMPs incorporés dans l'ADN par les ADN polymérases dépend d'une part de la concentration intracellulaire en rNTPs qui est 10 à 80 fois plus élevée que celle en dNTPs en condition normale de croissance (McElhinny et al. 2010; Buckstein et al. 2008; Lemor et al. 2018; Ferraro et al. 2010; Traut 1994) et d'autre part de la sélectivité nucléotidique de chaque ADN polymérase (Brown et al. 2011).

Les ADN polymérases incorporent préférentiellement des dNTPs par rapport aux rNTPs avec des sélectivités différentes en fonction des ADN polymérases et des nucléotides. Les taux d'incorporation des ribonucléotides par les ADN polymérases chez *S. cerevisiae* ont été calculés. Ces fréquences d'incorporation sont de 1/1250, 1/5000 et 1/625 pour Pol ϵ , Pol δ et Pol α respectivement (Tableau 4) (Nick McElhinny et al. 2010). Ces fréquences d'incorporation permettent d'estimer que lors de chaque cycle de réplication plus de 10 000 ribonucléotides pourraient être incorporés dans le génome de *S. cerevisiae* (Tableau 4) (Nick McElhinny et al. 2010). Chez *Thermococcus kodakarensis*, PolB et PolD incorporent aussi des ribonucléotides dans l'ADN génomique à une fréquence de 1/2500 pour PolB et de 1/1500 pour PolD (Heider et al. 2017) alors que la fréquence est de 1/1250 pour PolD chez *Pyrococcus abyssi* (pas d'incorporation observée pour PolB et p41/p46 chez *Pyrococcus abyssi*) (Lemor et al. 2018). Cette différence de fréquence d'incorporation de ribonucléotides par PolD entre les deux espèces peut être due au fait que des concentrations en dNTPs et rNTPs différentes ont été utilisées. En effet, les concentrations intracellulaires en dNTPs et rNTPs des Eucaryotes ou de *Pyrococcus abyssi* ont été utilisées chez *Thermococcus kodakarensis* ou chez *Pyrococcus abyssi* respectivement (Heider et al. 2017; Lemor et al. 2018). Chez *Pyrococcus abyssi*, environ 2800 ou 1400 ribonucléotides seraient

	Taux d'incorporation	Correction par l'activité exonucléase	Réf
Polα	1/625	?	Nick McElhinny et al. 2010
Polδ	1/1800 (Sce) ou 1/2000 (h)	non efficace	Clausen et al. 2013
Polϵ	1/1250 or 1/1000	1/3	Nick McElhinny et al. 2010; Williams et al. 2012
Polγ	1/2200	?	Forslund et al. 2018
rNMPs incorporés dans le génome de levure par les Pols	> 10 000 chez Sce		Nick McElhinny et al. 2010
Pol III	1/2300	?	Yao et al. 2013
rNMPs incorporés dans le génome d'<i>E.coli</i> par les Pols	> 2000		Yao et al. 2013
PolB	1/2500 ?	?	Heider et al. 2017
PolD	1/1250 (Pab) ou 1/2500 (Tko)	?	Lemor et al. 2018; Heider et al. 2017
rNMPs incorporés dans le génome d'<i>Archaea</i> par les Pols	\simeq 2800 (Pab) ou \simeq 2200 (Tko)		Lemor et al. 2018

TABLEAU 4: Taux de ribonucléotides incorporés dans le génome par les ADN polymérase répliquatives des trois domaines du vivant.

Les taux d'incorporation et de correction des ribonucléotides par les ADN polymérase répliquatives humaines (h), de *Saccharomyces cerevisiae* (Sce), de *Pyrococcus abyssi* (Pab) et de *Thermococcus kodakarensis* (Tko). Ces fréquences d'incorporation de chaque ADN polymérase ont permis d'estimer le taux de rNMPs incorporés à chaque cycle de répliquacion par les ADN polymérase.

incorporés lors de chaque cycle de réplication si PolD est la seule ADN polymérase répliquative ou si PolB synthétise le brin avancé et PolD le brin retardé respectivement (Lemor et al. 2018). Chez *Thermococcus kodakarensis*, environ 2200 ribonucléotides seraient incorporés par PolB et PolD lors de chaque cycle de réplication (Heider et al. 2017). Malgré les conditions extrêmes de leur environnement, les taux d'incorporation de rNMPs des ADN polymérases lors de la réplication des *Archaea* hyperthermophiles sont similaires à ceux des ADN polymérases des Eucaryotes ou des Bactéries (Heider et al. 2017; Lemor et al. 2018; Abellón-Ruiz et al. 2016; Zhang et al. 2010) (Tableau 4).

En plus des ADN polymérases répliquatives, il a été montré que les ADN polymérases impliquées dans la réparation de l'ADN comme par exemple Pol λ (Gosavi et al. 2012) et Pol μ (Moon et al. 2017) humaines ou Pol V d'*E. coli* (McDonald et al. 2012) sont capables d'incorporer des ribonucléotides lors de leur activité de réparation.

1.2 Mauvaise maturation des fragments d'Okazaki

Comme vu précédemment, l'initiation de la réplication de l'ADN est réalisée par une primase qui synthétise des amorces ARN d'environ une quinzaine de nucléotides. Ces fragments ARN sont présents de façon transitoire et sont éliminés lors de la maturation des fragments d'Okazaki. Cependant, des défauts de maturation de ces fragments d'Okazaki peuvent induire une mauvaise élimination des rNMPs de l'ADN (Zheng et al. 2011).

1.3 Les dommages oxydatifs

En condition de stress, des dommages oxydatifs peuvent provoquer la formation de rNMPs dans l'ADN (Randerath et al. 1992).

Les stress oxydatifs peuvent être exogènes mais aussi endogènes avec la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) formées dans la cellule par plusieurs voies métaboliques. Les ROS peuvent oxyder les nucléotides intracellulaires et les modifier entraînant une incorporation de bases endommagées dans l'ADN comme par exemple les 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxodG). Les ADN polymérases transléctionnelles peuvent incorporer un rNMP de façon appariée ou mésappariée en face d'un 8-oxodG, ou incorporer un ribonucléotide oxydé en face d'un dAMP (Ordonez et al. 2014; Cilli et al. 2015; Jamsen et al. 2021; Crespan et al. 2016).

2 Conséquences de la présence de ribonucléotides dans l'ADN

La présence de ribonucléotides dans l'ADN peut avoir des conséquences positives ou négatives pour l'organisme (Klein 2017; Williams et al. 2014; Cerritelli et al. 2016; Potenski et al. 2014).

2.1 Rôle de signal

Lorsqu'ils sont présents de façon transitoire, les rNMPs peuvent servir de signaux positifs. Par exemple, chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* la présence de deux rNMPs dans le brin retardé permet d'initier le processus de recombinaison utilisé pour la différenciation sexuée par le locus MAT (Vengrova et al. 2004, 2006). Lors de la réparation des mésappariements (MMR) il a également été montré que les rNMPs peuvent servir de signal pour identifier le brin nouvellement synthétisé (Lujan

et al. 2013; Ghodgaonkar et al. 2013). Chez les Eucaryotes et les Bactéries, les rNTPs peuvent également être incorporés dans l'ADN de façon transitoire par les ADN polymérase impliquées dans la réparation des cassures double brins par la voie "Non-Homologous End Joining" (NHEJ). Pol μ et la désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT) incorporent des ribonucléotides dans environ 60 % des produits lors de la réparation par la voie NHEJ, ces ribonucléotides stimulent la ligation du premier brin permettant la réparation du dommage sur le brin complémentaire. Le ribonucléotide incorporé dans le premier brin est ensuite réparé à son tour (Pryor et al. 2018; Martin et al. 2013).

2.2 Modification de la conformation de l'ADN

Lorsque plusieurs rNMPs sont présents dans l'ADN un changement conformationnel de la double hélice ADN peut se produire. L'insertion de trois rNMPs consécutifs provoque un changement de conformation de l'ADN de la forme B à la forme A (Egli et al. 1993). La présence d'un ribonucléotide provoque aussi une modification structurale locale de l'ADN (DeRose et al. 2012). Ces changements conformationnels peuvent avoir une influence sur les interactions de l'ADN avec les protéines, mais également sur les mécanismes de réplication, réparation et recombinaison (Klein 2017; Evich et al. 2016; Chiu et al. 2014).

2.3 Induction de stress répliatif

Lorsque les rNMPs ne sont pas éliminés par les différentes voies de réparation de la cellule, ils peuvent générer un stress répliatif dû à un ralentissement ou un arrêt de la fourche de réplication (Forsslund et al. 2018) mais aussi causer des instabilités génétiques (Klein 2017; McElhinny et al. 2010; Pizzi et al. 2015). Chez la levure, Pol α , Pol δ et Pol ϵ sont capables de répliquer un brin lorsqu'un rNMP est présent dans la matrice. Pol α est plus efficace que Pol δ et Pol ϵ pour passer un rNMP dans la matrice, cette capacité de "bypass" est différente en fonction de la nature du rNMP incorporé, de la position du rNMP et du contexte de la séquence (Watt et al. 2011).

Chez l'Homme plusieurs pathologies sont dues à l'accumulation de rNMPs dans l'ADN : le syndrome d'Aicardi Goutières, le lupus systémique érythémateux (Crow et al. 2006; Günther et al. 2015) et certains types de cancer (Dai et al. 2016; Beyer et al. 2017; Hiller et al. 2018).

L'élimination des rNMPs de l'ADN est donc essentielle pour maintenir la stabilité génomique. Plusieurs voies de réparation permettant d'éliminer les rNMPs sont présentes dans les cellules.

L'ÉLIMINATION DES RIBONUCLÉOTIDES DE L'ADN

1 Activité exonucléase des ADN polymérasés

Certaines ADN polymérasés possèdent une activité de relecture exonucléase dans le sens 3'→5' (Brutlag et al. 1972). Cette activité de relecture permet la correction de dNMPs mésappariés, améliorant ainsi la fidélité des ADN polymérasés (McCulloch et al. 2008)(Figure 4). Il a également été démontré que l'activité exonucléase 3'→5' de Pol ϵ des Eucaryotes permet de dégrader les rNMPs insérés par erreur lors de la polymérisation (Williams et al. 2012). Alors que l'activité exonucléase de Pol δ n'est pas efficace pour l'élimination des ribonucléotides (Clausen et al. 2013), l'activité exonucléase de Pol ϵ éliminerait environ 1/3 des ribonucléotides incorporés dans l'ADN (Williams et al. 2012) (Tableau 4). En présence d'une amorce contenant plusieurs ribonucléotides consécutifs à son extrémité 3', l'activité exonucléase de Pol ϵ est réduite lui permettant d'étendre l'amorce (Göksenin et al. 2012). Les ADN polymérasés B et D de *Pyrococcus abyssi* possèdent également cette activité exonucléase mais son efficacité pour éliminer les ribonucléotides n'a pas été évaluée.

2 Les voies de réparation des ribonucléotides

Il existe différentes voies de réparation de l'ADN permettant l'élimination de ribonucléotides (Caldcott 2014). La voie majeure est la voie d'excision de ribonucléotides (RER) initiée par la RNase H de type 2 (RNase HII/2) (Sparks et al. 2012; Heider et al. 2017). En cas de défaut de cette voie principale, la voie RER initiée par la topoisomérase 1 intervient (Williams et al. 2013). D'autres voies de réparation de la cellule telles que l'excision de bases (BER) (Malfatti et al. 2017), l'excision de nucléotides (NER) (Vaisman et al. 2014; Cai et al. 2014), la réparation de mésappariements (MMR) (Shen et al. 2012) peuvent jouer un rôle secondaire dans l'élimination de ribonucléotides.

Parmi ces voies de réparation, seule la voie RER RNase HII a été démontrée chez les *Archaea* (Heider et al. 2017).

2.1 L'excision des ribonucléotides initiée par la RNase HII/2 (RER RNase HII/2)

La voie RER se déroule en même temps ou après la réplication. La voie RER initiée par la RNase HII chez les Bactéries et les *Archaea* et la RNase H2 chez les Eucaryotes est la voie majeure pour l'excision de rNMPs dans l'ADN (Vaisman et al. 2014; Heider et al. 2017; Sparks et al. 2012). La RNase HII/2 permet l'initiation de la voie RER par le clivage de la liaison phosphodiester en 5' du ribonucléotide, ainsi que la résolution des hybrides ARN : ADN appelés R-loops (Arudchandran et al. 2000; Sparks et al. 2012). Les *Archaea* possèdent une enzyme RNase HII homologue à celle retrouvée chez les Eucaryotes. RNase HII n'est pas essentielle chez les *Archaea* et la délétion de ce gène n'entraîne

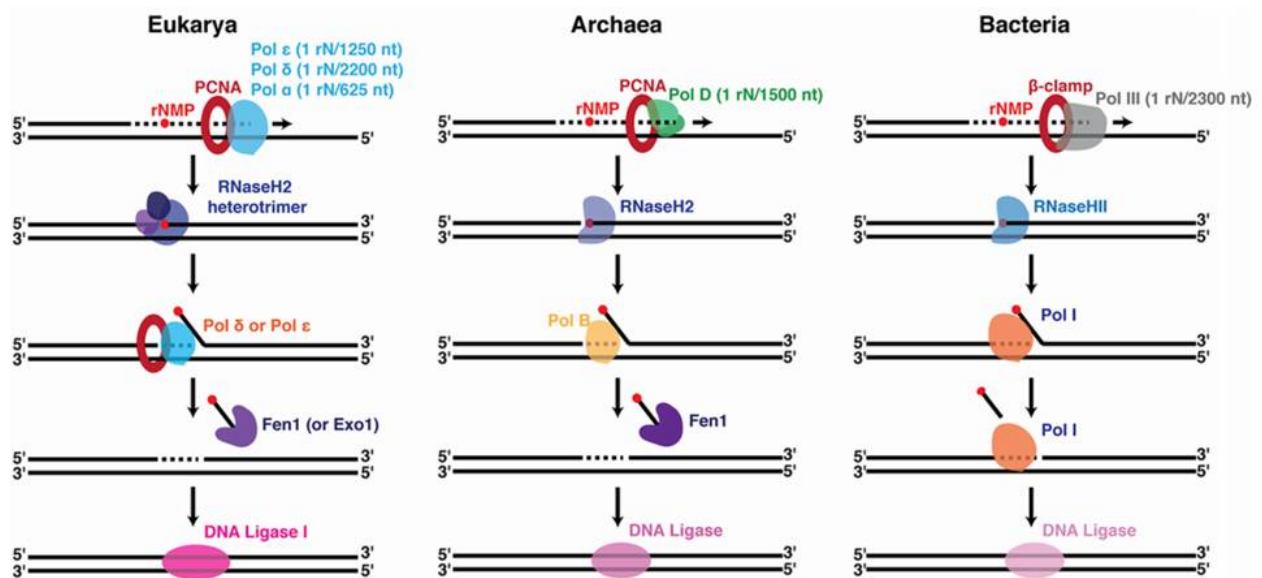


FIGURE 12: Voie de réparation RER initiée par la RNase HII dans les trois domaines du vivant d'après Heider et al. 2017.

Dans les trois domaines du vivant la voie RER est initiée par l'incision du rNMP par RNase HII/2. Le brin comportant le rNMP à son extrémité est déplacé par Pol δ ou Pol ϵ chez les Eucaryotes, PolB chez les *Archaea*, et Pol I chez les Bactéries, créant un brin flottant clivé par l'endonucléase Fen1 chez les Eucaryotes et les *Archaea* ou Pol I chez les Bactéries. Dans les trois domaines du vivant l'ADN ligase I/1 permet de finir la réparation.

pas de défaut de croissance chez les *Thermococcales* (Birien et al. 2018; Heider et al. 2017; Burkhart et al. 2017) et chez l'Halophile *Haloferax volcanii* (Meslet-Cladière et al. 2007). De plus, il a été montré que la délétion de RNase HII chez *Thermococcus barophilus* entraîne une augmentation significative du nombre de rNMPs incorporés dans le génome (Lemor et al. 2018). Ces résultats confirment la fonction d'élimination des rNMPs de RNase HII chez les *Archaea*. Chez les mammifères l'enzyme RNase H2 est essentielle. En effet, la délétion du gène codant la RNase H2 chez la souris est létale et empêche la croissance embryonnaire (Reijns et al. 2012). Chez la levure, RNase H2 a un rôle important dans la phase G2/M du cycle cellulaire pour la voie RER ainsi que la résolution des R-loops. En revanche, RNase H2 ne serait pas efficace dans la phase S du cycle cellulaire et agirait donc de manière post-répliquative suggérant que la majorité des ribonucléotides et des R-loops sont éliminés post-réplication (Lockhart et al. 2019). Chez la levure et *E. coli*, l'accumulation des ribonucléotides et des R-loops non éliminés par RNase H2 sont pris en charge par RNase H1 qui fonctionne indépendamment du cycle cellulaire et serait activée en réponse à un stress induit lorsque la voie RER RNase HII n'arrive pas à éliminer tous les ribonucléotides (Lockhart et al. 2019; Walsh et al. 2019).

Après l'incision par RNase HII/2, le mécanisme et les protéines impliqués dans la voie de réparation RER RNase HII sont semblables à la maturation des fragments d'Okazaki. Le brin contenant le ribonucléotide à son extrémité 5' est déplacé par Pol I chez les Bactéries (Vaisman et al. 2014), Pol δ ou Pol ϵ chez les Eucaryotes (Sparks et al. 2012), PolB chez les *Archaea* (Heider et al. 2017). Le brin flottant crée comportant le ribonucléotide à son extrémité 5' est ensuite clivé par Pol I chez les Bactéries (Vaisman et al. 2014), Fen1 chez les *Archaea* (Heider et al. 2017), et Fen1 ou l'exonucléase Exo1 chez les Eucaryotes (Sparks et al. 2012). Chez les Bactéries, l'activité exonucléase 5'→3' de Pol I peut agir sur le simple brin déplacé comme exonucléase ou endonucléase (Vaisman et al. 2015). L'ADN

ligase I/1 finit ensuite le processus de réparation (Sparks et al. 2012; Vaisman et al. 2014; Heider et al. 2017) (Figure 12). Chez les *Archaea*, il a été proposé que PolD pourrait remplacer PolB lorsque celle-ci est défaillante dans le RER (Heider et al. 2017). De même, chez les Bactéries en absence de Pol I, Pol III serait impliquée dans la voie RER (Vaisman et al. 2014).

2.2 L'excision des ribonucléotides initiée par la Topoisomérase 1 (RER Top1)

En cas de défaut de la voie RER *via* la RNase HII une autre voie RER secondaire peut être initiée par la Topoisomérase 1 (Top1) (Kim et al. 2011; Sparks et al. 2015). L'existence de cette voie secondaire a été démontrée chez les Eucaryotes mais pas chez les *Archaea* ni les Bactéries. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, lorsque le gène codant RNase HII est délété les rNMPs peuvent être réparés dans le brin en cours de synthèse par Top1. De plus, dans les cellules de levure délétées en RNase HI et RNase HII la délétion de Top1 est létale (Williams et al. 2013). Le clivage de rNMPs par Top1 peut parfois générer des délétions de 2 à 5 paires de bases lorsqu'elle agit dans des séquences ADN répétées (Williams et al. 2013; Kim et al. 2017) (Figure 13). De plus, la réparation des ribonucléotides par la voie Top1 est asymétrique et induit des instabilités chromosomiques (Conover et al. 2015). La réparation des rNMPs par Top1 peut donc causer un stress réplcatif (Williams et al. 2017).

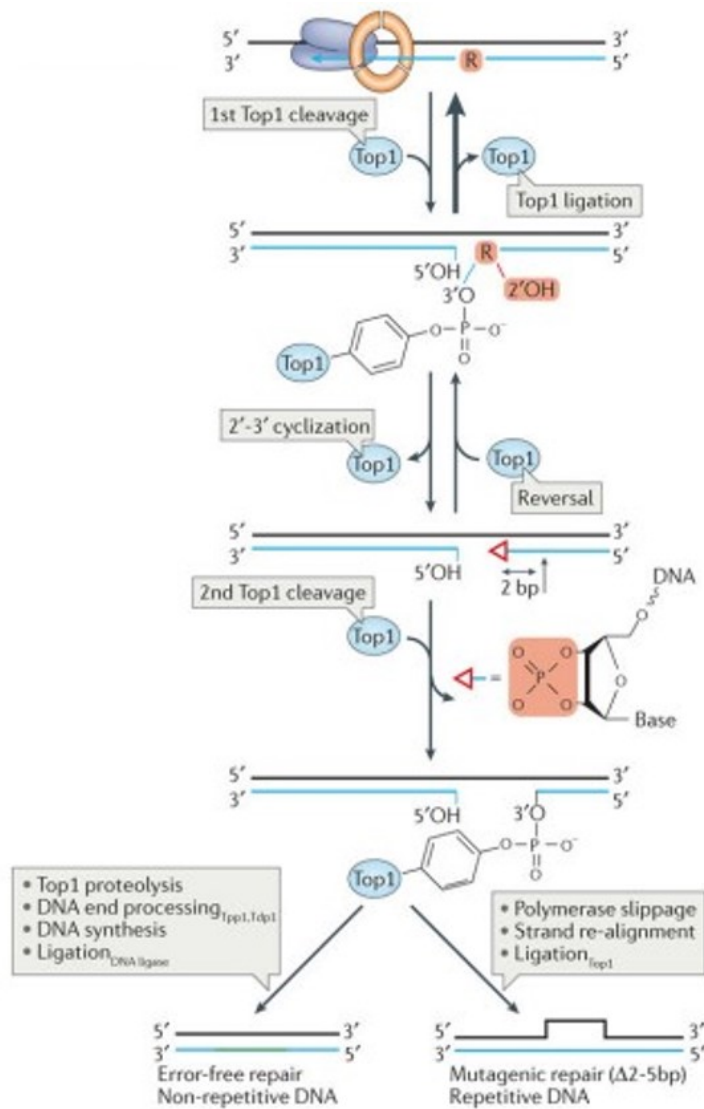


FIGURE 13: Voie de réparation RER initiée par la Topoisomérase I chez les Eucaryotes d'après Williams et al. 2016.

Le clivage en 3' du rNMP par Top1 entraîne la formation d'un phosphate cyclique 2'-3' (triangle rouge) et d'une extrémité 5'-OH. Top1 réalise ensuite un second clivage de l'extrémité cyclique 2'-3'. La réparation de Top1 peut être mutagénique ou sans erreur. Les deux premières étapes sont réversibles et peuvent reformer le produit original contenant un rNMP qui peut alors être pris en charge par la voie RER RNase HII.

LES Archaea

1 Découverte et classification

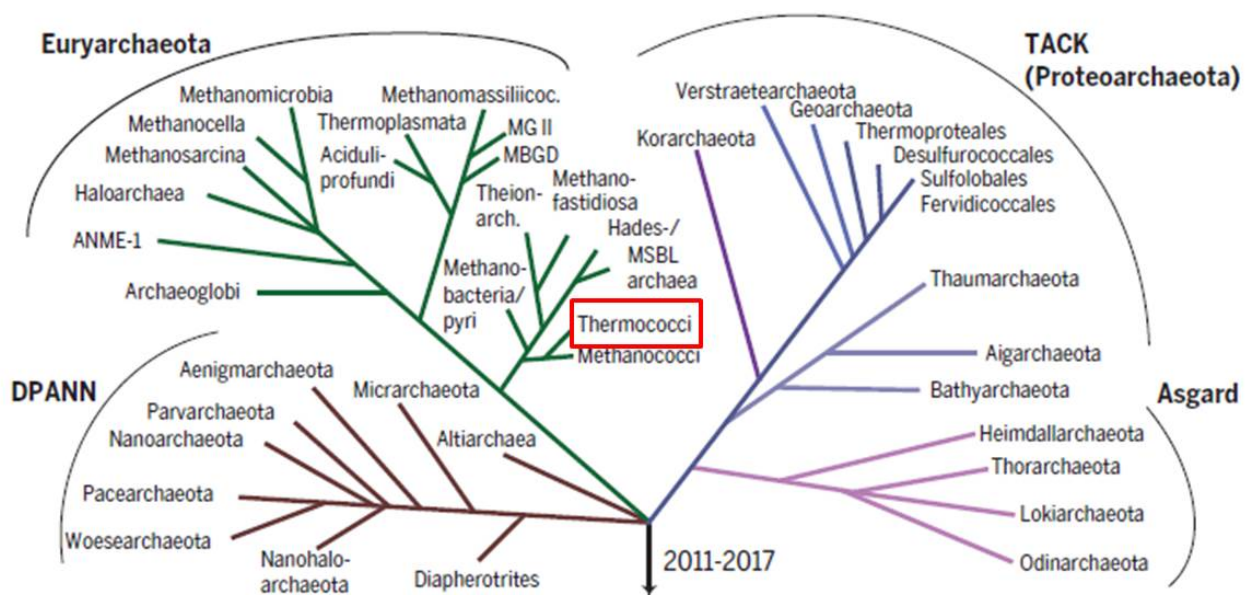


FIGURE 14: Arbre phylogénétique représentant le domaine des *Archaea* d'après Spang et al. 2017. Actuellement le domaine des *Archaea* est divisé en quatre phyla : les DPANN, les *Euryarchaea*, les TACK et les Asgard. Nos deux modèles d'étude appartiennent aux *Thermococcales* qui sont encadrés en rouge.

Les *Archaea* ont été découvertes en 1977 par Carl Woese et son équipe (Woese et al. 1977). Les *Archaea* ont d'abord été appelées Archeobactéries et classées avec les Procaryotes dans l'arbre du vivant qui comportait deux domaines : les Eucaryotes et les Procaryotes. En 1990, pour la première fois un arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S composé de trois domaines du vivant : Eucaryotes, Bactéries et *Archaea* est proposé (Woese et al. 1990). Au sein des *Archaea* il existe pour l'instant 4 phyla : les *Euryarchaea*, les Asgard, les TACK regroupant les *Thaumarchaeota*, les *Aigarchaeota*, les *Crenarchaeota* et les *Korarchaeota*, et les DPANN regroupant les *Diapherotrites*, les *Parvarcheota*, les *Aenigmarchaeota* et les *Nanoarchaeota* (Figure 14) (Spang et al. 2017). La classification des *Archaea* est régulièrement remise en question et actualisée progressivement avec l'isolation et la mise en culture de nouvelles souches.

Les *Archaea* ont d'abord été découvertes dans des environnements extrêmes comme par exemple les lacs hypersalés, les volcans, les sources hydrothermales (Chaban et al. 2006 ; Prieur et al. 1995) puis ont été retrouvées et échantillonnées dans des environnements très variés (Robertson et al. 2005) jusque dans le microbiote humain (Chibani et al. 2021).

Les deux modèles d'étude choisis, *Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus barophilus* ont été échantillonnés près de sources hydrothermales où les conditions de vie sont qualifiées d'extrêmes en raison de l'absence d'oxygène et de lumière, de la pression importante et des températures pouvant aller de 4°C à 400°C. Ce sont deux *Archaea* de l'ordre des *Thermococcales* dans le phylum des *Euryarchaea* (Figure 14). Les *Thermococcales* sont des *Archaea* hyperthermophiles, anaérobies strictes et hétérotrophes (Gunbin et al. 2009).

2 Les *Archaea* comme modèle d'étude de la maintenance génomique

2.1 Modèles d'études biochimiques, l'exemple de *Pyrococcus abyssi*

Les *Archaea* sont des procaryotes ne possédant pas de noyau et ont un génome circulaire organisé en opérons comme les Bactéries. En revanche, elles ont des métabolismes très variés et leur machinerie moléculaire, notamment pour la maintenance génomique contient de nombreuses protéines homologues aux Eucaryotes mais aussi des protéines spécifiques aux *Archaea*. Les *Archaea* ont donc des points communs dans leurs mécanismes et protéines impliqués dans la réplication et la réparation avec les Bactéries et les Eucaryotes mais également des spécificités retrouvées uniquement chez les *Archaea*. Il existe aussi des variabilités au sein des *Archaea*. Par exemple, les chromosomes des *Crenarchaea Sulfolobus* ont une organisation en compartiments A/B, des domaines et des boucles comme les Eucaryotes. Dans le compartiment A des structures appelées domaines d'interaction chromosomal (CID) similaires à celles retrouvées dans les chromosomes des Bactéries ont été identifiées (Takemata et al. 2021). Chez l'*Euryarchaea Haloferax volcanii*, les chromosomes ne sont pas organisés en compartiments mais contiennent des domaines et des boucles ADN (Cockram et al. 2021).

Les conditions extrêmes de croissance des *Archaea* extrémophiles impliquent que les mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN doivent être très efficaces pour maintenir l'intégrité du génome. Par exemple, il a été montré que les systèmes de réparation de l'ADN de *Pyrococcus abyssi* étaient efficaces pour réparer les cassures double brins induites par les hautes températures et les radiations ionisantes (Jolivet et al. 2003). De plus, les protéines impliquées dans les mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN des *Archaea* sont similaires à celles des Eucaryotes (Cohen et al. 2003). Ces micro-organismes représentent donc d'excellents modèles biologiques pour étudier la maintenance génomique. Les *Archaea* ont été utilisées dans de nombreuses études biochimiques et structurales des protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN (Y. Ishino et al. 2012; Madru et al. 2020; Greenough et al. 2014; Nishida et al. 2006; Lemor et al. 2018; Heider et al. 2017; Barry et al. 2006; S. Ishino et al. 2013).

Le modèle d'étude biochimique du laboratoire est *Pyrococcus abyssi* (Pab). *Pyrococcus abyssi* a été échantillonnée dans l'eau de mer proche d'une source hydrothermale à 2000 mètres de profondeur dans le bassin nord fidjien (Erauso et al. 1993). *Pyrococcus abyssi* est une *Archaea* anaérobie stricte, chimiohétérotrophe et hyperthermophile avec une température de croissance entre 67°C et 102°C et un optimum de croissance à 96°C. Elle peut croître à des pressions allant de 0,2 à 40 MPa avec une pression optimale de 20 MPa (Erauso et al. 1993). *Pyrococcus abyssi* malgré un habitat naturel particulier, se cultive en laboratoire, en anaérobie et à 96°C avec un optimum de pH de 6,8 (Godfroy et al. 2000) (Tableau 5). *Pyrococcus abyssi* a une forme de coque de 0,8 µm à 2 µm de diamètre et est mobile grâce à son flagelle (Erauso et al. 1993). De plus, son génome de forme circulaire d'1,7 Mpb

est séquencé et annoté (Cohen et al. 2003; Gao et al. 2012). *Pyrococcus abyssi* possède également un plasmide pGT5 de 3,4 kpb isolé et séquencé (25 à 30 copies) (Erauso et al. 1996).

	<i>Pyrococcus abyssi</i>	<i>Thermococcus barophilus</i>
Température (°C)	67 - 102 (96)	48 - 95 (85)
Pression (MPa)	0,2 - 40 (20)	0,3 - 40 (20)
pH	4 - 8,5 (6,8)	4,5 - 9,5 (7)
Taille du génome (Mpb)	1,7	2
Taille du plasmide (kpb)	3,4	54

TABLEAU 5: Caractéristiques de croissance de *Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus barophilus* (Marteinsson et al. 1999; Vannier et al. 2011; Erauso et al. 1993; Cohen et al. 2003; Gao et al. 2012)

Le tableau représente les minimum et maximum de température, pression et pH avec les optimum entre parenthèses.

2.2 Modèles d'études génétiques, l'exemple de *Thermococcus barophilus*

Des systèmes génétiques ont été développés chez certaines *Archaea*, les Méthanogènes (*Methanococcales* et *Methanosarcinales*), les Halophiles (*Halobacteriales*), les Thermococcales (*Thermococcus*) et les Sulfolobales (*Sulfolobus*) (Leigh et al. 2011).

Au laboratoire, la méthode de transformation de *Thermococcus barophilus* par pop-in pop-out a été développée (Figure 15) (Thiel et al. 2014; Birien et al. 2018). Notre modèle d'étude génétique, *Thermococcus barophilus* est une *Archaea* hyperthermophile anaérobie stricte isolée à 3550 mètres de profondeur au niveau de cheminées hydrothermales de la dorsale médio-Atlantique. *Thermococcus barophilus* est une *Archaea* anaérobie stricte, chimiohétérotrophe, piézophile et hyperthermophile. *Thermococcus barophilus* peut croître à des pressions allant de 0,3 à 40 MPa et des températures de 48°C à 95°C. Elle se cultive en anaérobie avec un optimum de croissance à 85°C à pression atmosphérique et un pH optimum de 7 (Tableau 5). Les cellules de *Thermococcus barophilus* sont en forme de coques de 0,8 à 2 µm de diamètre (Marteinsson et al. 1999). *Thermococcus barophilus* possède un chromosome circulaire de 2 Mpb et un plasmide pTBMP1 de 54 kpb qui ont été entièrement séquencés et annotés (Vannier et al. 2011).

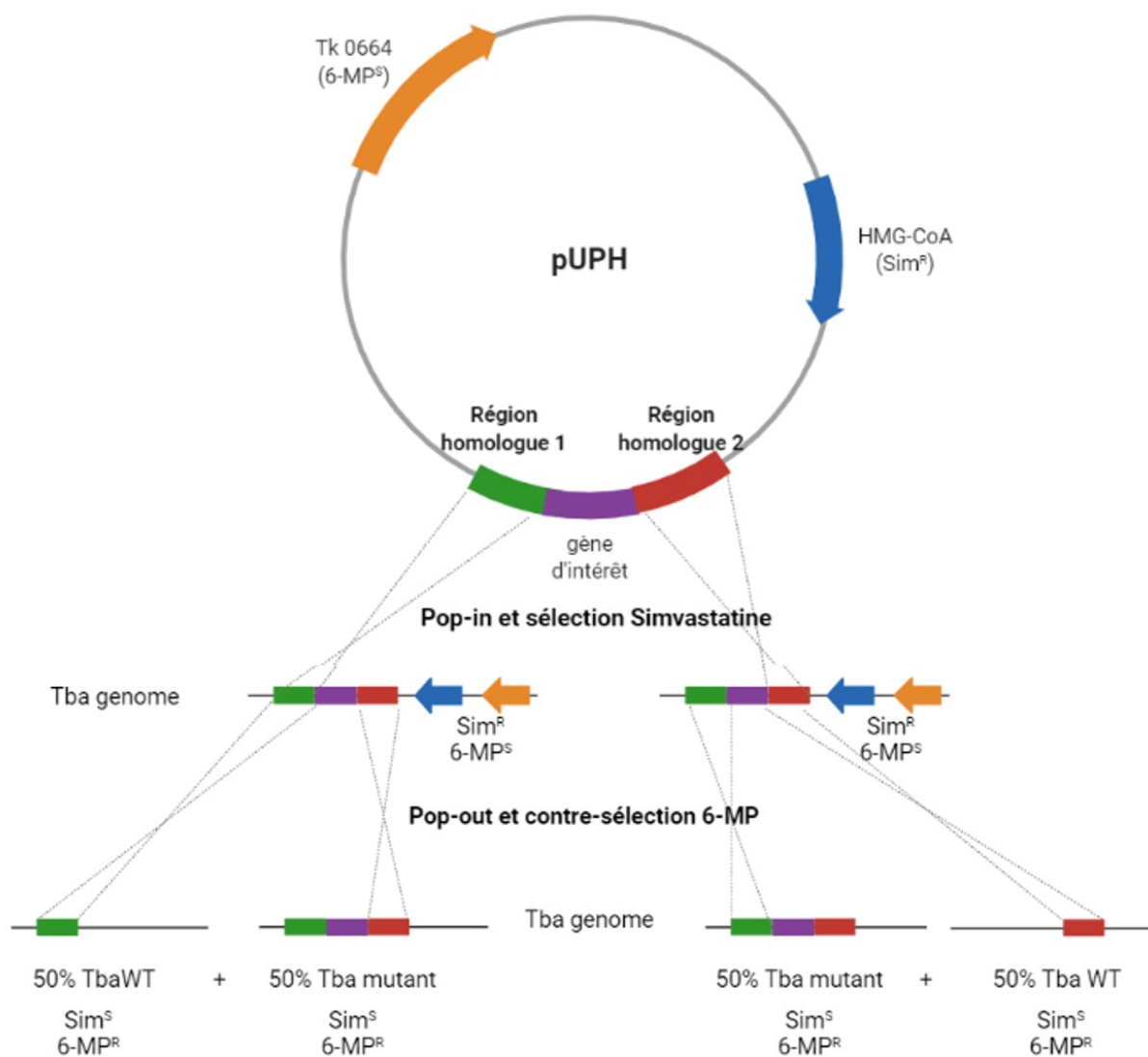


FIGURE 15: Méthode du pop-in pop-out chez *Thermococcus barophilus* adapté de Thiel et al. 2014 et Birien et al. 2018.

Le gène d'intérêt (en violet) est intégré dans le plasmide pUPH entouré de deux cassettes correspondant à des régions homologues du génome de Tba (en vert et rouge). Le plasmide pUPH contient le gène *Tk0664* conférant une sensibilité au 6-MP (en orange) et le gène permettant de conférer une résistance à la Simvastatine (en bleu). Lors de l'étape de Pop-in, un premier crossing-over a lieu au niveau de l'une des deux régions homologues. Les cellules ayant incorporé le plasmide sont sélectionnées par la Simvastatine. Lors de l'étape de Pop-out, un deuxième crossing-over est réalisé soit au niveau de la même région homologue que lors du premier crossing-over entraînant un phénotype sauvage, soit au niveau de la région homologue différente de celle utilisée lors du premier crossing-over entraînant le phénotype mutant. La contre-sélection au 6-MP permet de vérifier que le plasmide est éliminé du génome. Schéma réalisé avec BioRender.

OBJECTIFS

Il a été montré que les ADN polymérase des Eucaryotes pouvaient incorporer par erreur des rNMPs dans l'ADN en cours de synthèse (McElhinny et al. 2010 ; Bergoglio et al. 2003). Les ADN polymérase de *Pyrococcus abyssi* sont également capables d'incorporer des rNMPs dans l'ADN (Lemor et al. 2018). *Pyrococcus abyssi* étant une *Archaea* hyperthermophile, la question de l'impact des ribonucléotides sur la stabilité génomique se pose. En effet, la dégradation spontanée de l'ARN est plus importante à température élevée et à pH alcalin (Li et al. 1999). Pour étudier les effets de l'incorporation de rNMPs dans l'ADN et les mécanismes par lesquels ils sont éliminés chez les *Archaea*, ce projet sera composé de trois objectifs. Le premier objectif sera d'étudier l'importance de la fonction exonucléase des ADN polymérase de *Pyrococcus abyssi* dans l'élimination des ribonucléotides de l'ADN. Le deuxième objectif sera d'étudier la voie de réparation RER RNase HII de *Pyrococcus abyssi*. Pour finir, le dernier objectif sera de quantifier le pool de nucléotides intracellulaires de *Thermococcus barophilus* et *Haloferax volcanii* afin de compléter une analyse ribose-seq effectuée précédemment.

1 Importance de la fonction exonucléase des ADN polymérase dans l'élimination des ribonucléotides de l'ADN

Il est connu que certaines ADN polymérase comme les ADN polymérase ϵ et δ de *Saccharomyces cerevisiae* possèdent une activité exonucléase 3'→5'. L'activité exonucléase de Pol ϵ permet de dégrader les ribonucléotides insérés dans l'ADN par erreur lors de la polymérisation contrairement à l'activité exonucléase de Pol δ (Williams et al. 2012 ; Clausen et al. 2013) (Tableau 4). Cette efficacité de correction des ribonucléotides par les ADN polymérase n'a pas encore été étudiée chez les *Archaea* (Tableau 4). Les ADN polymérase B et D de *Pyrococcus abyssi* possèdent une activité exonucléase (Tableau 3). La capacité de cette fonction exonucléase pour éliminer les ribonucléotides lors de la réplication sera étudiée *in vitro* chez *Pyrococcus abyssi*. L'influence de la nature de la base du rNMP sur l'efficacité de l'activité exonucléase de PolB et PolD sera également évaluée. De plus, il a été montré que des mésappariements de rNMPs pourraient être présents dans l'ADN de la levure (Shen et al. 2012) et que PolD de Pab était capable de créer des mésappariements de base de rNMPs lors de la réplication (Lemor et al. 2018). L'efficacité de la fonction exonucléase des ADN polymérase de *Pyrococcus abyssi* sera donc également étudiée sur des ribonucléotides mésappariés.

2 Etude de la voie d'excision des ribonucléotides (RER) initiée par la RNase HII

Lorsque les ribonucléotides ne sont pas corrigés par l'activité de relecture des ADN polymérase il existe des voies de réparation permettant d'éliminer ces rNMPs. Actuellement, la seule voie de réparation des ribonucléotides identifiée chez les *Archaea* est la voie RER initiée par la RNase HII.

Récemment, une partie de la voie RER RNase HII a été reconstituée *in vitro* chez *Thermococcus kodakarensis*, cette étude se limite uniquement à la correction des ribonucléotides avec appariement de bases correctes dans l'ADN (Heider et al. 2017). Afin de compléter cette reconstitution *in vitro* de la voie de réparation RER RNase HII le modèle *Pyrococcus abyssi* sera utilisé. La reconstitution sera réalisée avec comme point de départ différents substrats ADN double brin comportant un rNMP. L'influence de la nature du rNMP incorporé ainsi que du mésappariement d'un rNMP sur l'activité ribonucléase de RNase HII sera évaluée. En effet, lors d'une étude précédente il a été montré que l'ADN polymérase D de *Pyrococcus abyssi* était capable d'incorporer des ribonucléotides mésappariés *in vitro* (Lemor et al. 2018). Il a été montré au LM2E que la délétion du gène codant RNase HII chez *Thermococcus barophilus* était viable (Birien et al. 2018). *Thermococcus barophilus* sera donc utilisée comme modèle *in vivo* pour étudier la fonction ribonucléase de RNase HII.

3 Quantification du pool de nucléotide intracellulaire de *Thermococcus barophilus* et *Haloferax volcanii*

Une analyse par ribose-seq des génomes de *Thermococcus barophilus* et *Haloferax volcanii* et de mutants RNase H de ces souches a permis d'évaluer le taux de rNMPs incorporés dans leur génome et d'évaluer l'importance fonctionnelle des RNases H sur ce taux d'incorporation (collaboration LM2E G. Henneke et GeorgiaTech Atlanta, USA F. Storici; Article en préparation Y. Moalic et al). Afin de compléter cette analyse, le contenu intracellulaire des nucléotides de *Thermococcus barophilus*, *Haloferax volcanii* et de leur mutants RNase H sera quantifié. Nous pourrons ainsi comparer le taux d'incorporation de chaque rNMP avec leur ratio intracellulaire. La variation des ratios rNTPs/dNTPs intracellulaires entre les souches sauvages et les mutants RNase H sera également étudiée.

CHAPITRE II

**Activité exonucléase des ADN
polymérase**

PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE

Les ribonucléotides sont les bases non-canoniques les plus fréquentes dans l'ADN (Nick McElhinny et al. 2010). Une cause de leur présence dans l'ADN est leur incorporation lors de la réplication par les ADN polymérases des trois domaines du vivant (McElhinny et al. 2010 ; Lemor et al. 2018 ; Yao et al. 2013 ; Bergoglio et al. 2003 ; Williams et al. 2012 ; Heider et al. 2017). Les ADN polymérases répliquatives possèdent plusieurs mécanismes pour éviter l'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN : un site d'exclusion stérique "steric gate" permettant la discrimination entre les rNTPs et les dNTPs (Brown et al. 2011) et leur activité 3'→5' exonucléase permettant d'améliorer leur fidélité lors de la réplication en éliminant les mésappariements (McCulloch et al. 2008 ; Kunkel 2009). Chez la levure, il a été montré que l'activité exonucléase de Pol ϵ est capable de corriger les ribonucléotides incorporés dans l'ADN (Williams et al. 2012) alors que l'activité exonucléase de Pol δ n'est pas efficace pour corriger les ribonucléotides (Clausen et al. 2013). Il a aussi été montré que des ribonucléotides mésappariés pouvaient être présents dans l'ADN (Shen et al. 2012).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de l'activité 3'→5' exonucléase des deux ADN polymérases répliquatives des *Archaea* PolB et PolD pour corriger les ribonucléotides appariés ou mésappariés dans l'ADN. L'efficacité de l'activité de relecture exonucléase de PolB et PolD pour corriger des substitutions ou des ribonucléotides a d'abord été évaluée de façon simultanée à la synthèse d'ADN. Puis la capacité des activités exonucléases de PolB et PolD à corriger un ribonucléotide nouvellement incorporé à l'extrémité 3' d'une amorce par une ADN polymérase a été étudiée. Les structures du site actif exonucléase de PolB et PolD en présence d'un ribonucléotide ont été obtenues par Pierre Raia et Ludovic Sauguet (Unité de Dynamique structurale des macromolécules, Institut Pasteur). Pour compléter ces résultats, l'influence du site d'exclusion stérique de PolB sur le taux d'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN a aussi été étudiée.

ARTICLE EN PRÉPARATION :

CONTRIBUTION OF THE PROOFREADING EXONUCLEASE ACTIVITY OF ARCHAEAL DNA POLYMERASES TO RNMP REMOVAL FROM NASCENT DNA STRAND

Maurane Reveil¹, Pierre Raia², Audrey Bosse¹, Blandine Vourc'h¹, Yann Moalic¹, Mohamed Jebbar¹, Ludovic Sauguet², Ghislaine Henneke¹

¹ Univ Brest, CNRS, Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, F-29280 Plouzané, France

² Dynamique Structurale des Macromolécules, Institut Pasteur - CNRS, 75015 Paris, France

1 Introduction

Ribonucleotides (rNMPs) are the main non-canonical nucleotides into genomic DNA. Indeed, they can be incorporated into DNA by DNA polymerases of the three domains of life during DNA synthesis (McElhinny et al. 2010; Williams et al. 2012; Bergoglio et al. 2003; Yao et al. 2013; Lemor et al. 2018; Heider et al. 2017). The incorporation frequency of rNMPs by DNA polymerases is affected by the rNTP intracellular concentration which is 10 to 80-fold higher than dNTP intracellular concentration in Eukaryotes, *Bacteria* and *Archaea* under normal growing conditions (McElhinny et al. 2010; Buckstein et al. 2008; Lemor et al. 2018; Ferraro et al. 2010; Traut 1994) and by the discrimination between rNTP and dNTP by each DNA polymerases (Brown et al. 2011). The ribonucleotides incorporation frequency by *S. cerevisiae* DNA polymerases are 1/1250 for Pol ϵ , 1/5000 for Pol δ and 1/625 for Pol α . These incorporation frequencies allowed to estimate that more than 10 000 ribonucleotides (rNMPs) could be incorporated by DNA polymerases in *S. cerevisiae* genome during each cycle of replication (Nick McElhinny et al. 2010). Our archaeal model, *Pyrococcus abyssi* (Pab) possesses 2 replicative DNA polymerases: a family B DNA polymerase (PolB) and a family D DNA polymerase (PolD). Previous studies showed that in *Archaea* PolB and PolD also incorporate ribonucleotides in DNA, with an incorporation frequency of 1/2500 for PolB in *Thermococcus* sp. 9°N and of 1/1500 or 1/1250 for PolD in *Thermococcus* sp. 9°N or *Pyrococcus abyssi* respectively (Heider et al. 2017; Lemor et al. 2018). Despite their extreme living conditions, the rNMP incorporation frequencies of hyperthermophilic archaeal DNA polymerases are similar to those of Eukaryotes or *Bacteria* (Heider et al. 2017; Lemor et al. 2018; Abellón-Ruiz et al. 2016; Zhang et al. 2010). Embedded rNMPs in

DNA can be used as a positive signal (e.g. mating-type switching in yeast (Vengrova et al. 2004, 2006) or nascent strand recognition during the mismatch repair (MMR) (Lujan et al. 2013)). However, if rNMPs are not removed from the DNA they can cause genomic instabilities (Klein 2017; McElhinny et al. 2010; Pizzi et al. 2015).

Beyond DNA synthesis activity, replicative DNA polymerases has intrinsic 3'→5' exonuclease activity acting in several mechanisms to maintain genome integrity (Brutlag et al. 1972; McCulloch et al. 2008). The DNA polymerase proofreading exonuclease activity increases the fidelity of DNA replication by a factor of 10^2 to 10^3 depending on the DNA polymerases and the error types (McCulloch et al. 2008; Kunkel 2009). It has also been demonstrated in *S. cerevisiae* that Pol ϵ exonuclease activity corrects around 1/3 of incorporated rNMPs in DNA whereas Pol δ exonuclease activity is not efficient to remove ribonucleotides (Clausen et al. 2013; Williams et al. 2012). Up to now, the ability of the exonuclease activity of archaeal DNA polymerases to correct embedded ribonucleotides in DNA has not been studied.

We aimed to investigate PolB and PolD exonuclease activity efficiency to remove rNMPs incorporated in DNA. It has been shown that mismatched rNMPs could be found in DNA (Shen et al. 2012). Mismatched rNMPs can be incorporated in DNA by X and Y families DNA polymerases during translesion synthesis in Eukaryotes and *Bacteria* (Ordonez et al. 2014; Cilli et al. 2015; Jamsen et al. 2021). To our knowledge, archaeal PolD is the only replicative DNA polymerase for which the incorporation of mismatched rNMPs has been described (Lemor et al. 2018). The exonuclease activity efficiency of PolB and PolD will thus be assessed on matched and mismatched rNMPs. First, we studied the contribution of the proofreading exonuclease activity on rNMP processing, by comparing the wild-type and exonuclease-deficient PolD and PolB. We then assessed the exonuclease efficiency to remove a 3'-end newly inserted rNMP. The influence of intracellular dNTPs and rNTPs on the exonuclease efficiency will also be observed. The results indicate that the 3'→5' exonuclease activity of PolB is efficient to correct ribonucleotides during DNA synthesis by its proofreading activity but is ineffective to remove newly inserted matched rNMP at terminal primers. On the contrary, PolD is more efficient in editing newly inserted matched rNMP at terminal primers than in exonucleolytic proofreading of ribonucleotides during synthesis. According to our structural data, this difference of exonuclease activities between PolB and PolD cannot be accounted by physical constraint of rNMP into the exonuclease active site. Both PolB and PolD exonuclease activities are efficient to correct newly inserted mismatched rNMP at terminal primers and confer high fidelity of DNA replication.

2 Experimental procedures

Enzymes production and purification

The enzymes from *Pyrococcus abyssi* (Pab) used in this study were cloned, overexpressed and purified as previously described in the following articles: wild-type (PolB) and exonuclease deficient version (PolBexo-) of PabPolB (D215A mutation) (Gouge et al. 2012), wild-type (PolD) and exonuclease deficient version (PolDexo-) of PabPolD (H451A mutation) (Palud et al. 2008), PabRNase HIII (Meslet-Cladière et al. 2007; Le Laz et al. 2010), PabPCNA and PabRPA (Henneke et al. 2002). *E. coli* RNase HI and RNase HII were purchased from New England Biolabs.

Oligonucleotides and annealing

Oligonucleotides used in this study (Table S1) were purchased from Eurogentec and purified by RP-HPLC with the exception of the 87 bp oligonucleotides, which were purified by PAGE. Oligonucleotides were labeled with Cy5 fluorophore for detection. M13mp18 single stranded circular DNA template (ssM13mp18) was purchased from New England Biolabs. Annealing of two complementary oligonucleotides was performed in 10 mM Tris-HCl (pH 8) and 50 mM NaCl at a final concentration of 500 nM for linear hybrids or at a final concentration of 272 nM primer and 91 nM M13 template for circular hybrids. The mixture was heated to 95°C for 5 min for linear hybrids or to 75°C for 15 min for circular hybrids and slowly cooled to room temperature.

Extension reaction of linear hybrids

Extension assays were carried out in reaction mixture (20 μ L) containing 50 nM of fluorescently primed labelled oligonucleotides, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl and 5 mM MgCl₂ with either 400 nM of PolB or PolBexo- or 1 μ M of PolD or PolDexo-. The 4 dNTPs only or the 4 dNTPs and the 4 rNTPs at intracellular concentration as determined previously in Pab (Lemor et al. 2018) (Jena Bioscience) were added to the reaction. The assays were performed at 55°C for 30 min. Reactions were stopped on ice.

Extension reaction of circular hybrids

Extension assays were carried out in reaction mixture (50 μ L) containing 21 nM of fluorescently labelled primer annealed on ssM13mp18 template, the 4 dNTPs only or the 4 dNTPs and the 4 rNTPs at intracellular concentration as determined previously in Pab (Lemor et al. 2018) (Jena Bioscience), 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl and 5 mM MgCl₂ with 1.6 μ M RPA. A 10 min pre-incubation at 55°C was performed before adding 200 or 500 nM PCNA for the conditions with PolB and PolBexo- or PolD and PolDexo- respectively. A second 10 min pre-incubation at 55°C was done before the addition of either 400 nM of PolB or PolBexo- or 1 μ M of PolD or PolDexo-. The assays were performed at 55°C or 65°C for 3 hours. Reactions were stopped on ice.

Detection of incorporated rNMPs in DNA by enzymatic RNase H treatment

The reaction products of "Extension reaction of linear hybrids" and "Extension reaction of circular hybrids" sections, were purified by the QIAquick Nucleotide Removal kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol and eluted in 30 μ L H₂O. DNA pellets were obtained by speed vac for 40 min at 30°C and suspended in 20 μ L H₂O for linear substrates or 40 μ L H₂O for circular substrates. For the linear substrates, half of the reaction mixture (10 μ L) was incubated at 55°C for 1 hour in 50 mM Tris-HCl (pH 8) and 5 mM MgCl₂ with or without 500 nM PabRNase HIII. For the circular substrates,

a part of the reaction mixture (10 μL) was incubated at 37°C for 1 hour with or without 250 U/mL *E. coli* RNase HII or *E. coli* RNase HI in their respective buffer (New England Biolabs). Reactions were stopped on ice and by adding one volume of a stop solution containing 86 % formamide, 10 mM EDTA (pH 8), and for the linear substrates only, 1 μM of “oligonucleotide competitor” (the exact complement of the template strand under study), followed by a denaturation at 95°C for 5 min.

3'→5' exonuclease degradation reactions

Degradation assays were carried out in reaction mixture (20 μL) containing 50 nM of fluorescently primed labelled oligonucleotides, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl and 5 mM MgCl_2 with either 3 nM of PolB or 100 nM of PolD. The assays were performed at 55°C for 30 min. Reactions were stopped on ice and by adding one volume of a stop solution containing 86 % formamide, 10 mM EDTA (pH 8), 10 mM NaOH and 1 μM of “oligonucleotide competitor” (the exact complement of the template strand under study), followed by a denaturation at 95°C for 5 min.

Visualisation and quantification of products

Linear substrates reaction products (≤ 87 bp) were loaded onto 18 % denaturing polyacrylamide (AccugelTM), 7 M urea gels and run for 4h30 at 5 Watts. Circular substrates reaction products (> 87 bp) were loaded onto 1 % agarose alkaline gels (1 mM EDTA pH 8, 50 mM NaOH) and run at 4°C for 14h30 at 30 Volts. After gel electrophoresis agarose alkaline gels were stained with SYBR Gold® (Invitrogen). Labelled oligonucleotides were detected with Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) and quantified with Image Quant TL 8.1 software (GE Healthcare) as described in Lemor et al. 2018. Densitometry traces were obtained with Image Quant TL 8.1 software (GE Healthcare).

Detection of mutations by Sanger sequencing

Extension reactions were performed as in “Extension reaction of circular hybrids” section, in a final volume of 100 μL . After stopping reactions on ice, the products were purified by the QIAquick Nucleotide Removal kit (QIAGEN) according to the manufacturer’s protocol and eluted first in 30 μL H_2O before a second elution in 20 μL H_2O . Purified products were dried with a speed vac for 1h at 30°C and suspended in 20 μL H_2O . Samples were sequenced by Sanger (Microsynth Seqlab). Mutation analysis were performed with Chromas 2.6.6.

Structural data

DP1 (Pdb id: 5IHE) and PolB (Pdb id: 4FLW) exonuclease active site structures were obtained previously (Sauguet et al. 2016; Gouge et al. 2012). DP1 and PolB crystallization conditions, structure determination and data refinement informations are available in Sauguet et al. 2016 and Gouge et al. 2012.

3 Results

PolD exonucleolytic activity is more efficient than PolB to remove newly inserted rNMPs

We first analysed the structures of PolB and PolD exonuclease active sites on a rNMP containing substrate (Figure 16A). DP1 the small subunit of PolD carrying the exonuclease activity was previously co-crystallized with a dAMP in the exonuclease active site (Sauguet et al. 2016) and PolB was previously co-crystallized with a dGMP in the exonuclease active site (Gouge et al. 2012). To assess if a rNMP could enter in the exonuclease active site of PolB and PolD and observe its conformation in the exonuclease active site compared to a dNMP, DP1 was co-crystallized with a rAMP (unreleased structure) and the exonuclease active site of PolB was modeled with a rGMP (Figure 16A). The OH group on the C2' of the rAMP or rGMP (represented by red sticks at the C2' in Figure 16A) does not prevent the ribonucleotide from entering into the exonuclease active site of PolB and PolD. Therefore, rNMPs can fit in the exonuclease active sites of PolB and PolD, there is no physical constraint (Figure 16A).

We then investigated the exonuclease activity of PolB and PolD to remove newly inserted rNMPs. The efficiency to correct a 3'-end rNMP was first determined in exonucleolytic assays by omitting nucleotides, in which only the exonuclease function of DNA polymerases is measurable (Figure 16B-F). PolD exonuclease activity is 1.5-fold higher on a 3'-OH rNMP substrate compared to the corresponding 3'-OH dNMP substrate except for a rUMP (Figure 16B orange bars). PolD exonuclease activity is similar on a 3'-rUMP compared to a 3'-dTMP containing substrate (Figure 16B orange bars and 16D lane 2 compared to lane 5, see the products shorter than 33-nt). PolB exonuclease function is 0.6-fold less active on a 3'-OH rNMP than the corresponding 3'-OH dNMP containing substrate except in the case of the 3'-rAMP substrate which is as hydrolysed as the 3'-dAMP substrate by PolB exonuclease activity (Figure 16B purple bars and 16C lane 3 compared to lane 6, see the products shorter than 33-nt). Taken together, these results show that PolD exonuclease activity is more efficient than PolB to correct newly inserted rNMPs at the 3'-OH end of the primer (Figure 16B-F). The efficiency of PolB and PolD exonuclease activity varies depending on the rNMP base. PolD exonuclease activity is more efficient on a 3'-rAMP and 3'-rGMP (Figure 16C and 16F lane 2, see the products shorter than 33-nt) compared to a 3'-rCMP and 3'-rUMP (Figure 16D and 16E lane 2, see the products shorter than 33-nt and 16B orange bars). rAMP and rGMP are also the bases the more efficiently removed by PolB exonuclease activity (rAMP > rGMP > rUMP > rCMP) (Figure 16B purple bars and 16C-F lane 3, see the products shorter than 33-nt).

We then assessed the exonuclease activity of PolB and PolD to remove rNMP from the 3'-end of the nascent strand in primer-extension assays in which both exonuclease and polymerase functions of PolB and PolD are measurable (Figure 16G-K). RNase HIII treatment of the 87-nt extension products determines whether the removal of the 3'-rNMP containing primer occurs by PolB or PolD exonuclease activity. RNase HIII cleavage of the 87-nt extension products leading to 32-nt products will indicate an extension of the primer by PolB or PolD without removing the 3'-rNMP prior extension.

We first noticed that to obtain around 100 % of fully extended products (87-nt products) from a 3'-OH rNMP containing primer, PolB and PolBexo- concentrations have to be around 200-times higher than with a 3'-OH dNMP whereas PolD and PolDexo- concentrations have to be 32-times higher than

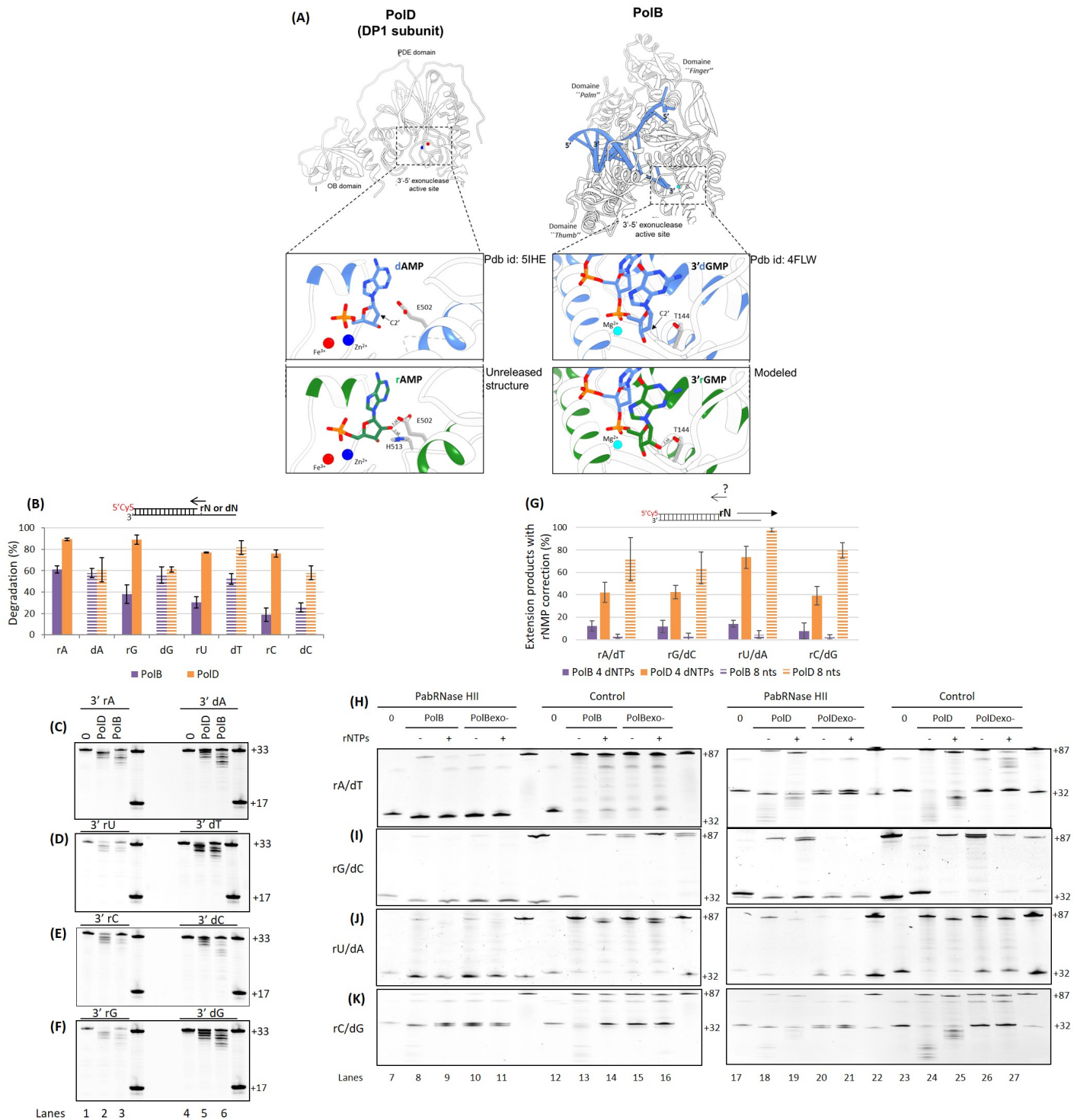


Figure 16: PolD exonuclease activity is more efficient than PoB to correct matched embedded ribonucleotides.

(A) Structure of a ribonucleotide into the exonuclease active sites of PolB and PolD. (B) Histogram representing the exonuclease activity efficiency of PolB and PolD estimated by the quantifications from the gels (C, D, E and F) of three independent experiments. Electrophoresis profiles on a denaturing polyacrylamide gel of 3'-matched rAMP and dAMP (C), rUMP and dTMP (D), rCMP and dCMP (E) or rGMP and dGMP (F) containing substrates after incubation with PolB and PolD. (G) Histogram representing the percentage of extended products after 3'-rNMP correction obtained with PolB, PolD and their exonuclease deficient versions estimated by the quantifications from the gels (H, I, J and K) of three independent experiments. Electrophoresis profiles on a denaturing polyacrylamide gel of 3'-matched rAMP (H), rGMP (I), rUMP (J) or rCMP (K) containing substrates obtained by incubation with PolB and PolD after control or RNase HIII treatment.

to obtain around 100 % of fully extended products from a 3'-OH dNMP (Results not shown). The exonuclease activity of PolD is around 1.5-fold more efficient to remove a 3'-rNMP in presence of the 8 nucleotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) compared to the 4 dNTPs only (Figure 16G dashed orange bars compared to orange bars). In contrast, PolB exonuclease activity is around 3-fold less efficient to correct a 3'-rNMP in presence of the 8 nucleotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) compared to the 4 dNTPs only (Figure 16G dashed purple bars compared to purple bars). A newly inserted rNMP at the 3'-end of a primer impedes PolDexo- extension activity compared to PolD (Figure 16H-K lanes 26 and 27 compared to lanes 24 and 25, see the 87-nt and 33-nt products). In contrast, PolB extension activity is as efficient as PolBexo- on a 3'-rNMP primer except for rCMP (Figure 16H-K lanes 13 and 14 compared to 15 and 16, see the 87-nt and 33-nt products). PolB seems to extend a 3'-rNMP containing primer more efficiently than PolD (Figure 16H-K lanes 13-16 compared to lanes 24-27, see the 87-nt and 33-nt products). The 3'-rCMP containing primer is the less extended by PolB and PolD (Figure 16K lanes 13-16 and 24-27, see the 87-nt products). This 3'-rCMP substrate is also the more hydrolysed by PolB and PolD exonuclease activities (Figure 16K lanes 13, 14, 24 and 25, see the products shorter than 33-nt). As expected, all the products extended by PolBexo- and PolDexo- (Figure 16H-K lanes 15, 16, 26 and 27, see the 87-nt products) are hydrolysed by RNase HII treatment (Figure 16H-K lanes 10, 11, 20 and 21, see the 32-nt products) in accordance with the inactivated exonucleolytic function of PolD and PolB for the 3'-rNMP primer excision. In contrast, around 40 % to 90 % of PolD extension products (Figure 16H-K lanes 18 and 19, see the 87-nt products) and 1 % to around 15 % of PolB extension products (Figure 16H-K lanes 8 and 9, see the 87-nt products) are not hydrolysed by RNase HII treatment indicating 3'-rNMP removal from some primers prior to extension.

In both conditions tested (8 nucleotides or the 4 dNTPs only), PolD exonuclease activity is more efficient to correct a 3'-rUMP compared to other rNMP bases (Figure 16G orange bars and 16J lanes 18 and 19 compared to 16H, 16I and 16K lanes 18 and 19, see the 32-nt products). PolB exonuclease activity is not very efficient to correct a 3'-rNMP regardless of the nature of the base. Indeed, the 3'-rNMP correction of PolB extension products is ranging from 1 % to 15 % (Figure 16G purple bars and 16H-K lanes 8 and 9, see the 32-nt products). With the 4 dNTPs only, PolD exonuclease activity is around 3.5-fold more efficient than PolB to correct a 3'-rAMP or a 3'-rGMP (Figure 16G orange compared to purple bars and 16H, 16I lane 18 compared to lane 8, see the 32-nt products), and around 5-fold more efficient than PolB to correct a 3'-rUMP or 3'-rCMP (Figure 16G orange compared to purple bars and 16J, 16K lane 18 compared to lane 8, see the 32-nt products). With the 8 nucleotides, PolD exonuclease activity is around 23-fold more efficient to correct a 3'-rAMP, 3'-rGMP or a 3'-rUMP (Figure 16G orange compared to purple dashed bars and 16H-J lane 19 compared to lane 9, see the 32-nt products) and about 38-fold more efficient than PolB to remove a 3'-rCMP (Figure 16G orange compared to purple dashed bars and 16K lane 19 compared to lane 9, see the 32-nt products).

Interestingly, the base influence on the efficiency of PolB and PolD exonuclease activity is different when the exonuclease function is evaluated (Figure 16B) or when both polymerase and exonuclease functions are measurable in primer-extension assays (Figure 16G). For instance, in primer-extension assays, rUMP is the most efficiently removed by PolD exonuclease activity (Figure 16G orange) whereas it's the less in exonucleolytic assays (Figure 16B orange). In the same way, PolB exonuclease activity is equally effective on all rNMPs independently of the nature of the bases in primer-extension assays (Figure 16G purple), whereas its efficiency varies depending on the base by measuring its exonucleolytic activity (Figure 16B purple). Taken together, these results demonstrate that PolD exonuclease activity is more efficient than PolB to correct a newly inserted rNMP in DNA. The removal efficiency

is dependent on the rNMP base. In presence of the 8 nucleotides, PolB exonuclease activity is weaker whereas PolD exonuclease activity is higher than with the presence of the 4 dNTPs only. The cellular level of free rNTPs seems to limit PolB exonuclease activity and enhance PolD exonuclease activity.

Since a previous study demonstrated that PolB and PolD were able to incorporate a rCMP or a rGMP opposite a template rGMP or rCMP respectively (Lemor et al. 2018) we assessed PolB and PolD exonuclease activity on these substrates (Figure S4). PolB and PolD exonuclease activities remove as efficiently a 3'-rCMP and a 3'-rGMP opposite a template dGMP and rGMP or a template dCMP and rCMP respectively (Figure S4A and S4C compared to Figure 16B and 16G, Figure S4B compared to Figure 16E and 16F, and Figure S4D and S4E compared to Figure 16I and 16K). In these conditions, the template nucleotide (dNMP or rNMP) opposite the 3'-rNMP containing primer does not have an influence on the efficiency of PolB and PolD exonuclease activity to correct the rNMP.

Both PolB and PolD exonuclease activity are efficient to remove mismatched rNMPs.

A previous study showed that PolB and PolD can incorporate two main mismatched rNMPs, rAMP/dC or rUMP/dC (Lemor et al. 2018). We thus assessed PolB and PolD exonuclease efficiency to remove these two mismatched rNMPs possibilities (Figure 17). PolB exonucleolytic activity is more efficient to correct a mismatched rNMP compared to a matched rNMP whereas PolD exonucleolytic activity is as efficient to correct a mismatched than a matched 3'-rNMP (Figure 17A-C compared to Figure 16B-D, see the products shorter than 33-nt). PolD exonuclease activity is 1.2-fold more efficient to remove a mismatched 3'-rAMP than the corresponding mismatched 3'-dAMP (Figure 17A orange and 17B lane 2 compared to lane 5, see the products shorter than 33-nt). PolB exonuclease activity is similar on a mismatched 3'-rAMP and a mismatched 3'-dAMP (Figure 17A purple and 17B lane 3 compared to lane 6, see the products shorter than 33-nt). However, PolB and PolD exonuclease activities are less efficient to remove a mismatched 3'-rUMP compared to a mismatched 3'-dTMP (Figure 17A and 17C lanes 2 and 3 compared to lanes 5 and 6, see the products shorter than 33-nt).

We then assessed PolB and PolD exonuclease efficiency in primer-extension assays, when both exonuclease and polymerase functions are active (Figure 17D-F). With the 8 nucleotides PolB and PolD exonuclease activities correct all the mismatched 3'-rNMP containing substrates (Figure 17D purple and orange dashed bars and 17E and 17F lanes 9 and 19, see the 32-nt products). With the 4 dNTPs only, PolD exonuclease activity also corrects all the mismatched 3'-rNMP containing substrates (Figure 17D orange bars and 17E and 17F lane 18, see the 32-nt products) whereas PolB exonuclease activity removes around 90 % of the mismatched 3'-rNMP containing substrates (Figure 17D purple bars and 17E and 17F lane 8, see the 32-nt products). Collectively, these results show that PolB and PolD exonuclease activities are able to remove newly inserted 3'-mismatched rNMP at the primer end before extension.

PolB is more efficient than PolD in exonucleolytic proofreading of ribonucleotides during DNA synthesis

To study the influence of the exonuclease activity on stable rNMP incorporation during DNA synthesis, we compared the rNMP incorporation frequency PolB, PolD and their exonuclease deficient versions (PolBexo- and PolDexo- respectively). The extension reactions of 33-nt primer annealed on a ssM13mp18 were performed at 55°C or 65°C in the presence of RPA, PCNA and all 4 dNTPs with

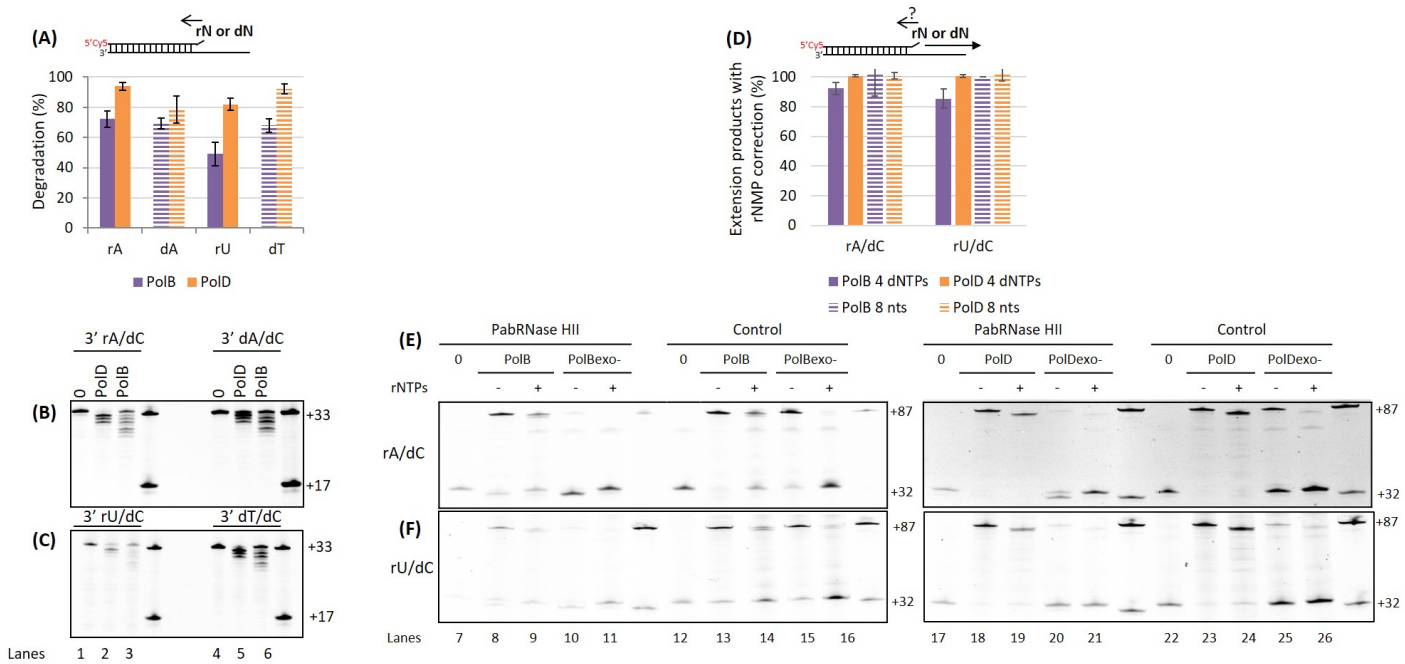


Figure 17: Both PolB and PolD exonuclease activities are efficient to correct a mismatched rNMP. (A) Histogram representing the exonuclease activity efficiency of PolB and PolD estimated by the quantifications from the gels (B and C) of three independent experiments. Electrophoresis profiles on a denaturing polyacrylamide gel of 3'-mismatched rAMP and dAMP (B) or rUMP and dTMP (C) containing substrates after incubation with PolB and PolD. (D) Histogram representing the percentage of extended products after 3'-rNMP correction obtained with PolB, PolD and their exonuclease deficient versions estimated by the quantifications from the gels (E and F) of three independent experiments. Electrophoresis profiles on a denaturing polyacrylamide gel of 3'-mismatched rAMP (E) or rUMP (F) containing substrates obtained by incubation with PolB and PolD after control or RNase HII treatment.

or without all 4 rNTPs at physiological concentrations as determined previously (Lemor et al. 2018) (Figure 18A).

In the conditions tested, we first observed that RPA reduces PolB and PolD extension activity whereas PCNA is stimulatory (Figure S1 lanes 1 and 6 compared to lanes 2 and 7).

The extension products obtained by PolB, PolD and their exonuclease deficient versions were submitted to RNase HI treatment (Figure S3) which hydrolyses a run of at least 4 embedded rNMPs in DNA (Figure S2), or to RNase HII treatment (Figure 18) which hydrolyses one or several embedded rNMP in DNA (Figure S2).

We first observed the incorporation of rNMPs by DNA polymerases with the RNase HII treatment (Figure 18). PolB doesn't incorporate rNMPs in DNA since its extension products are not fragmented by the RNase HII treatment (Figure 18A lanes 3 and 4 compared to lanes 15 and 16) whereas PolBexo- incorporates rNMPs in DNA as seen by its extension products cleavage by RNase HII treatment (Figure 18A lanes 6 and 7 compared to lanes 18 and 19 and 18B, see the corresponding densitometric purple and light purple curves). PolD and PolDexo- extension products are fragmented by RNase HII treatment (Figure 18A lanes 9, 10, 12 and 13 compared to lanes 21, 22, 24 and 25 and 18B, see the corresponding densitometric orange and light orange curves). Moreover, the shorter size fragmented product of highest intensity were obtained for PolDexo- ($0.5 \text{ Kb} \pm 0.2$), while those obtained with PolD have a similar size than the ones obtained with PolBexo- ($1.4 \text{ Kb} \pm 0.9$ and $1.5 \text{ Kb} \pm 0.5$, respectively)(Figure 18C). Thus, both PolD and PolDexo- incorporate rNMPs in DNA. The temperature influence on rNMP incorporation was also assessed. For PolB we didn't notice any difference in extension products fragmentation by RNase HII treatment between 55°C and 65°C (Figure 18A lanes 16 and 19 compared to lanes 15 and 18). The extension products of PolD and PolDexo- are slightly more fragmented by RNase HII treatment at 65°C ($1 \text{ Kb} \pm 0.2$ for PolD and $0.4 \text{ Kb} \pm 0.1$ for PolDexo-) compared to 55°C ($1.4 \text{ Kb} \pm 0.9$ for PolD and $0.5 \text{ Kb} \pm 0.2$ for PolDexo-) (Figure 18A lanes 22 and 25 compared to lanes 21 and 24). Overall these results indicate that in the temperature conditions tested, the temperature had no influence on the rNMP incorporation frequency of PolB and slightly increased the incorporation frequency of PolD.

It has been shown that Pol β is able to incorporate 8 consecutive ribonucleotides *in vitro* (Bergoglio et al. 2003). Similarly, *E. coli* DNA Pol V is able to synthesize long stretches of RNA *in vitro* (Vaisman et al. 2012). We thus assessed if PolB, PolD and their exonuclease deficient versions are able to incorporate several consecutive rNMPs by RNase HI treatment which recognizes and cleaves a run of at least 4 rNMPs (Figure S2). The extension products of PolB, PolD, PolBexo- and PolDexo- are not hydrolysed by RNase HI (Figure S3 lanes 2 and 3 compared to lanes 14 and 15, lanes 5 and 6 compared to lanes 17 and 18, lanes 8 and 9 compared to lanes 20 and 21, lanes 11 and 12 compared to lanes 23 and 24). It thus appears that PolB and PolD don't incorporate runs of 4 consecutive rNMPs or more in DNA. We also noticed that an increase of temperature doesn't promote the incorporation of runs of 4 consecutive rNMPs in DNA by PolB (Figure S3 lanes 2 and 5 compared to lanes 3 and 6) and PolD (Figure S3 lanes 8 and 11 compared to lanes 9 and 12).

We estimated the rNMP incorporation frequency of PolB, PolD and their exonuclease deficient versions as the median of the fragment size distribution after RNase HII treatment (Figure 18C).

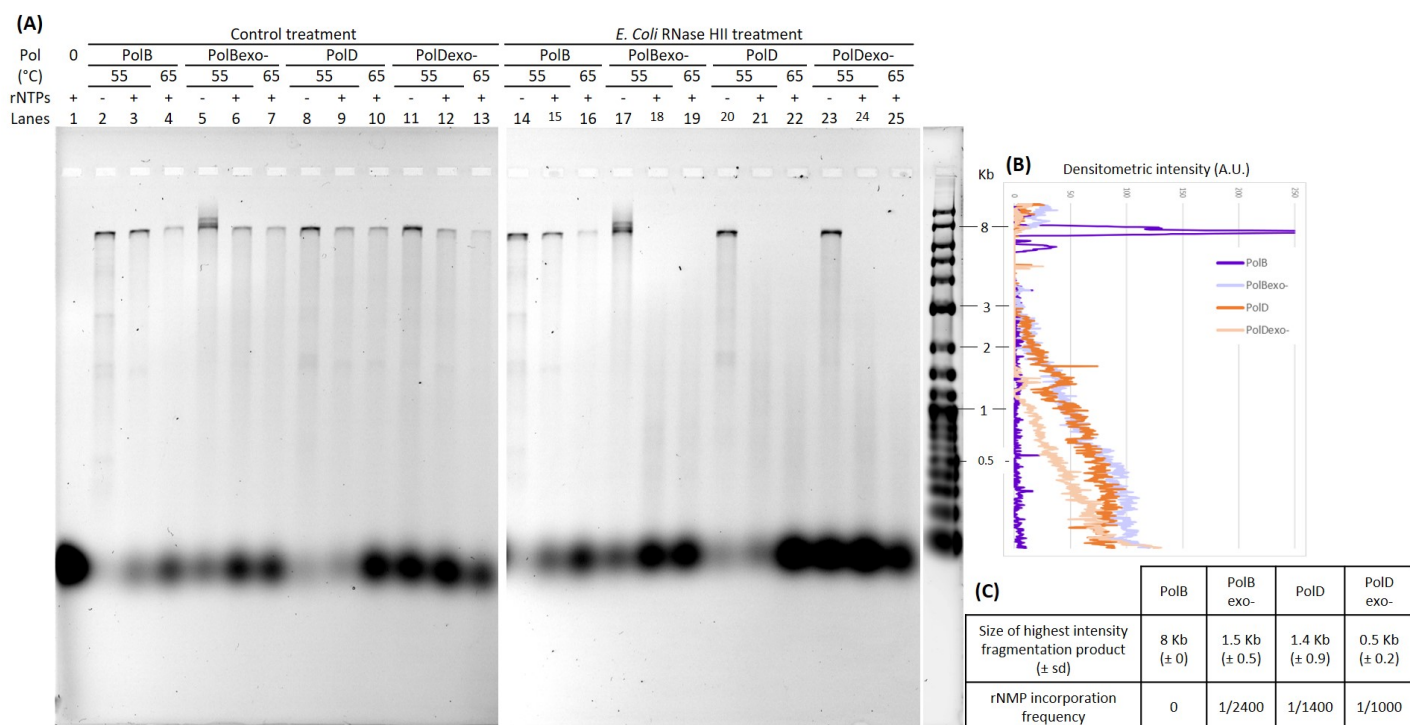


Figure 18: Ribonucleotide incorporation by PolB and PolD compared to their exonuclease deficient versions.

(A) Electrophoresis profile on a denaturing alkaline agarose gel. Ribonucleotide incorporation is observed by RNase HII treatment of the extension products obtained by PolB, PolBexo- (400 nM), PolD or PolDexo- (1000 nM). (B) Densitometric traces of PolB (purple), PolBexo- (light purple), PolD (orange), PolDexo- (light orange) extension products with rNTPs at 55°C after RNase HII treatment and normalized with the control treatment. (C) Size of the highest intensity fragmentation products obtained after RNase HII treatment were calculated from (B) and rNMP incorporation frequency was estimated as the median of fragment size distribution after RNase HII treatment.

At first sight, PolBexo- and PolDexo- rNMP incorporation are higher compared to PolB and PolD respectively confirming that PolD incorporates more rNMPs than PolB (Figure 18C). We observed that PolBexo- incorporates rNMP in DNA since its extension products are fragmented by RNase HIII treatment (Figure 18A lane 18). This result suggests that the steric gate of the Pol active site is not sufficient to limit rNMP incorporation by PolB. However, PolB doesn't incorporate rNMP in DNA (Figure 18A lane 15) suggesting that its exonuclease activity is involved in the absence of rNMP incorporation by PolB. We estimated that PolD rNMP incorporation rate is 1/1400 and PolDexo- incorporation rate is slightly higher (1/1000).

Based on these rNMPs incorporation frequencies we propose that PolB exonuclease activity is able to correct by proofreading all incorporated rNMP and that PolD exonuclease activity is able to correct by proofreading around 30 % of rNMP. Collectively, both PolB and PolD exonuclease activities are able to correct rNMPs by proofreading and this rNMP exonucleolytic proofreading activity is more efficient for PolB than PolD.

Compared to PolD, PolB exonuclease activity further enhances the overall fidelity of DNA synthesis

We observed that the rNMP exonucleolytic proofreading efficiencies of PolB and PolD were different. We thus wondered if this difference in PolB and PolD exonucleolytic proofreading activity observed in the case of ribonucleotide removal can affect replication fidelity. Therefore, we studied the exonucleolytic proofreading of incorporated errors by PolB and PolD and analysed its contribution to the overall accuracy. We compared the fidelity of PolB, PolD and their exonuclease deficient versions (PolBexo- and PolDexo- respectively) during the synthesis of M13 template (Figure 19). We also assessed the influence of the presence of the 4 rNTPs on the exonucleolytic activity. The only type of errors we observed was substitutions and as expected, PolBexo- and PolDexo- incorporate more mismatched bases than PolB and PolD. We also noticed that the presence of rNTPs seems to promote substitution by PolBexo- and PolDexo-. The substitution of the base G by A, T or C is predominant compared to other substitutions (Figure 19 blue). In presence of the 8 nucleotides at the intracellular concentrations, we estimated that PolB exonuclease activity proofreads almost all the substitutions incorporated and that PolD exonuclease activity proofreads around 80 % of substitutions incorporated.

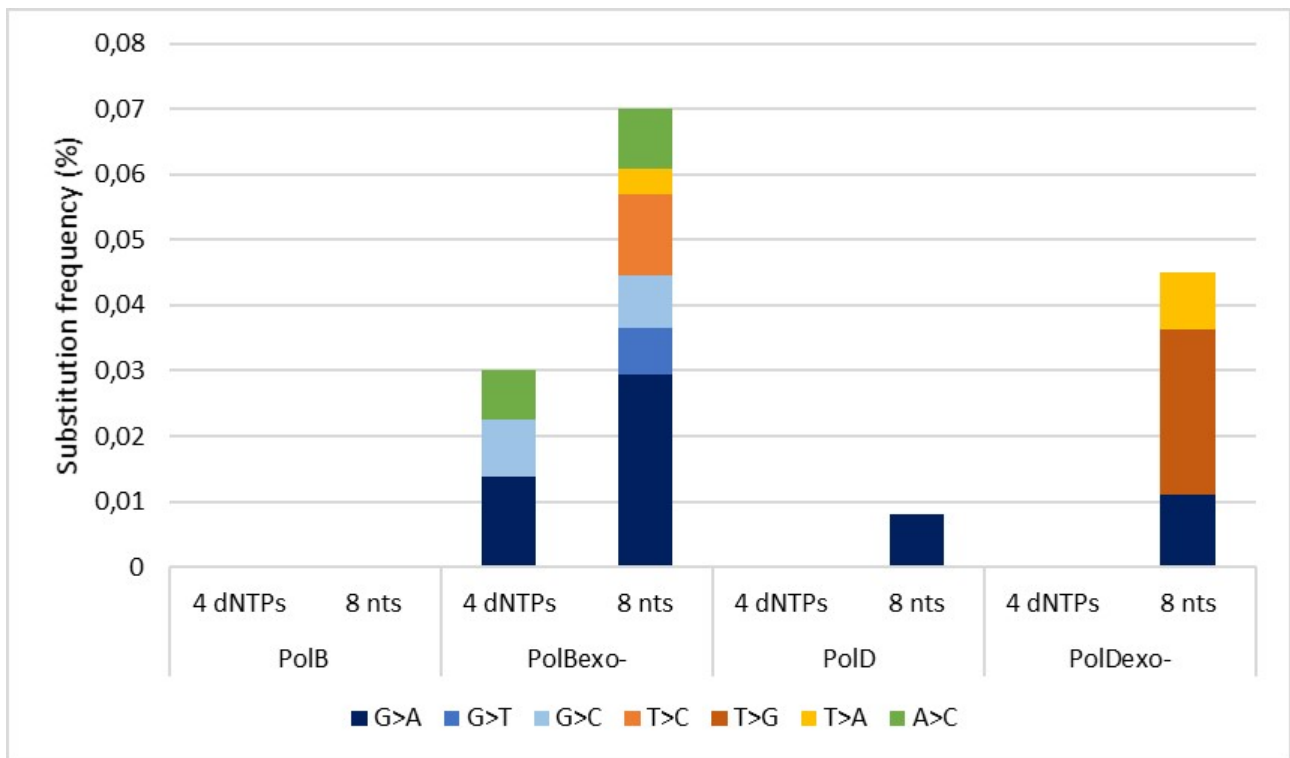


Figure 19: Influence of exonuclease activity on the mutation frequency of PolB and PolD. Mutation frequencies were estimated by Sanger sequencing of extension products of PolB, PolD, PolBexo- and PolDexo-. The mutation frequencies were determined from 5 to 7 independent experiments. The experiments were performed in presence of the 4 dNTPs only (4 dNTPs) or the 4 dNTPs and the 4 rNMPs (8 nts).

4 Discussion

We first found that PolB exonucleolytic activity corrects only from 1 to 15 % of matched 3'-rNMP from the primer terminus (Figure 16G). In contrast, PolB exonuclease activity is efficient to remove all of the newly inserted mismatched 3'-rNMP before extension (Figure 17D). We then assessed PolB rNMP correction by its exonucleolytic proofreading activity (Figure 18). We found that PolBexo- incorporates around 1 rNMP for 2400 dNMP while PolB doesn't incorporate rNMP during DNA synthesis (Figure 18). These results suggest that the steric gate of PolB is not sufficient by itself to prevent ribonucleotides incorporation by PolB and that the proofreading exonuclease activity is also involved in preventing ribonucleotide incorporation by PolB. PolB exonuclease activity is very efficient to correct rNMP during DNA synthesis (Figure 18), but is not efficient to remove preexisting 3'-rNMPs from primer (Figure 16). Our hypothesis concerning PolB exonuclease activity efficiency to remove mismatched 3'-rNMP and not matched 3'-rNMP is that PolB exonuclease activity recognizes and corrects only mismatches independently of the nature of the sugar at the primer terminus. Our study is also consistent with previous work showing that PolB doesn't incorporate ribonucleotides in DNA (Figure 16 and Lemor et al. 2018). However, another study in *Thermococcus* sp 9°N demonstrated that PolB incorporates 1 ribonucleotide every 2500 nucleotides (Heider et al. 2017). This distinct result could be explained by the different archaeal strains studied or by the different nucleotide intracellular concentrations used (*Pyrococcus abyssi* intracellular concentrations in our and Lemor et al. 2018 studies or Eukaryotes intracellular concentrations in Heider et al. 2017 study). Another difference with Heider et al. 2017, is the use of the single-stranded DNA binding RPA in our reactions. We noticed that

RPA and PCNA modulate the efficiency of DNA synthesis by PolB and PolD (Figure S1). Similarly, it would be interesting to investigate the possible influence of RPA and PCNA on PolB and PolD proofreading exonuclease activities in further studies.

We then studied the exonucleolytic activity of PolD to proofread rNMP during DNA synthesis or to correct newly inserted 3'-rNMP. We demonstrated that PolD exonuclease activity corrects around 75 % of matched 3'-rNMP (Figure 16G) and around 100 % of mismatched 3'-rNMP from the primer terminus (Figure 17D). We then observed that PolD incorporates around 1 rNMP every 1400 dNMP whereas PolDexo- incorporates around 1 rNMP every 1000 dNMP (Figure 18), thus PolD exonucleolytic proofreading activity corrects around 30 % of rNMP during DNA synthesis. Moreover, PolD rNMP incorporation frequency is increased by 1.4-fold when its exonuclease function is inactive (Figure 18). We also showed that both PolD and PolDexo- don't seem to incorporate more than three consecutive ribonucleotides as seen by the insensitivity of extension products to RNase HI treatment which cleaves four consecutive ribonucleotides (Figure S3). These results suggest that PolD is more efficient to correct 3'-rNMP prior DNA synthesis (Figure 16G and Figure 17D) than to correct rNMP by its exonucleolytic proofreading activity (Figure 18). This result is consistent with previous studies showing that *Pyrococcus abyssi* PolD incorporates around 1 ribonucleotide every 1250 nucleotides (Lemor et al. 2018) and that *Thermococcus* sp. 9°N PolD incorporates around 1 ribonucleotide every 1500 nucleotides (Heider et al. 2017). In the condition where only the exonuclease function is active, depending on the rNMP base the removal efficiency by PolD (rAMP \simeq rGMP > rCMP \simeq rUMP) and PolB (rAMP > rGMP > rUMP > rCMP) mirror the intracellular concentration of free ribonucleotides (rATP > rGTP \simeq rUTP > rCTP), as well as the priority order for rNMP incorporation in DNA by PolD (rAMP > rGMP \simeq rCMP > rUMP) (Lemor et al. 2018).

We showed that both PolB and PolD exonuclease activities are efficient to remove rNMP from DNA but they don't act in the same way. Indeed, PolB is more efficient to correct rNMP by its exonucleolytic proofreading activity compared to PolD. Moreover, it appears that PolD is more efficient to correct newly inserted 3'-rNMP. To correct a 3'-rNMP containing primer, the primer goes out of the polymerase active site to enter in the exonuclease active site. In the exonuclease active site, the rNMP can be released from the primer which then goes back in the polymerase active site. One hypothesis to explain the observed difference of exonuclease efficiency to correct a 3'-rNMP could be the structural difference between PolB and PolD. Indeed, PolB has both polymerase and exonuclease functions on the same subunit whereas PolD has its exonuclease and polymerase functions on two different subunits (Gouge et al. 2012; Sauguet et al. 2016). The balance between the polymerase and exonuclease functions may thus be distinct between PolB and PolD. To our knowledge, this is the first study showing mismatched 3'-rNMP correction by replicative DNA polymerases, it would be interesting to investigate the exonuclease efficiency to remove mismatched rNMP of other replicative DNA polymerases.

In *Archaea*, PolB and PolD are able to correct rNMP by their exonucleolytic proofreading activity, with PolB being more efficient than PolD. However, PolD exonuclease activity is able to correct newly inserted 3'-rNMP in DNA whereas PolB is not very efficient in correcting 3'-rNMP from primer (except in the case of a mismatched 3'-rNMP). In yeast, the B family replicative DNA polymerases, Pol δ and Pol ϵ incorporate respectively \simeq 1 rNMP every 1800 dNMP (Clausen et al. 2013) or \simeq 1 rNMP

every 1250 dNMP (Nick McElhinny et al. 2010). PolD displays a rNMP incorporation frequency similar to that of Pol ϵ (Figure 18). Pol ϵ exonuclease deficient version has a rNMP incorporation frequency increase of 1.5-fold compared to Pol ϵ WT (Williams et al. 2012), this increase is similar to the one observed for PolDexo- (1.4-fold) compared to PolD (Figure 18). Yeast Pol ϵ corrects around 1/3 of rNMP by its exonucleolytic proofreading activity (Williams et al. 2012) whereas human and yeast Pol δ are not efficient to correct rNMP by exonucleolytic proofreading during DNA synthesis (Clausen et al. 2013). PolD exonucleolytic proofreading activity corrects $\simeq 30\%$ of rNMP during DNA synthesis, similar to Pol ϵ proofreading activity, and PolB rNMP proofreading activity is more efficient than Pol ϵ and corrects all the rNMP during DNA synthesis (Figure 18). Concerning the rNMP correction of newly inserted rNMP, yeast and human Pol ϵ exonuclease activity corrects respectively $\simeq 43\%$ or 50% of 3'-rNMP (Williams et al. 2012; Göksenin et al. 2012), whereas Pol δ is not efficient to correct a 3'-rNMP containing primer (Clausen et al. 2013). PolB is not very efficient to correct a newly inserted rNMP (1% to 15%) whereas PolD is more efficient ($\simeq 75\%$) than Pol ϵ to correct a 3'-rNMP prior to extension (Figure 16G). In the condition where both polymerase and exonuclease functions are active, depending on the base the rNMP removal efficiency by PolD (rAMP \simeq rGMP $>$ rCMP \simeq rUMP) is similar to that of *S. cerevisiae* Pol ϵ (rUMP $>$ rAMP $>$ rCMP = rGMP) (Williams et al. 2012). Since we observed that exonuclease activity efficiency of PolB and PolD to remove newly inserted ribonucleotides depends on the nature of the base, it will be interesting to investigate the influence of the flanking sequence context as well. Indeed, it has been observed that a rich G+C content in the flanking sequence context decreases Pol ϵ exonuclease activity efficiency to remove a rNMP (Williams et al. 2012). It has been shown that human Pol ϵ 3'→5' exonuclease activity is slowed by the presence of 3 or more 3'-end rNMPs (Göksenin et al. 2012). Since our data can't exclude the incorporation of up to 3 rNMPs in DNA by PolB and PolD (Figure S3), it would be of interest to assess PolD and PolB exonuclease activity on primer containing consecutive ribonucleotides at the 3'-end.

PolB and PolD exonuclease activities are less efficient to remove a 3'-end matched or mismatched rUMP compared to other bases (Figure 16B, 16D and Figure 17A, 17C). However, in primer-extension assay, when both polymerase and exonuclease functions are active, a 3'-end rUMP is the rNMP base removed with the highest efficiency by PolD exonuclease activity (Figure 16C). PolB from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus abyssi*, contains a recognition specific pocket for uracil (Wardle et al. 2008; Gouge et al. 2012). Upon binding to the template containing uracil, archaeal PolB displays replication stalling. Furthermore, archaeal B family DNA polymerases have a higher affinity for uracil than dTMP in single stranded DNA (Shuttleworth et al. 2004; Gouge et al. 2012). Similarly, a slight increase of binding to the template strand-uracil, which is accompanied by a reduced polymerisation, is observed with PolD from *Pyrococcus abyssi* (Richardson et al. 2013). The weaker PolB and PolD exonuclease activities on a rUMP substrate observed in our study when the polymerase function of PolB and PolD is inactive could be due to this particular sensing of uracil by archaeal DNA polymerases. The switch between polymerase and exonuclease mode for rUMP removal from the primer terminus might be particularly specific in archaeal DNA polymerases (Wardle et al. 2008; Richardson et al. 2013).

We studied the importance of the exonucleolytic function of PolB and PolD in correcting replication errors at physiological nucleotide concentrations. We observed that both exonuclease deficient versions of PolB and PolD generate base substitutions during DNA synthesis. The main mutation observed in our experiment conditions was the substitution of a G base (Figure 19). In yeast, the

substitution rate of G and C is also higher than the substitution rate of A and T (Lynch et al. 2008; Lujan et al. 2014). Interestingly, the intracellular rNTP concentrations have an influence of DNA polymerase fidelity since the substitution frequency of PolBexo- and PolDexo- were higher (around 2-times for PolBexo-) in presence of intracellular rNTP concentrations (Figure 19). In our experimental conditions, PolB exonuclease activity proofreads all the substitutions (Figure 19) and all the embedded rNMPs (Figure 18) incorporated during DNA synthesis. PolD exonuclease activity is more efficient to proofread substitution ($\simeq 80\%$) (Figure 19) than embedded rNMPs ($\simeq 30\%$) (Figure 18). In *S. cerevisiae*, Pol ϵ is also less efficient to correct newly inserted rNMPs than mismatched bases (Williams et al. 2012; Shcherbakova et al. 2003). Indeed, Pol ϵ exonuclease activity proofreads $\simeq 92\%$ of substitutions (Shcherbakova et al. 2003). In our experimental conditions, the only type of mutation detected was base substitution, it will be interesting to increase the replicates number or to sequence another part of the genome to assess the exonuclease activity influence on other type of errors (e.g., insertions, deletions) in further studies.

5 Supplementary data

Type of substrate	Sequence 5' → 3'	Length	Label	Annealing Primer/Template
L32	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA	32	5'Cy5	L32/M13
L33_dG	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG	33	5'Cy5	L33_dG/L87_dC
L33_dT	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAT	33	5'Cy5	L33_dT/L87_dA
L33_dA	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAA	33	5'Cy5	L33_dA/L87_dT L33_dA/L87_dC
L33_dC	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAC	33	5'Cy5	L33_dC/L87_dG
L33_rg	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAg	33	5'Cy5	L33_rg/L87_dC L33_rg/L87_rc
L33_ru	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAu	33	5'Cy5	L33_ru/L87_dA L33_ru/L87_dC
L33_ra	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAa	33	5'Cy5	L33_ra/L87_dT L33_ra/L87_dC
L33_rc	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAc	33	5'Cy5	L33_rc/L87_dG L33_rc/L87_rg
L87_dG	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT GTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87		
L87_dT	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT TTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87		
L87_dA	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT ATAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87		
L87_dC	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT CTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87		
L87_rc	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT cTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87		
L87_rg	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT gTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87		

Table S1: Oligonucleotide sequences used in this study.

Deoxyribonucleotides are in capital letters and ribonucleotides are in lowercase letters. Variable bases are written in blue for deoxyribonucleotides or in red for ribonucleotides.

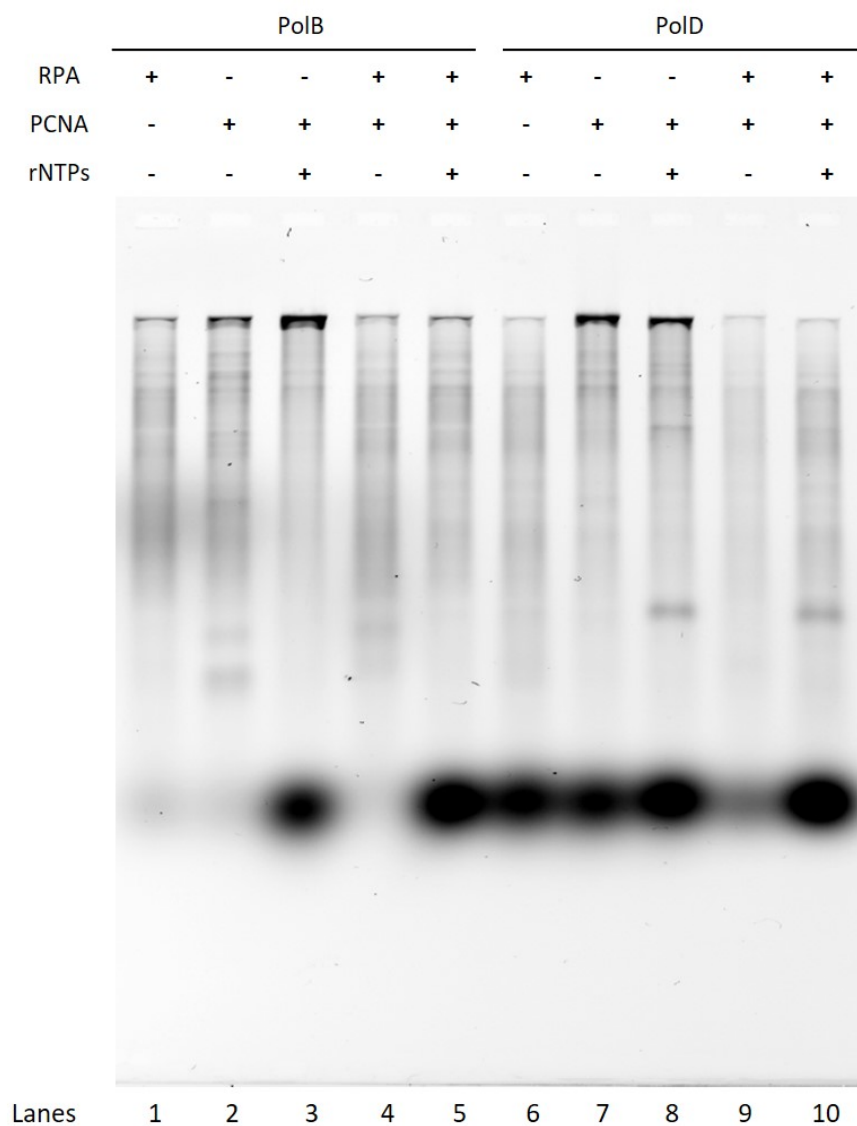


Figure S1: Influence of PCNA and RPA on DNA pols activity. Electrophoresis profile on a denaturing alkaline agarose gel. Influence of RPA, PCNA and intracellular rNTPs on the polymerisation efficiency of PolB (400 nM) or PolD (1000 nM) is observed.

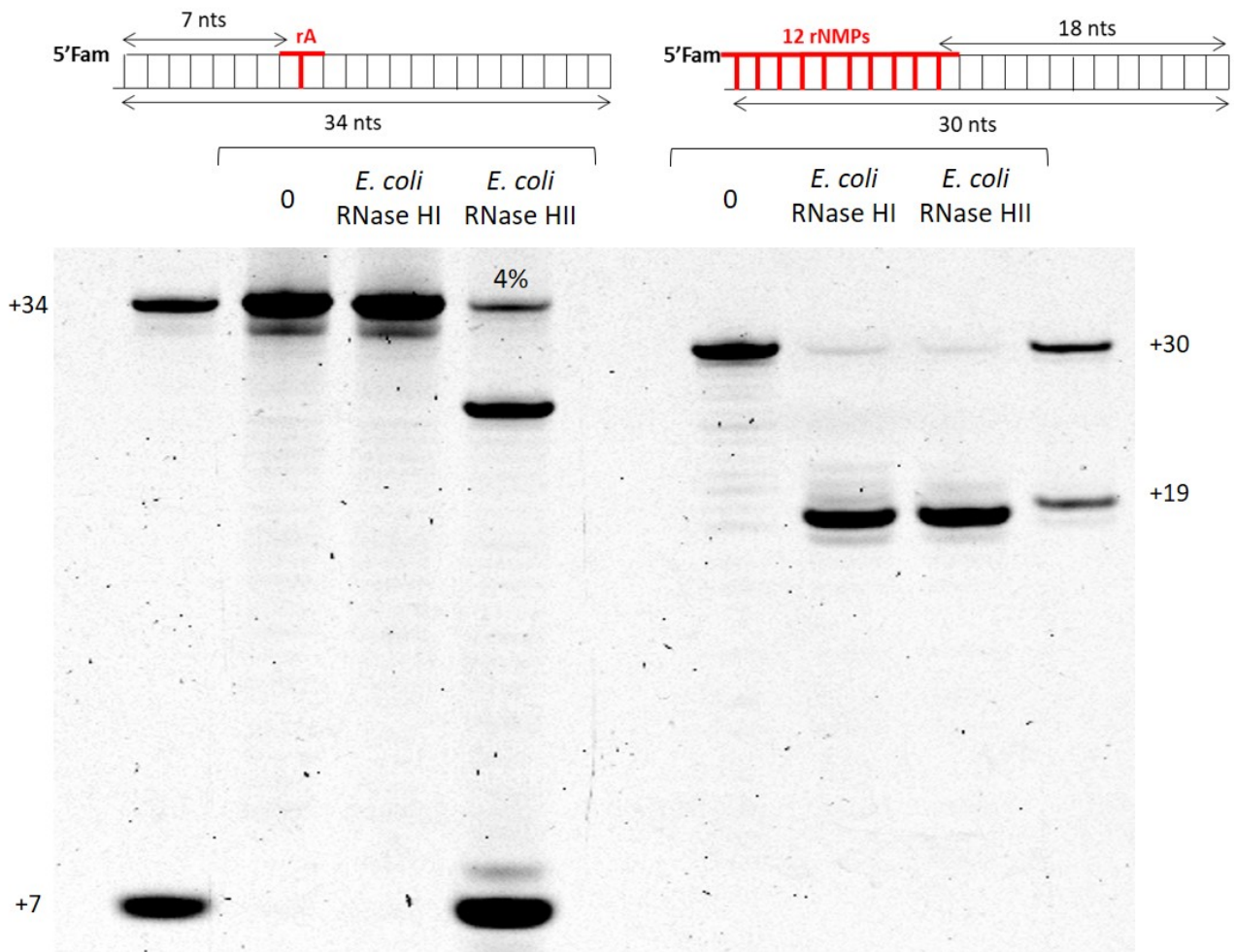


Figure S2: Cleavage specificity of *E. coli* RNase HI and RNase HII depending on the substrate. Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel. Cleavage specificity of *E. coli* RNase HI and RNase HII was assessed on a 1-rAMP or a 12-consecutive rNMPs containing substrates. The lanes 0 correspond to the negative control without enzyme.

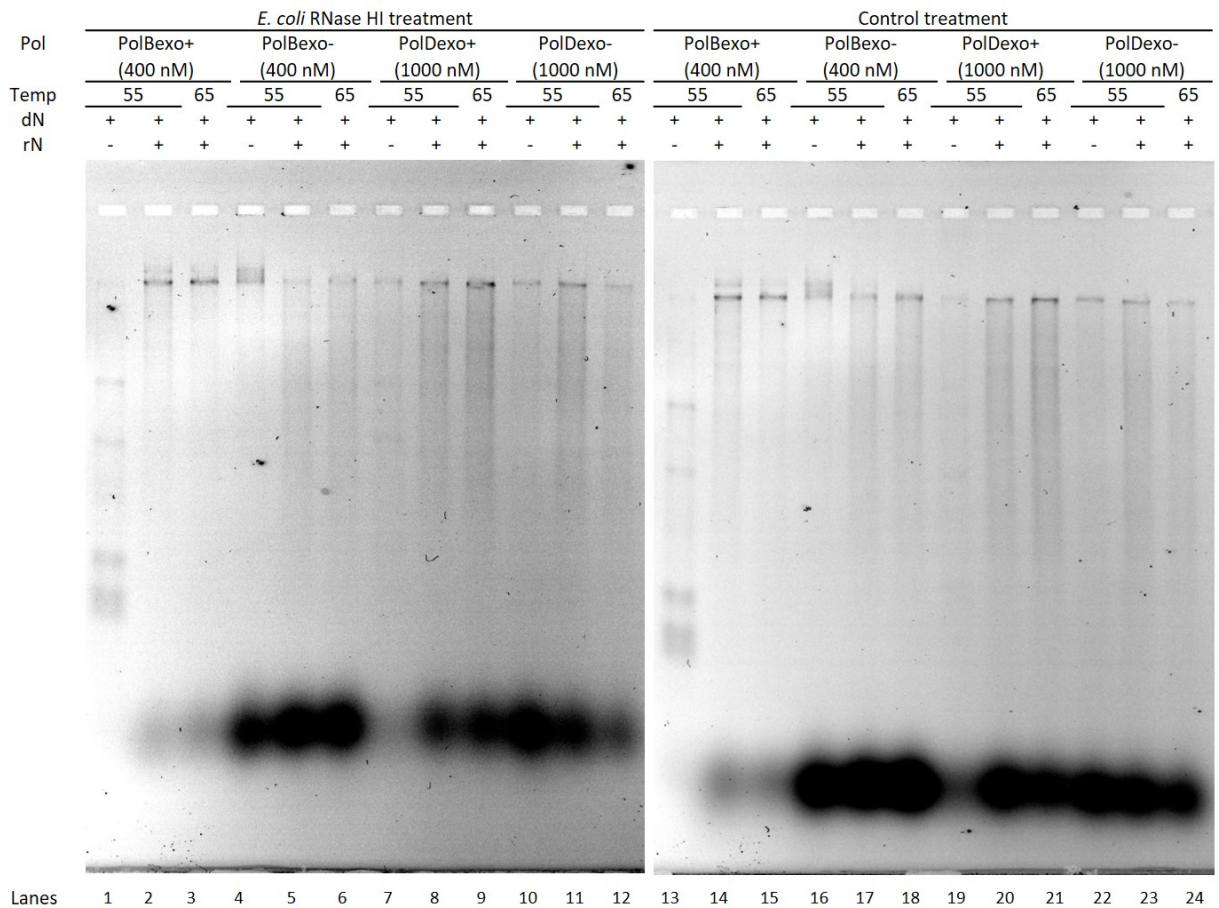


Figure S3: Run of 4 ribonucleotides incorporation by PolB and PolD compared to their exonuclease deficient versions detected by RNase HI treatment.

Electrophoresis profile on a denaturing alkaline agarose gel. Ribonucleotide incorporation is observed by RNase HI treatment of the extension products obtained by PolB, PolBexo- (400 nM), PolD or PolDexo- (1000 nM) at 55°C.

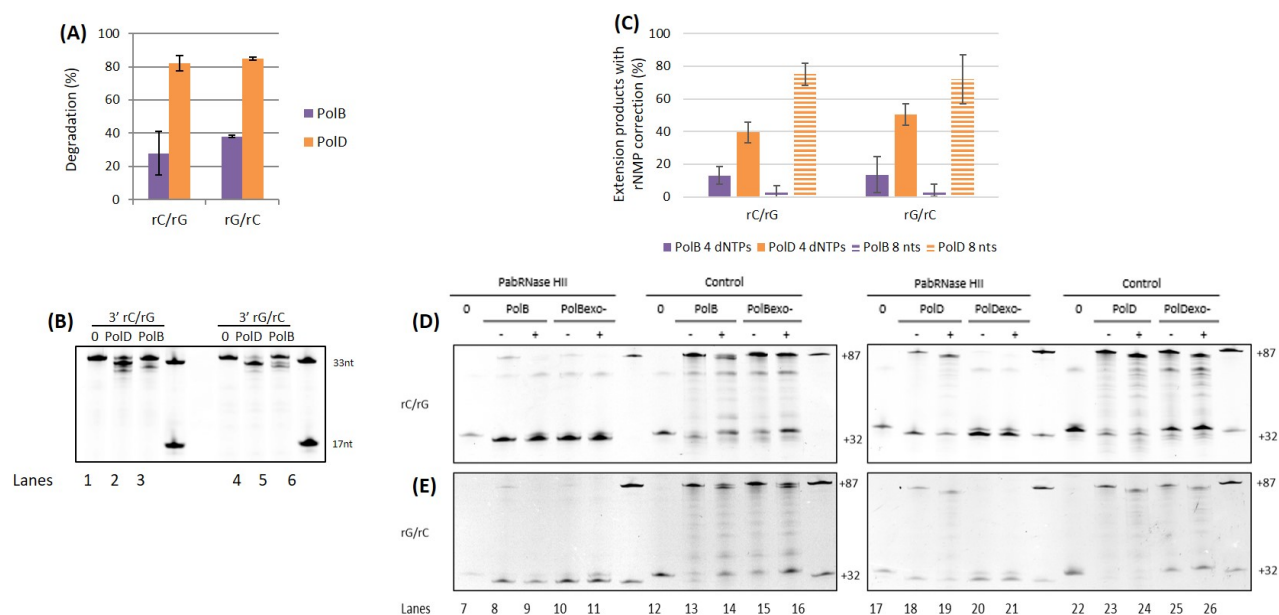


Figure S4: Exonuclease activity of PolB and PolD on a 3' rC/rG or rG/rC containing substrates. (A) Histogram representing the exonuclease activity efficiency of PolB and PolD estimated by the quantifications from the gel (B) of three independent experiments. (B) Electrophoresis profiles on a denaturing polyacrylamide gel of 3' rCMP or rGMP opposite a template rGMP or rCMP substrate respectively after incubation with PolB and PolD. (C) Histogram representing the percentage of extended products after 3'rNMP correction obtained with PolB, PolD and their exonuclease deficient versions estimated by the quantifications from the gels (D and E) of three independent experiments. Electrophoresis profiles on a denaturing polyacrylamide gel of 3'rCMP opposite a template rGMP (D) or 3'rGMP opposite a template rCMP (E) containing substrates obtained by incubation with PolB and PolD after control or RNase HII treatment.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

1 Matériel et méthodes supplémentaires

1.1 Enzymes utilisées

En plus des versions sauvage et exonucléase déficiente des ADN polymérases B et D de *Pyrococcus abyssi* (voir Matériel et Méthodes de l'article en préparation), PolBexo- comportant la mutation Y410G correspondant à une mutation du "steric gate" de l'ADN polymérase B (PolBY410G) a également été utilisée. La mutation correspondante chez *Thermococcus gorgonarius* Y409G (Cozens et al. 2012) a permis d'identifier la tyrosine 410 comme "steric gate" de PolBexo-. La production et la purification de PolBY410G ont été réalisées selon Gouge et al. 2012.

1.2 Hybridation des amorces et des matrices

Les différents oligonucléotides utilisés sont représentés dans le Tableau 6. Ils sont fabriqués par Eurogentec, produits par synthèse chimique et purifiés soit par HPLC (oligonucléotides courts ≤ 34 bases et possédant ou non un marquage) ou par PAGE (oligonucléotides longs > 34 bases). Les doubles brins sont réalisés par hybridation d'une amorce et d'une matrice à une concentration finale de 500 nM dans un tampon (10 mM Tris-HCl pH 8 ; 50 mM NaCl). L'hybridation de l'amorce sur la matrice est réalisée par une incubation de 5 min à 95°C suivie d'un gradient de températures décroissant sur la nuit. Les hybrides circulaires utilisant l'amorce ssM13mp18 (NEB) sont réalisés comme dans la section Matériel et méthodes de l'article en préparation.

1.3 Réaction d'incorporation de ribonucléotides

21 nM d'amorce hybridée sur une matrice M13 sont incubés avec 400 nM de PolB et 30 nM de PCNA dans un tampon de réaction contenant 2 mM de MgCl₂ (5 mM de Tris-HCl pH 8,8 ; 0,1 mM de DTT ; 1 mM de KCl et 2 mM de MgCl₂) ou 5 mM de MgCl₂ (50 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM DTT ; 50 mM NaCl ; 5 mM MgCl₂) à 55°C. Le temps d'incubation est précisé dans les légendes des figures. Les 4 dNTPs, 4 rNTPs ou 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) (Jena Bioscience) sont ajoutés à la réaction aux concentrations intracellulaires déterminées précédemment (Lemor et al. 2018). La réaction est stoppée sur glace par ajout d'une concentration finale de 10 mM d'EDTA pH 8.

Les produits étendus sont ensuite incubés 2 heures à 55°C dans 250 mM de NaCl ou NaOH. La réaction est ensuite arrêtée sur glace par ajout de tampon Stop à une concentration finale (49 % formamide, 5 mM EDTA pH 8). Une dénaturation 5 minutes à 95°C des produits de réaction est enfin réalisée.

Le traitement RNase H, ainsi que la visualisation et quantification des produits de réaction sont réalisés comme dans la section Matériel et méthodes de l'article en préparation.

Type de substrat	Séquence 5' → 3'	Longueur	Marquage en 5'	Hybride
L32	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA	32	Cy5	L87_dC / M13
L26	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCG	26	Cy5	L34
L33_rg	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA ^g	33	Cy5	L87_dC
L33_dG	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG	33	Cy5	L87_dC
L33_rc	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA ^c	33	Cy5	L87_dG
L33_dC	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAC	33	Cy5	L87_dG
L33_ra	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA ^a	33	Cy5	L87_dT / L87_dC
L33_dA	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAA	33	Cy5	L87_dT / L87_dC
L33_ru	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA ^u	33	Cy5	L87_dA / L87_dC
L33_dT	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAT	33	Cy5	L87_dA / L87_dC
L32_arn	ugccaagcuugcaugccugcaggucgacucua	32	Cy5	L87_dC
L32_arn	ugccaagcuugcaugccugcaggucgacucua	32	Fam	L87_dC
L34	GGATCCTTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA	34		
L87_dC	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA	87		
L87_dT	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTITAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA			
L87_dA	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTATAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA			
L87_dG	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTGTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCA			

TABLEAU 6: Oligonucléotides utilisés pour former les différents hybrides pour les réactions d'incorporation et de dégradation.

Les désoxyribonucléotides sont écrits en lettres majuscules et les ribonucléotides en lettres minuscules. Les bases variables sont écrites en couleur.

2 Efficacité de l'activité exonucléase de PolB pour corriger les ribonucléotides et influence du site d'exclusion stérique

2.1 Influence de la concentration en magnésium sur l'efficacité de PolB

L'efficacité de l'activité exonucléase de PolB sur l'élimination des ribonucléotides ainsi que l'influence de son site d'exclusion stérique ont été étudiés. Pour cela, trois versions de PolB ont été utilisées, PolB, sa version exonucléase déficiente PolBexo-, et sa version exonucléase déficiente comportant la mutation de son site d'exclusion stérique PolBY410G. La réaction d'extension de l'hybride L32/M13 (Figure 20A) par PolB a d'abord été réalisée dans un tampon de réaction contenant 2 mM de magnésium correspondant à la concentration optimale pour PolB (Gueguen et al. 2001). En présence de dNTPs uniquement, l'amorce est complètement étendue par PolB, PolBexo- et PolBY410G (Figure 20B pistes 1, 3 et 5). En revanche, en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) l'activité de polymérase de PolB, PolBexo- et PolBY410G semble réduite (Figure 20B pistes 2, 4 et 6). Une hypothèse de la diminution de l'activité de polymérisation de PolB en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) est que les rNTPs, présents en forte concentration par rapport aux dNTPs, pourraient piéger les cations divalents (Son et al. 1975; Forslund et al. 2018). Afin de voir si la réduction de l'activité de PolB observée en présence de rNTPs est due à la concentration en magnésium trop faible un tampon de réaction contenant 5 mM de magnésium a été utilisé (Figure 20C). Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration en magnésium permet de lever l'inhibition de l'activité de polymérisation de PolB et PolBexo- observée en présence de rNTPs (Figure 20C pistes 14 et 16). En revanche, l'activité de polymérisation de PolBY410G est toujours inhibée (Figure 20C piste 18). Une augmentation de la concentration de PolBY410G et/ou de la concentration en magnésium ne permettent pas de lever l'inhibition de l'activité polymérase de PolBY410G (résultats non montrés). Un tampon de réaction contenant 5 mM de magnésium a donc été utilisé pour la suite des réactions d'extension.

2.2 Influence du temps de réaction

En présence des 4 dNTPs, l'amorce ADN est entièrement étendue par PolB, PolBexo- et PolBY410G (Figure 20C pistes 13, 15 et 17). Après traitement alcalin, les produits étendus en présence des 4 dNTPs uniquement par PolB et PolBexo- ne sont pas dégradés (Figure 20C pistes 19 et 21). En présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) les produits étendus par PolB ne sont pas dégradés par le traitement alcalin (Figure 20C piste 20). En revanche, une dégradation des produits étendus par PolBexo- est observée après traitement alcalin indiquant une incorporation de rNMPs dans l'ADN par PolBexo- (Figure 20C piste 22). La réaction d'extension de l'hybride L32/M13 a ensuite été réalisée avec un temps d'incubation plus court (Figure 20D). En absence de ribonucléotides après une heure d'incubation, une extension maximale de l'amorce par PolB, PolBexo- et PolBY410G est observée (Figure 20D pistes 25, 27 et 29). Cependant la quantité de produits entièrement étendus est plus faible après une heure d'incubation (Figure 20D pistes 25, 27 et 29) qu'après trois heures d'incubation (Figure 20C pistes 13, 15 et 17). En présence de ribonucléotides, la taille maximale des produits d'extension obtenus par PolB est d'environ 3,5 kb après une heure d'incubation (Figure 20D piste 26) alors que des produits entièrement étendus sont obtenus après 3 heures d'incubation (Figure 20C piste 14). En revanche, PolBexo- étend entièrement l'amorce en présence de rNTPs après une heure ou trois heures d'incubation (Figure 20D piste 28 et 20C piste 16). Après une heure d'incubation, les produits éten-

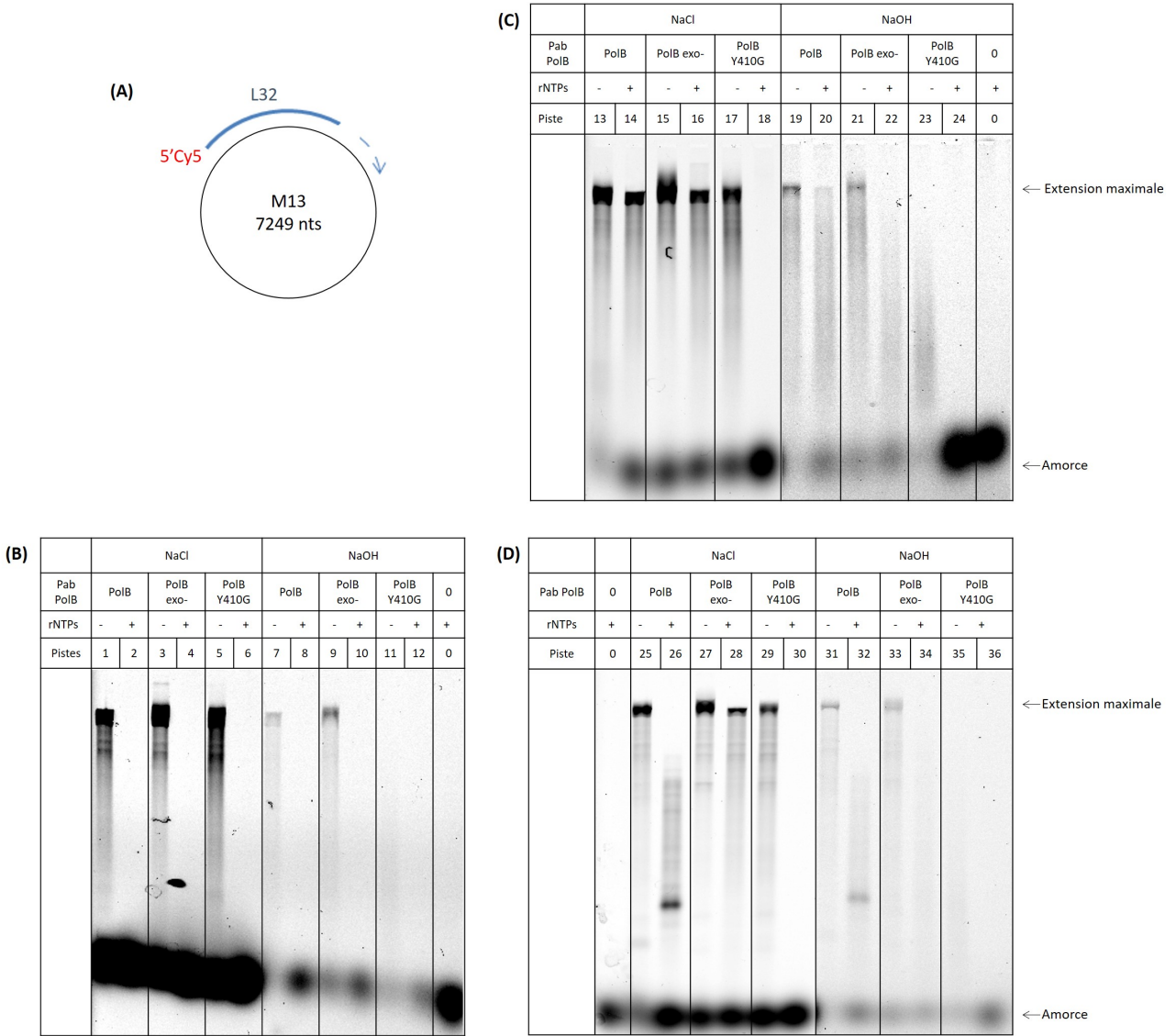


FIGURE 20: Influence de la concentration en magnésium, du temps d'incubation et de l'activité exonucléase sur l'incorporation de ribonucléotides par PolB. Profil d'électrophorèse en gel dénaturant d'agarose alcalin. La réaction d'extension de l'hybride L32/M13 (A) a été réalisée à 55°C pendant 3 heures en présence de 2 mM de magnésium (B) ou 5 mM de magnésium (C) ou pendant 1 heure en présence de 5 mM de magnésium (D). Le traitement des produits d'extension au NaCl ou au NaOH est réalisé à 55°C pendant 2 heures. Les enzymes ont été utilisées à une concentration de 400 nM. Les pistes 0 correspondent aux contrôles négatifs sans enzyme.

pus par PolB sont plus courts en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) (Figure 20D piste 26) par rapport aux 4 dNTPs uniquement (Figure 20D piste 25) alors qu'une extension maximale de l'amorce par PolBexo- est obtenue en présence ou non de ribonucléotides (Figure 20D pistes 27 et 28). Comme précédemment en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs), le traitement alcalin dégrade les produits d'extension de PolBexo- (Figure 20D piste 34) mais ceux de PolB ne semblent pas dégradés (Figure 20 piste 32).

2.3 Incorporation de ribonucléotides par PolBY410G

Lorsque l'extension de l'amorce est réalisée par PolBY410G en présence des 4 dNTPs, les produits étendus sont dégradés par le traitement alcalin (Figure 20C piste 23). Ces produits étendus en l'absence de rNTPs dans le milieu ne devraient pas être dégradés par le traitement alcalin. Afin de vérifier que la dégradation observée n'était pas due à la présence de NaOH dans le gel dénaturant, la migration des produits d'extension a été effectuée sur un gel d'agarose neutre sans NaOH. Après migration sur gel neutre une dégradation des produits d'extension de PolBY410G en présence de dNTPs uniquement est également observée (résultats non montrés).

En présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) l'amorce ne semble pas étendue par PolBY410G (Figure 20C piste 18). Par la suite, la capacité d'extension d'une amorce par PolBY410G en présence des 8 nucléotides a donc été vérifiée. Pour cela, l'incorporation de nucléotides par PolB, PolBexo- et PolBY410G a été mesurée sur des matrices ADN plus courtes en présence des 4 dNTPs ou des 4 rNTPs ou des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) (Figure 21). L'incorporation de ribonucléotides a d'abord été observée dans des réactions d'extension d'amorce de l'hybride L26/L34 composé d'une amorce de 26 nucléotides hybridée sur une matrice de 34 nucléotides (Figure 21A). En présence des 4 dNTPs, PolB, PolBexo- et PolBY410G étendent l'amorce et génèrent des produits d'extension d'une longueur de 34 nucléotides (Figure 21B pistes 1, 5 et 9). Ces produits étendus ne sont pas dégradés par le traitement alcalin (Figure 21C pistes 13, 17 et 21). Une dégradation de l'hybride L26/L34 par l'activité exonucléase de PolB est observée en présence des 4 dNTPs, des 4 rNTPs et des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) (Figure 21B pistes 1, 2 et 3). En présence des 4 rNTPs uniquement PolB n'étend pas l'amorce (Figure 21B piste 2) contrairement à PolBexo- et PolBY410G qui étendent l'amorce avec une extension limitée à 4 pb et 5 pb respectivement (Figure 21B pistes 6 et 10). Ces produits d'extension sont dégradés par le traitement alcalin (Figure 21C pistes 18 et 22). En présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs), l'extension de l'amorce par PolB et PolBexo- est limitée à 7 pb (Figure 21B pistes 3 et 7) et à 5 pb pour PolBY410G (Figure 21B piste 11). La quantité de produits étendus de 7 nucléotides obtenue par PolB est moins importante que celle obtenue par PolBexo- (Figure 21B pistes 3 et 7). Après traitement alcalin, les produits d'extension par PolB et PolBexo- ne semblent pas dégradés (Figure 21C pistes 15 et 19). En revanche, les produits d'extension de PolBY410G sont entièrement dégradés (Figure 21C piste 23).

Afin de confirmer l'extension maximale de l'amorce à 5 nucléotides par PolBY410G la réaction d'extension a ensuite été réalisée avec l'hybride L32/L87 (Figure 21D). Cet hybride est composé d'une amorce de 32 nucléotides hybridée à une matrice de 87 nucléotides permettant l'obtention de produits d'extension plus longs comparativement à l'hybride L26/L34. En présence des 4 dNTPs, une extension maximale de l'amorce est obtenue par PolB, PolBexo- et PolBY410G (Figure 21E pistes 25, 29 et 33) et ces produits d'extension ne sont pas dégradés par le traitement alcalin (Figure 21F pistes 37, 41 et 45). L'hybride L32/L87 ne semble pas dégradé par l'activité exonucléase de PolB en présence de

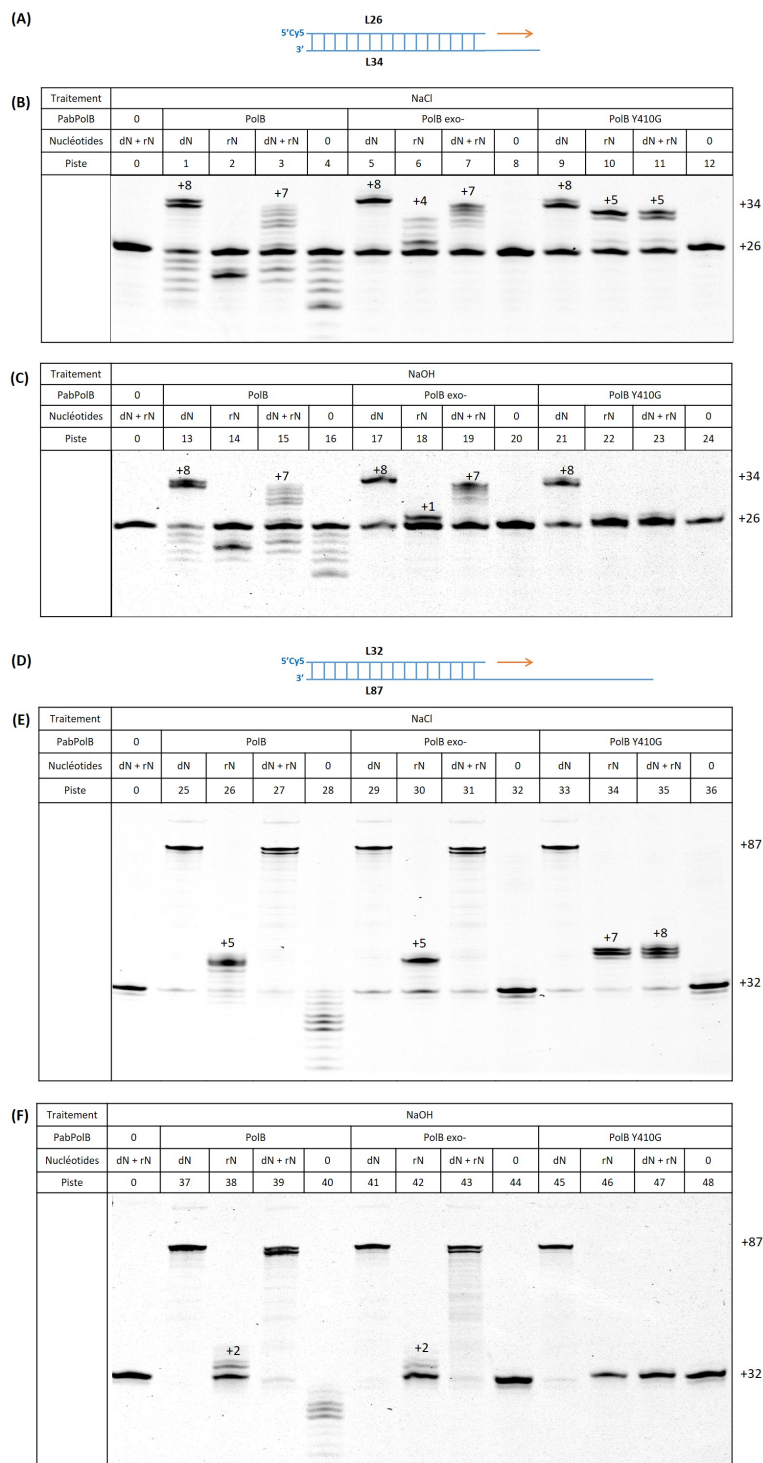


FIGURE 21: Influence de l'activité exonucléase sur l'incorporation de ribonucléotides par PolB dans de courts ADN linéaires.

Profils d'électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide. La réaction a été réalisée à 55°C pendant 30 minutes. Le traitement des produits d'extension au NaCl ou au NaOH est réalisé à 55°C pendant 2 heures. Les enzymes ont été utilisées à une concentration de 3 nM. Les pistes 0 correspondent aux contrôles négatifs sans enzyme. Les pistes dN correspondent à la condition avec 4 dNTPs, les pistes rN correspondent à la condition avec les 4 rNTPs, les pistes dN + rN correspondent à la condition avec les 4 dNTPs et les 4 rNTPs. (A) Schéma de l'hybride L26/L34. (B) Profil d'extension de l'hybride L26/L34 après traitement au NaCl. (C) Profil d'extension de l'hybride L26/L34 après traitement au NaOH. (D) Schéma de l'hybride L32/L87. (E) Profil d'extension de l'hybride L32/L87 après traitement au NaCl. (F) Profil d'extension de l'hybride L32/L87 après traitement au NaOH.

nucléotides (Figure 21E pistes 25, 26 et 27) contrairement à l'hybride L26/L34 (Figure 21B pistes 1, 2 et 3). En présence des 4 rNTPs, une extension de l'amorce L32 de 5 nucléotides est obtenue par PolB et PolBexo- (Figure 21E pistes 26 et 30) alors que l'amorce L26 n'est pas étendue par PolB (Figure 21B piste 2). Une extension plus longue de l'amorce L32 (7 nucléotides) est obtenue par PolBY410G (Figure 21E piste 34) par rapport à l'amorce L26 (5 nucléotides) en présence des 4 rNTPs (Figure 21B piste 10). En présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) des produits d'extension de 87 nucléotides (correspondant à l'extension maximale) et de 86 nucléotides sont obtenus par PolB et PolBexo- (Figure 21E pistes 27 et 31). Ces produits d'extension ne sont pas dégradés par le traitement alcalin (Figure 21F pistes 39 et 43) ce qui confirme que PolB et PolBexo- ne semblent pas incorporer de rNMPs dans des courtes matrices ADN. En présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) l'extension par PolBY410G est limitée à 8 nucléotides (Figure 21E piste 35). Ces produits d'extension sont entièrement dégradés par le traitement alcalin (Figure 21F piste 47).

En présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs), PolBY410G semble incorporer uniquement des rNMPs dans l'ADN. Afin de vérifier cette hypothèse, les produits d'extension de PolBY410G en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) ont été soumis à un traitement enzymatique (Figure 22). Le traitement par RNase HI d'*E. coli* permet d'identifier la présence d'au moins quatre rNMPs insérés à la suite alors que la RNase HII d'*E. coli* reconnaît et clive en 5' d'un seul rNMP (Figure 22A) (Cerritelli et al. 2009; Hyjek et al. 2019). PabRNase HII effectue également le clivage d'un seul rNMP mais ne semble pas cliver ou clive moins efficacement les rNMPs mésappariés à la différence d'*E. coli* RNase HII (Malfatti et al. 2019 et voir l'article en préparation du Chapitre III). Ce traitement enzymatique des produits d'extension de PolBY410G permettra donc de vérifier que PolBY410G incorpore uniquement des rNMPs. Les produits d'extension obtenus en présence des 4 dNTPs uniquement ne sont pas dégradés par les RNases H (Figure 22B pistes 1, 5 et 9) par rapport au traitement contrôle sans enzyme (Figure 22C pistes 13, 17 et 21). Les produits d'extension en présence des 4 rNTPs ou des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) sont dégradés par la RNase HI d'*E. coli* (Figure 22B pistes 2 et 3) par rapport au contrôle (Figure 22C pistes 14 et 15). Après dégradation il reste des produits de 2 et 3 nucléotides comme attendu (Figure 22A) qui ne peuvent donc plus être reconnus par RNase HI. En revanche, la RNase HII d'*E. coli* ne dégrade pas les produits d'extension obtenus en présence des 4 rNTPs (Figure 22B piste 6) et dégrade très peu ceux obtenus en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) (Figure 22B piste 7) par rapport au traitement contrôle (Figure 22C pistes 18 et 19). Afin de confirmer cette observation, l'activité de la RNase HII d'*E. coli* a été vérifiée et les mêmes résultats ont été obtenus. PabRNase HII au contraire clive entièrement les produits d'extension obtenus en présence des 4 rNTPs et des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) en laissant un rNMP dans la matrice (Figure 22B pistes 10 et 11).

2.4 Discussion et Perspectives

Comme observé dans l'article en préparation avec le traitement RNase HII (Figure 18), nous avons observé que les produits d'extension de PolBexo- sont plus sensibles au traitement alcalin que ceux de PolB (Figure 20C pistes 20 et 22). La fonction exonucléase de PolB est efficace comme activité de relecture pour éliminer les ribonucléotides lors de la synthèse d'ADN comme observé précédemment après traitement enzymatique par la RNase HII d'*E. coli* (Figure 18), et après traitement alcalin (Figure 20). En présence de rNTPs, PolB est moins efficace pour synthétiser des produits de taille maximale (Figure 20D piste 26) que PolBexo- (Figure 20D piste 28). De plus, des produits d'extension maximale sont obtenus en présence ou non de ribonucléotides par PolBexo- (Figure 20D pistes 27 et

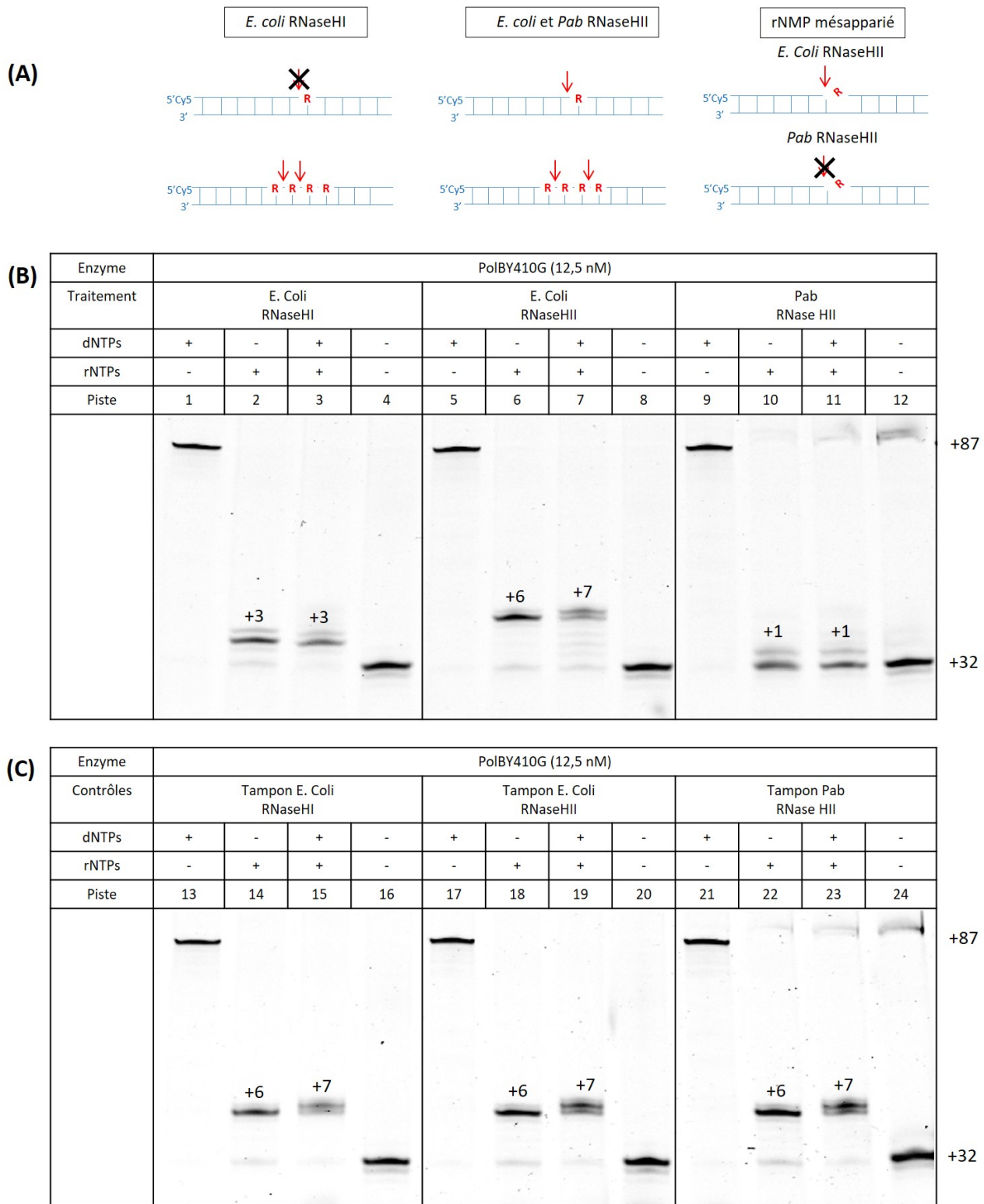


FIGURE 22: Détection de l'incorporation de ribonucléotides par PolBY410G dans une courte amorce ADN linéaire par traitement enzymatique.

Profils d'électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide. La réaction d'extension a été réalisée à 55°C pendant 30 minutes. PolBY410G a été utilisée à une concentration de 12,5 nM. Le traitement des produits d'extension est réalisé pendant 1 heure à 37°C ou 55°C pour les RNases d'*E. coli* ou de *Pyrococcus abyssi* respectivement. (A) Produits générés après coupure endonucléase par RNase HI et RNase HIII. (B) Profil d'extension de l'hybride L32/L87 par PolBY410G après traitement enzymatique par RNase HI ou RNase HIII d'*E. coli* ou PabRNase HIII. (C) Profil d'extension de l'hybride L32/L87 par PolBY410G après traitement contrôle par les tampons de réaction des RNases.

28) alors qu'après extension par PolB les produits obtenus sont de taille maximale de 7,25 kb ou d'environ 3,5 kb en absence ou en présence de ribonucléotides respectivement (Figure 20D pistes 25 et 26). Ces résultats montrent que la présence de ribonucléotides influence l'équilibre entre la fonction exonucléase et la fonction polymérase de PolB. Le ralentissement de la synthèse par PolB en présence de rNTPs observé entre une ou trois heures d'incubation (Figure 20C piste 14 et 20D piste 26) est concordant avec le va et vient entre les fonctions exonucléase et polymérase. Par la suite, il serait également intéressant d'étudier l'influence d'une amorce composée de rNMPs uniquement ou composée de rNMPs et dNMPs mimant un fragment d'Okazaki, sur le taux d'incorporation des ribonucléotides dans la matrice M13 par les ADN polymérases pourvues ou non de leur fonction exonucléase. En effet, il a été montré que plus le nombre de rNMPs incorporés consécutivement dans une matrice ADN augmente, plus la synthèse de l'ADN par les ADN polymérases est inhibée (Zou et al. 2018; Clausen et al. 2013). L'insertion de 3 rNMPs consécutifs dans l'ADN provoque un changement de conformation de l'ADN de la forme B à la forme A (Egli et al. 1993). Ce changement de conformation induit une diminution de l'affinité des ADN polymérases pour la matrice ADN provoquant une inhibition de la synthèse ADN (Zou et al. 2018).

Les réactions d'extension d'amorces hybridées à des matrices oligonucléotidiques ne permettent pas d'observer une incorporation de rNMPs par PolBexo- (Figure 21 pistes 19 et 43) contrairement à une amorce hybridée sur une matrice ADN M13 (Figure 20C piste 22). Les produits d'extension obtenus à partir de matrices oligonucléotidiques sont trop courts par rapport à la faible fréquence d'incorporation de rNMPs de PolB. Pour étudier l'influence de la fonction exonucléase sur le taux d'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN de PolB l'extension d'une amorce hybridée à une matrice ADN M13 est donc plus adaptée. Nous avons observé qu'en présence de rNTPs, PolBY410G ne semblait pas étendre l'hybride L32/M13 (Figure 20C piste 18). De plus, les produits d'extension obtenus par PolBY410G en présence des 4 dNTPs uniquement et de l'hybride L32/M13 sont dégradés de façon anormale par le traitement alcalin (Figure 20C piste 23, 20B piste 11 et 20D piste 35). Une des hypothèses pour expliquer la dégradation des produits d'extension de PolBY410G à partir d'une matrice M13 en présence de dNTPs uniquement serait l'incorporation de nucléotides mésappariés. Ces mésappariements, s'ils sont trop fréquents, pourraient entraîner une modification de la conformation de l'ADN le rendant potentiellement sensible au traitement alcalin. Pour confirmer cette hypothèse il serait intéressant de traiter les produits d'extension de PolBY410G par les résolvases T7 endonucléase I ou T4 endonucléase VII qui reconnaissent et clivent les dNMPs mésappariés (Babon et al. 2003; Fuhrmann et al. 2005). En présence d'une amorce hybridée sur une matrice oligonucléotidique plus courte une extension limitée entre 5 et 8 pb en présence de rNTPs est visible (Figure 21B pistes 10 et 11 et 21E pistes 34 et 35). De plus, en présence des 4 dNTPs uniquement, contrairement aux produits obtenus après extension de l'hybride L32/M13 par PolBY410G (Figure 20C piste 23 et 20D piste 35) les produits d'extension plus courts obtenus à partir de matrices oligonucléotidiques ne sont pas dégradés par le traitement alcalin (Figure 21C piste 21 et 21F piste 45). Contrairement à PolB et PolBexo- une amorce hybridée sur une courte matrice oligonucléotidique linéaire semble plus adaptée qu'une amorce hybridée sur une longue matrice ADN circulaire pour l'étude de l'activité de PolBY410G.

En présence des 4 rNTPs uniquement, PolB n'étend pas l'amorce L26 (Figure 21B piste 2) mais étend l'amorce L32 de 5 nucléotides (Figure 21E piste 26). Cette différence de capacité d'extension d'une amorce par PolB en présence de ribonucléotides uniquement est sûrement influencée par l'hy-

bride. En effet, il a été observé qu'en présence de nucléotides l'activité exonucléase de PolB est stimulée par l'hybride L26/L34 (Figure 21B pistes 1, 2 et 3) et non par l'hybride L32/L87 (Figure 21E pistes 25, 26 et 27). Les profils d'extension de PolB et PolBexo- de l'hybride L32/L87 sont similaires (Figure 21E pistes 25 à 27 et 29 à 31) alors qu'ils sont différents pour l'hybride L26/L34 (Figure 21B pistes 1 à 3 et 5 à 7). L'activité exonucléase de PolB stimulée par l'hybride L26/L34 semble expliquer ces différences ou similarités de profils d'extension. De même, la fonction polymérase de PolBexo- semble plus efficace en présence de l'hybride L32/L87 (Figure 21E piste 30) qu'en présence de l'hybride L26/L34 (Figure 21B piste 6). Lors d'une étude précédente en présence des 4 rNTPs, une extension d'environ 5 nucléotides d'une amorce de 17 nucléotides hybridée sur une matrice de 87 nucléotides et une très faible extension de 5 nucléotides de l'hybride L26/L34 étaient obtenues par PolB (Lemor et al. 2018). Ces résultats semblent confirmer que les fonctions exonucléase et polymérase sont influencées par le type d'amorce et de la matrice (longueur de la partie simple brin, composition en bases de la matrice, nombre de paires de bases appariées). Cependant, le blocage de la polymérisation par PolB et PolBexo- à 5 nucléotides est observé sur différentes matrices en présence de rNTPs uniquement (Figure 21E pistes 26 et 30) (Lemor et al. 2018). Ce blocage à 5 nucléotides pourrait être dû au fait que dans les différentes matrices utilisées, la base à insérer en position +6 est un rUMP qui a été précédemment identifié comme le ribonucléotide le moins bien incorporé par PolB (Lemor et al. 2018). Une autre hypothèse est que l'incorporation de 5 rNMPs entraîne un changement de conformation de l'ADN de la forme B vers la forme A provoquant un manque de stabilité de la liaison de l'ADN polymérase sur l'hybride ADN.

Comme observé pour PolB et PolBexo-, l'activité de polymérisation de PolBY410G est plus importante en présence de l'hybride L32/L87 pour lequel une extension de 7 ou 8 nucléotides est obtenue en présence des 4 rNTPs ou des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) respectivement (Figure 21E pistes 34 et 35), alors qu'une extension de 5 nucléotides est observée en présence de l'hybride L26/L34 (Figure 21B pistes 10 et 11). Une extension maximale de 5 ou 8 nucléotides en fonction de l'hybride utilisé est donc obtenue par PolBY410G en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs). Il a été montré que PolBY409G de *Thermococcus gorgonarius* étendait une amorce ADN ou ARN hybridée à une matrice ADN de 6 ou 7 pb maximum. L'addition d'une mutation supplémentaire modifiant le potentiel électrostatique et ainsi augmentant l'affinité de l'ADN polymérase B pour l'ADN permet à l'ADN polymérase B de *Thermococcus gorgonarius* d'étendre entièrement une amorce ADN ou ARN lors de la polymérisation de ribonucléotides (Cozens et al. 2012). Le blocage de PolBY410G à 5 ou 8 pb en fonction de la matrice pourrait être dû à la structure et aux charges électrostatiques de PolBY410G.

Après traitement alcalin les produits étendus par PolBY410G en présence des 8 nucléotides (4 dNTPs + 4 rNTPs) aux concentrations physiologiques sont entièrement dégradés (Figure 21 piste 11 comparé à la piste 23 et piste 35 comparé à la piste 47). Il semblerait donc que PolBY410G incorpore uniquement des rNMPs dans une matrice ADN. Le traitement enzymatique par RNase HI d'*E. coli* semble confirmer cette hypothèse puisque le clivage des produits d'extension observé montre la présence d'au moins 4 rNMPs à la suite dans l'amorce étendue par PolBY410G (Figure 22B pistes 2 et 3). De plus, les produits d'extension de PolBY410G sont également entièrement clivés par PabRNase HII (Figure 22 pistes 10 et 11) en revanche, ils ne sont pas dégradés par la RNase HII d'*E. coli* (Figure 22B pistes 6 et 7) contrairement à ce qui était attendu. Des différences d'activité et de reconnaissance des rNMPs incorporés dans l'ADN par les RNases HII d'*E. coli* et de *Pyrococcus abyssi* ont déjà été dé-

montrées. En effet, la RNase HIII d'*E. coli* est capable de reconnaître et de cliver des rNMPs modifiés ou mésappariés plus efficacement que PabRNase HIII (Malfatti et al. 2019). Cependant, les résultats présentés ici indiquent un clivage des produits d'extension de PolBY410G par PabRNase HIII et non par RNase HIII d'*E. coli* (Figure 22B pistes 6, 7, 10 et 11). Le clivage par PabRNase HIII suggère que les produits générés par PolBY410G ne seraient pas oxydés ni pourvus de sites abasiques (Malfatti et al. 2019). Ces rNMPs incorporés par PolBY410G devraient être reconnus et clivés également par la RNase HIII d'*E. coli*. Après vérification de l'activité de la RNase HIII d'*E. coli*, l'absence de clivage des produits d'extension de PolBY410G a de nouveau été observée. Afin de confirmer l'absence de clivage des produits étendus de PolBY410G par la RNase HIII d'*E. coli*, il serait intéressant de refaire ces expériences mais en utilisant des matrices ADN différentes. Une analyse des produits d'extension de PolBY410G par spectrométrie de masse pourrait être intéressante afin de voir si les rNMPs incorporés par PolBY410G sont modifiés.

3 Obtention de produits d'extension pour l'optimisation du séquençage Nanopore

Afin de poursuivre l'étude de l'importance de la fonction exonucléase pour la relecture et la correction de rNMPs dans l'ADN, il serait intéressant de développer le séquençage Nanopore (Jain et al. 2015) qui permettrait d'avoir des informations sur la position et la nature des ribonucléotides insérés par les ADN polymérase dans l'ADN. L'optimisation du séquençage Nanopore de matrices contenant des rNMPs a été commencée en collaboration avec Thomas Williams de l'Université d'Edinburgh (Institute of Genetics and Molecular Medicine).

Le taux d'incorporation de rNMPs par les 3 versions de PolB a été observé en présence d'une grande matrice ADN circulaire (M13). La réaction d'extension de l'amorce a été réalisée en présence des 4 dNTPs ou de 3 dNTPs (dTTP, dGTP et dCTP) et de rATP en concentration équimolaire avec ou sans ajout de dATP 6 fois moins concentré. L'optimisation de cette réaction est réalisée en présence de 3 dNTPs et d'un rNTP afin d'obtenir des produits d'extension contenant un seul type de ribonucléotide. L'objectif de l'ajout de dATP en faible concentration est d'obtenir des produits d'extension plus longs afin d'optimiser le séquençage Nanopore.

Lorsque les 4 dNTPs sont en concentration équimolaire PolB, PolBexo- et PolBY410G étendent l'amorce hybridée sur la matrice M13 entièrement (Figure 23 pistes 1, 5 et 9). Comme observé précédemment (Figure 20C piste 23), le produit étendu par PolBY410G en présence de dNTPs uniquement est dégradé par le traitement alcalin (Figure 23 piste 22 comparée à la piste 9). En présence de 3 dNTPs l'extension des amorces par PolB, PolBexo- et PolBY410G n'est pas complète (Figure 23 pistes 2, 6 et 10). L'extension la plus longue est d'environ 500 pb et est obtenue par PolBexo- (Figure 23 piste 6) comparativement à celle obtenue avec PolB d'environ 150 pb (Figure 23 piste 2), alors que l'extension la plus courte est obtenue par PolBY410G (Figure 23 piste 10). Ces résultats suggèrent que PolBexo- incorpore plus de dNMPs mésappariés dans l'ADN que PolB. L'activité exonucléase permettant d'améliorer la fidélité des ADN polymérase (McCulloch et al. 2008), ces résultats étaient attendus. L'absence du site d'exclusion stérique et de l'activité exonucléase de PolB semble réduire son activité de polymérisation (Figure 23 piste 10).

Lorsque le rATP est ajouté en concentration équimolaire, les produits d'extension obtenus par PolB et PolBexo- (Figure 23 pistes 3 et 7) sont de tailles similaires à ceux obtenus en présence de 3 dNTPs uniquement (Figure 23 pistes 2 et 6). En revanche, comme attendu, après traitement alcalin, les produits d'extension obtenus par PolB ne contiennent pas de rAMP (Figure 23 piste 16) alors que ceux obtenus par PolBexo- sont dégradés (Figure 23 piste 20). Les produits d'extension obtenus par PolBY410G sont plus longs en présence des 3 dNTPs et de rATP (Figure 23 piste 11) par rapport à la présence des 3 dNTPs uniquement (Figure 23 piste 10). Ce résultat confirme que PolBY410G incorporerait préférentiellement des rNMPs par rapport à des dNTPs mésappariés. La dégradation des produits par le traitement alcalin pourrait indiquer une incorporation de rAMP par PolBY410G (Figure 23 piste 24) comme observé avec de courtes amorces (Figure 21 pistes 23 et 47). Cependant, la dégradation par le traitement alcalin des produits d'extension de PolBY410G en présence des 4 dNTPs uniquement ne permet pas de confirmer l'incorporation de rNMPs uniquement observée précédemment (Figure 21 pistes 23 et 47).

L'ajout de dATP en plus faible concentration permet l'extension complète de la matrice par PolB

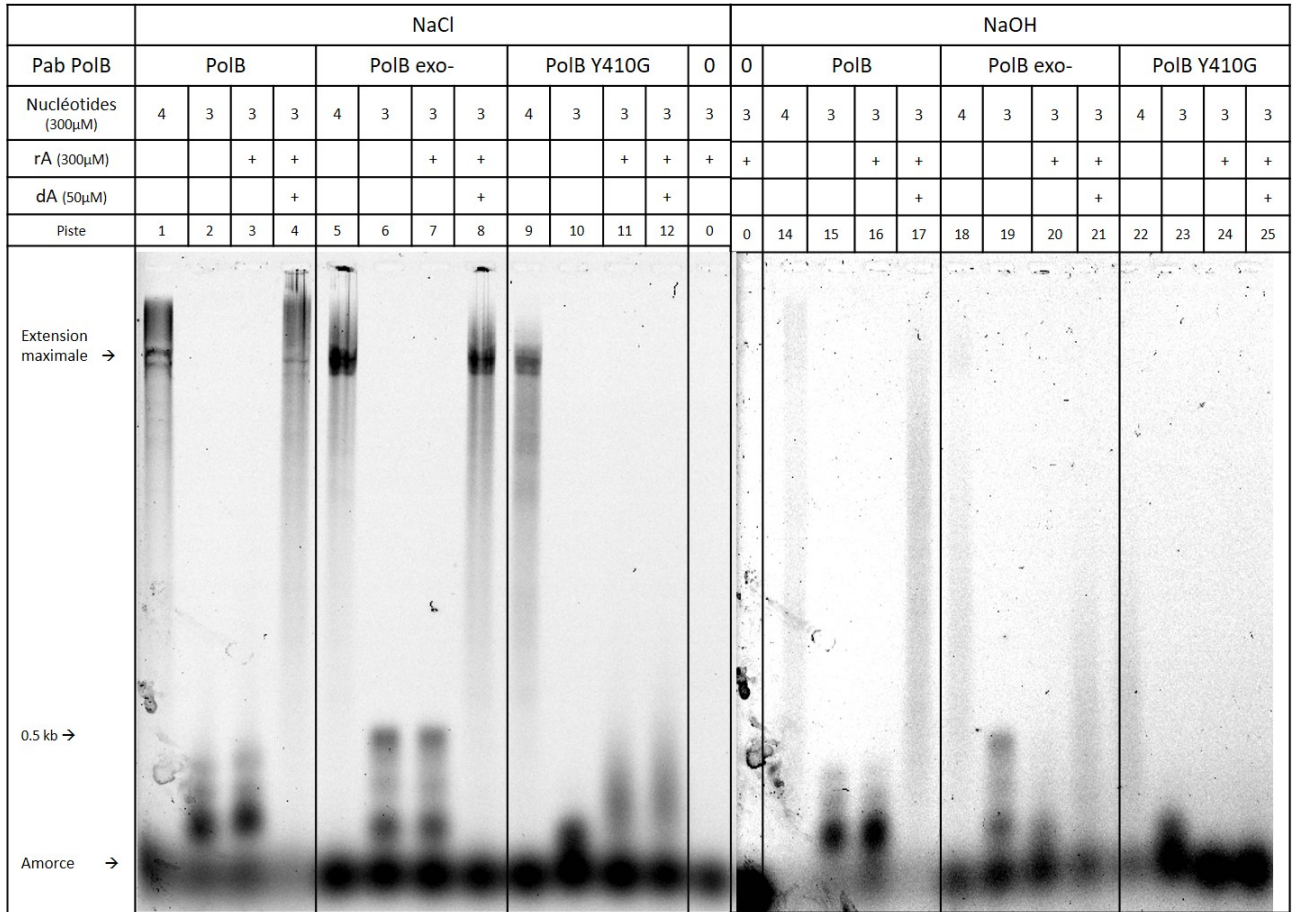


FIGURE 23: Influence de la concentration en nucléotides sur l'incorporation de ribonucléotides par PolB dans une matrice ADN circulaire.

Profil d'électrophorèse en gel dénaturant d'agarose alcalin. La réaction a été réalisée à 55°C pendant 1 heure. Le traitement des produits d'extension au NaCl ou au NaOH est réalisé à 55°C pendant 2 heures. Les enzymes ont été utilisées à une concentration de 400 nM. Les pistes 0 correspondent aux contrôles négatifs sans enzyme. La réaction est réalisée en présence des 4 dNTPs, de 3 dNTPs (dTTP, dCTP et dGTP) ou de 3 dNTPs et de rATP en concentration équimolaire avec ou sans dATP six fois moins concentré.

et PolBexo- (Figure 23 pistes 4 et 8). En revanche, en présence ou non de dATP les produits d'extension obtenus par PolBY410G semblent de taille équivalente (Figure 23 pistes 11 et 12). Cela confirme que PolBY410G ne semble incorporer que des ribonucléotides comme observé précédemment (Figures 21 et 22).

L'ajout de dATP en faible concentration permet d'obtenir une extension totale par PolB et PolBexo- (Figure 23 pistes 4 et 8) mais ne semble pas avoir d'influence sur l'activité de PolBY410G (Figure 23 piste 12). Les produits d'extension obtenus par PolBexo- semblent les plus appropriés pour l'optimisation du séquençage Nanopore. En effet, ils contiennent des rNMPs contrairement à ceux de PolB. De plus, les produits d'extension de PolBexo- sont plus longs que ceux de PolBY410G et ne sont pas dégradés par le traitement alcalin en l'absence de rNMPs. Par la suite, l'optimisation de la réaction d'extension d'une amorce hybridée sur une matrice de 3829 pb (pRSF_duet) par PolBexo- après 1 cycle de PCR a été commencée pour se rapprocher des conditions utilisées lors du séquençage Nanopore (Hennion et al. 2018), mais les conditions optimales pour obtenir l'extension complète par 1 cycle de PCR n'ont pas été déterminées.

4 Etude de l'activité exonucléase des ADN polymérase *in vivo*

Pour compléter cette étude *in vitro*, la construction de mutants de *Thermococcus barophilus* pour étudier l'importance de la fonction exonucléase de PolD et PolB *in vivo* a été commencée. L'objectif est de réaliser une substitution des acides aminés D215 ou H451 responsables de l'activité exonucléase des ADN polymérase B et D de *Pyrococcus abyssi* respectivement (Gouge et al. 2012; Palud et al. 2008; Jozwiakowski et al. 2014; Greenough et al. 2014). Pour obtenir le mutant PabpolB Δ exo, il faudra compléter le mutant Tba Δ polB déjà obtenu au laboratoire (Birien et al. 2018) avec le plasmide pPabpolB Δ exo comportant le gène polB de Pab avec la mutation D215A. L'ADN polymérase D étant essentielle, pour obtenir le mutant PabpolD Δ exo il faudra premièrement compléter Tba Δ TERMP_00517 (la souche modifiée de Tba pour les transformations génétiques, Thiel et al. 2014) avec le plasmide pPabpolD Δ exo comportant le gène polD de Pab avec la mutation H451A avant de déléter le gène polD de Tba.

La construction de ces mutants a été commencée, le plasmide pPabpolB Δ exo a été obtenu mais la transformation de Tba Δ polB par ce plasmide n'a pas encore été accomplie. Si ces mutants sont obtenus, des éventuels retards de croissance ou phénotypes particuliers pourraient être observés suite à une exposition à des agents génotoxiques qui induisent des stress répliatifs tels que la mitomycine C (MMC) et le méthane-méthyl sulfonate (MMS). Les taux d'incorporation de ribonucléotides *in vivo* dans les ADN génomiques issus de PabpolB Δ exo et PabpolD Δ exo déterminés par un traitement alcalin comme précédemment décrit (Lemor et al. 2018) pourraient être comparés aux taux d'incorporation estimés *in vitro*. Les taux de mutations spontanées s'accumulant au cours des générations dans les mutants exonucléase pourraient également être déterminés et comparés aux souches sauvages.

CHAPITRE III

**Etude de la voie de réparation RER
initiée par la RNase HII**

PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE

Dans le Chapitre II, l'efficacité des activités exonucléase de PolB et PolD pour corriger les ribonucléotides incorporés par les ADN polymérase a été étudiée. Nous avons observé que tous les ribonucléotides n'étaient pas éliminés par l'activité exonucléase de PolB et PolD. De plus, d'autres facteurs peuvent être responsables de la présence de ribonucléotides dans l'ADN comme une mauvaise maturation des fragments d'Okazaki (Zheng et al. 2011) ou des dommages oxydatifs (Randerath et al. 1992). Ces ribonucléotides incorporés de façon stable dans l'ADN doivent être éliminés afin d'éviter des stress répliatifs et des instabilités génomiques (Klein 2017; McElhinny et al. 2010). La voie de réparation majeure des ribonucléotides est la voie RER initiée par la RNase HII. Cette voie est retrouvée dans les trois domaines du vivant et est actuellement la seule voie de réparation des ribonucléotides connue chez les *Archaea* (Sparks et al. 2012; Heider et al. 2017; Vaisman et al. 2014). Cette voie RER initiée par la RNase HII n'a été étudiée qu'une fois chez les *Archaea* (Heider et al. 2017). L'objectif de ce troisième chapitre est d'étudier la voie de réparation RER initiée par la RNase HII chez les *Archaea* *Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus barophilus*.

La voie de réparation RER initiée par la RNase HII a premièrement été reconstituée *in vitro* avec les protéines recombinantes de *Pyrococcus abyssi*. Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que des ribonucléotides mésappariés pourraient être présents dans l'ADN (Shen et al. 2012; Lemor et al. 2018). L'efficacité de la voie RER sera donc comparée sur des substrats comportant un ribonucléotide apparié ou mésapparié à corriger. Pour compléter ces analyses *in vitro*, la voie de réparation RER a également été étudiée *in vivo* avec le modèle d'étude génétique du laboratoire *Thermococcus barophilus*. Les délétions des gènes codant PolB et RNase HII chez *Thermococcus barophilus* ont déjà été obtenues au laboratoire (Birien et al. 2018). La construction des complémentations hétérologues de ces mutants par les gènes *polB* et *rnhII* de Pab ont d'abord été réalisées, et nous avons également essayé d'obtenir le double mutant comportant la délétion des gènes *polB* et *rnhII* de Tba. Puis des analyses phénotypiques et l'évaluation du taux de ribonucléotides incorporés dans les génomes de ces mutants et de leur complémentations hétérologues ont permis d'étudier la voie RER *in vivo*.

ARTICLE EN PRÉPARATION : ARCHAEAL RIBONUCLEOTIDE EXCISION REPAIR IS EFFICIENT TO CORRECT MATCHED AND MISMATCHED RIBONUCLEOTIDES

Maurane Reveil¹, Lucie Chapel¹, Blandine Vourc'h¹, Audrey Bosse¹, Léa Vialle¹, Yann Moalic¹, Mohamed Jebbar¹, Ghislaine Henneke¹

¹ Univ Brest, CNRS, Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, F-29280 Plouzané, France

1 Introduction

Ribonucleotides (rNMPs) are the main non-canonical nucleotides into genomic DNA. Indeed, embedded rNMPs in DNA have several causes: their incorporation into DNA by DNA polymerases of the three domains of life during DNA synthesis (Lemor et al. 2018; Heider et al. 2017; Yao et al. 2013; Nick McElhinny et al. 2010), a default in Okazaki fragment maturation (Zheng et al. 2011; Rumbaugh et al. 1997) or their formation in DNA by oxidative stress (Randerath et al. 1992). Embedded rNMPs in DNA can be used as a positive signal (*e.g.*, mating-type switching in yeast (Vengrova et al. 2004, 2006) or nascent strand recognition during the mismatch repair (Lujan et al. 2013)). However, if rNMPs are not removed from DNA they can cause DNA conformational changes and genomic instabilities (Klein 2017; McElhinny et al. 2010; Pizzi et al. 2015; Evich et al. 2016). rNMPs accumulation in DNA is responsible for genetic diseases like Aicardi-Goutières syndrome and systemic lupus erythematosus (Crow et al. 2006; Günther et al. 2015). Several repair pathways can correct embedded rNMPs. The major pathway is the type 2 RNase H (RNase HII/2) dependent Ribonucleotide Excision Repair (RER) (Sparks et al. 2012; Heider et al. 2017; Vaisman et al. 2014). In Eukaryotes, if this pathway is deficient, a secondary RER initiated by Top1 can be involved to remove rNMPs (Williams et al. 2013; Kim et al. 2011; Sparks et al. 2015). In Eukaryotes and *Bacteria* other repair pathways can also remove rNMPs like base excision repair (Malfatti et al. 2017), nucleotide excision repair (Vaisman et al. 2013) and mismatch repair (Shen et al. 2012). For now, RNase HII/2 initiated RER is the only evolutionary conserved pathway in the three domains of life to correct embedded rNMPs in DNA (Heider et al. 2017; Sparks et al. 2012; Vaisman et al. 2014). RNase HII in *Archaea* and *Bacteria* or RNase H2 in Eukaryotes cleaves the 5'-phosphodiester bond of the embedded rNMP. Archaeal RNase

HII, the eukaryotic RNase H2 counterpart (Malfatti et al. 2019), is not essential and its knock-out in *Thermococcales* does not affect growth (Birien et al. 2018; Heider et al. 2017; Burkhart et al. 2017) while in mammals RNase H2 is essential (Reijns et al. 2012). A previous study also showed that RNase HII knock-out in *Thermococcus barophilus* (Tba) leads to an increase of rNMPs incorporation in the genome (Lemor et al. 2018). After RNase HII/2 cleavage in RER, a DNA polymerase (Pol), Pol δ or Pol ϵ in Eukaryotes or Pol I in *Bacteria* catalyses the 5'-rNMP strand displacement (Sparks et al. 2012; Vaisman et al. 2014). In *Archaea* the possible role of PolB or PolD in RER pathway is still not well understood but it has been shown that PolB is involved in rNMP strand displacement after RNase HII cleavage (Heider et al. 2017). In *Bacteria*, Pol I degrades the displaced strand containing rNMP by its 5'→3' exonuclease or 5'-flap endonuclease activity before DNA ligase ends the repair (Vaisman et al. 2014; Turchi et al. 1994). In Eukaryotes and *Archaea* the displaced strand is cleaved by the endonuclease Fen1 before ligation by DNA ligase 1 (Lig1) (Heider et al. 2017; Sparks et al. 2012). In yeast, it has been observed that the exonuclease Exo1 can act instead of Fen1 for flap cutting (Sparks et al. 2012). Although the general pathway for RER is well established, there is little concern about rNMP removal by exonucleolytic processing. To our knowledge, only two studies support the possible role of RNase H2 and Fen1 in the excision of a monoribonucleotide fully annealed to DNA (Rydberg et al. 2002; Rumbaugh et al. 1997). Up to now, the mechanism underlying the removal of single embedded rNMP focuses on matched rNMP containing substrates. However, recent studies provided *in vitro* and *in vivo* evidences of the possible presence of mismatched ribonucleotides in DNA (Shen et al. 2012; Lemor et al. 2018). One of these studies showed that rA is the most incorporated rNMP as a match ($\simeq 95\%$) or a mismatch ($\simeq 13\%$) by the archaeal DNA polymerase D from *Pyrococcus abyssi* (PabPolD) opposite template dT and dC bases respectively, and that dA is the most incorporated dNMP as a mismatch ($\simeq 16\%$) opposite template rC base (Lemor et al. 2018). Other results showed that mispaired rNMPs occur during translesion synthesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxodG) or template DNA synthesis by the bacterial DinB2 DNA polymerase from *Mycobacterium smegmatis* (Ordóñez et al. 2014). In Eukaryotes, findings revealed the formation of mismatches containing ribonucleotide and oxidised template bases by DNA polymerase β (Cilli et al. 2015) as well as stable formation of oxidised rGMP opposite template dA base by DNA polymerase μ (Jamsen et al. 2021). Moreover, it has been shown in Eukaryotes that RNase H2 didn't correct abasic rNMP or ribose 8-oxoG sites and that these modified rNMP are not corrected by RER but by Base Excision Repair (BER) (Malfatti et al. 2017). The question of mismatched rNMP correction by RER is thus raised.

In this study, we aimed to assess PolB and PolD involvement in the RNase HII initiated RER pathway in *Archaea* and whether mismatched rNMPs generated by PolD can be excised from DNA (Lemor et al. 2018). We also investigated the *in vivo* role of proteins involved in RER pathway. Results show that PolB or PolD can be involved in RER pathway but RER is more efficient to correct a matched rNMP with PolB than PolD. In contrast, when the rNMP to remove is mispaired it seems that RER is more efficient with PolD than PolB. Our *in vivo* analysis corroborates these *in vitro* results showing that PolB deletion led to a slight increase of embedded rNMPs in genomic DNA, suggesting that another Pol can act in RER. Interestingly, we also show that the Fen1 endonuclease and exonuclease activities can remove a single rNMP embedded in DNA, supporting the existence of 5'-flap and 5'→3' exonuclease RER mechanisms in *Archaea*.

2 Experimental procedures

Enzymes production and purification

The enzymes from *Pyrococcus abyssi* used in this study were cloned, overexpressed and purified as previously described in the following articles: exonuclease deficient versions of PabPolB (D215A mutation) (Gouge et al. 2012) and PabPolD (H451A mutation) (Palud et al. 2008), PabPCNA (Henneke et al. 2002), PabRNase HIII, PabFen1 and PabLig1 (Meslet-Cladière et al. 2007).

Oligonucleotides

Oligonucleotides used in this study (Table S2) were purchased from Eurogentec and purified by RP-HPLC with the exception of the 87 bp oligonucleotides, which were purified by PAGE. Oligonucleotides were labeled with FAM or Cy5 fluorophores for detection. Annealing of two or three complementary oligonucleotides was performed in 10 mM Tris-HCl (pH 8) and 50 mM NaCl at a final concentration of 500 nM. The mixture was heated to 95°C for 5 min and slowly cooled to room temperature. For PabLig1 assays and PabFen1 nuclease activities the oligonucleotide substrates were phosphorylated before annealing. 300 pmol of oligonucleotides were incubated with T4 Polynucleotide Kinase (ThermoFisher), in 1X reaction buffer A (ThermoFisher) and 1 mM ATP. The mixture was incubated at 37°C for 30 min, heated at 65°C for 20 min. The resulting annealed substrates were gel-purified from excess single-stranded oligonucleotides by the QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol.

PabRNase HIII, PabFen1 and PabLig1 activity assays

Activity assays were carried out in reaction mixture (20 μ L) containing 50 nM of fluorescently labelled oligonucleotide substrate, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl and 5 mM MgCl₂ with either PabRNase HIII, PabFen1 or PabLig1 (enzyme concentrations and additional components are mentioned in the figure legends). The assays were performed at 60°C for 30 min. Reactions were stopped on ice by adding one volume of a stop solution containing 86 % formamide, 10 mM EDTA (pH 8), 10 mM NaOH and 1 μ M of "oligonucleotide competitor" (the exact complement of the template strand under study) followed by denaturation at 95°C for 3 min.

RER *in vitro* reconstitution

RER assays were carried out in reaction mixture (30 μ L) containing 50 nM of fluorescently dual-labelled oligonucleotide substrate, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, and dNTPs at intracellular concentrations as determined previously in *P. abyssi* (Lemor et al. 2018). The mixtures were incubated at 60°C for 15 min after adding 500 nM of PabRNase HIII. Then 300 nM of PabPCNA were added, followed by a further incubation at 60°C for 8 min. Finally, 250 nM of PabPolB and/or 1 μ M of PabPolD, 300 nM of PabFen1 and 300 nM of PabLig1 were supplemented to the reaction mixtures, followed by incubation at 60°C for 1 hour. Reactions were stopped on ice. The reaction products were purified using the QIAquick Nucleotide Removal kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol and eluted in 20 μ L H₂O. To confirm rNMP removal by RER, half of the reaction mixture (10 μ L) was incubated at 55°C for 1 hour in 50 mM Tris-HCl (pH 8) and 5 mM MgCl₂ with or without 500 nM PabRNase HIII. Reactions were quenched on ice by adding one volume of a stop solution containing 86 % formamide, 10 mM EDTA (pH 8), 10 mM NaOH and 1 μ M of "oligonucleotide competitor" (the exact complement of the template strand under study), followed by denaturation at 95°C for 5 min.

Visualisation and quantification of fluorescently labelled products

Reaction products were resolved on 12 % denaturing polyacrylamide 8 M urea gels. Labelled oligonucleotides were detected with Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) and quantified with Image Quant TL 8.1 software (GE Healthcare) as published previously (Lemor et al. 2018).

Heterologous complementation

The strains used in this study are described in Table 7. The mutant strains were obtained as in Birien et al. 2018. Briefly, primers used to complement genes of interest are described in Table S3. The inserts obtained were cloned in pUPH plasmid (Birien et al. 2018). The resulting plasmids were produced in *E. coli* DH5 α cells, followed by extraction. Then Tba cells were transformed according to Birien et al. 2018 protocol. After cell transformation the mutants were first selected on plates containing Thermococcales Rich Medium (TRM) (Zeng et al. 2009) supplemented with 2.5 μ g/mL of simvastatin (Sigma) and then 100 μ M of 6-Methylpurine (Sigma). The sequences of mutant plasmids and strains were assessed by PCR and confirmed by Illumina PE150 sequencing (Novogene). Growth curves were monitored in TRM (Zeng et al. 2009) or Thermococcales Amino Acid (TAA) medium (Thiel et al. 2014) supplemented with sulfur. Cell densities were determined by direct cell counting using a Thoma cell (0.02 mm depth) under a phase contrast Olympus model BH-2 microscope.

Strains	Genotype	Parent Strain	References
UBOCC-M-3107	Tba wild-type	Tba MP	(Marteinsson et al. 1999)
UBOCC-M-3300	Tba Δ TERMP_00517 (TERMP_RS02570)	Tba wild-type	(Birien et al. 2018)
UBOCC-M-3302	Tba Δ polB (TERMP_RS08040)	UBOCC-M-3300	(Birien et al. 2018)
UBOCC-M-3303	Tba Δ rnhII (TERMP_RS03345)	UBOCC-M-3300	(Birien et al. 2018)
	Tba Δ polB (TERMP_RS08040) complemented by PabpolB (PAB_RS09320)	UBOCC-M-3302	This study
	Tba Δ rnhII (TERMP_RS03345) complemented by PabrnhII (PAB_RS02765)	UBOCC-M-3303	This study

Table 7: *Thermococcus barophilus* and derivative mutant strains used in this study

Gene expression assessment by RT-qPCR

RT-qPCR analysis were performed to assess the level of genes expression in the mutant strains. TbaWT, the parent strain Tba Δ TERMP_00517, Tba Δ polB, Tba Δ rnhII and their respective heterologous complementations Tba Δ polB +PabpolB, and Tba Δ rnhII +PabrnhII strains were grown in TRM medium supplemented with sulfur at 85°C for 6 hours (log phase). Cells were harvested by centrifugation for 6 min, 8000 g at 4°C and suspended in 1 mL Trizol (Invitrogen). 200 μ L of pure chloroform (Sigma) were added and samples were gently mixed 10 s and left at room temperature for 3 min. The aqueous phases were collected by centrifugation for 15 min, 13000 g at 4°C. The RNA precipitation was performed by adding 500 μ L of isopropanol (Sigma) and incubating at room temperature for 5 min. Cell pellets obtained after centrifugation for 15 min, 13000 g at 4°C were washed two times with ethanol 70 % and air-dried. DNase treatment was done according to manufacturer's protocol (RQ1 RNase-free DNase Kit, Promega). Extracted RNA were quantified by Nanodrop 2000 (ThermoFisher) and 500 ng of RNA were used in Reverse Transcription reaction performed according to the manufacturer's protocol (iScriptTM Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR Kit, Bio-Rad). The obtained cDNAs were used in qPCR reaction achieved according to the manufacturer's protocol (SsoAdvancedTM Universal SYBR® Green Supermix Kit, Bio-Rad) with the following incu-

bation program: 30 s at 95°C, 40 cycles amplification (15 s at 95°C, 30 s at 60°C), Melting curve (65°C to 95°C with 0.5°C increments, 5 s by step). Primers used for qPCR reaction are described in Table S4. The relative expressions were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Schmittgen et al. 2008).

Detection of ribonucleotides in genomic DNA

TbaWT, the parental strain Tba Δ *TERMP_00517*, Tba Δ *polB*, Tba Δ *polB +PabpolB*, Tba Δ *rnhII* and Tba Δ *rnhII +PabrnhII* strains (Table 7) were grown in a gas-lift bioreactor under anaerobic conditions at 85°C, pH 6.8 in SME medium (Godfroy et al. 2000; Raven et al. 1992; Raven et al. 1997). Logarithmically growing cells were harvested by centrifugation for 1 hour, 8000 g at 4°C. The detection of ribonucleotides in genomic DNA was done by alkaline treatment as described in Lemor et al. 2018 with some modifications. Cell pellets (\simeq 1 g) were suspended in 3.2 mL TE 1X (Sigma). Cell lysis was performed by adding 200 μ L Proteinase K (20 mg/mL), 400 μ L Sarkosyl (10 %) (Sigma) and 400 μ L SDS (10 %) (Sigma) followed by incubation at 37°C for 1.5 hours. Isolation of total DNA was achieved according to Lemor et al. 2018 protocol except RNase A treatment which was done in TE 1X (Sigma), NaCl (0.5 M). RNase A in the presence of 0.5 M NaCl allows the selective degradation of single-stranded RNA without degrading embedded ribonucleotides in genomic DNA (Cerritelli et al. 2020; Ding et al. 2015; Ramírez et al. 2015). Products were separated on 1 x TBE neutral agarose gel. Gels were stained with SYBR Gold® (Invitrogen). Densitometry traces were obtained with Image Quant TL 8.1 software (GE Healthcare).

Drop dilution assays

Drop dilution assays protocol was adapted from Fujikane et al. 2010 and Kushida et al. 2019. TbaWT, the parental strain Tba Δ *TERMP_00517*, Tba Δ *polB*, Tba Δ *rnhII* and their respective heterologous complementations Tba Δ *polB +PabpolB* and Tba Δ *rnhII +PabrnhII* strains were grown in TRM medium at 85°C for 6 hours (log phase). 1 mL of cells culture were harvested by centrifugation for 6 min, 8000 g at 4°C and suspended in 100 μ L of TRM supplemented with 0.015 %, 0.1 % or 0.2 % methyl methane-sulfonate (MMS, Sigma), 20, 30 or 100 μ g/mL mitomycin C (MMC, Sigma), 5 or 10 μ M 4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO, Sigma) or 30 or 400 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂, Sigma) and incubated at room temperature for 4 hours. Cells are then harvested by centrifugation for 6 min, 8000 g at 4°C and suspended in TRM (10 μ L). Cells were diluted to 1.10^6 , 1.10^5 , 1.10^4 , 1.10^3 and 1.10^2 and 2 μ L of each dilution were spotted on solid TRM medium (1 % phytigel, TRM, 0.5 g/L colloidal sulfur). After 5 days of incubation at 85°C, the colonies on plates were transferred to polyvinylidene fluoride membranes and stained with Coomassie Blue.

3 Results

PabRNase HII is able to cleave a mismatched rAMP with a lesser efficiency than a matched rAMP

A previous study showed that rAMP was the most incorporated rNMP as a match or a mismatch by PabPolD (Lemor et al. 2018). Therefore, we first compared the cleavage activities of PabRNase HII on substrates containing a matched or a mismatched rAMP embedded in a 34-bp DNA sequence (Figure 24A). When the matched rAMP-containing DNA substrate was incubated with increasing amounts of PabRNase HII, a major product appeared (Figure 24A). Complete hydrolysis was observed at 50 nM (Figure 24A lane 7). This oligomer was shown to migrate at the same position as the 7-nt ladder. These results indicate that PabRNase HII specifically cleaves on the 5'-side of the matched rAMP-containing DNA substrate. Using the same conditions, PabRNase HII was also effective on a mismatched rAMP-containing DNA substrate, generating 7-nt products in length but full degradation required at least 200 nM (Figure 24B lane 17). As reported in Figure 24C, PabRNase HII is more efficient to cleave a matched rAMP compared to a mismatched rAMP-containing DNA substrate. Overall, these data demonstrate that PabRNase HII maintains its ability to process not only a matched rNMP embedded in DNA but also a mismatched rNMP, leaving a monoribonucleotide attached to the DNA strand.

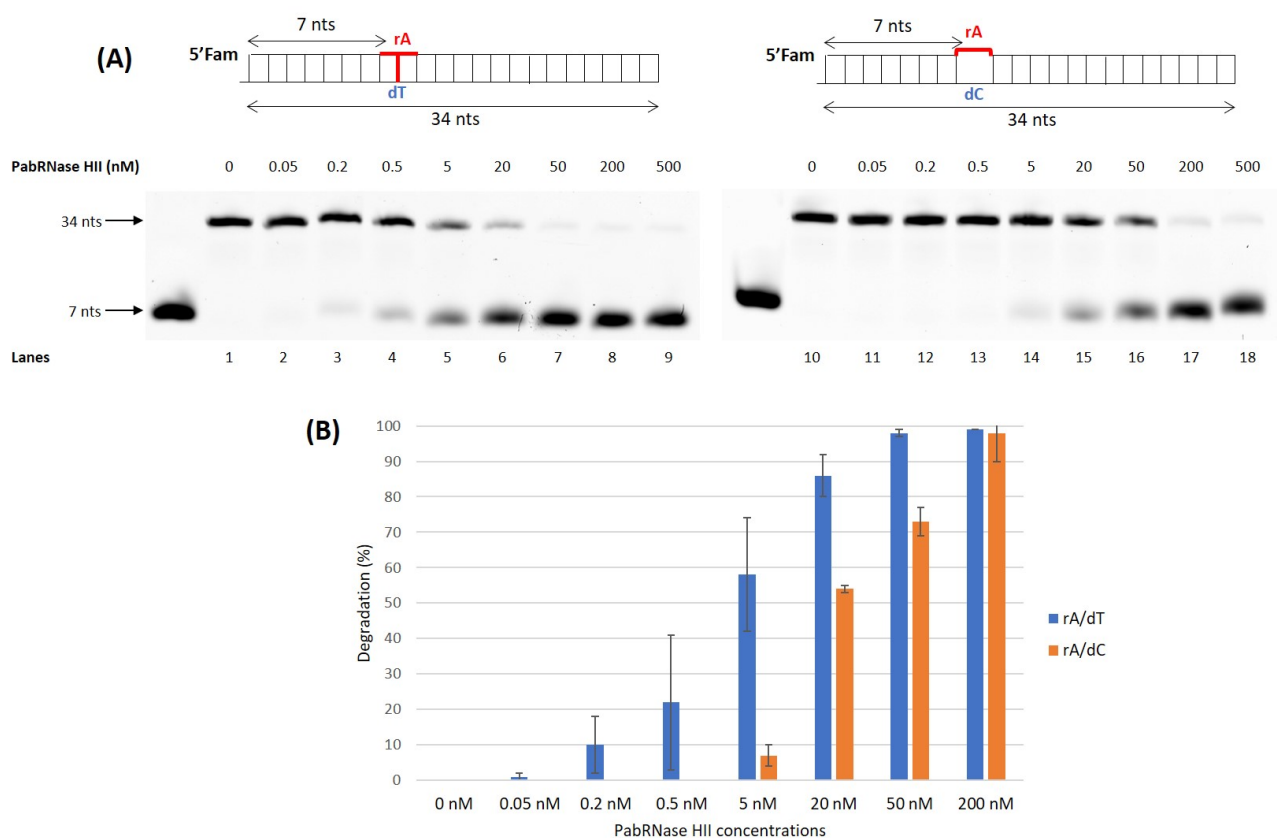


Figure 24: PabRNase HII cleavage efficiency on a matched rAMP compared to a mismatched rAMP. (A) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel. The reaction was realized with PabRNase HII concentrations from 0.05 nM to 500 nM. Lanes 1 and 10 correspond to negative control without enzymes. The reactions were done with L34_rA/L34_dT or L34_rA/L34_dC (Table S2). (B) Histogram representing the percentage of substrates cleavage by PabRNase HII activity.

PabFen1 5'→3' exonuclease activity is able to remove the 5'-rNMP from the nicked template after PabRNase HIII incision

In RER, PabFen1 endonuclease activity has been largely studied in cleaving flap structures (Heider et al. 2017; Sparks et al. 2012; Williams et al. 2016). In contrast, there is only little concern about rNMP removal fully annealed to the template strand by the 5'→3' exonuclease activity of Fen1, while this is reminiscent of RNA primer removal in Okazaki fragment processing (B. Liu et al. 2017; Huang et al. 1996; Sato et al. 2003). Thus, we assessed 5'-flap endonuclease and 5'→3' exonuclease activities of Fen1 on different substrates that mimic relevant intermediates of the RER pathway.

First, we studied PabFen1 endonuclease activity on single and double-flap substrates (Kao et al. 2002; Matsui et al. 2014) (Figure S5). On single 16-nt 5'-flap substrate (Figure S5A lanes 1-8), 16-nt products were mainly generated. Additional fragments (14 and 15-nt in length), shorter than the released 16-nt, were faintly detectable (Figure S5A lanes 2-6). These results indicate that PabFen1 endonuclease is active on single 5'-flap substrates, cutting at the flap junction in the double-stranded (ds) DNA and less frequently 1 or 2-nt before the junction in the flap structure. On double-flap substrate containing a 1-nt 3'-tail, known as a cellular substrate (Kao et al. 2002), PabFen1 endonucleolytic cleavage gave exclusively one 17-nt product (Figure S5A lanes 9-16), corresponding to the precise cutting at a single position one nucleotide into the annealed region. Moreover, at a concentration of 0.3 μ M with or without PabPCNA or PabRNase HIII, PabFen1 endonucleolytic cleavage is more efficient on a double-flap than single-flap substrate (Figure S5B). As previously observed for eukaryotic Fen1 (Harrington et al. 1995; Kao et al. 2002), PabFen1 endonuclease activity is more specific and more efficient on double-flap than single-flap structures (Figure S5A lanes 10-16 compared to lanes 2-8). Overall, these data clearly show that the double-flap substrate containing a 1-nt 3'-tail is optimal for PabFen1 endonuclease activity.

Because 5'-rNMP nicked template reflect the *in vivo* intermediate generated by RNase HIII cleavage 5' to the junctional ribonucleotide, we analysed if this substrate was stimulatory to PabFen1 5'→3' exonuclease activity. Two nicked substrates were designed with the downstream strand annealed to the DNA template containing a 5'-phosphorylated matched dAMP (Figure 25A lanes 1-8) or rAMP (Figure 25A lanes 9-16). PabFen1 exonuclease activity is able to cleave both the 5'-dAMP (Figure 25A lanes 2-6) and the 5'-rAMP substrates (Figure 25A lanes 10-14). PabFen1 exonuclease activity cleaves mainly the 5'-dAMP or the 5'-rAMP (29-nt products) but is also able to cleave less frequently one or two nucleotides after the 5'-dAMP or 5'-rAMP (Figure 25A lanes 2-5 and 10-12). PabFen1 5'→3' exonuclease activity is as efficient on a rAMP substrate (Figure 25A lanes 10-14 and Figure 25B orange) than on dAMP substrate (Figure 25A lanes 2-6 and Figure 25B blue). We also observed that PabPCNA and PabRNase HIII doesn't seem to have an influence on PabFen1 5'→3' exonuclease activity regardless of the substrate in our experimental conditions (Figure 25B). Taken together, these results showed that PabFen1 exonuclease activity is able to remove a matched 5'-rNMP and could therefore act after PabRNase HIII incision in the RER pathway.

PabLig1 is able to ligate a 5'-rNMP nicked substrate in the presence of PabPCNA only

Because the reaction intermediate obtained after RNase HIII incision is a nicked template, we sought to verify whether PabLig1 was active on it. Ligation templates were the same as for Fen1 5'→3' exonuclease activity: two 5'-phosphorylated matched dAMP or rAMP nicked templates (Figure 26A lanes 1-4 and 5-8, respectively) and two 5'-phosphorylated mismatched dAMP or rAMP nicked tem-

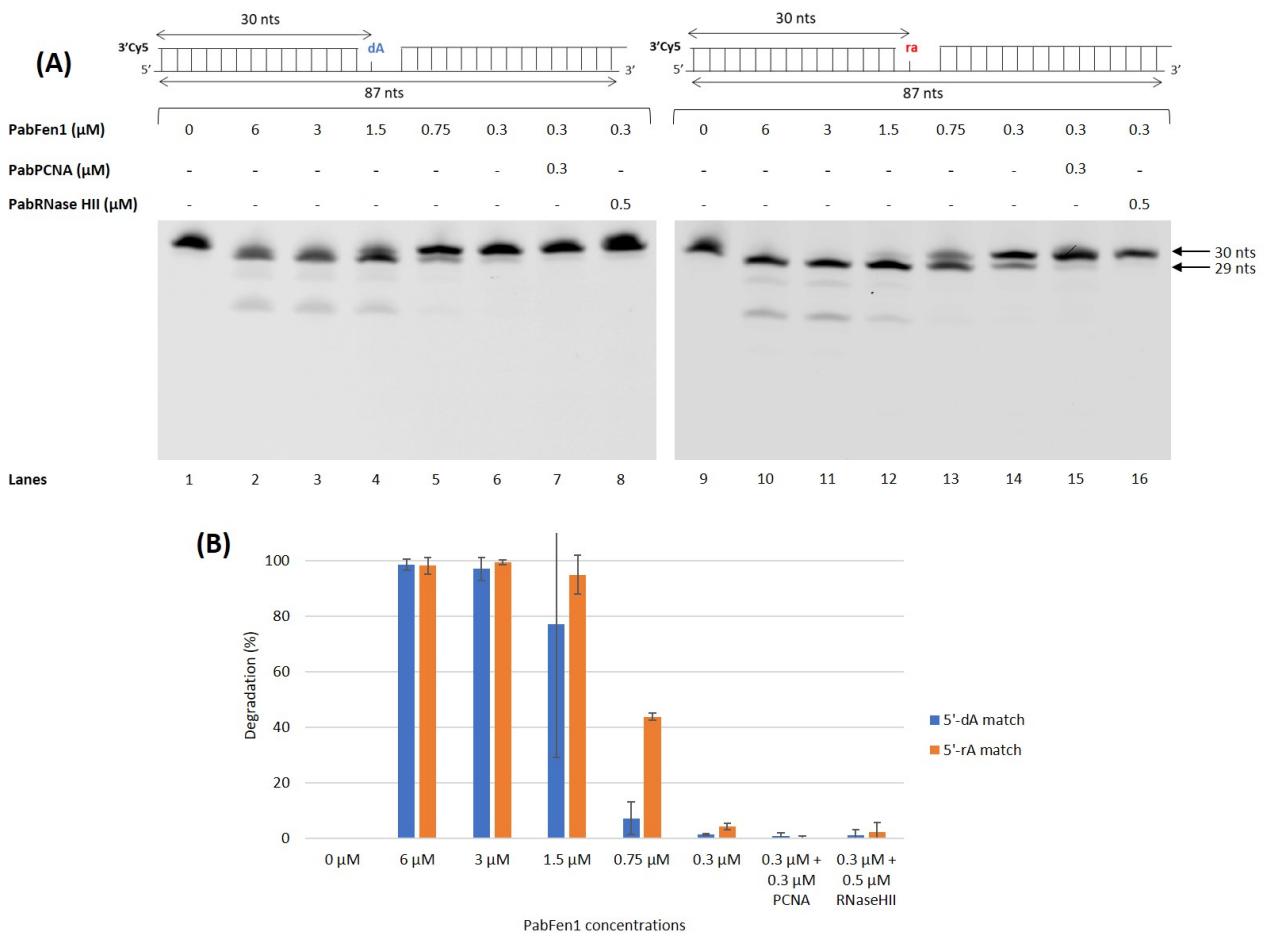


Figure 25: Enzymatic characterisation of PabFen1 5'→3' exonuclease activity.

(A) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel. The reaction was realized with PabFen1 concentrations from 0.3 μM to 6 μM with or without 0.3 μM PabPCNA or 0.5 μM PabRNase HII. Lanes 1 and 9 correspond to negative control without enzymes. The reactions were done with L30:L57RC/L87 or L30_rA:L57RC/L87 (Table S2). (B) Histogram representing the percentage of substrates degradation by PabFen1 exonuclease activity.

plates opposite dC (Figure 26A lanes 9-11 and 12-14, respectively). In our experimental conditions, PabLig1 is active on nicked DNA template containing dNMP ends ($\simeq 42\%$), and ligation efficiency is higher in the presence of PabPCNA ($\simeq 57\%$) (Figure 26A lanes 1 and 2 and Figure 26B blue bars). However, ligation is negligible on the nicked template with a 5'-dAMP mismatch opposite template dC and a very faint band 31-nt in length appears (Figure 26A lane 9 and Figure 26B grey bar). This result shows that ligation reaction is not favourable in the presence of a mismatched 5'-DNA end and abortive 5'-adenylate (AMP) products accumulate ($\simeq 5\%$) (Figure 26B). These ligation failure products have already been observed in *Bacteria* and Eukaryotes and were indicative of poor substrates for DNA ligases (Zhu et al. 2008; Tomkinson et al. 1997; Tumbale et al. 2014; S. W. Yang et al. 1992). Interestingly, when PabPCNA is supplied to the reaction, ligation products are detectable ($\simeq 30\%$) along with low amounts of 5'-AMP-intermediates (Figure 26A lane 10 and Figure 26B grey bar). When ligation was examined on matched or mismatched 5'-rAMP nicked template, no activity was measurable (Figure 26A lanes 5 and 12). However, when PabPCNA was added to the reaction, ligation products (87-nt in length) corresponding to the nick sealing of a matched 5'-rAMP were formed ($\simeq 32\%$), and low level of ligation failure products accumulated ($\simeq 4\%$) (Figure 26A lane 6 and Figure 26B orange bar). In the presence of a mismatched 5'-rAMP opposite template dC, ligation was very weak even with PabPCNA (Figure 26A lanes 12 and 13 and Figure 26B yellow bar) but higher amounts of ligation failure products ($\simeq 9\%$) were observed (Figure 26A lane 13 and Figure 26B yellow bar).

Collectively, these results show that PabPCNA enhances PabLig1 activity on all nicked substrates (5'-dAMP match, 5'-rAMP match and 5'-dAMP mismatch) while 5'-rAMP mismatch templates remain poor substrates.

Both PabPolB and PabPolD can act in RNase HIII initiated RER pathway

We did the *in vitro* reconstitution of RER pathway with a matched (Figure 27A) or a mismatched (Figure 27C) rAMP containing dsDNA substrate. The oligonucleotide strand (87-nt in length) containing the rAMP is double-labelled with a 3'-Cy5 and a 5'-FAM (Figure 27B lane 1 and 27D lane 10, Cy5 and FAM panels). As seen in Figure 24, PabRNase HIII cleaves at the 5' side of the matched or mismatched rAMP (Figure 27B lane 2 and 27D lane 11), leading to the accumulation of 57-nt products in FAM panel and 30-nt products in Cy5 panel.

After PabRNase HIII incision, PabPolB or PabPolD were supplied in the reaction to assess their ability to perform strand displacement activity on the resulting nicked template. PabPolB (Figure 27B lane 3 and 27D lane 12) or PabPolD (Figure 27B lane 4 and 27D lane 13) were able to extend the 3'-OH of the 57-nt strand by displacing the 5'-rAMP downstream strand (30-nt in length), leading to the generation of full-length 87-nt products as observed in the FAM panel.

In this study, we showed that PabFen1 5'→3' exonuclease activity could act after PabRNase HIII incision and remove the 5'-monoribonucleotide fully attached to the DNA strand in the nicked dsDNA template (Figure 25). To confirm that this activity might be relevant in RER, we added all enzymes of the pathway except DNA polymerases (Figure 27B lane 5 and 27D lane 14). In these conditions, 57-nt products in the FAM panel and 30-nt products in the Cy5 panel corresponding to PabRNase HIII cleavage appeared. In the Cy5 panel two other products were also obtained (Figure 27B lane 5 and 27D lane 14), a 29-nt product consistent with rAMP removal from the 30-nt downstream strand by PabFen1 5'→3' exonucleolytic activity as observed in Figure 25A (lanes 10-15), and a 31-nt product

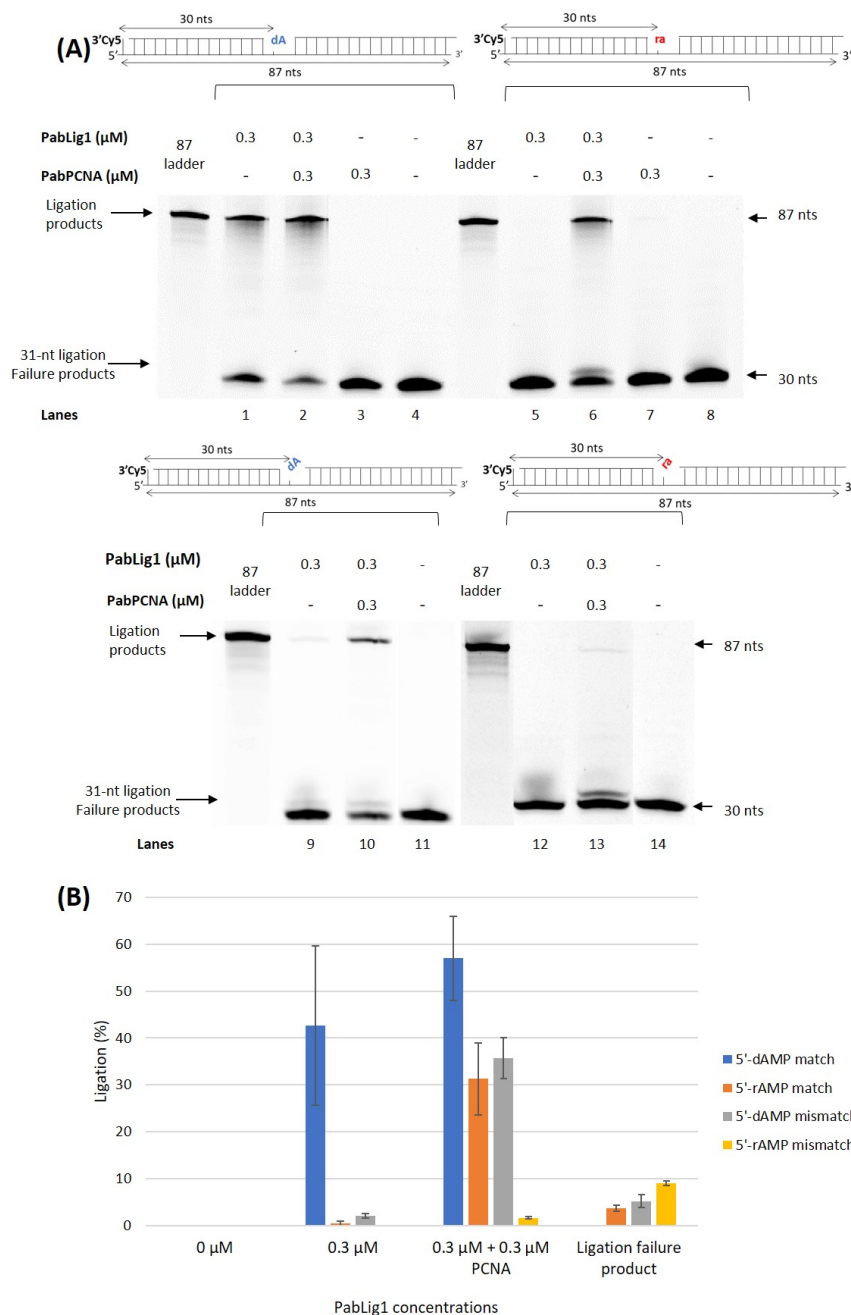


Figure 26: Enzymatic characterisation of PabLig1 on single matched or mismatched dAMP or rAMP and on stretch rNMPs containing substrates.

(A) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel. The reaction was realized with 0.3 μM PabLig1 with or without 0.3 μM PabPCNA. Lanes 4, 8, 11 and 14 correspond to negative control without enzymes. The reactions were done with phosphorylated substrates containing a matched 5'-dAMP or 5'-rAMP (L30:L57RC/L87 and L30_rA:L57RC/L87 respectively, Table S2) or a mismatched 5'-dAMP or 5'-rAMP (L30:L57RC/L87_dC and L30_rA:L57RC/L87_dC respectively, Table S2) and 1 mM ATP. (B) Histogram representing the percentage of ligation products obtain after ligation reaction using PabLig1 concentrations from 0.3 μM to 6 μM with or without 0.3 μM PCNA. The reactions were done with phosphorylated L30:L57RC/L87, L30_rA:L57RC/L87, L30:L57RC/L87_dC or L30_rA:L57RC/L87_dC (Table S2) and 1 mM ATP.

corresponding to abortive 5'-adenylate intermediate generated by PabLig1 as observed in Figure 26A (lanes 6 and 13). These results demonstrate that PabFen1 5'→3' exonuclease activity could act in RER pathway immediately after PabRNase HII incision on the nicked template by cleaving a matched or mismatched rAMP before DNA polymerase strand displacement. Accumulation of ligation failure products (31-nt in length) corroborates the low efficiency of PabLig1 to seal a matched or a mismatched rAMP nick in ds DNA template (Figure 27B lane 5 and 27D lane 14 consistent with results in Figure 26). However, the sealing of a matched 5'-rAMP stimulated by PabPCNA previously observed (Figure 26B) is not seen when PabFen1 and PabRNase HII are added to the reaction (Figure 27B lane 5). This result can be explained by a balance between the incision of rAMP substrates by PabRNase HII and their sealing by PabLig1. Another explanation is that PabPCNA is involved in several functional interactions with PabFen1, PabLig1 and PabRNase HII making it less available to stimulate PabLig1 activity.

When RER reconstitution was performed with PabPolB, 48 % or 38 % of full-length extension products (87-nt in length) were obtained from a matched or a mismatched rAMP containing substrate respectively (Figure 27B lane 6 and 27D lane 15, see FAM and Cy5 panels). When RER reconstitution was performed with PabPolD, 21 % or 53 % of full-length extension products (87-nt in length) were obtained from a matched or a mismatched rAMP containing substrate respectively (Figure 27B lane 7 and 27D lane 16, see FAM and Cy5 panels). When RER was reconstituted with both PabPolB and PabPolD 30 % or 31 % of full-length extension products (87-nt in length) were obtained from a matched or a mismatched rAMP containing substrate respectively (Figure 27B lane 8 and 27D lane 17, see FAM and Cy5 panels). To confirm that the double-labelled final reaction products (87-nt in length, see FAM and Cy5 panels in Figure 27B lanes 6-8 and Figure 27D lanes 15-17) were devoid of rAMP, all reaction products were subjected to RNase HII treatment (Figure S6 and Figure 27E). The amounts of 87-nt products obtained with PabPolB and/or PabPolD are the same after control treatment (Figure 27B lanes 6-8 and 27D lanes 15-17) and RNase HII treatment (Figure S6B lanes 6-8 and S6D lanes 15-17 and Figure 27E) indicating that all rAMPs are efficiently removed by RER. Interestingly, these results show that the PolB-mediated RER pathway is more active on a matched rAMP whereas the PolD-mediated RER pathway is more efficient on a mismatched rAMP (Figure 27E). RER reconstitution with both DNA polymerases displays similar correction efficiencies with either the rAMP match or mismatch (Figure 27B lane 8 and 27D lane 17 and 27E). Collectively, these results suggest that both PolD and PolB can be involved in RNase HII initiated RER pathway in *Archaea*.

Construction of RER archaeal deletion mutants and their heterologous complementations

We wish to compare the role of enzymes observed *in vitro* with their *in vivo* requirement in RER. TbaWT, TbaΔ*TERMP_00517* (genetic-tool strain used for selective Tba transformation), TbaΔ*polB* and TbaΔ*rmhII* deletion mutants are the archaeal strains dedicated for this study. They have been shown to grow normally without detectable abnormalities (Birien et al. 2018). First, we performed the heterologous complementations of TbaΔ*polB* and TbaΔ*rmhII* with Pab*polB* (TbaΔ*polB* +Pab*polB*) and Pab*rmhII* (TbaΔ*rmhII* +Pab*rmhII*) respectively (Table 7) to assess if these enzymes are functionally conserved in RER in *Thermococcales*. The expression of RNase HII and PolB in Tba cells and their heterologous complementations were evaluated by RT-qPCR (Figure S7). These results demonstrate that PabPolB and PabRNase HII are expressed in the heterologous complementations

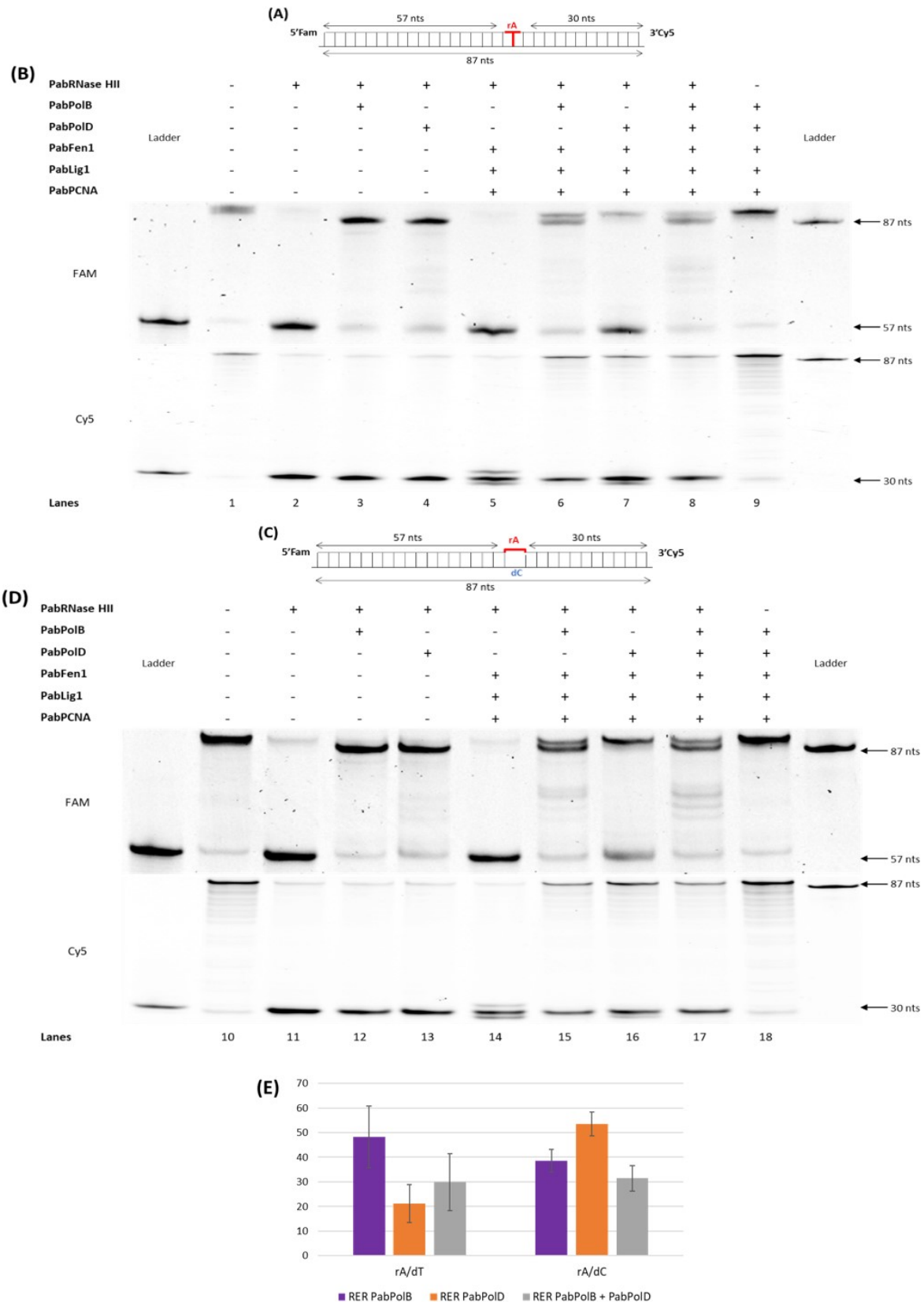


Figure 27: RNase HII initiated RER reconstitution with PabPolB and PabPolD.

Lanes 1 and 10 correspond to negative control without enzymes. (A) Substrate L87_rA/L87_dT (Table S2). (B) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel of the RER reconstitution with the L87_rA/L87_dT substrate. (C) Substrate L87_rA/L87_dC (Table S2). (D) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel of the RER reconstitution with the L87_rA/L87_dC substrate. (E) Histogram representing the rNMP correction of RER with PabPolB and/or PabPolD. The final reaction products obtained by RER reconstitution were submitted to enzymatic treatment to assess rNMP correction.

of Tba Δ *polB* (Tba Δ *polB* +Pab*polB* strain) and Tba Δ *rnhII* (Tba Δ *rnhII* +Pab*rnhII* strain) respectively. Besides, the expression of PabPolB and PabRNase HII are around 30-fold or 10-fold higher in Tba Δ *polB* +Pab*polB* or Tba Δ *rnhII* +Pab*rnhII* respectively, compared to the homologous expression of TbaPolB and TbaRNase HII in TbaWT (Figure S7). We also attempted to construct the double deletion mutant Tba Δ *rnhII* Δ *polB* but this was not viable (Table S5). Moreover, the growth phenotypes of all Tba deletion mutants along with Pab*polB* and Pab*rnhII* heterologous complementation were analyzed in a rich TRM medium and a minimal TAA medium. In the two conditions tested, we did not notice any growth delay for all Tba mutants and their heterologous complementations (Figure S8).

Accumulation of genomic ribonucleotides in RNase HII and PolB null Tba cells

We then assessed the effect of *rnhII* or *polB* deletions on the level of genomic ribonucleotides. An important degradation of Tba Δ *rnhII* genomic DNA was observed after alkaline treatment compared to TbaWT and to the parent strain Tba Δ *TERMP_00517* genomic DNA (Figure 28A lane 15 compared to lanes 3 and 6, and 28B green densitometric continuous line compared with the blue continuous and dashed lines). These results demonstrate an increase of genomic ribonucleotides in RNase HII null Tba cells (1/1700) compared to TbaWT and to the parent strain Tba Δ *TERMP_00517* (1/5750). Interestingly, the heterologous complementation of Tba Δ *rnhII* displays almost the same level of genomic ribonucleotides (1/5250) than TbaWT and Tba Δ *TERMP_00517* (1/5750) strains (Figure 28A lane 18 compared to lanes 3 and 6, 28B densitometric green dashed line compared with the blue continuous and dashed lines and 28C). Collectively, these results corroborate the crucial role of RNase HII-mediated RER pathway observed *in vitro* (Figures 24 and 27) and *in vivo* (Figure 28 and Lemor et al. 2018). These data also show that RNase HII is functionally conserved among *Thermococcales* Pab and Tba organisms. The alkaline treatment of Tba Δ *polB* genomic DNA led to a slight increase of embedded genomic ribonucleotides (1/5250) compared to TbaWT and Tba Δ *TERMP_00517* (1/5750) strains (Figure 28A lane 9 compared to lanes 3 and 6, and 28B densitometric purple continuous line compared with the blue continuous and dashed lines). This increase of ribonucleotides in Tba Δ *polB* genome is weak compared to that observed in Tba Δ *rnhII* genome (Figure 28A lane 9 compared to lane 15, and 28B densitometric purple continuous line compared with the green continuous line). Surprisingly, the genome of Tba Δ *polB* +Pab*polB* contains more ribonucleotides (1/2200) than in TbaPolB null cells (1/5250) (Figure 28A lane 12 compared to lane 9, and 28B densitometric purple dashed line compared to purple continuous line).

Taken together, these results suggest that in the absence of PolB, PolD or another DNA polymerase may act in RER as observed *in vitro* (Figure 27). We also observed an increase of the genomic ribonucleotides level in the heterologous complementation of Tba Δ *polB* whereas the heterologous complementation of Tba Δ *rnhII* displays the same genomic ribonucleotides level of TbaWT and Tba Δ *TERMP_00517*. Therefore, in contrast to RNase HII, PolB displays different functional interactions with RER proteins between Pab and Tba.

Sensitivity to DNA damaging agents of the RER deletion strains and their heterologous complementation derivatives

Drop dilution assays were performed to compare the potential sensitivity of the TbaWT and the parental strain Tba Δ *TERMP_00517*, to Tba Δ *polB*, Tba Δ *rnhII* and their respective heterologous complementation with Pab*polB* (Tba Δ *polB* +Pab*polB*) and Pab*rnhII* (Tba Δ *rnhII* +Pab*rnhII*) to

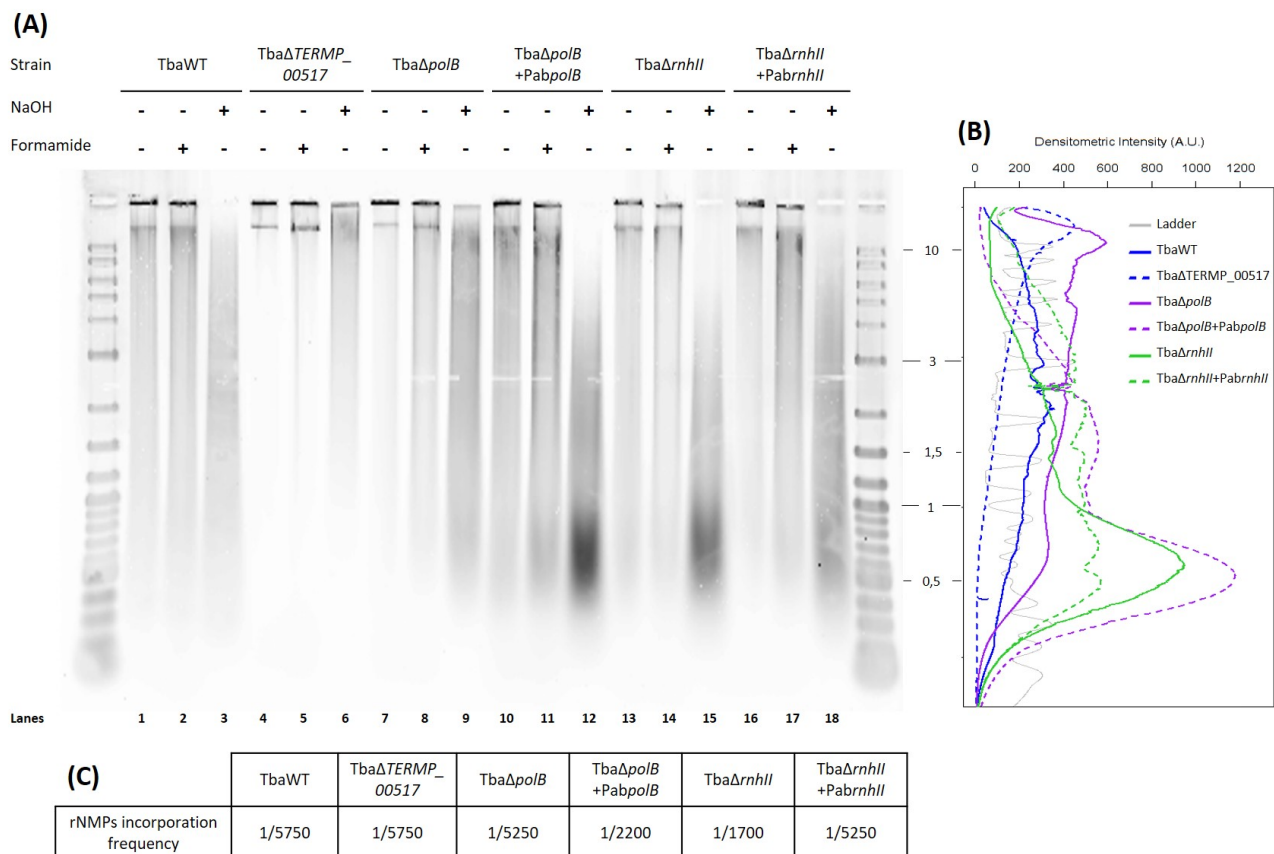


Figure 28: Genomic ribonucleotides embedded in TbaWT cells compared to its RER derivative mutants and their heterologous complementations.

(A) Alkali sensitivity of genomic DNA from TbaWT, Tba Δ TERMP_00517, Tba Δ polB, Tba Δ rnhII, Tba Δ polB +PabpolB and Tba Δ rnhII +PabrnhII cells. Electrophoresis profile of genomic DNA after alkaline (NaOH +) or control treatment with NaCl (NaOH -) on an agarose gel under neutral (Formamide -) or denaturing (Formamide +) conditions. (B) Densitometry traces of NaOH conditions from (A) are shown. (C) The rNMPs incorporation frequency was estimated as the median of fragment size distribution after alkaline treatment.

DNA damaging agents MMS, MMC, 4-NQO or H₂O₂ (Figure 29). After exposure to 20 µg/mL MMC, which provokes interstrand crosslinks, all strains grew normally. However, after incubation with higher MMC concentrations (30 and 100 µg/mL) none of the strains survived including the TbaWT and TbaΔ*TERMP_00517* strains (Figure 29). The exposition to 5 µM 4-NQO, a UV-mimetic inducing bulky adducts in DNA, reduced the viability of TbaWT and TbaΔ*TERMP_00517*. TbaΔ*polB* seems more sensitive to 5 µM 4-NQO than TbaWT and TbaΔ*TERMP_00517* and this sensitivity seems to be restored by Pab*polB* complementation (TbaΔ*polB* +Pab*polB*). The exposition to 4-NQO was lethal from 5 µM for TbaΔ*rnhII* and TbaΔ*rnhII* +Pab*rnhII* and from 10 µM for TbaWT, TbaΔ*TERMP_00517*, TbaΔ*polB* and TbaΔ*polB* +Pab*polB* (Figure 29). The DNA damages produced by MMC and 4-NQO are generally repaired by Nucleotide Excision Repair (NER) pathway which has not been described yet in *Archaea* (Grogan 2015; Marshall et al. 2020; White et al. 2018).

After exposure to MMS, a DNA alkylating agent known to cause base modifications and replication stress, TbaΔ*rnhII* and TbaΔ*rnhII* +Pab*rnhII* complementation grew normally in all conditions tested, while TbaΔ*polB* was sensitive to 0.1 % and 0.2 % MMS (Figure 29). Interestingly, the heterologous complementation of TbaΔ*polB* with Pab*polB* restored the resistance of TbaΔ*polB* +Pab*polB* cells to MMS. This enhanced survival was comparable to that of the TbaWT and TbaΔ*TERMP_00517* strains, confirming that TbaΔ*polB* sensitivity to MMS is due to the loss of PolB (Figure 29). The effect of exposure of TbaΔ*polB* and TbaΔ*rnhII* deletion strains to the oxidizing agent H₂O₂ resulted in reduced survival compared to TbaWT and TbaΔ*TERMP_00517* parent strain. Interestingly, the heterologous complementation of TbaΔ*polB* with Pab*polB* was resistant to 30 µM H₂O₂ whereas the heterologous complementation of TbaΔ*rnhII* with Pab*rnhII* has no effect (Figure 29). These results showed that the sensitivity of TbaΔ*polB* to H₂O₂ was due to the loss of PolB and that overexpression of PolB restored the resistance of the cells to H₂O₂. Therefore, these results suggest that PolB could have a role in oxidative stress response in *Thermococcales* cells. The DNA damages induced by H₂O₂ and MMS can be repaired by Base Excision Repair (BER) pathway, suggesting that PolB could be involved in BER.

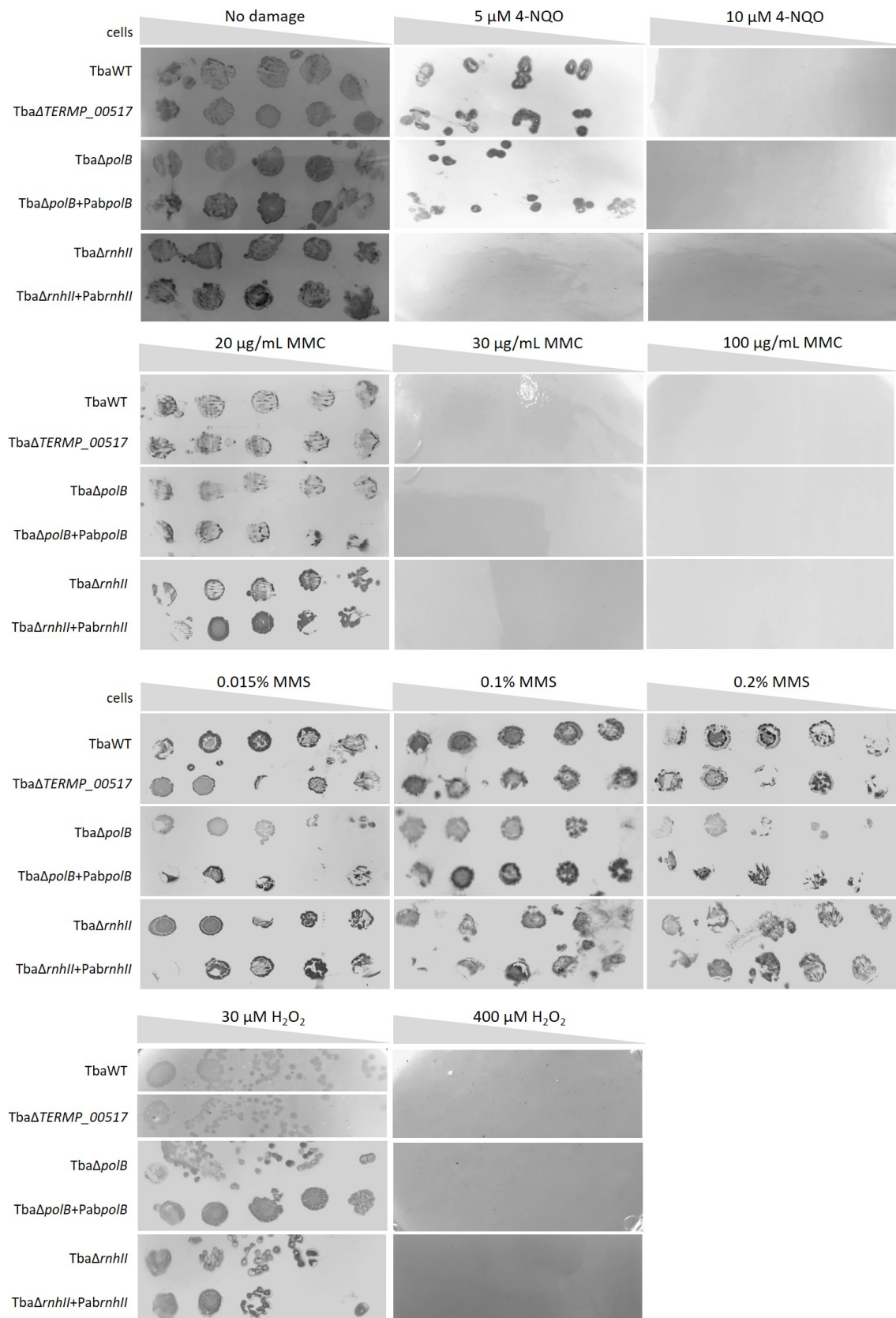


Figure 29: Sensitivity of RER mutants and their heterologous complementation after exposition to MMC, H₂O₂ or MMS.

A drop dilution assay was performed using TbaWT, TbaΔ*TERMP_00517*, TbaΔ*polB*, TbaΔ*rnhII*, TbaΔ*polB* +Pab*polB* and TbaΔ*rnhII* +Pabr*nhII*. 2 x 10⁶ to 2 x 10² cells (from left to right) were spotted on TRM medium after treatment with genotoxic agents. Cells are visualized by staining with Coomassie blue after transfer to PVDF membranes.

4 Discussion

Our results confirmed the conserved rNMP incision function of RNase HII/2 in RER in the three domains of life (Figure 28 and Lemor et al. 2018; Reijns et al. 2012; Malfatti et al. 2019). The sensitivity of Tba Δ *rnhII* to alkaline treatment showed the important role of RNase HII in the RER pathway (Figure 28). This increase in the rate of genomic rNMPs of Tba Δ *rnhII* compared to TbaWT were already observed in a previous study (Lemor et al. 2018). In our study the genomic ribonucleotides frequency in TbaRNase HII null cells was 1/1700 (Figure 28C), this result is consistent with the genomic ribonucleotides frequency in *Thermococcus kodakarensis* RNase HII null cells of 1/1500 (Heider et al. 2017). However, unlike mammals, RNase HII is not essential and no growth defects were observed in RNase HII-null cells in *Thermococcus barophilus* (Figure S8 and Birien et al. 2018) and in *Thermococcus kodakarensis* (Heider et al. 2017). Our data can't exclude the possibility that another protein, like Top1 in Eukaryotes, could substitute for RNase HII in archaeal RER pathway (Williams et al. 2013; Sparks et al. 2015; Reijns et al. 2012; Kim et al. 2011; Heider et al. 2017; Birien et al. 2018). The heterologous complementation of Tba Δ *rnhII* induces a genomic incorporation rate of rNMP almost equivalent to that of TbaWT showing that RNase HII function is conserved among *Thermococcales* (Figure 28).

As previously observed in Eukaryotes, PabFen1 endonuclease activity is more specific and active on double flap substrate compared to a single flap substrate (Figure S5). Our results corroborate with previous studies showing the same specificity of eukaryotic Fen1 for double flap substrates (Harrington et al. 1995; Kao et al. 2002). This substrate specificity is due to a recognition pocket conserved in Fen1 in *Archaea* and Eukaryotes. Accommodation of the 3'-flap in this pocket enhances cleavage activity and precise cutting (Chapados et al. 2004; Friedrich-Heineken 2004). It has already been observed that human and yeast Fen1 exonuclease activity can excise a ribonucleotide after RNase HII incision in the context of Okazaki fragment processing (Huang et al. 1996; B. Liu et al. 2017; Sato et al. 2003) but only two studies (Rydberg et al. 2002; Rumbaugh et al. 1997) suggest that the combination of Fen1 and RNase HII rNMP cleavage could potentially act to repair ribonucleotides. Therefore, we investigated the 5'→3' exonuclease activity of Fen1 individually on relevant RER substrates and by reconstituting the RER pathway. The data clearly showed rNMP removal by Fen1 after RNase HII incision (Figures 25 and 27). This suggests that PabFen1 could act on nicked templates in RER through an exonucleolytic pathway after RNase HII incision or on 5'-flap nicked templates in RER through a flap pathway after RNase HII incision and DNA Pol strand displacement synthesis (Figure 30). In yeast, the exonuclease Exo1 is thought to replace Fen1 for flap cleavage in the RER pathway although RER with Exo1 is less efficient than RER with Fen1 (Sparks et al. 2012). This model seems to be consistent with previous *in vivo* and *in vitro* functional evidences of Exo1 (Tran et al. 2002). More recently, it has been proposed that an RNase H2 and Exo1-mediated exonucleolytic pathway is involved in RNA-DNA primer removal from Okazaki fragments in eukaryotic cells (B. Liu et al. 2017). In *Bacteria*, after RNase HII incision, Pol I cut the rNMP either by its 5'-flap endonuclease activity or by its 5'→3' exonuclease activity (Vaisman et al. 2014). Comparatively, our results provide support for exonucleolytic or endonucleolytic pathways in RER which seem to exist in the three domains of life. Further studies are now required to investigate which pathways prevail in archaeal cells and whether there are relevant to Eukaryotes.

In our study, we observed that sealing activity of PabLig1 was very weak on a 5'-rAMP substrate (Figure 26), a weak sealing activity of eukaryotic DNA ligase I on 5'-rNMP substrates (Rumbaugh

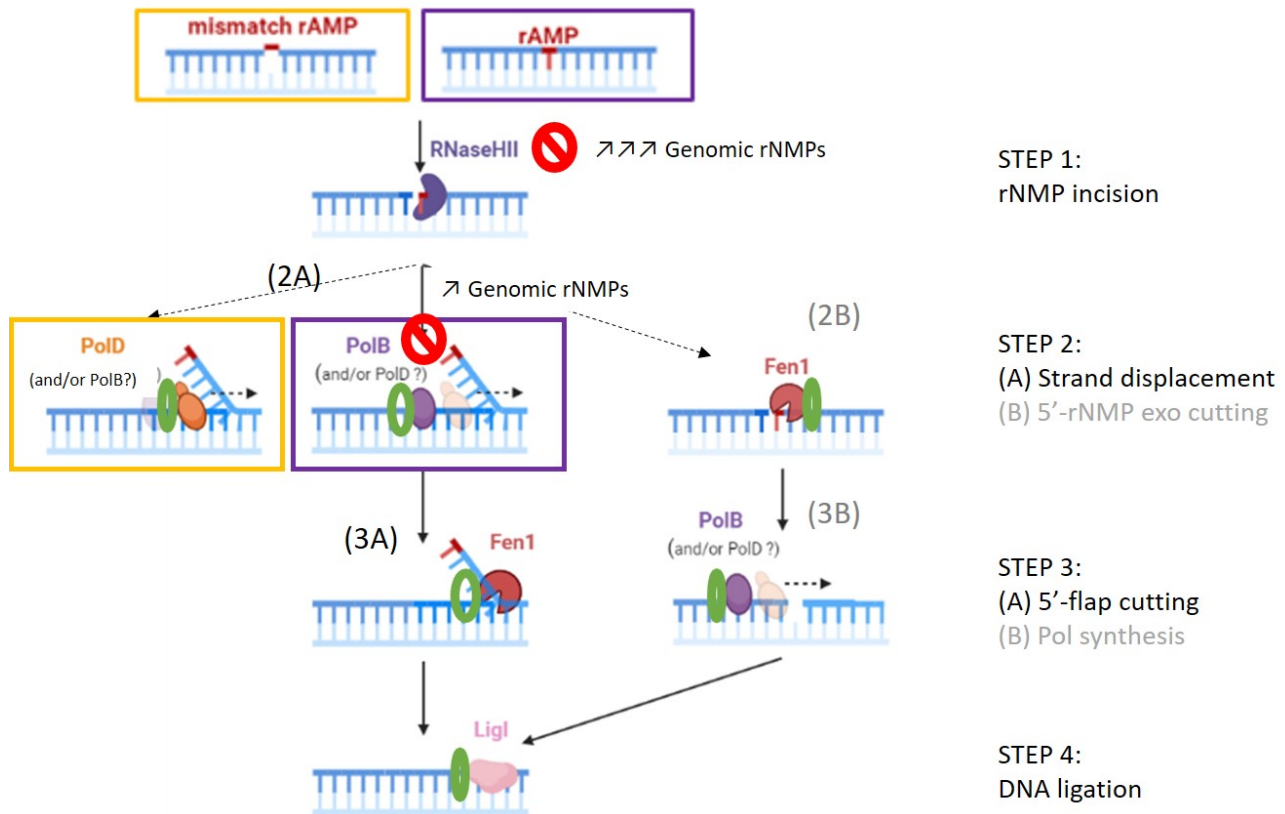


Figure 30: Proposed model for archaeal RNase HIII initiated RER pathway.

The archaeal RER pathway is efficient to repair matched (purple frame) or mismatched (orange frame) rNMP. The green ring represents the PCNA. The first step is the incision in 5' of the rNMP by RNase HIII. In the main pathway (STEP 2A), the second step is the strand displacement by PolB creating the rNMP containing flap cut by Fen1 endonuclease activity in the STEP 3A. In the second step, PolB can be replaced by PolD (which is more efficient for strand displacement of a mismatched 5'-rNMP). An alternative pathway (in grey) in which Fen1 5'→3' exonuclease activity cuts the rNMP after RNase HIII incision in STEP 2B, before PolB or PolD extension in STEP 3B, could be involved in RER. The final step is the sealing by Lig1 ending the RER pathway. The red circles represent the effect of PolB or RNase HIII deletion. Schema made with BioRender.

et al. 1997), and human DNA ligase I and III on a 5'-rGMP substrate were also previously observed. However, the activity of bacteriophage T4 ligase and *E. coli* LigA was similar on a 5'-rGMP compared to a 5'-dNMP (Tumbale et al. 2014). The ligation failure product observed during the sealing reaction of a 5'-rAMP containing substrate (Figure 26A 31-nt products) was also observed in the sealing reaction of a 5'-rGMP by human ligase I and III and bacteriophage T4 ligase (Tumbale et al. 2014). However, this ligation failure products were more important than ligation products for PabLig1 (Figure 26B). In human and yeast, the aprataxin deadenylase repairs the adenylated ligation failure products obtained on 5'-rNMP nicked substrate (Tumbale et al. 2014). The sealing of a 5'-mismatched dNMP or rNMP by PabLigI was also not efficient (Figure 26B). Human DNA Lig I and Lig III activities are very weak to seal a nick with a 3'-mismatched dNMP at the intracellular salt concentrations (Bhagwat et al. 1999). In our experimental conditions, PabPCNA was able to enhance PabLig1 sealing activity of a ribonucleotide and a mismatched deoxyribonucleotide (Figure 26). In human and yeast, the effect of PCNA on ligation activity by Lig1 is still not clear. Some studies showed that PCNA doesn't enhance Lig1 activity and suggest that the interaction between Lig1 and PCNA is more important for Lig1 recruitment than for the stimulation of Lig1 activity (Levin et al. 1997; Jónsson et al. 1998; Vijayakumar et al. 2007) whereas other show a stimulation of Lig1 activity by PCNA (Tom et al. 2001). Another study in the *Archaea Pyrococcus furiosus* demonstrated that the stimulatory or inhibitory effect of PCNA on Lig1 activity is dependent on salt concentration (Kiyonari et al. 2006). Therefore, it will be interesting to observe the effect of PabPCNA on PabLig1 activity at the cellular salt and ions concentrations to confirm the stimulation of DNA ligation of 5'-matched and mismatched rNMP as well as 5'-mismatched dNMP.

In a previous RER study carried out on matched rNMP embedded in dsDNA template in *Thermococcus* sp 9°N, the rNMP-corrected products were 5 times more important when RER was reconstituted with PolB compared to PolD (Heider et al. 2017). RER with both PolB and PolD corrected as many embedded rNMP as RER with PolB alone (Heider et al. 2017). In our work, RER pathway was 2.5-fold more efficient with PolB compared to PolD on a matched rNMP substrate and RER with both PolB and PolD was less efficient than RER with PolB alone (Figure 27E). Furthermore, the higher level of rNMPs embedded in genomic DNA of *Tba*Δ*polB* mutant strain than that of the *Tba*WT strain suggests that another Pol, probably PolD, may substitute for PolB in archaeal RER pathway (Figure 28). The RER efficiency difference observed in our study and Heider et al. 2017 study can be due to the rNMP base used for RER reconstitution (rAMP or rGMP respectively) and the different nucleotide concentrations used in the reaction (Pab intracellular dNTP concentrations in our study or 0.1 mM dNTPs in Heider et al. 2017 study). In both studies, RER pathway with PolB is more efficient to correct a matched rNMP than RER with PolD but in absence of PolB, PolD could act in RER to correct a sufficient amount of ribonucleotides to reach the level of embedded ribonucleotides tolerated by the cells (Figure 27 and Heider et al. 2017). In yeast, both Polδ and Polε can also act in RER but RER with Polδ is two times more effective than RER with Polε (Sparks et al. 2012). In *E. coli* Pol I could be substituted by Pol III in RER (Vaisman et al. 2014). The redundancy for Pol activities in RER seems to be conserved in all domains of life.

In this study we also assessed RER efficiency to correct a mismatched rNMP. We first showed that PabRNase HII was able to cleave a mismatched rAMP although less effectively compared to a matched rAMP (Figure 24). In contrast to our results, a previous study demonstrated that PabRNase HII

doesn't seem to cleave a mismatched rNMP (Malfatti et al. 2019). This divergent result can be explained by the different mismatched base used, rGMP/dAMP in Malfatti et al. 2019 study or rAMP/dCMP in our study and by the different time of reaction incubation used. This distinct RNase HII incision activity depending on the identity of the mismatched base could be due to a difference in affinity of RNase HII for the rGMP and the rAMP base or a difference in the accommodation of the mismatched bases in RNase HII active site. In future studies it will be interesting to assess PabRNase HII activity on different substrates to observe a potential cleavage efficiency depending on the mismatched base and to investigate the mechanism underlying PabRNase HII differential activities. RER pathway with PolD was more efficient to correct a mismatched rNMP compared to RER with PolB (Figure 27E). This result could be explained by the presence of a mismatch at the end enabling PolD strand displacement activity to be more efficient compared to a matched 5'-end. Indeed, PolD strand displacement activity of the downstream strand fully annealed to the template has been shown to be weak compared to PolB (Henneke 2012; Greenough et al. 2015; Hogrel et al. 2020).

We finally observed that PolB can be involved in the response to oxidative damage especially in BER pathway consistent with a previous study (Gehring et al. 2020). Indeed, Tba PolB-null cells were sensitive to MMS and H₂O₂ exposition. *PabpolB* overexpression (Tba Δ *polB* +*PabpolB*) leads to a restored resistance to H₂O₂ and MMS exposition (Figure 29). The loss of PolB in *Thermococcus kodakarensis* also leads to a sensitivity to MMS exposure (Kushida et al. 2019).

After exposure to 20 μ g/mL of MMC we didn't observe any difference of sensitivity between all the strains studied in this work, and no strains survived to 30 or 100 μ g/mL of MMC (Figure 29). In *Thermococcus kodakarensis*, cells resist to 30 μ g/mL of MMC (Kushida et al. 2019) and PolB-null cells were more sensitive to MMC than its parental strain (Kushida et al. 2019). Tba PolB-null cells were also sensitive to 4-NQO (Figure 29). Consistent with our results, the lack of PolB in *Thermococcus kodakarensis* is sensitive to UV-C and γ -ray irradiations (Kushida et al. 2019; Cubonova et al. 2013). Furthermore, our results showing a sensitivity to MMC and 4-NQO even for TbaWT strain (Figure 29) could be explained by the possible lack of NER in Tba. Indeed, NER pathway has not been described yet in *Archaea*.

5 Supplementary data

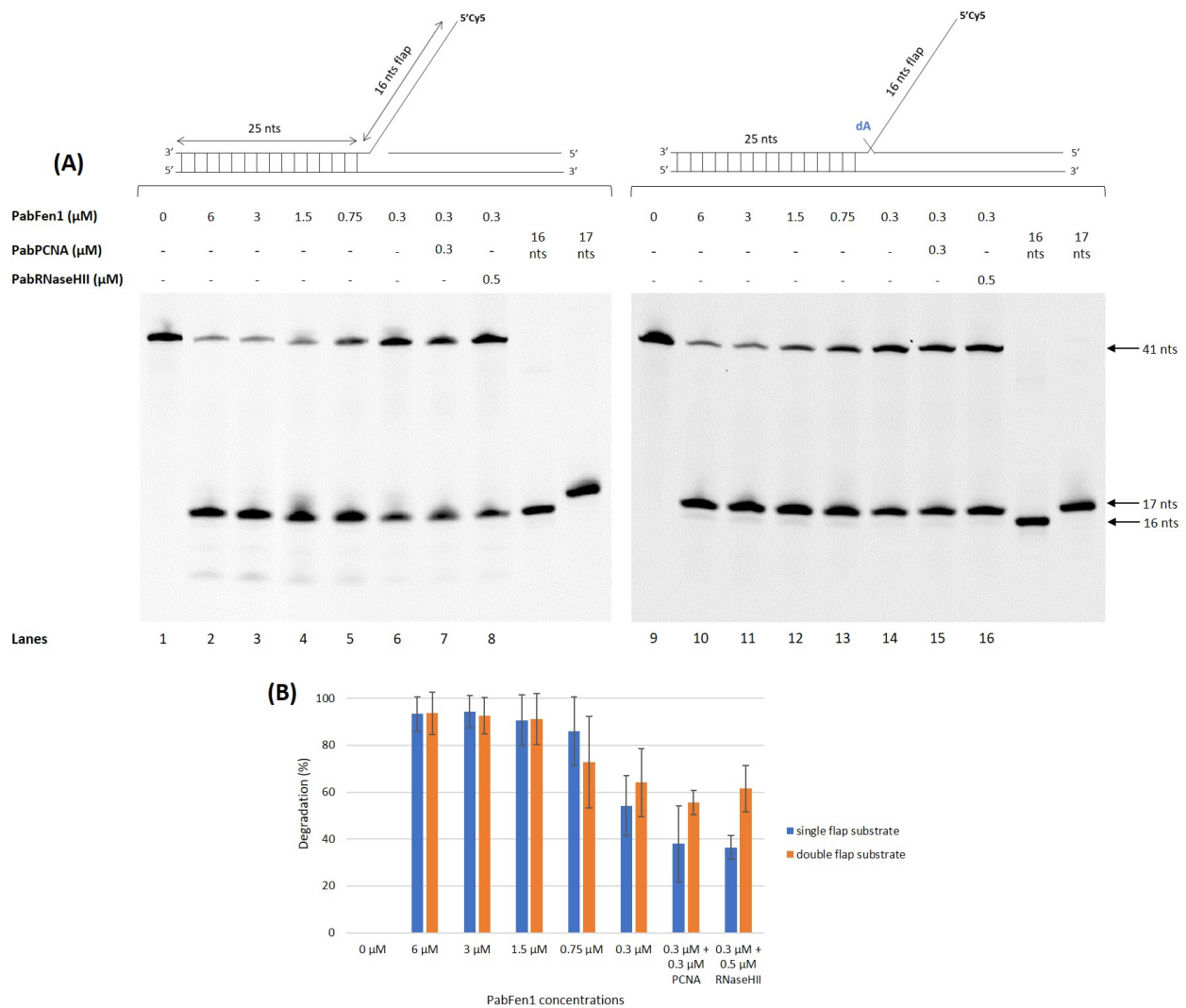


Figure S5: Enzymatic characterisation of PabFen1 on double flap and single flap substrates
 (A) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel. The reaction was realized with PabFen1 concentrations from 0.3 μM to 6 μM with or without 0.3 μM PabPCNA or 0.5 μM PabRNase HII. Lanes 1 and 9 correspond to negative control without enzymes. The reactions were done with Flap16:L32/L57 or Flap16:L33_dA/L57 (Table S2). (B) Histogram representing the percentage of PabFen1 endonuclease activity obtain by quantifications of (A).

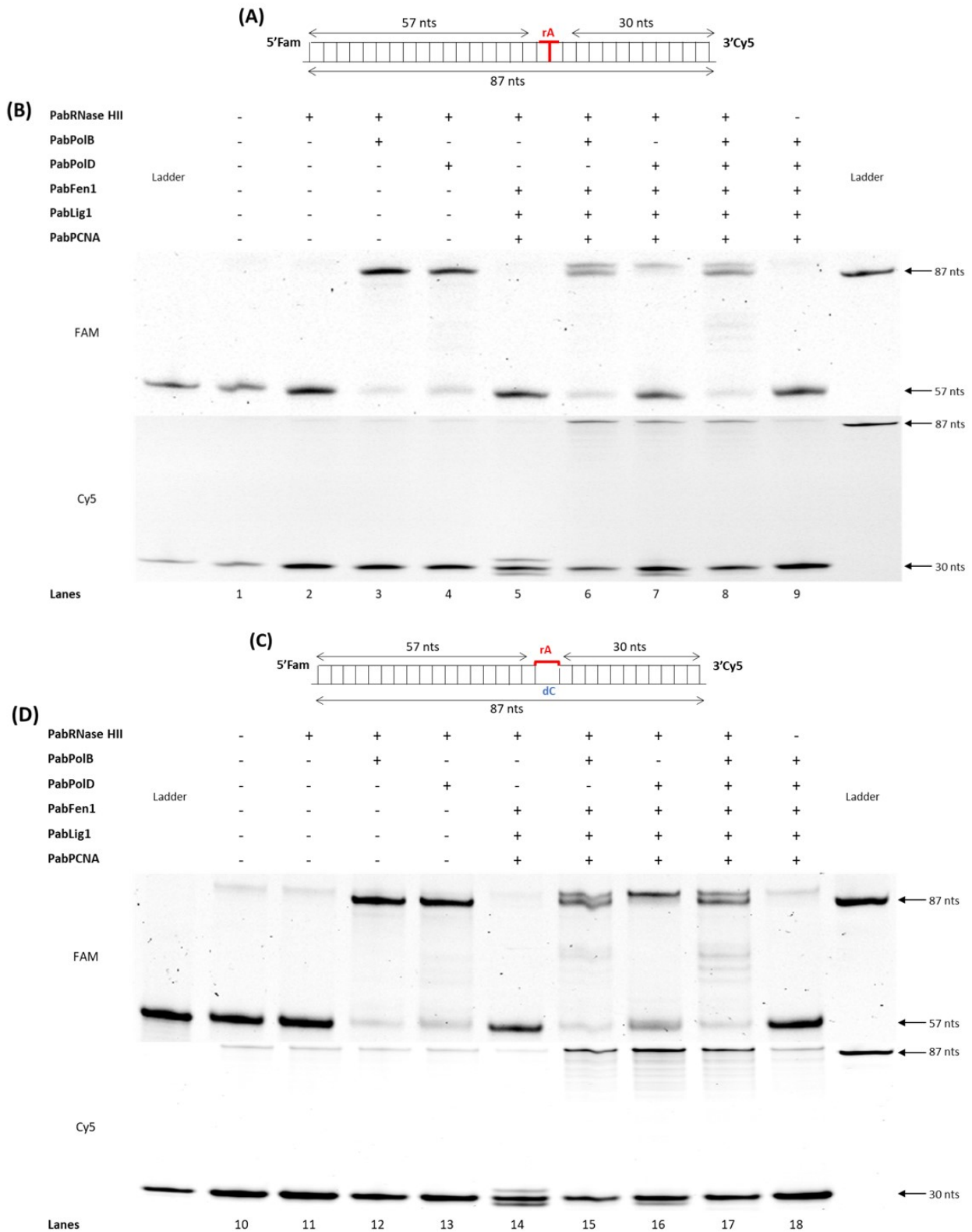


Figure S6: rNMP correction by RER pathway with PabPolB and PabPolD assessed by RNase HII treatment.

Lanes 1 and 10 correspond to negative control without enzymes. (A) Substrate L87_rA/L87_dT (Table S2). (B) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel of the RER reconstitution with the L87_rA/L87_dT substrate after RNase HII treatment. (C) Substrate L87_rA/L87_dC (Table S2). (D) Electrophoresis profile on a denaturing polyacrylamide gel of the RER reconstitution with the L87_rA/L87_dC substrate after RNase HII treatment

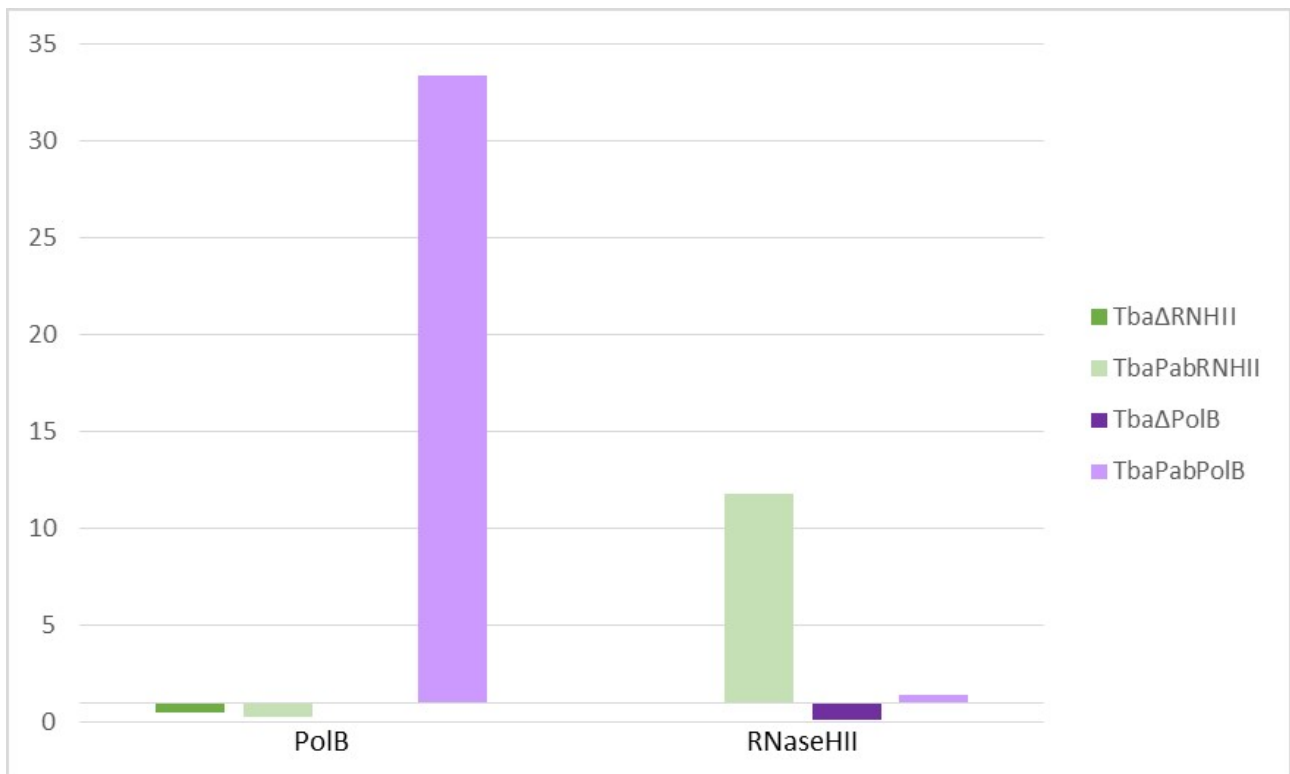


Figure S7: Relative quantification of PolB and RNase HIII expression in *TbaΔpolB*, *TbaΔrnhII*, *TbaΔpolB+PabpolB* and *TbaΔrnhII+PabrnhII* strains compared to *TbaWT* assessed by RT-qPCR. Downward bars represent downregulated mRNA compared to *TbaWT*, rising bars represent upregulated mRNA compared to *TbaWT*. The relative quantification was done on three independent experiments.

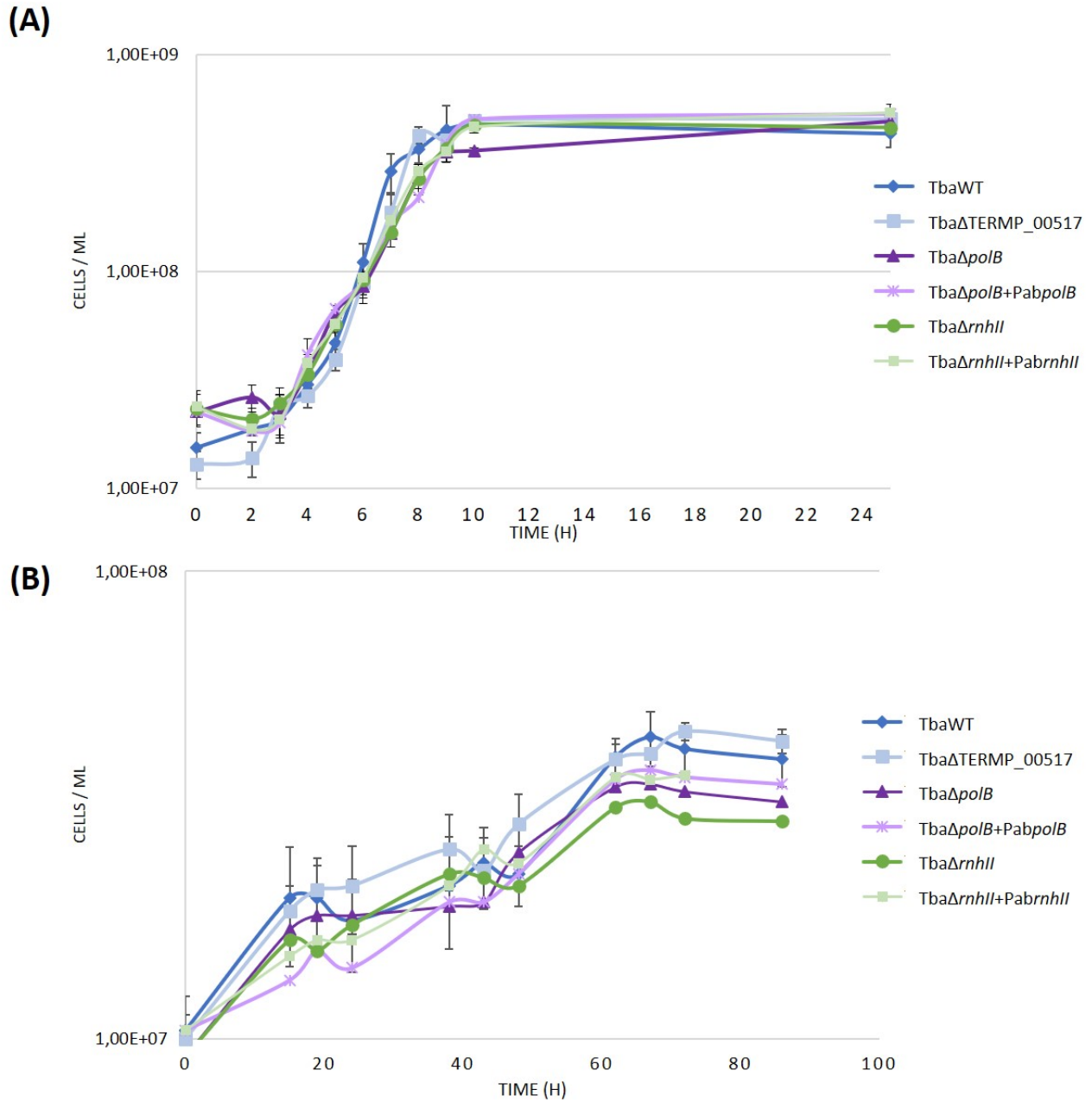


Figure S8: Growth curves of TbaWT, Tba Δ TERMP_00517, Tba Δ polB, Tba Δ rnhII, Tba Δ polB+PabpolB and Tba Δ rnhII+PabrnhII strains in TRM (A) or TAA (B) medium. The growth curves are the mean of three independent experiments and the error bars represent the standard deviation.

Type	Sequence 5' → 3'	Length	Label	Hybrid primer:(primer)/template
Flap16	AGATCATCAAGACTGCGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGA	41	5'Cy5	Flap16:L32/L57 Flap16:L33_dA/L57
L32	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA	32	/	Flap16:L32/L57
L33_dA	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAA	33	/	Flap16:L33_dA/L57
L57	TCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCA TGCAAGCTTGGCA	57	/	Flap16:L32/L57 Flap16:L33_dA/L57
L30_ra	aTTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG	30	3'Cy5	L30_ra:L57RC/L87 L30_ra:L57RC/L87_dC
L57RC	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGG GTACCGAGCTCGA	57	5'Fam	L30_ra:L57RC/L87
L87	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87	/	L30_ra:L57RC/L87
L30	ATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG	30	3'Cy5	L30:L57RC/L87 L30:L57RC/L87_dC
L87_rA	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGG GTACCGAGCTCGAaTTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG	87	5'Fam 3'Cy5	L87_rA/L87_dT L87_rA/L87_dC
L87_dT	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87	/	L87_rA/L87_dT
L87_dC	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	87	/	L87_rA/L87_dC L30:L57RC/L87_dC L30_ra:L57RC/L87_dC
L34_rA	GGATCCTaCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCA	34	5'Fam	L34_rA/L34_dT L34_rA/L34_dC
L34_dT	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGTAGGATCC	34	/	L34_rA/L34_dT
L34_dC	TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGCAGGATCC	34	/	L34_rA/L34_dC

Table S2: Oligonucleotide sequences used in this study
Deoxyribonucleotides are in capital letters and ribonucleotides are in lowercase letters.

Name	Sequence 5' → 3'	T _m (°C)	Mutant strain
PabPolB-Up	AAAAA <u>GCATGC</u> AGTCCCGAAATTAAGTGCAGGC	59	TbaΔPolB complemented by PabPolB
PabPolB-Do	AAAAA <u>CCCGGA</u> AAGAACTTGTAGTTGACTTAAAGGATCTCCG	61	
PabpromRNHII-Up	AAACGTCGGTAGGGTCTCCCTTTCTTGAGTTT	59	TbaΔRNHII complemented by PabRNHII
PabpromRNHII-Do	AAAAA <u>CTCGAG</u> TTATGTTCTCACTGCGATCAAGTTTATTGTATGG	59	
PabRNHII-Up	AAAAA <u>CCCGGA</u> AATCCACCTGGAGCAGTAGC	62	
PabRNHII-Do	GACCTACCGACGTTTCTAGGTTACTACTTCGACATTC	62	

Table S3: Primers used for mutant strains construction
Restriction sites used are in bold and underlined.

Name	Sequence 5' → 3'	Amplicon (bp)	Target
PCNA-Up	GCATGAGGGCAATGGATCCAA	198 pb	TbaPCNA
PCNA-Do	GGGTTACCTCAAGGAAGTTCTCCTCA		
30S-Up	AGTGGTGGCCGCTATTATTG	156	Tba and Pab 30S
30S-Do	TAGGATTTACCCCTACCCC		
TbaPolB-Up	AATTGATCTGCCGTATGTTGAGGTTGT	172 pb	TbaPolB
TbaPolB-Do	AATGAACAACCTCAGTCCTAATTTCTGAGC		
TbaRNHII-Up	TTCGCCATGCTCTTTGTAGTACTCC	223 pb	TbaRNaseHII
TbaRNHII-Do	CGAAATAATTGGGAAAGGCCTGAACCTCT		
PabPolB-Up	GAATACGACATACCCTTTGCGAAGC	170 pb	PabPolB
PabPolB-Do	CCTTCCTCGTCGGCGTAGC		
PabRNHII-Up	GAGTTAAGGATTCAAAGCAGTTGACGC	200 pb	PabRNaseHII
PabRNHII-Do	GTAGATAACTTCAGGCTTGACCTTCAGG		

Table S4: qPCR primers used for gene expression assessment.

Strains	Parent Strain	Nb of transformations	Clones screened
TbaΔRNaseHIIΔPolB	TbaΔRNaseHII (UBOCC-M-3303)	2	39
TbaΔPolBΔRNaseHII	TbaΔPolB (UBOCC-M-3302)	2	27

Table S5: Not viable mutants in our transformation conditions.

CHAPITRE IV

Nucleotide pool quantification of
Haloferax volcanii and *Thermococcus*
barophilus MP

PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE

Up to now, the precise analysis of the position, sequence context and hotspot of embedded ribonucleotides has been studied in yeast genomes (Balachander et al. 2020; Clausen et al. 2015; Daigaku et al. 2015; Koh et al. 2015) and in unicellular alga (El-Sayed et al. 2021). A Ribose-seq analysis was performed to measure ribonucleotide incorporation in different archaeal genomes (Y. Moalic et al, article in preparation) (Koh et al. 2015). That study was done in two archaeal strains *Thermococcus barophilus* MP (Tba) and *Haloferax volcanii* (Hvo). Both are *Euryarchaea*, Tba is hyperthermophile and anaerobic while Hvo is mesophile, halophile and aerobic (Marteinsson et al. 1999; Mullakhanbhai et al. 1975). The genome of Tba contains only one RNase H: RNase HIII while there are two RNase H in the genome of Hvo: RNase HI and RNase HIII. Tba and Hvo wild-type strains were compared to their RNase H derivative mutants: Tba Δ *rnhII*, Hvo Δ *rnhI*, Hvo Δ *rnhII*, Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII*. We first noticed that TbaWT genome contains around 26 times more embedded ribonucleotides than HvoWT genome (Figure 31A and 31B, grey bars). In the genome of RNase H mutants an increase of embedded rNMPs was observed comparatively to WT cells (Figure 31 grey bars) supporting the function of RNase H to remove ribonucleotides from DNA. In both Tba and Hvo RNase HIII null-cells, rCMP is the most incorporated while rUMP is the less incorporated in Tba Δ *rnhII* and Hvo Δ *rnhII* genomes (Figure 31A and 31B, green and red bars). In yeast RER deficient strain (carrying a mutation of the catalytic site of RNase H2) rCMP and rAMP are also the more incorporated in the genomes (Wanrooij et al. 2017).

We observed a slight increase of ribonucleotide in Hvo Δ *rnhI* genome (\simeq 1.4-fold higher than HvoWT), a more important increase in Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* (\simeq 17-fold higher than HvoWT) and the highest increase in Hvo Δ *rnhII* (\simeq 100-fold than HvoWT) (Figure 31B, grey bars). The genome of Tba Δ *rnhII* contains 4-fold more incorporated ribonucleotides than TbaWT (Figure 31A, grey bars).

To complete that Ribose-seq analysis, the intracellular nucleotide pool of TbaWT, HvoWT and their RNase H derivative mutants was quantified. Our aim is to investigate whether there is a correlation between the level and balance of intracellular rNTPs with the density and identity of rNMPs incorporated in the genome. The rNTP/dNTP intracellular ratio will be compared between WT and RNase H null-cells to observe any rNTP/dNTP ratio variation in the cells. The nucleotide intracellular pool quantification was done in collaboration with Professor Anders Hofer (Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umea University). This project led to a 1-month scientific stay in Anders Hofer's laboratory funded by ISBlue international mobility fellowship. The nucleotides were quantified by HPLC-UV which was initially used for yeast nucleotides quantification (Hofer et al. 1998). ATP is the nucleotide with the shortest half life time so the ATP/ADP ratio will be used as a control to validate the results (Varik et al. 2017).

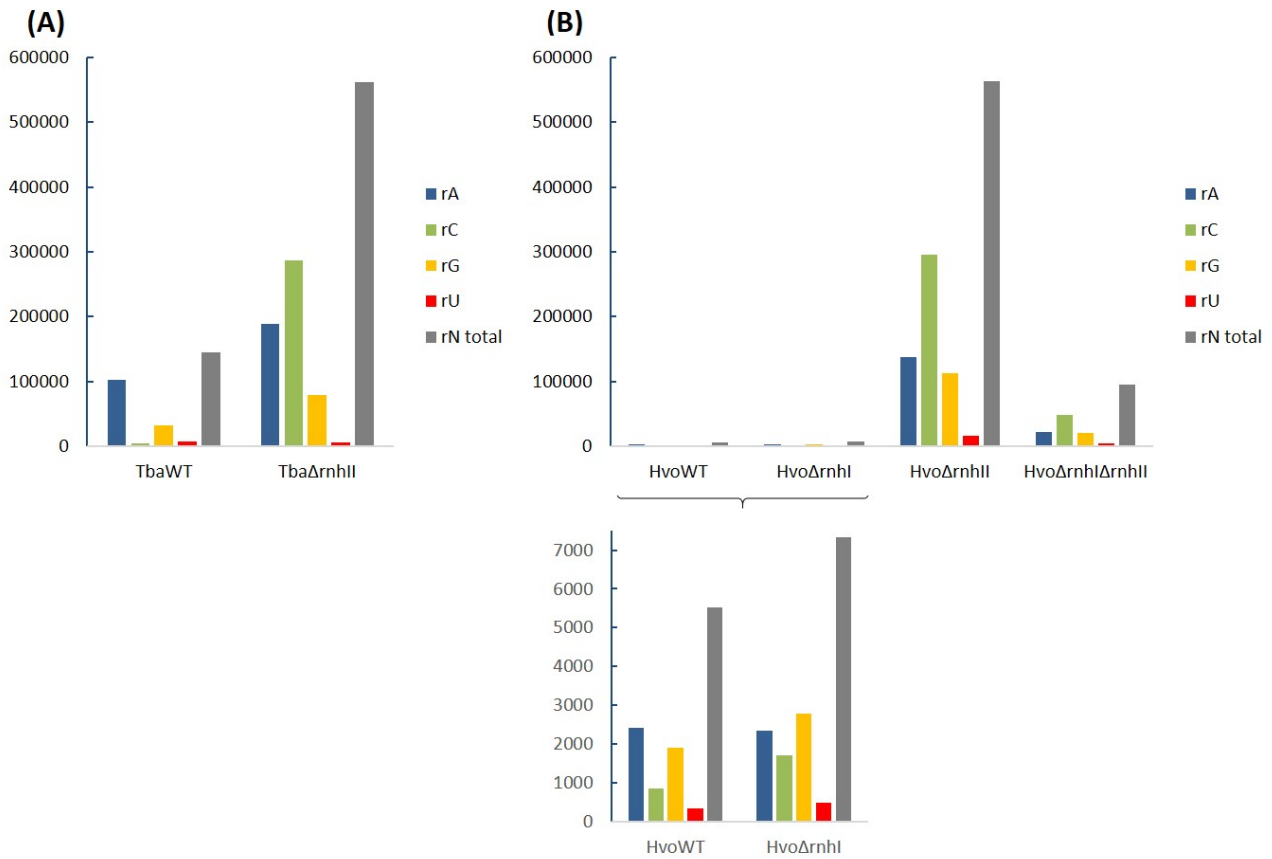


Figure 31: Ribonucleotides incorporated in the genomes of wild-type Tba, Hvo and their corresponding RNase H mutants measured by Ribose-seq (article in preparation, Y. Moalic, G. Henneke and F. Storici).

Level of ribonucleotides incorporation in TbaWT and TbaΔ*rnhII* genomes (A) and in HvoWT, HvoΔ*rnhI*, HvoΔ*rnhII* and HvoΔ*rnhI*Δ*rnhII*, the inset shows a magnification of HvoWT and HvoΔ*rnhI* genomic ribonucleotides (B).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

1 Culture and cell collection

HvoWT, Hvo Δ *rnhI*, Hvo Δ *rnhII* and Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* cells were grown at 42 °C in YPC medium as previously described (Meslet-Cladière et al. 2007; Allers et al. 2004). 200 mL of cells in logarithmic growth phase at density from 6.8×10^8 to 27.4×10^8 cells/mL were harvested by centrifugation for 5 minutes at 6000 g at 4 °C. Cell pellets were washed with 5 mL ice-cold NaCl solution (144 g/L) before centrifugation for 2 minutes at 6000 g at 4 °C. The supernatants were discarded and the cell pellets were used for nucleotide extraction.

Tba MP (UBOCC-M-3107) and Tba Δ *rnhII* (UBOCC-M-3303) cells were grown in a gas-lift bioreactor under anaerobic condition at 85 °C, in SME medium with a pH of 6.8 (Godfroy et al. 2000; Raven et al. 1992; Raven et al. 1997). Logarithmically growing cultures at a cell density from 2.8×10^8 to 5.4×10^8 cells/mL were harvested by centrifugation for 5 minutes at 15 000 g at 4 °C. Each cell pellet was immersed in 100 μ L ice-cold NaCl solution (NaCl 14 g/L, 2 % glucose) under anaerobic conditions before nucleotide extraction. The immersion step was include for Tba cells because it helped to increase the final yield of the nucleotides.

2 Nucleotide Extraction and HPLC analysis

The nucleotide extraction protocol was adapted from Hofer et al. 1998. For Hvo strains, cell pellet were resuspended in 500 μ L of ice-cold 12 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and 15 mM MgCl₂ solution. For Tba strains, 100 μ L ice-cold 24 % (w/v) TCA and 30 mM MgCl₂ solution was added to each tube (containing 100 μ L NaCl-glucose solution) and the content was mixed under anaerobic conditions by pipetting up and down. The cells were flash frozen in liquid nitrogen and incubated for 15 minutes with stirring at 4 °C. This flash-freezing step was performed one time for Hvo strains and three times for Tba strains. In the case of Tba, the content of three tubes were pooled resulting in a sample volume of 600 μ L.

The supernatant of each sample was collected by centrifugation for 1 min at 18 000 g at 4°C and extracted by 750 μ L of Freon-Trioctylamine solution (75.2 % v/v Trichlorotrifluorethane ; 21.8 % v/v Trioctylamine). After centrifugation, the aqueous phase (upper phase) containing the nucleotides was collected and subjected to a second extraction with 500 μ L of Freon-Trioctylamine solution. The upper phase was saved and the pH was confirmed to be above 5 by spotting 0.2 μ L on a pH paper. The resulting solution was finally purified by solid phase extraction as described before prior to HPLC analysis (Ranjbarian et al. 2021). Nucleotide analysis was performed by the Fast HPLC protocol in which ADP, and all eight NTPs and dNTPs are separated in a single run on a reverse phase column in the presence of tetrabutylammonium ions as ion pairing agent (Ranjbarian et al. 2021). The quantification of the nucleotides was then performed by comparing the peak areas for abundant nucleotides (ADP and NTPs) and peak heights for dNTPs to a nucleotide standard. Three independent

cells collection (from the same bioreactor culture for Tba samples or from three independent cultures for Hvo samples) and quantification of dNTPs and rNTPs were performed.

RESULTS

1 Hvo nucleotide pool quantification

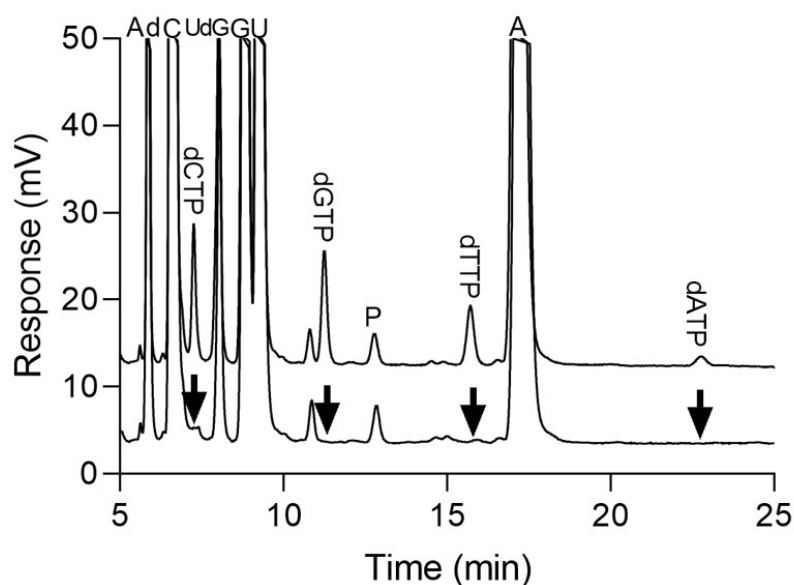


Figure 32: DNA polymerase assay to control *Haloferax volcanii* wild-type dNTP pool quantification. Two chromatograms showing HvoWT sample (top chromatogram) and Hvo sample treated with DNA polymerization reagents (bottom chromatogram): M13 DNA, primers (random decamers) and Klenow DNA polymerase. The arrows in the bottom chromatogram show the specific removal of dNTPs.

The intracellular nucleotide pool was quantified for Hvo WT and Hvo RNase H mutants. The ATP/ADP ratio was high enough (≈ 8.5 in HvoWT strain) to sustain the results obtained (Varik et al. 2017). It was determined in *Bacteria* and Eukaryote cells that the ATP/ADP ratio should be above 5, and values of ≈ 10 or higher are recommended for reliable results (Varik et al. 2017; Pogolotti et al. 1982; Ranjbarian et al. 2021). Moreover, a DNA polymerase-dependent dNTP confirmation assay was performed on HvoWT samples. This assay allows to confirm that no other components (e.g. NADPH degradation products observed in TCA extracted samples) co-elute with the dNTP peaks observed in the chromatograms (Ranjbarian et al. 2021). All dNTP peaks disappear upon Klenow DNA polymerase treatment demonstrating that there are no other compounds interfering with the analysis of dNTPs (Figure 32) (Ranjbarian et al. 2021).

For all Hvo strains, ATP is the most abundant while GTP the lowest (Figure 33A blue and yellow). The relative quantities of dNTPs ($dCTP \approx dGTP \approx dTTP > dATP$) are the same in HvoWT and Hvo RNase H mutants whereas those of rNTPs differ between HvoWT ($ATP \approx CTP$

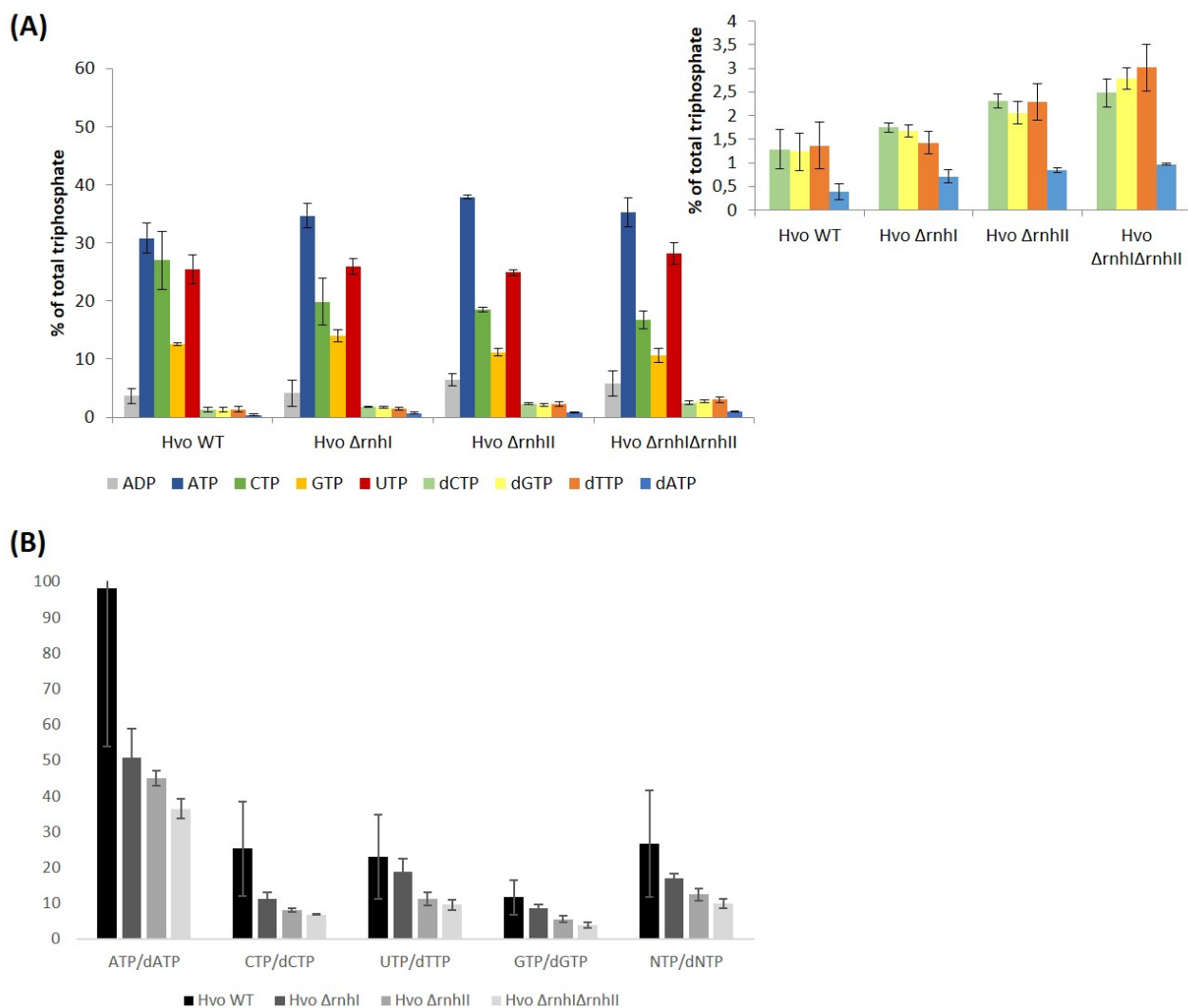


Figure 33: Nucleotide pool quantification from wild-type Hvo cells and corresponding RNase H mutants cells

(A) ADP, NTPs and dNTPs from wild-type Hvo cells (WT) as well as single and double mutants of RNase HI and RNase HII. The inset shows a magnification of the dNTP pools. The results are plotted as a percentage of the total triphosphate pool (i.e. ATP, CTP, GTP, UTP, dCTP, dGTP, dTTP and dATP). (B) The results in A are replotted as the ratio of each NTP to the corresponding dNTP. Each bar represents an average of three independent experiments with standard errors indicated.

\simeq UTP > GTP) and Hvo RNase H mutants (ATP > UTP > CTP > GTP) (Figure 33A). The main difference observed between Hvo strains is a slight decrease of CTP level in RNase H mutants compared to WT (Figure 33A, green bars). This slight CTP decrease in RNase H mutants could be due to CTP incorporation in DNA. Indeed, the Ribose-seq analysis showed that CTP is the rNMP the more incorporated in Hvo Δ *rnhII* and Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* genomes (Figure 31B, green bars). The total rNTP content is 27-fold, 17-fold, 12-fold or 10-fold higher than total dNTP content for HvoWT, Hvo Δ *rnhI*, Hvo Δ *rnhII* or Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* respectively (Figure 33B). In a global way, we notice that the four dNTP levels increase in Hvo RNase H mutants compared to HvoWT. The greatest total dNTP level increase is observed for Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* mutant (Figure 33A). The rNTP/dNTP ratios vary between 12 (GTP/dGTP) and 98 (ATP/dATP) for HvoWT, between 9 (GTP/dGTP) and 51 (ATP/dATP) for Hvo Δ *rnhI*, between 6 (GTP/dGTP) and 45 (ATP/dATP) for Hvo Δ *rnhII* and between 4 (GTP/dGTP) and 36 (ATP/dATP) for Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* (Figure 33B). Furthermore, the rNTP/dNTP ratios are between 2 and 3 times higher in HvoWT compared to Hvo RNase H mutants, except the UTP/dTTP ratio which is only 1.2 times higher in HvoWT compared to Hvo Δ *rnhI* (Figure 33B). Taken together, these results are consistent with the higher propensity for rNMP incorporation in the genome of Hvo RNase H mutants compared to HvoWT cells as observed by Ribose-seq (Figure 31B).

2 Tba nucleotide pool quantification

For Tba nucleotide pool level, the cell collection and nucleotide extraction methods required optimization. We first assessed several nucleotide extraction solutions: organic solvent (composed of acetonitrile or mix of acetonitrile and methanol) or acid solution (composed of TCA-MgCl₂). The extraction with organic solvent reduced triphosphate groups degradation compared to acid extraction with TCA-MgCl₂ (Rabinowitz et al. 2007; Grob et al. 2003; Palmer et al. 1994). Nucleotides were only detected with TCA-MgCl₂ extraction solution but their concentration was too low to be quantified. Then we tried different extraction methods to improve the nucleotide concentration. The best results were obtained upon cell washing with NaCl solution (14 g/L, two times less concentrated compared to SME medium) before extraction in TCA-MgCl₂ solution for 15 minutes with stirring at 4°C. The cells were then flash frozen and thawed three times in liquid nitrogen to enhance TCA extraction (results not shown). With this optimized method the nucleotide concentration was sufficient to be quantified by HPLC-UV. However, the low ATP/ADP ratio obtained indicating a nucleotide degradation during cell collection and extraction steps prevented us to validate the results (Varik et al. 2017; Pogolotti et al. 1982). It was shown in *Escherichia coli* that cell collection by centrifugation can induce a higher nucleotide degradation than cell collection by filtration (Varik et al. 2017). We tried to collect archaeal cells by filtration to avoid the degradation of nucleotides but the rich medium led to a slower filtration and a lower cell concentration compared to centrifugation. For Tba cell collection, centrifugation is thus more suitable than filtration as previously shown for *Pyrococcus abyssi* (Ralec 2013). To improve the ATP/ADP ratio we reduced centrifugation time from 1 hour to 5 min by increasing the centrifugal force and cells were immediately resuspended in washing solution (NaCl 14 g/L, 2 % glucose) under constant nitrogen flushing. This precludes any usage of anaerobic chamber and allowed us to reduce time of the cell collection step. These optimization steps resulted in a sufficient concentration of dNTPs and rNTPs to be quantified and a better ATP/ADP ratio as a control.

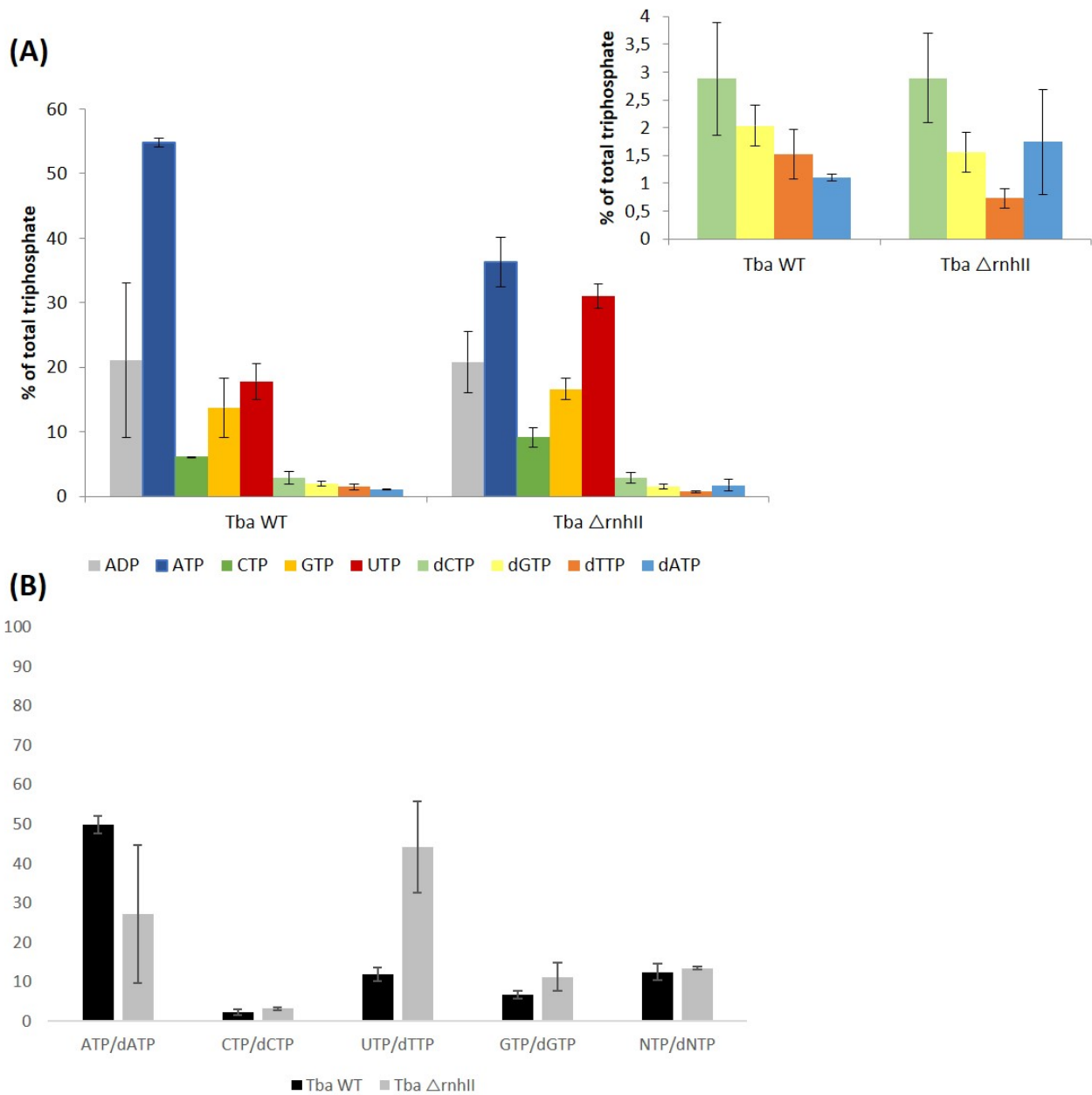


Figure 34: Nucleotide pool quantification from wild-type Tba cells and corresponding RNase H mutant cells

(A) ADP, NTPs and dNTPs from wild-type Tba cells (WT) as well as RNase HIII mutant. The inset shows a magnification of the dNTP pools. The results are plotted as a percentage of the total triphosphate pool (i.e. ATP, CTP, GTP, UTP, dCTP, dGTP, dTTP and dATP). (B) The results in A are replotted as the ratio of each NTP to the corresponding dNTP. Each bar represents an average of three independent experiments with standard errors indicated.

The ATP/ADP ratio of $\simeq 3$ for TbaWT is still below the threshold of 5 to validate the results (Varik et al. 2017; Pogolotti et al. 1982; Ranjbarian et al. 2021). However, this threshold was determined for *Escherichia coli* and Eukaryotic cells and may not be the most suitable for archaeal cells. Furthermore, during these experiments Tba cells were grown and collected at atmospheric pressure which can cause stress to the cells and could also explain the lower ATP/ADP ratio.

The relative quantities of dNTPs differ between TbaWT (dCTP > dGTP > dTTP > dATP) and Tba Δ *rnhII* (dCTP > dATP \simeq dGTP > dTTP) whereas those of rNTPs (ATP > UTP > GTP > CTP) are the same in TbaWT and Tba Δ *rnhII* (Figure 34A). The main differences observed are the decrease of ATP level and the increase of UTP level in Tba Δ *rnhII* compared to TbaWT (Figure 33A blue and red). Consistent with these results, UTP is slightly more incorporated in TbaWT than Tba Δ *rnhII* (Figure 31A, red bars) whereas ATP is $\simeq 1.8$ -fold more incorporated in Tba Δ *rnhII* than TbaWT (Figure 31A, blue bars). For dNTPs we also observe a decrease of dTTP and an increase of dATP in Tba Δ *rnhII* compared to TbaWT (Figure 33A light blue and light red). However, the CTP intracellular concentration is similar in TbaWT and Tba Δ *rnhII* (Figure 34A, green bars) whereas the CTP is 72-fold more incorporated in Tba Δ *rnhII* than TbaWT genome (Figure 31A, green bars). The total rNTP content is 13-fold higher than the total dNTP content for TbaWT and Tba Δ *rnhII*. In particular, the rNTP/dNTP ratios vary between 3 (CTP/dCTP) and 50 (ATP/dATP) or 44 (UTP/dTTP) for TbaWT or Tba Δ *rnhII* respectively. The rNTP/dNTP intracellular ratios are higher for Tba Δ *rnhII* compared to TbaWT except for the ATP/dATP ratio. The largest difference is observed for the UTP/dTTP ratio 3.5 times higher for Tba Δ *rnhII* compared to TbaWT (Figure 34B).

DISCUSSION

1 Comparison of nucleotide pools from HvoWT, TbaWT and their derivative RNase H mutants cells

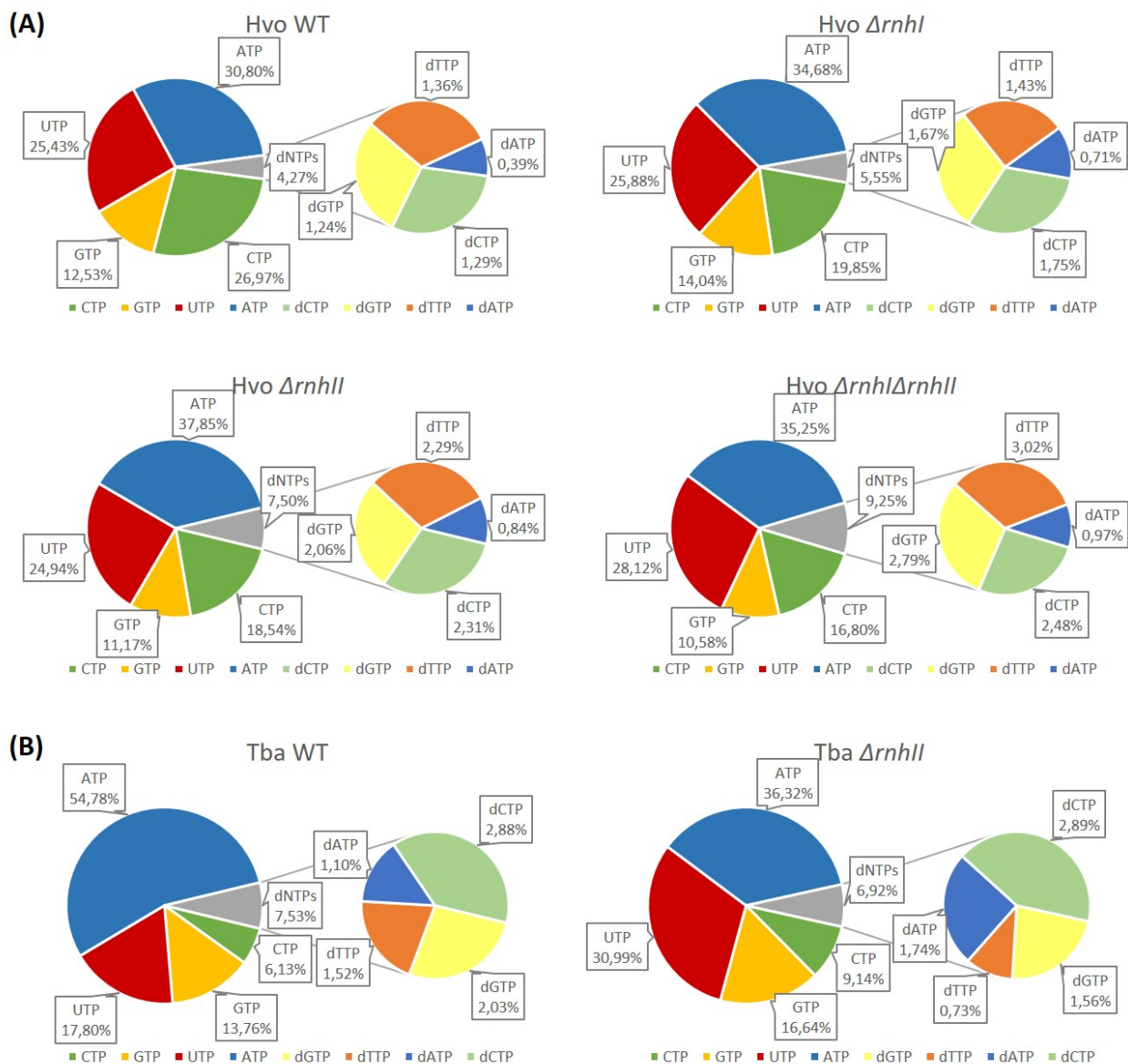


Figure 35: Comparison of nucleotide pools of *Haloferax volcanii*, *Thermococcus barophilus* and their derivative RNase H mutants

Nucleotide pool of HvoWT and its RNase H derivative mutants (A), compared to *Thermococcus barophilus* and its RNase H derivative mutant (B).

RNase HII deletion in Tba or Hvo cells does not have the same effect on the intracellular nucleotide pools. In Hvo, RNase HII deletion causes an increase in the total dNTPs level of about 2 times compared to the wild-type, whereas in Tba, the total dNTPs level is similar in RNase HII mutant and the wild-type (Figure 35). As observed for Tba cells, the deletion of the catalytic subunit of RNase H2 didn't affect the dNTP level in yeast (Wanrooij et al. 2017). However, a slight increase of dNTP pool has been observed in a strain carrying a mutation of the catalytic subunit of RNase H2 along with a mutation in the active site of Pol ϵ leading to an increase of rNMPs incorporation (Williams et al. 2013). An increase of the dNTP pool has already been observed after several types of DNA damaging stress in yeast (Chabes et al. 2003) and in *E.coli* (Gon et al. 2011). In our study, the Ribose-seq analysis showed that embedded ribonucleotides in genomic DNA were \simeq 4-fold higher in Tba Δ *rnhII* and \simeq 100-fold higher in Hvo Δ *rnhII* than in TbaWT and HvoWT respectively (Figure 31). The higher increase of rNMP incorporation in Hvo Δ *rnhII* may lead to higher rate of mutations than in Tba Δ *rnhII* and could explain the increase of dNTP pool observed in Hvo Δ *rnhII* and not in Tba Δ *rnhII*. Similarly, previous studies showing an increase in dNTP pool in response to DNA damages (Chabes et al. 2003; Gon et al. 2011). Moreover, it has been shown in yeast that an alteration in dNTP pool didn't have an effect on the rNMP incorporation in WT genome but leads to a different pattern of rNMP incorporation in the genomes of cells carrying a mutation of the catalytic subunit of RNase H2 (Wanrooij et al. 2017).

The total rNTP content is similar in TbaWT and Tba Δ *rnhII* (Figure 34B, NTP/dNTP ratio) whereas it is higher in HvoWT compared to Hvo RNase H mutants (Figure 33B, NTP/dNTP ratio). Regarding the rNTP pool, the main difference observed when RNase HII is deleted in Hvo is a decrease in CTP compared with the wild-type, whereas in Tba the main differences are a decrease in ATP and an increase in UTP compared to the wild-type. We also noticed that the rNTP/dNTP ratios are lower in Hvo Δ *rnhII* compared to HvoWT (Figure 33B) whereas the rNTP/dNTP ratios are higher in Tba Δ *rnhII* compared to TbaWT except for ATP/dATP ratio (Figure 34B).

2 Correlation between nucleotide pool and level of embedded ribonucleotides in the genomes of Tba, Hvo and their relative RNase H mutants

We first observed that TbaWT genome contains around 26 times more embedded ribonucleotides than HvoWT genome (Figure 31) and the intracellular NTP/dNTP ratio is around 3 times higher in HvoWT compared to TbaWT (Figures 33B and 34B). The slight decrease of rNTP pool observed in Hvo Δ *rnhII* compared to HvoWT (Figure 35A) is consistent with the high increase (\simeq 100-fold) of ribonucleotide incorporation in Hvo Δ *rnhII* genome compared to HvoWT (Figure 31). In Tba Δ *rnhII* cells the rNTP pool is similar to TbaWT in accordance to the smaller increase (\simeq 4-fold) of ribonucleotide incorporation in Tba Δ *rnhII* compared to TbaWT than the one observed for Hvo Δ *rnhII* cells (Figure 31).

In both Hvo and Tba WT strains, rAMP is the more incorporated in genomic DNA (Figure 31). In Chapter II, we confirmed previous results showing that only PolD seems to incorporate rNMPs in Pab genomic DNA (Figure 18 and Lemor et al. 2018). Moreover, the main genomic rAMP incorporation we observed in Ribose-seq analysis is consistent with previous *in vitro* results indicating that PolD incorporates mostly rAMP during DNA synthesis (Lemor et al. 2018).

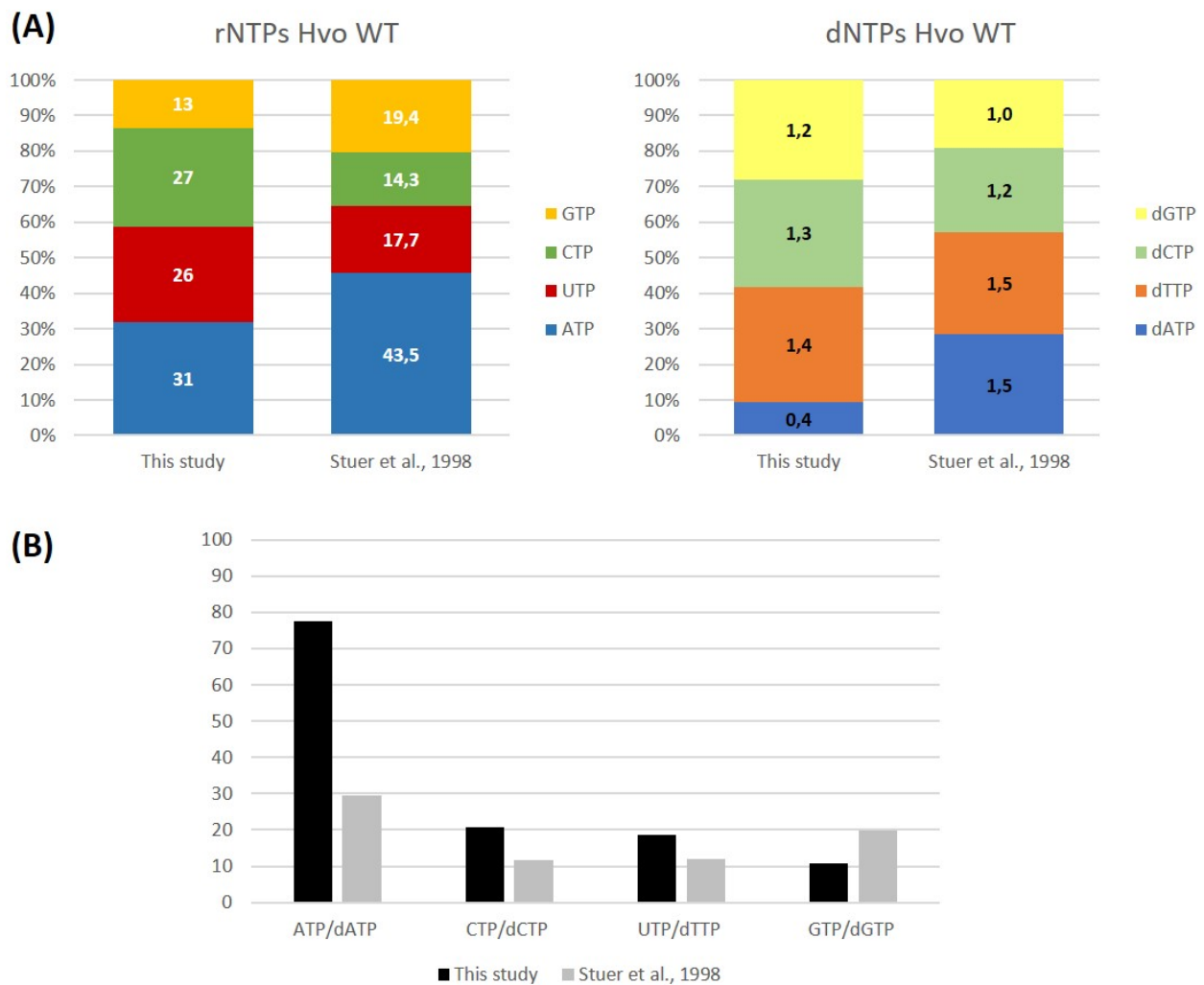


Figure 36: Comparison of nucleotide pools from wild-type *Haloferax volcanii* by two methods (A) Nucleotide pool quantification from HvoWT by HPLC-UV (this study) compared to detection of radioactive labelled phosphates by thin layer chromatography (Stuer-Lauridsen et al. 1998). (B) rNTP/dNTP intracellular ratios of HvoWT obtained by HPLC-UV (this study) compared to detection of radioactive labelled phosphates by thin layer chromatography (Stuer-Lauridsen et al. 1998).

In *Tba* Δ *rnhII* and *Hvo* Δ *rnhII* genomes rCMP is the more incorporated (72-fold and 345-fold more incorporated than in *Tba*WT and *Hvo*WT respectively). A decrease of rCTP pool (\simeq 1.5-fold) and an increase in dCTP pool (\simeq 1.8-fold) are observed in *Hvo* Δ *rnhII* compared to *Hvo*WT consistent with the rCMP incorporation in the genome of *Hvo* Δ *rnhII* (Figures 31 and 33A). However, in *Tba* Δ *rnhII* the intracellular rCTP pool is 1.5-fold higher than in *Tba*WT, thus the intracellular rNTP pool of *Tba* Δ *rnhII* doesn't seem to be correlated with the rNMP incorporation observed (Figures 31 and 34A). Moreover, the main differences observed between the nucleotides pool of *Tba* Δ *rnhII* and *Tba*WT are the rATP and rUTP pool ratios (Figure 35B). The Ribose-seq analysis indicates that rAMP and rGMP have a similar rate of genome incorporation (57-fold and 60-fold more incorporated in *Tba* Δ *rnhII* than *Tba*WT genomes respectively) and that rUMP is slightly less incorporated than rAMP and rGMP (48-fold more incorporated in *Tba* Δ *rnhII* than *Tba*WT genomes) (Figure 31). This lack of correlation between the more incorporated ribonucleotide bases and their intracellular pool level observed could be explained by the incorporation of mismatched ribonucleotides in *Tba* genome. As seen previously in Chapters II and III, several evidences support the possibility of the presence of mismatched ribonucleotides in DNA (Lemor et al. 2018; Shen et al. 2012). The analyses of the Ribose-seq data to confirm this hypothesis are currently in progress.

3 Comparison of Hvo nucleotide pool quantification with two different methods

The evaluation of nucleotide pool in *Hvo*WT cells has been previously achieved by thin layer chromatography which consisted of quantifying radioactive labelled phosphates (Stuer-Lauridsen et al. 1998). In comparison with the previous results, the level of dNTPs is quite similar while it is different for rNTPs (Figure 36A and 36B). The main differences are CTP level higher in our study compared to Stuer-Lauridsen et al. 1998 and the ATP level higher in Stuer-Lauridsen study compared to our study (Figure 36A). Differences in nucleotide pool quantification depending on the method used have already been observed (Lemor 2017), therefore in the following section we will compare the nucleotides pool quantification from different organisms obtained by HPLC-UV only.

4 Comparison of nucleotide pool of organisms belonging to the three domains of life

To go further in the analysis, we also compared *Hvo*WT nucleotide pool with other organisms using HPLC-UV methodology (Figure 37). Although the nucleotide pools are specific for each organism, we observed that ATP for ribonucleotides, and dTTP for deoxyribonucleotides, are the highest in all organisms (except dTTP in *Tba*) (Figure 37A). It appears that *Hvo* cells have the lowest ATP level compared to other organisms (Figure 37A). The total rNTP content in *Halofera**x volcanii*, *Thermococcus barophilus* and *Pyrococcus abyssi* is between 12 and 23 times higher than the total dNTP content. The total rNTP/dNTP ratio of the *Archaea Halofera**x volcanii*, *Thermococcus barophilus* and *Pyrococcus abyssi* is therefore close to that of *Escherichia coli*. In contrast, the total rNTP/dNTP ratio of the *Archaea Sulfolobus solfataricus* (79:1) is close to that of *Saccharomyces cerevisiae* (82:1). Moreover, the ATP/dATP is the higher ratio for all organisms studied and the lower ratio differs between organisms, CTP/dCTP for *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pyrococcus abyssi* and *Thermococcus*

barophilus, UTP/dTTP for *Sulfolobus solfataricus* and GTP/dGTP for *Haloferax volcanii*. Among the *Archaea*, the two hyperthermophile *Euryarchaea* *Pyrococcus abyssi* and *Thermococcus barophilus* have the closest nucleotide pool concentration (Figure 37A). *Sulfolobus solfataricus* is also an hyperthermophile but belongs to the *Crenarchaea* and its nucleotide pool differs from other *Archaea* studied here. The mesophilic *Euryarchaea* *Haloferax volcanii* also has a different nucleotide pool than other *Archaea* studied here (Figure 37A). In *Archaea*, it is possible that nucleotide pool could be influenced by the environmental growth conditions such as temperature as well as phylum.

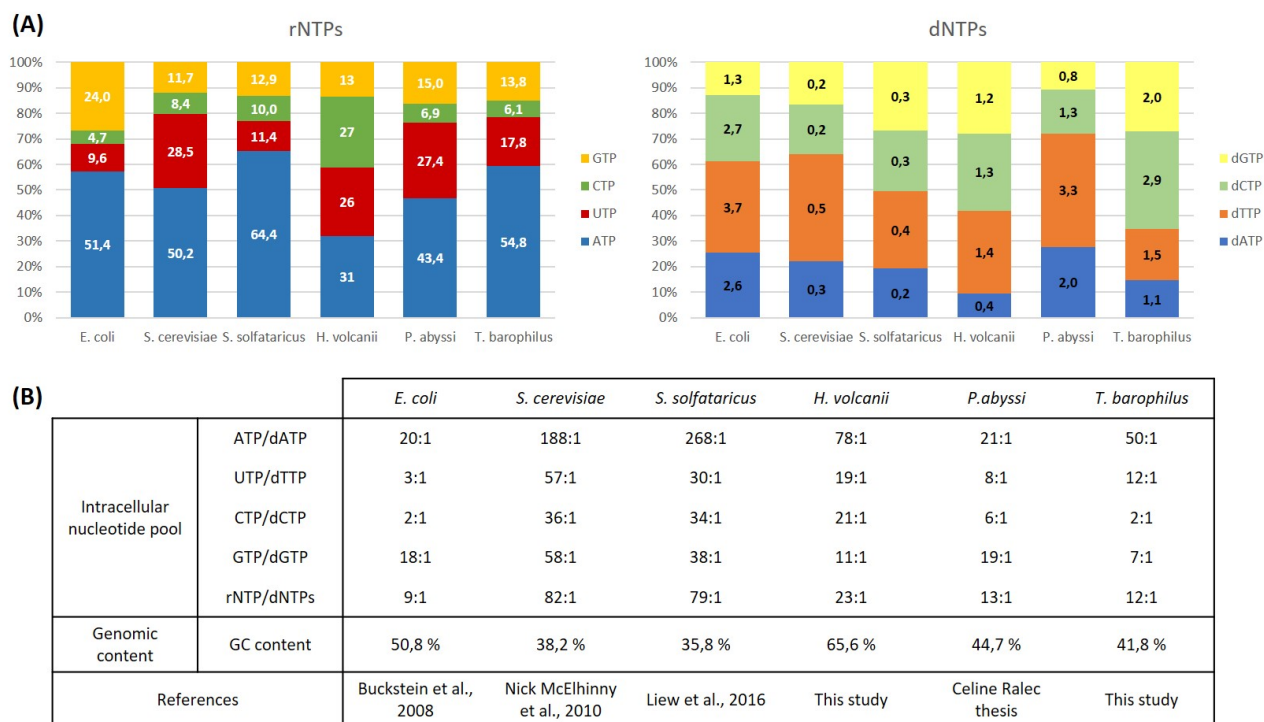


Figure 37: Comparison of nucleotide pool quantification from organisms of the three domains of life by HPLC-UV

Nucleotide pool quantification (A), rNTP/dNTP intracellular ratios and GC content (B) from *Escherichia coli* (Buckstein et al. 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Nick McElhinny et al. 2010), *Sulfolobus solfataricus* (Liew et al. 2016), *Haloferax volcanii* (this study), *Pyrococcus abyssi* (Ralec 2013), and *Thermococcus barophilus* (this study).

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

We managed to quantify the intracellular nucleotide pool of two archaeal strains *Thermococcus barophilus* and *Haloferax volcanii*. The ATP/ADP ratio used as a control for these experiments was at the limit of the recommended value ($\simeq 10$) allowing to have reliable results for *Haloferax volcanii* samples and was slightly below the value ($\simeq 5$) for *Thermococcus barophilus* samples allowing to validate the results (Figures 33 and 34). These ATP/ADP ratio values were determined for *Bacteria* and Eukaryotes (Varik et al. 2017; Pogolotti et al. 1982; Ranjbarian et al. 2021). Further studies on archaeal nucleotide pool quantification could determine a more suitable ATP/ADP ratio for *Archaea* especially for the anaerobic hyperthermophiles.

As in other organisms belonging to the three domains of life, the total rNTP content of *Thermococcus barophilus* and *Haloferax volcanii* is much higher than the total dNTP content (12 and 23 times higher respectively) (Figure 37). Among *Archaea*, *Thermococcus barophilus* intracellular nucleotide pool is more similar to the other hyperthermophile *Euryarchaea Pyrococcus abyssi*. *Haloferax volcanii* a mesophile *Euryarchaea* has similar intracellular nucleotide level to *Pyrococcus abyssi* and *Thermococcus barophilus* except for dATP, ATP and CTP (Figure 36B). It would be interesting to quantify intracellular nucleotide pool of other *Archaea* to observe a potential pattern difference between hyperthermophiles and mesophiles or between the different phyla.

We also noticed that RNase H deletion has different influence on the intracellular nucleotide pool of *Thermococcus barophilus* and *Haloferax volcanii*. Indeed, we observed an increase of the total dNTP content in *Haloferax volcanii* RNase H mutants compared to the WT whereas in *Thermococcus barophilus* the total dNTP content is similar between the RNase H mutant and the WT strain (Figure 35). It has been shown that an increase of the dNTP pool could lead to an increase of mutations incorporated by DNA polymerases (Kumar et al. 2011; Chabes et al. 2003; Mathews 2006), it thus would be interesting to assess if the mutation rate of Hvo and Tba RNase H mutants is increased compared to Hvo and Tba wild-type strains. Regarding the rNTP content, the main difference was a decrease of CTP in *Haloferax volcanii* RNase H mutant compared to the WT strain whereas in *Thermococcus barophilus* the main change was a decrease of ATP and an increase in UTP in the RNase H mutant compared to the WT strain (Figure 35).

No growth delay were observed between TbaWT and Tba Δ *rnhII* cells (Figure S8, Chapter III) neither between HvoWT and Hvo Δ *rnhI*, Hvo Δ *rnhII* and Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* cells (Meslet-Cladière et al. 2007). It also has been observed that Hvo Δ *rnhI*, Hvo Δ *rnhII* and Hvo Δ *rnhI* Δ *rnhII* strains are sensitive to UV compared to HvoWT (Meslet-Cladière et al. 2007) and Tba Δ *rnhII* was sensitive to 4-NQO (Figure 29). It is interesting to note that the exposition to 4-NQO, the UV-mimetic which induces bulky adducts in DNA, induced a reduced survival at 5 μ M and was lethal at 10 μ M for TbaWT and Tba Δ *rnhII*. This result seems to be consistent with the lack of NER in Tba. This is not surprising since Tba cells are not naturally exposed to UV in deep sea environment. It would be interesting to perform more phenotypic analysis on Tba and Hvo RNase H deletion mutants.

Conclusion générale

Plusieurs études dans les trois domaines du vivant ont permis d'estimer que l'incorporation de ribonucléotides dans l'ADN génomique est le dommage à l'ADN le plus fréquent (Nick McElhinny et al. 2010; Reijns et al. 2012; Lemor et al. 2018; Clausen et al. 2013). La cause la plus importante de la présence de ribonucléotides appariés ou mésappariés dans l'ADN est leur incorporation par les ADN polymérasés. Chez *S. cerevisiae*, la capacité de correction des activités exonucléases de Pol ϵ et Pol δ ont été étudiées. Il a été montré que l'activité exonucléase de Pol ϵ corrige environ 1/3 des ribonucléotides incorporés dans l'ADN lors de la réplication alors que Pol δ n'est pas efficace pour la relecture des ribonucléotides (Nick McElhinny et al. 2010; Clausen et al. 2013; Williams et al. 2012). La capacité de réparation des ribonucléotides des activités exonucléases des ADN polymérasés n'a pas encore été étudiée chez les *Archaea*. Les cellules possèdent également plusieurs voies pour réparer les ribonucléotides. La voie majeure et retrouvée dans les trois domaines du vivant est la voie d'excision des ribonucléotides RER initiée par la RNase HII/2 (Sparks et al. 2012; Vaisman et al. 2014; Heider et al. 2017). Pour l'instant cette voie de réparation RER n'a été reconstituée qu'une seule fois chez les *Archaea* (Heider et al. 2017).

La capacité de l'activité exonucléase à corriger les ribonucléotides a d'abord été étudiée dans le Chapitre II. En accord avec une précédente étude (Lemor et al. 2018), PolB ne semble pas incorporer de ribonucléotides dans l'ADN. Nous avons montré que cette absence d'incorporation de ribonucléotides par PolB est due, au moins en partie, à l'activité exonucléase de relecture de PolB lors de la réplication. En revanche, PolD incorpore environ un ribonucléotide pour 1400 désoxyribonucléotides, et corrigerait environ 30 % des ribonucléotides lors de la synthèse ADN par son activité de relecture exonucléase (Figure 18). L'activité exonucléase de PolB, comme Pol δ chez les Eucaryotes, ne semble pas efficace pour corriger les ribonucléotides appariés nouvellement insérés en 3' dans l'ADN alors que l'activité exonucléase de PolD corrigerait environ 75 % des ribonucléotides appariés nouvellement insérés en 3' (Figure 16). Lorsqu'un ribonucléotide nouvellement inséré en 3' est mésapparié, les activités exonucléases de PolB et PolD sont efficaces pour le corriger (Figure 17). Cette étude a permis d'évaluer l'efficacité des fonctions exonucléases des ADN polymérasés répliquatives des *Archaea* pour corriger les ribonucléotides appariés ou mésappariés (Tableau 8).

La reconstitution de la voie RER initiée par la RNase HII chez *Pyrococcus abyssi* et l'étude phénotypique des mutants de la voie RER chez *Thermococcus barophilus* dans le Chapitre III ont permis de compléter le seul modèle de voie RER existant chez les *Archaea* (Heider et al. 2017). Nous avons montré que PolB et PolD pouvaient être impliquées dans la voie RER, PolB étant plus efficace que PolD, elle serait majoritairement utilisée dans la voie RER. Nous avons également mis en évidence une voie secondaire dans laquelle Fen1 agirait par son activité 5'→3' exonucléase pour éliminer le ribonucléotide après incision par la RNase HII. La capacité de la voie RER initiée par la RNase HII à corriger un ribonucléotide mésapparié a été étudiée pour la première fois. RER est efficace pour la correction d'un ribonucléotide mésapparié et PolD est plus efficace que PolB dans la voie RER lorsque le ribonucléotide est mésapparié (Figure 27).

L'analyse précise de la proportion, de la nature et de la position des ribonucléotides présents dans l'ADN génomique de *Thermococcus barophilus*, *Haloferax volcanii*, et de leurs mutants délétés des RNases H a été effectuée par Ribose-seq (travaux complémentaires à mon doctorat réalisés par Y. Moalic et G. Henneke avec l'équipe de F. Storici, Georgia Tech Atlanta, USA). Dans le Chapitre IV, la détermination de la quantité en nucléotides intracellulaires de *Thermococcus barophilus* et *Haloferax*

	Taux d'incorporation	Taux de correction de rNMPs appariés par l'activité exonucléase	Taux de correction de rNMPs mésappariés par l'activité exonucléase
Polδ	1/1800 (Sce) ou 1/2000 (h)	non efficace	?
Polϵ	1/1250 or 1/1000	1/3	?
Pol III	1/2300	?	?
PolB	1/2500 (Tko) ?	\simeq 100 % lors de la synthèse ADN et non efficace en <i>trans</i>	\simeq 100 % en <i>trans</i>
PolD	1/1250 ou 1/1400 (Pab) ou 1/2500 (Tko)	\simeq 30 % lors de la synthèse ADN et \simeq 75 % en <i>trans</i>	\simeq 100 % en <i>trans</i>
Ref	Nick McElhinny et al. 2010; Clausen et al. 2013; Williams et al. 2012; Yao et al. 2013; Lemor et al. 2018; Heider et al. 2017, Chapitre II	Nick McElhinny et al. 2010; Clausen et al. 2013, Chapitre II	Chapitre II

TABLEAU 8: Taux de ribonucléotides incorporés dans le génome et éliminés par l'activité exonucléase des ADN polymérase répliquatives des trois domaines du vivant

Les taux d'incorporation et de correction des ribonucléotides par les ADN polymérase répliquatives humaines (h), de *Saccharomyces cerevisiae* (Sce), de *Pyrococcus abyssi* (Pab) et de *Thermococcus kodakarensis* (Tko).

volcanii a permis de compléter cette analyse Ribose-seq. Les contenus intracellulaires en nucléotides de *Thermococcus barophilus* et *Pyrococcus abyssi* sont proches (Figure 37). Les délétions des RNases H induisent des modifications des ratios intracellulaires de nucléotides qui sont différentes entre *Thermococcus barophilus* et *Haloferox volcanii*. En effet, la délétion de RNase HIII chez Hvo entraîne une augmentation du taux de dNTPs et une diminution du taux de CTP, alors qu'elle provoque chez Tba une diminution du taux d'ATP et une augmentation du taux d'UTP (Figures 33 et 34).

Cette thèse a permis de proposer un modèle pour la correction des ribonucléotides incorporés dans l'ADN chez les *Archaea* d'une part par l'activité exonucléase des ADN polymérase répliquatives, et d'autre part par la voie RER (Figure 38).

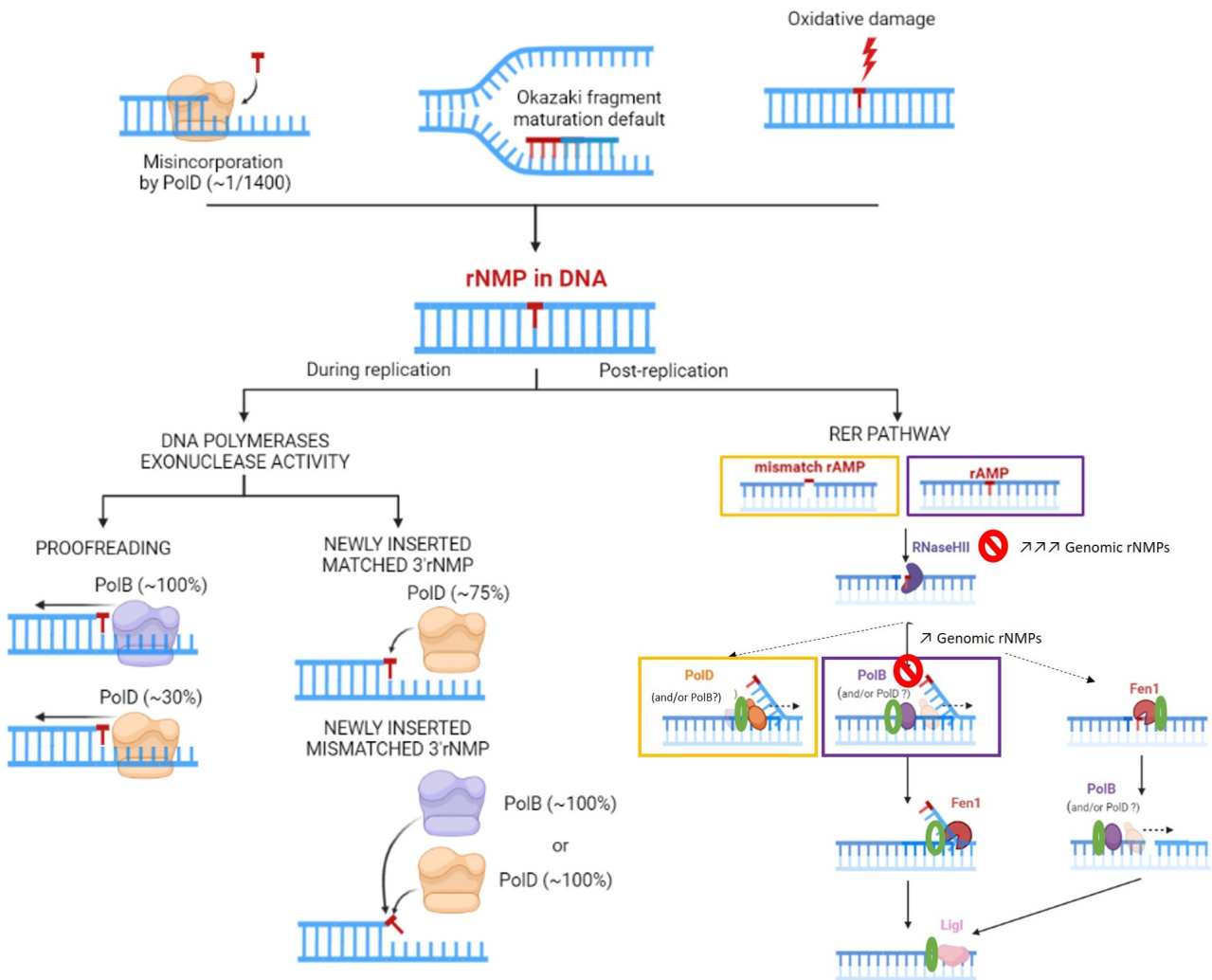


FIGURE 38: Modèle d'élimination des ribonucléotides de l'ADN chez les *Archaea* par l'activité exonucléase des ADN polymérase répliquatives et la voie RER. Schéma réalisé avec BioRender.

MILIEU SME

Composants	Quantité pour 1 L
Extrait de levure	1 g
Peptone	2 g
NaCl	28 g
Solution de sels de magnésium	10 mL
Solution A	1 mL
Solution B	1 mL
Solution C	1 mL
Solution D	1 mL
Solution de vitamines	0,5 mL
Solution de rézaurine (1 g/L)	0,5 mL
Sel dissodium PIPES	6,05 g
L-cystéine	0,5 g
pH ajusté à 7	

Solution A	
Composants	Quantité pour 1 L
MnSO ₄ , 4H ₂ O	9 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2,5 g
NiCl ₂ , 6H ₂ O	2,5 g
AlK(SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	0,3 g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,3 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,15 g
Eau milliQ	qsp 1 L

Solution B	
Composants	Quantité pour 1 L
CaCl ₂ , 2H ₂ O	56 g
NaBr	25 g
KCl	16 g
KI	10 g
SrCl ₂ , 6H ₂ O	4 g
Eau milliQ	qsp 1 L

Solution C	
Composants	Quantité pour 1 L
K ₂ HPO ₄	50 g
H ₃ BO ₃	7,5 g
Na ₂ WO ₄ , 2H ₂ O	3,3 g
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,15 g
Na ₂ SeO ₃	0,005 g
Eau milliQ	qsp 1 L

Solution D	
Composants	Quantité pour 1 L
FeCl ₂ , 4H ₂ O	10 g
Acide chlorhydrique 1M	qsp 1 L

Solution de vitamines	
Composants	Quantité pour 1 L
Biotine	40 mg
Acide folique	40 mg
Pyridoxine-HCl	200 mg
Thiamine-HCl	100 mg
Riboflavine	100 mg
Acide nicotinique	100 mg
DL. Calcium pantothenate	100 mg
Vitamine B12	2 mg
Acide lipoïque	100 mg
Ethanol dans eau distillée 50% v/v	qsp 1 L

Solution de sels de magnésium	
Composants	Quantité pour 1 L
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	180 g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	140 g
Eau milliQ	qsp 1 L

MILIEU YPC

YPC liquide

Composants	Quantité pour 500 mL
H ₂ O milliQ	150 mL
30 % SW	300 mL
10X YPC	50 mL
Autoclaver 20 min à 120°C et laisser refroidir	
CaCl ₂ 1M	1,5 mL

30 % SW

Composants	Quantité pour 1 L
NaCl	240 g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	30 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	35 g
KCl	7 g
Tris-HCl 1M pH 7,5	20 mL
Eau milliQ	qsp 1 L

10X YPC

Composants	Quantité pour 204 mL
Eau milliQ	156 mL
Yeast extract (Difco)	10,2 g
Peptone (Oxoid)	2,04 g
Casamino Acids	2,04 g
KOH 1 M (en agitant)	3,6 mL
Eau milliQ	Qsp 204 mL

Références Bibliographiques

BIBLIOGRAPHIE

- Abellón-Ruiz, J., K. J. Waldron et B. A. Connolly. 2016. « *Archaeoglobus Fulgidus* DNA Polymerase D: A Zinc-Binding Protein Inhibited by Hypoxanthine and Uracil ». *Journal of Molecular Biology* 428 (14) : 2805-2813.
- Allers, T., H.-P. Ngo, M. Mevarech et R. G. Lloyd. 2004. « Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon *Haloferax Volcanii* Based on the leuB and trpA Genes ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2) : 943-953.
- Arudchandran, A., S. Cerritelli, S. Narimatsu, M. Itaya, D. Y. Shin, Y. Shimada et R. J. Crouch. 2000. « The Absence of Ribonuclease H1 or H2 Alters the Sensitivity of *Saccharomyces Cerevisiae* to Hydroxyurea, Caffeine and Ethyl Methanesulphonate: Implications for Roles of RNases H in DNA Replication and Repair ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 5 (10) : 789-802.
- Astatke, M., K. Ng, N. D. Grindley et C. M. Joyce. 1998. « A Single Side Chain Prevents *Escherichia Coli* DNA Polymerase I (Klenow Fragment) from Incorporating Ribonucleotides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (7) : 3402-3407.
- Ausiannikava, D., et T. Allers. 2017. « Diversity of DNA Replication in the Archaea ». *Genes* 8 (2).
- Ayyagari, R., X. V. Gomes, D. A. Gordenin et P. M. J. Burgers. 2003. « Okazaki Fragment Maturation in Yeast: I. Distribution of Functions between FEN1 and DNA2 ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (3) : 1618-1625.
- Babon, J. J., M. McKenzie et R. G. H. Cotton. 2003. « The Use of Resolvases T4 Endonuclease VII and T7 Endonuclease I in Mutation Detection ». *Molecular Biotechnology* 23 (1) : 73-82.
- Bae, S.-H., K.-H. Bae, J.-A. Kim et Y.-S. Seo. 2001. « RPA Governs Endonuclease Switching during Processing of Okazaki Fragments in Eukaryotes ». *Nature* 412 (6845) : 456-461.
- Bae, S.-H., et Y.-S. Seo. 2000. « Characterization of the Enzymatic Properties of the Yeast Dna2 Helicase/Endonuclease Suggests a New Model for Okazaki Fragment Processing ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (48) : 38022-38031.
- Balachander, S., A. L. Gombolay, T. Yang, P. Xu, G. Newnam, H. Keskin, W. M. M. El-Sayed et al. 2020. « Ribonucleotide Incorporation in Yeast Genomic DNA Shows Preference for Cytosine and Guanosine Preceded by Deoxyadenosine ». *Nature Communications* 11 (1) : 2447.
- Balakrishnan, L., et R. A. Bambara. 2013. « Okazaki Fragment Metabolism ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2) : a010173-a010173.
- Barry, E. R., et S. D. Bell. 2006. « DNA Replication in the Archaea ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (4) : 876-887.

- Batra, V., W. Beard, L. Pedersen et S. Wilson. 2016. « Structures of DNA Polymerase Mispaiored DNA Termini Transitioning to Pre-catalytic Complexes Support an Induced-Fit Fidelity Mechanism ». *Structure* 24 (11) : 1863-1875.
- Bergoglio, V., E. Ferrari, U. Hübscher, C. Cazaux et J.-S. Hoffmann. 2003. « DNA Polymerase β Can Incorporate Ribonucleotides during DNA Synthesis of Undamaged and CPD-damaged DNA ». *Journal of Molecular Biology* 331 (5) : 1017-1023.
- Berquist, B. R., P. DasSarma et S. DasSarma. 2007. « Essential and Non-Essential DNA Replication Genes in the Model Halophilic Archaeon, *Halobacterium Sp. NRC-1* ». *BMC genetics* 8 : 31.
- Beyer, U., F. Brand, H. Martens, J. Weder, A. Christians, N. Elyan, B. Hentschel et al. 2017. « Rare ADAR and RNASEH2B Variants and a Type I Interferon Signature in Glioma and Prostate Carcinoma Risk and Tumorigenesis ». *Acta Neuropathologica* 134 (6) : 905-922.
- Bhagwat, A. S., R. J. Sanderson et T. Lindahl. 1999. « Delayed DNA Joining at 3' Mismatches by Human DNA Ligases ». *Nucleic Acids Research* 27 (20) : 4028-4033.
- Birien, T., A. Thiel, G. Henneke, D. Flament, Y. Moalic et M. Jebbar. 2018. « Development of an Effective 6-Methylpurine Counterselection Marker for Genetic Manipulation in *Thermococcus Barophilus* ». *Genes* 9 (2) : 77.
- Bochner, B. R., et B. N. Ames. 1982. « Complete Analysis of Cellular Nucleotides by Two-Dimensional Thin Layer Chromatography ». *The Journal of Biological Chemistry* 257 (16) : 9759-9769.
- Bocquier, A. A., L. Liu, I. K. Cann, K. Komori, D. Kohda et Y. Ishino. 2001. « Archaeal Primase: Bridging the Gap between RNA and DNA Polymerases ». *Current biology: CB* 11 (6) : 452-456.
- Bohall, P. B., et S. D. Bell. 2021. « Phenotypic Characterization of *Sulfolobus Islandicus* Strains Lacking the B-Family DNA Polymerases PolB2 and PolB3 Individually and in Combination ». *Frontiers in Microbiology* 12 : 666974.
- Bonnin, A., J. M. Lázaro, L. Blanco et M. Salas. 1999. « A Single Tyrosine Prevents Insertion of Ribonucleotides in the Eukaryotic-Type Phi29 DNA Polymerase ». *Journal of Molecular Biology* 290 (1) : 241-251.
- Brown, J. A., et Z. Suo. 2011. « Unlocking the Sugar "Steric Gate" of DNA Polymerases ». *Biochemistry* 50 (7) : 1135-1142.
- Brutlag, D., et A. Kornberg. 1972. « Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. 36. A Proofreading Function for the 3' Leads to 5' Exonuclease Activity in Deoxyribonucleic Acid Polymerases ». *The Journal of Biological Chemistry* 247 (1) : 241-248.
- Buckstein, M. H., J. He et H. Rubin. 2008. « Characterization of Nucleotide Pools as a Function of Physiological State in *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 190 (2) : 718-726.
- Burkhart, B. W., L. Cubonova, M. R. Heider, Z. Kelman, J. N. Reeve et T. J. Santangelo. 2017. « The GAN Exonuclease or the Flap Endonuclease Fen1 and RNase HII Are Necessary for Viability of *Thermococcus Kodakarensis* ». *Journal of Bacteriology* 199 (13) : e00141-17.

- Çağlayan, M. 2019. « Interplay between DNA Polymerases and DNA Ligases: Influence on Substrate Channeling and the Fidelity of DNA Ligation ». *Journal of Molecular Biology* 431 (11) : 2068-2081.
- Cai, Y., N. E. Geacintov et S. Broyde. 2014. « Ribonucleotides as Nucleotide Excision Repair Substrates ». *DNA repair* 13 : 55-60.
- Caldecott, K. W. 2014. « Ribose—An Internal Threat to DNA ». *Science* 343 (6168) : 260-261.
- Cann, I. K. O., et Y. Ishino. 1999. « Archaeal DNA Replication: Identifying the Pieces to Solve a Puzzle ». *Genetics* 152 (4) : 1249-67.
- Cannone, G., Y. Xu, T. Beattie, S. Bell et L. Spagnolo. 2015. « The Architecture of an Okazaki Fragment-Processing Holoenzyme from the Archaeon *Sulfolobus Solfataricus* ». *Biochemical Journal* 465 (2) : 239-245.
- Castrec, B., S. Laurent, G. Henneke, D. Flament et J.-P. Raffin. 2010. « The Glycine-Rich Motif of *Pyrococcus Abyssii* DNA Polymerase D Is Critical for Protein Stability ». *Journal of Molecular Biology* 396 (4) : 840-848.
- Castrec, B., C. Rouillon, G. Henneke, D. Flament, J. Querellou et J.-P. Raffin. 2009. « Binding to PCNA in Euryarchaeal DNA Replication Requires Two PIP Motifs for DNA Polymerase D and One PIP Motif for DNA Polymerase B ». *Journal of Molecular Biology* 394 (2) : 209-218.
- Cavanaugh, N. A., W. A. Beard, V. K. Batra, L. Perera, L. G. Pedersen et S. H. Wilson. 2011. « Molecular Insights into DNA Polymerase Deterrents for Ribonucleotide Insertion ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (36) : 31650-31660.
- Cavanaugh, N. A., W. A. Beard et S. H. Wilson. 2010. « DNA Polymerase β Ribonucleotide Discrimination: Insertion, Misinsertion, Extension, and Coding ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (32) : 24457-24465.
- Cerritelli, S. M., et R. J. Crouch. 2009. « Ribonuclease H: The Enzymes in Eukaryotes: Ribonucleases H of Eukaryotes ». *FEBS Journal* 276 (6) : 1494-1505.
- Cerritelli, S. M., et R. J. Crouch. 2016. « The Balancing Act of Ribonucleotides in DNA ». *Trends in Biochemical Sciences* 41 (5) : 434-445.
- Cerritelli, S. M., J. Iranzo, S. Sharma, A. Chabes, R. J. Crouch, D. Tollervey et A. El Hage. 2020. « High Density of Unrepaired Genomic Ribonucleotides Leads to Topoisomerase 1-Mediated Severe Growth Defects in Absence of Ribonucleotide Reductase ». *Nucleic Acids Research* 48 (8) : 4274-4297.
- Chaban, B., S. Y. Ng et K. F. Jarrell. 2006. « Archaeal Habitats — from the Extreme to the Ordinary ». *Canadian Journal of Microbiology* 52 (2) : 73-116.
- Chabes, A., B. Georgieva, V. Domkin, X. Zhao, R. Rothstein et L. Thelander. 2003. « Survival of DNA Damage in Yeast Directly Depends on Increased dNTP Levels Allowed by Relaxed Feedback Inhibition of Ribonucleotide Reductase ». *Cell* 112 (3) : 391-401.

- Chapados, B. R., D. J. Hosfield, S. Han, J. Qiu, B. Yelent, B. Shen et J. A. Tainer. 2004. « Structural Basis for FEN-1 Substrate Specificity and PCNA-Mediated Activation in DNA Replication and Repair ». *Cell* 116 (1) : 39-50.
- Chemnitz Galal, W., M. Pan, Z. Kelman et J. Hurwitz. 2012. « Characterization of DNA Primase Complex Isolated from the Archaeon, *Thermococcus Kodakaraensis* ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (20) : 16209-16219.
- Chibani, C. M., A. Mahnert, G. Borrel, A. Almeida, A. Werner, J.-F. Brugère, S. Gribaldo, R. D. Finn, R. A. Schmitz et C. Moissl-Eichinger. 2021. « A Catalogue of 1,167 Genomes from the Human Gut Archaeome ». *Nature Microbiology* : 1-14.
- Chiu, H.-C., K. D. Koh, M. Evich, A. L. Lesiak, M. W. Germann, A. Bongiorno, E. Riedo et F. Storici. 2014. « RNA Intrusions Change DNA Elastic Properties and Structure ». *Nanoscale* 6 (17) : 10009-10017.
- Cilli, P., A. Minoprio, C. Bossa, M. Bignami et F. Mazzei. 2015. « Formation and Repair of Mismatches Containing Ribonucleotides and Oxidized Bases at Repeated DNA Sequences ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (43) : 26259-26269.
- Clausen, A. R., S. Zhang, P. M. Burgers, M. Y. Lee et T. A. Kunkel. 2013. « Ribonucleotide Incorporation, Proofreading and Bypass by Human DNA Polymerase δ ». *DNA Repair* 12 (2) : 121-127.
- Clausen, A. R., S. A. Lujan, A. B. Burkholder, C. D. Orebaugh, J. S. Williams, M. F. Clausen, E. P. Malc et al. 2015. « Tracking Replication Enzymology in Vivo by Genome-Wide Mapping of Ribonucleotide Incorporation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (3) : 185-191.
- Cockram, C., A. Thierry, A. Gorlas, R. Lestini et R. Koszul. 2021. « Euryarchaeal Genomes Are Folded into SMC-dependent Loops and Domains, but Lack Transcription-Mediated Compartmentalization ». *Molecular Cell* 81 (3) : 459-472.e10.
- Cohen, G. N., V. Barbe, D. Flament, M. Galperin, R. Heilig, O. Lecompte, O. Poch et al. 2003. « An Integrated Analysis of the Genome of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Abyssus* ». *Molecular Microbiology* 47 (6) : 1495-1512.
- Conover, H. N., S. A. Lujan, M. J. Chapman, D. A. Cornelio, R. Sharif, J. S. Williams, A. B. Clark, F. Camilo, T. A. Kunkel et J. L. Argueso. 2015. « Stimulation of Chromosomal Rearrangements by Ribonucleotides ». *Genetics* 201 (3) : 951-961.
- Cooper, C. D. 2018. « Archaeal DNA Polymerases: New Frontiers in DNA Replication and Repair ». *Emerging Topics in Life Sciences* 2 (4) : 503-516.
- Cozens, C., V. B. Pinheiro, A. Vaisman, R. Woodgate et P. Holliger. 2012. « A Short Adaptive Path from DNA to RNA Polymerases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (21) : 8067-8072.
- Crespan, E., A. Furrer, M. Rösinger, F. Bertoletti, E. Mentegari, G. Chiapparini, R. Imhof et al. 2016. « Impact of Ribonucleotide Incorporation by DNA Polymerases β and λ on Oxidative Base Excision Repair ». *Nature Communications* 7 (1) : 10805.

- Crow, Y. J., A. Leitch, B. E. Hayward, A. Garner, R. Parmar, E. Griffith, M. Ali et al. 2006. « Mutations in Genes Encoding Ribonuclease H2 Subunits Cause Aicardi-Goutières Syndrome and Mimic Congenital Viral Brain Infection ». *Nature Genetics* 38 (8) : 910-916.
- Cubonova, L., T. Richardson, B. W. Burkhart, Z. Kelman, B. A. Connolly, J. N. Reeve et T. J. Santangelo. 2013. « Archaeal DNA Polymerase D but Not DNA Polymerase B Is Required for Genome Replication in *Thermococcus Kodakarensis* ». *Journal of Bacteriology* 195 (10) : 2322-2328.
- Dai, B., P. Zhang, Y. Zhang, C. Pan, G. Meng, X. Xiao, Z. Wu, W. Jia, J. Zhang et L. Zhang. 2016. « RNaseH2A Is Involved in Human Gliomagenesis through the Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis ». *Oncology Reports* 36 (1) : 173-180.
- Daigaku, Y., A. Keszthelyi, C. A. Müller, I. Miyabe, T. Brooks, R. Retkute, M. Hubank, C. A. Nieduszynski et A. M. Carr. 2015. « A Global Profile of Replicative Polymerase Usage ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (3) : 192-198.
- Delagoutte, E. 2012. « DNA Polymerases: Mechanistic Insight from Biochemical and Biophysical Studies ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 17 : 509-544.
- Delarue, M., O. Poch, N. Tordo, D. Moras et P. Argos. 1990. « An Attempt to Unify the Structure of Polymerases ». *Protein Engineering* 3 (6) : 461-467.
- DeRose, E. F., L. Perera, M. S. Murray, T. A. Kunkel et R. E. London. 2012. « Solution Structure of the Dickerson DNA Dodecamer Containing a Single Ribonucleotide ». *Biochemistry* 51 (12) : 2407-2416.
- Ding, J., M. S. Taylor, A. P. Jackson et M. A. M. Reijns. 2015. « Genome-Wide Mapping of Embedded Ribonucleotides and Other Noncanonical Nucleotides Using emRiboSeq and EndoSeq ». *Nature Protocols* 10 (9) : 1433-1444.
- Donigan, K. A., M. P. McLenigan, W. Yang, M. F. Goodman et R. Woodgate. 2014. « The Steric Gate of DNA Polymerase ϵ Regulates Ribonucleotide Incorporation and Deoxyribonucleotide Fidelity ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (13) : 9136-9145.
- Egli, M., N. Usman et A. Rich. 1993. « Conformational Influence of the Ribose 2'-Hydroxyl Group: Crystal Structures of DNA-RNA Chimeric Duplexes ». *Biochemistry* 32 (13) : 3221-3237.
- Erauso, G., S. Marsin, N. Benbouzid-Rollet, M. F. Baucher, T. Barbeyron, Y. Zivanovic, D. Prieur et P. Forterre. 1996. « Sequence of Plasmid pGT5 from the Archaeon *Pyrococcus Abyssis* : Evidence for Rolling-Circle Replication in a Hyperthermophile ». *Journal of Bacteriology* 178 (11) : 3232-3237.
- Erauso, G., A.-L. Reysenbach, A. Godfroy, J.-R. Meunier, B. Crump, F. Partensky, J. A. Baross et al. 1993. « *Pyrococcus Abyssis* Sp. Nov., a New Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent ». *Archives of Microbiology* 160 (5) : 338-349.
- Evich, M., A. M. Spring-Connell, F. Storici et M. W. Germain. 2016. « Structural Impact of Single Ribonucleotide Residues in DNA ». *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology* 17 (20) : 1968-1977.

- Ferraro, P., E. Franzolin, G. Pontarin, P. Reichard et V. Bianchi. 2010. « Quantitation of Cellular Deoxynucleoside Triphosphates ». *Nucleic Acids Research* 38 (6) : e85.
- Fijalkowska, I. J., P. Jonczyk, M. M. Tkaczyk, M. Bialoskorska et R. M. Schaaper. 1998. « Unequal Fidelity of Leading Strand and Lagging Strand DNA Replication on the *Escherichia Coli* Chromosome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (17) : 10020-10025.
- Forslund, J. M. E., A. Pfeiffer, G. Stojkovič, P. H. Wanrooij et S. Wanrooij. 2018. « The Presence of rNTPs Decreases the Speed of Mitochondrial DNA Replication ». Sous la direction de N.-G. Larsson. *PLOS Genetics* 14 (3) : e1007315.
- Friedrich-Heineken, E. 2004. « The Fen1 Extrahelical 3'-Flap Pocket Is Conserved from Archaea to Human and Regulates DNA Substrate Specificity ». *Nucleic Acids Research* 32 (8) : 2520-2528.
- Fuhrmann, M., W. Oertel, P. Berthold et P. Hegemann. 2005. « Removal of Mismatched Bases from Synthetic Genes by Enzymatic Mismatch Cleavage ». *Nucleic Acids Research* 33 (6) : e58-e58.
- Fujikane, R., S. Ishino, Y. Ishino et P. Forterre. 2010. « Genetic Analysis of DNA Repair in the Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus Kodakaraensis* ». *Genes & Genetic Systems* 85 (4) : 243-257.
- Gao, J., et J. Wang. 2012. « Re-Annotation of Two Hyperthermophilic Archaea *Pyrococcus Abyssii* GE5 and *Pyrococcus Furiosus* DSM 3638 ». *Current Microbiology* 64 (2) : 118-129.
- Garg, P. 2004. « Idling by DNA Polymerase Maintains a Ligatable Nick during Lagging-Strand DNA Replication ». *Genes & Development* 18 (22) : 2764-2773.
- Gawel, D., I. J. Fijalkowska, P. Jonczyk et R. M. Schaaper. 2014. « Effect of dNTP Pool Alterations on Fidelity of Leading and Lagging Strand DNA Replication in *E. Coli* ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 759 : 22-28.
- Gehring, A. M., K. M. Zatopek, B. W. Burkhart, V. Potapov, T. J. Santangelo et A. F. Gardner. 2020. « Biochemical Reconstitution and Genetic Characterization of the Major Oxidative Damage Base Excision DNA Repair Pathway in *Thermococcus Kodakarensis* ». *DNA Repair* 86 : 102767.
- Ghodgaonkar, M., F. Lazzaro, M. Olivera-Pimentel, M. Artola-Borán, P. Cejka, M. Reijns, A. Jackson, P. Plevani, M. Muzi-Falconi et J. Jiricny. 2013. « Ribonucleotides Misincorporated into DNA Act as Strand-Discrimination Signals in Eukaryotic Mismatch Repair ». *Molecular Cell* 50 (3) : 323-332.
- Giannattasio, M., et D. Branzei. 2019. « DNA Replication Through Strand Displacement During Lagging Strand DNA Synthesis in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Genes* 10 (2) : 167.
- Godfroy, A., N. D. Raven et R. J. Sharp. 2000. « Physiology and Continuous Culture of the Hyperthermophilic Deep-Sea Vent Archaeon *Pyrococcus Abyssii* ST549 ». *FEMS Microbiology Letters* 186 (1) : 127-132.
- Göksenin, A. Y., W. Zahurancik, K. G. LeCompte, D. J. Taggart, Z. Suo et Z. F. Pursell. 2012. « Human DNA Polymerase ϵ Is Able to Efficiently Extend from Multiple Consecutive Ribonucleotides ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (51) : 42675-42684.

- Gon, S., R. Napolitano, W. Rocha, S. Coulon et R. P. Fuchs. 2011. « Increase in dNTP Pool Size during the DNA Damage Response Plays a Key Role in Spontaneous and Induced-Mutagenesis in *Escherichia Coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (48) : 19311-19316.
- Gosavi, R. A., A. F. Moon, T. A. Kunkel, L. C. Pedersen et K. Bebenek. 2012. « The Catalytic Cycle for Ribonucleotide Incorporation by Human DNA Pol λ ». *Nucleic Acids Research* 40 (15) : 7518-7527.
- Gouge, J., C. Ralec, G. Henneke et M. Delarue. 2012. « Molecular Recognition of Canonical and Deaminated Bases by *P. Abyssii* Family B DNA Polymerase ». *Journal of Molecular Biology* 423 (3) : 315-336.
- Greenough, L., Z. Kelman et A. F. Gardner. 2015. « The Roles of Family B and D DNA Polymerases in *Thermococcus* Species 9°N Okazaki Fragment Maturation ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (20) : 12514-12522.
- Greenough, L., J. F. Menin, N. S. Desai, Z. Kelman et A. F. Gardner. 2014. « Characterization of Family D DNA Polymerase from *Thermococcus* Sp. 9°N ». *Extremophiles* 18 (4) : 653-664.
- Grob, M. K., K. O'Brien, J. J. Chu et D. D. Y. Chen. 2003. « Optimization of Cellular Nucleotide Extraction and Sample Preparation for Nucleotide Pool Analyses Using Capillary Electrophoresis ». *Journal of Chromatography B* 788 (1) : 103-111.
- Grogan, D. W. 2015. « Understanding DNA Repair in Hyperthermophilic Archaea: Persistent Gaps and Other Reasons to Focus on the Fork ». *Archaea* 2015 : 1-12.
- Gueguen, Y., J. L. Rolland, O. Lecompte, P. Azam, G. Le Romancer, D. Flament, J. P. Raffin et J. Dietrich. 2001. « Characterization of Two DNA Polymerases from the Hyperthermophilic Euryarchaeon *Pyrococcus Abyssii* ». *European Journal of Biochemistry* 268 (22) : 5961-5969.
- Gunbin, K. V., D. A. Afonnikov et N. A. Kolchanov. 2009. « Molecular Evolution of the Hyperthermophilic Archaea of the *Pyrococcus* Genus: Analysis of Adaptation to Different Environmental Conditions ». *BMC Genomics* 10 (1) : 639.
- Günther, C., B. Kind, M. A. M. Reijns, N. Berndt, M. Martinez-Bueno, C. Wolf, V. Tüngler et al. 2015. « Defective Removal of Ribonucleotides from DNA Promotes Systemic Autoimmunity ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (1) : 413-424.
- Harrington, J. J., et M. R. Lieber. 1995. « DNA Structural Elements Required for FEN-1 Binding ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (9) : 4503-4508.
- Heider, M. R., B. W. Burkhardt, T. J. Santangelo et A. F. Gardner. 2017. « Defining the RNaseH2 Enzyme-Initiated Ribonucleotide Excision Repair Pathway in Archaea ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (21) : 8835-8845.
- Henneke, G. 2012. « *In Vitro* Reconstitution of RNA Primer Removal in Archaea Reveals the Existence of Two Pathways ». *Biochemical Journal* 447 (2) : 271-280.
- Henneke, G., D. Flament, U. Hübscher, J. Querellou et J.-P. Raffin. 2005. « The Hyperthermophilic Euryarchaeota *Pyrococcus Abyssii* Likely Requires the Two DNA Polymerases D and B for DNA Replication ». *Journal of Molecular Biology* 350 (1) : 53-64.

- Henneke, G., Y. Gueguen, D. Flament, P. Azam, J. Querellou, J. Dietrich, U. Hübscher et J.-P. Raffin. 2002. « Replication Factor C from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Abyssii* Does Not Need ATP Hydrolysis for Clamp-loading and Contains a Functionally Conserved RFC PCNA-binding Domain ». *Journal of Molecular Biology* 323 (5) : 795-810.
- Hennion, M., J.-M. Arbona, C. Cruaud, F. Proux, B. L. Tallec, E. Novikova, S. Engelen, A. Lemainque, B. Audit et O. Hyrien. 2018. « Mapping DNA Replication with Nanopore Sequencing ». *bioRxiv* 426858.
- Hiller, B., A. Hoppe, C. Haase, C. Hiller, N. Schubert, W. Müller, M. A. Reijns et al. 2018. « Ribonucleotide Excision Repair Is Essential to Prevent Squamous Cell Carcinoma of the Skin. » *Cancer Research* 78 (20) : 5917-5926.
- Hirose, S., R. Okazaki et F. Tamanoi. 1973. « Mechanism of DNA Chain Growth ». *Journal of Molecular Biology* 77 (4) : 501-517.
- Hofer, A., J. T. Ekanem et L. Thelander. 1998. « Allosteric Regulation of Trypanosoma Brucei Ribonucleotide Reductase Studied in Vitro and in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (51) : 34098-34104.
- Hofer, A., M. Crona, D. T. Logan et B.-M. Sjöberg. 2012. « DNA Building Blocks: Keeping Control of Manufacture ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47 (1) : 50-63.
- Hogrel, G., Y. Lu, N. Alexandre, A. Bossé, R. Dulermo, S. Ishino, Y. Ishino et D. Flament. 2020. « Role of RadA and DNA Polymerases in Recombination-Associated DNA Synthesis in Hyperthermophilic Archaea ». *Biomolecules* 10 (7) : 1045.
- Howes, T. R. L., et A. E. Tomkinson. 2012. « DNA Ligase I, the Replicative DNA Ligase ». In *The Eukaryotic Replisome: A Guide to Protein Structure and Function*, sous la direction de S. MacNeill, 62 : 327-341. Dordrecht : Springer Netherlands.
- Huang, L., J. A. Rumbaugh, R. S. Murante, R. J. R. Lin, L. Rust et R. A. Bambara. 1996. « Role of Calf RTH-1 Nuclease in Removal of 5'-Ribonucleotides during Okazaki Fragment Processing ». *Biochemistry* 35 (28) : 9266-9277.
- Hyjek, M., M. Figiel et M. Nowotny. 2019. « RNases H: Structure and Mechanism ». *DNA Repair* 84 : 102672.
- Ishimi, Y., A. Claude, P. Bullock et J. Hurwitz. 1988. « Complete Enzymatic Synthesis of DNA Containing the SV40 Origin of Replication ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (36) : 19723-19733.
- Ishino, S., L. M. Kelman, Z. Kelman et Y. Ishino. 2013. « The Archaeal DNA Replication Machinery: Past, Present and Future ». *Genes & Genetic Systems* 88 (6) : 315-319.
- Ishino, Y., et S. Ishino. 2012. « Rapid Progress of DNA Replication Studies in Archaea, the Third Domain of Life ». *Science China Life Sciences* 55 (5) : 386-403.
- Ito, J., et D. K. Braithwaite. 1991. « Compilation and Alignment of DNA Polymerase Sequences ». *Nucleic Acids Research* 19 (15) : 4045-4057.

- Ito, N., O. Nureki, M. Shirouzu, S. Yokoyama et F. Hanaoka. 2003. « Crystal Structure of the *Pyrococcus Horikoshii* DNA Primase-UTP Complex: Implications for the Mechanism of Primer Synthesis ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 8 (12) : 913-923.
- Jain, M., I. T. Fiddes, K. H. Miga, H. E. Olsen, B. Paten et M. Akeson. 2015. « Improved Data Analysis for the MinION Nanopore Sequencer ». *Nature Methods* 12 (4) : 351-356.
- Jamsen, J. A., A. Sassa, L. Perera, D. D. Shock, W. A. Beard et S. H. Wilson. 2021. « Structural Basis for Proficient Oxidized Ribonucleotide Insertion in Double Strand Break Repair ». *Nature Communications* 12 (1) : 5055.
- Jin, Y. H., P. Garg, C. M. W. Stith, H. Al-Refai, J. F. Sterling, L. J. W. Murray, T. A. Kunkel, M. A. Resnick, P. M. Burgers et D. A. Gordenin. 2005. « The Multiple Biological Roles of the 3'->5' Exonuclease of *Saccharomyces Cerevisiae* DNA Polymerase Require Switching between the Polymerase and Exonuclease Domains ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (1) : 461-471.
- Jin, Y. H., R. Ayyagari, M. A. Resnick, D. A. Gordenin et P. M. J. Burgers. 2003. « Okazaki Fragment Maturation in Yeast: II. Cooperation between the Polymerase and 3'-5' Exonuclease Activities of Pol δ in the Creation of a Ligatable Nick ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (3) : 1626-1633.
- Johnson, M. K., J. Kottur et D. T. Nair. 2019. « A Polar Filter in DNA Polymerases Prevents Ribonucleotide Incorporation ». *Nucleic Acids Research* 47 (20) : 10693-10705.
- Jokela, M., A. Eskelinen, H. Pospiech, J. Rouvinen et J. Syväoja. 2004. « Characterization of the 3' Exonuclease Subunit DP1 of *Methanococcus Jannaschii* Replicative DNA Polymerase D ». *Nucleic Acids Research* 32 (8) : 2430-2440.
- Jolivet, E., F. Matsunaga, Y. Ishino, P. Forterre, D. Prieur et H. Myllykallio. 2003. « Physiological Responses of the Hyperthermophilic Archaeon "*Pyrococcus Abyssii*" to DNA Damage Caused by Ionizing Radiation ». *Journal of Bacteriology* 185 (13) : 3958-3961.
- Jónsson, Z. O., R. Hindges et U. Hübscher. 1998. « Regulation of DNA Replication and Repair Proteins through Interaction with the Front Side of Proliferating Cell Nuclear Antigen ». *The EMBO Journal* 17 (8) : 2412-2425.
- Joyce, C. M., et S. J. Benkovic. 2004. « DNA Polymerase Fidelity: Kinetics, Structure, and Checkpoints ». *Biochemistry* 43 (45) : 14317-14324.
- Jozwiakowski, S. K., B. J. Keith, L. Gilroy, A. J. Doherty et B. A. Connolly. 2014. « An Archaeal Family-B DNA Polymerase Variant Able to Replicate Past DNA Damage: Occurrence of Replicative and Translesion Synthesis Polymerases within the B Family ». *Nucleic Acids Research* 42 (15) : 9949-9963.
- Kang, H. Y., E. Choi, S. H. Bae, K. H. Lee, B. S. Gim, H. D. Kim, C. Park, S. A. MacNeill et Y. S. Seo. 2000. « Genetic Analyses of *Schizosaccharomyces Pombe* Dna2(+) Reveal That Dna2 Plays an Essential Role in Okazaki Fragment Metabolism ». *Genetics* 155 (3) : 1055-1067.
- Kao, H.-I., L. A. Henricksen, Y. Liu et R. A. Bambara. 2002. « Cleavage Specificity of *Saccharomyces Cerevisiae* Flap Endonuclease 1 Suggests a Double-Flap Structure as the Cellular Substrate ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (17) : 14379-14389.

- Kasiviswanathan, R., et W. C. Copeland. 2011. « Ribonucleotide Discrimination and Reverse Transcription by the Human Mitochondrial DNA Polymerase ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (36) : 31490-31500.
- Kaufmann, G., S. Anderson et M. L. DePamphilis. 1977. « RNA Primers in Simian Virus 40 DNA Replication ». *Journal of Molecular Biology* 116 (3) : 549-567.
- Kelman, L. M., et Z. Kelman. 2014. « Archaeal DNA Replication ». *Annual Review of Genetics* 48 : 71-97.
- Killelea, T., A. Palud, F. Akcha, M. Lemor, S. L'haridon, A. Godfroy et G. Henneke. 2019. « The Interplay at the Replisome Mitigates the Impact of Oxidative Damage on the Genetic Integrity of Hyperthermophilic Archaea ». *eLife* 8 (e45320).
- Kim, N., S.-y. N. Huang, J. S. Williams, Y. C. Li, A. B. Clark, J.-E. Cho, T. A. Kunkel, Y. Pomnier et S. Jinks-Robertson. 2011. « Mutagenic Processing of Ribonucleotides in DNA by Yeast Topoisomerase I ». *Science* 332 (6037) : 1561-1564.
- Kim, N., et S. Jinks-Robertson. 2017. « The Top1 Paradox: Friend and Foe of the Eukaryotic Genome ». *DNA Repair* 56 : 33-41.
- Kiyonari, S., K. Takayama, H. Nishida et Y. Ishino. 2006. « Identification of a Novel Binding Motif in *Pyrococcus Furiosus* DNA Ligase for the Functional Interaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen * ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (38) : 28023-28032.
- Klein, H. L. 2017. « Genome Instabilities Arising from Ribonucleotides in DNA ». *DNA Repair* 56 : 26-32.
- Koh, K. D., S. Balachander, J. R. Hesselberth et F. Storici. 2015. « Ribose-Seq: Global Mapping of Ribonucleotides Embedded in Genomic DNA ». *Nature Methods* 12 (3) : 251-257.
- Kool, E. T. 2002. « Active Site Tightness and Substrate Fit in DNA Replication ». *Annual Review of Biochemistry* 71 : 191-219.
- Kornberg, A. 1969. « Active Center of DNA Polymerase ». *Science* 163 (3874) : 1410-1418.
- Kornberg, A., et T. A. Baker. 2005. *DNA Replication*. University Science Books.
- Kumar, D., A. L. Abdulovic, J. Viberg, A. K. Nilsson, T. A. Kunkel et A. Chabes. 2011. « Mechanisms of Mutagenesis in Vivo Due to Imbalanced dNTP Pools ». *Nucleic Acids Research* 39 (4) : 1360-1371.
- Kunkel, T. A. 2009. « Evolving Views of DNA Replication (In)Fidelity ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 74 : 91-101.
- Kurosawa, Y., T. Ogawa, S. Hirose, T. Okazaki et R. Okazaki. 1975. « Mechanism of DNA Chain Growth ». *Journal of Molecular Biology* 96 (4) : 653-664.
- Kushida, T., I. Narumi, S. Ishino, Y. Ishino, S. Fujiwara, T. Imanaka et H. Higashibata. 2019. « Pol B, a Family B DNA Polymerase, in *Thermococcus Kodakarensis* Is Important for DNA Repair, but Not DNA Replication ». *Microbes and Environments* 34 (3) : 316-326.

- Lao-Sirieix, S.-h., et S. D. Bell. 2004. « The Heterodimeric Primase of the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus Solfataricus* Possesses DNA and RNA Primase, Polymerase and 3'-Terminal Nucleotidyl Transferase Activities ». *Journal of Molecular Biology* 344 (5) : 1251-1263.
- Le Breton, M., G. Henneke, C. Norais, D. Flament, H. Myllykallio, J. Querellou et J.-P. Raffin. 2007. « The Heterodimeric Primase from the Euryarchaeon *Pyrococcus Abyssii*: A Multifunctional Enzyme for Initiation and Repair? ». *Journal of Molecular Biology* 374 (5) : 1172-1185.
- Le Laz, S., A. Le Goaziou et G. Henneke. 2010. « Structure-Specific Nuclease Activities of *Pyrococcus Abyssii* RNase HIII ». *Journal of Bacteriology* 192 (14) : 3689-3698.
- Leigh, J. A., S.-V. Albers, H. Atomi et T. Allers. 2011. « Model Organisms for Genetics in the Domain Archaea: Methanogens, Halophiles, Thermococcales and Sulfolobales ». *FEMS Microbiology Reviews* 35 (4) : 577-608.
- Lemor, M. 2017. « Influence de la variation de la concentration intracellulaire des désoxyribonucléotides et ribonucléotides sur la stabilité génomique chez *Pyrococcus abyssii* ». Thèse de doct., Université de Bretagne occidentale - Brest.
- Lemor, M., Z. Kong, E. Henry, R. Brizard, S. Laurent, A. Bossé et G. Henneke. 2018. « Differential Activities of DNA Polymerases in Processing Ribonucleotides during DNA Synthesis in Archaea ». *Journal of Molecular Biology* 430 (24) : 4908-4924.
- Leonard, A. C., et M. Méchali. 2013. « DNA Replication Origins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (10) : a010116.
- Levin, D. S., W. Bai, N. Yao, M. O'Donnell et A. E. Tomkinson. 1997. « An Interaction between DNA Ligase I and Proliferating Cell Nuclear Antigen: Implications for Okazaki Fragment Synthesis and Joining ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (24) : 12863-12868.
- Levin, D. S., A. E. McKenna, T. A. Motycka, Y. Matsumoto et A. E. Tomkinson. 2000. « Interaction between PCNA and DNA Ligase I Is Critical for Joining of Okazaki Fragments and Long-Patch Base-Excision Repair ». *Current Biology* 10 (15) : 919-922.
- Li, Y., et R. R. Breaker. 1999. « Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group ». *Journal of the American Chemical Society* 121 (23) : 5364-5372.
- Liew, L. P., Z. Y. Lim, M. Cohen, Z. Kong, L. Marjavaara, A. Chabes et S. D. Bell. 2016. « Hydroxyurea-Mediated Cytotoxicity Without Inhibition of Ribonucleotide Reductase ». *Cell Reports* 17 (6) : 1657-1670.
- Lindahl, T., et D. E. Barnes. 1992. « Mammalian DNA Ligases ». *Annual Review of Biochemistry* 61 (1) : 251-281.
- Liu, B., J. Hu, J. Wang et D. Kong. 2017. « Direct Visualization of RNA-DNA Primer Removal from Okazaki Fragments Provides Support for Flap Cleavage and Exonucleolytic Pathways in Eukaryotic Cells * ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (12) : 4777-4788.
- Liu, L., K. Komori, S. Ishino, A. A. Bocquier, I. K. O. Cann, D. Kohda et Y. Ishino. 2001. « The Archaeal DNA Primase: Biochemical Characterization of the P41-P46 Complex from *Pyrococcus Furiosus* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (48) : 45484-45490.

- Lockhart, A., V. B. Pires, F. Bento, V. Kellner, S. Luke-Glaser, G. Yakoub, H. D. Ulrich et B. Luke. 2019. « RNase H1 and H2 Are Differentially Regulated to Process RNA-DNA Hybrids ». *Cell Reports* 29 (9) : 2890-2900.e5.
- Lujan, S. A., A. R. Clausen, A. B. Clark, H. K. MacAlpine, D. M. MacAlpine, E. P. Malc, P. A. Mieczkowski et al. 2014. « Heterogeneous Polymerase Fidelity and Mismatch Repair Bias Genome Variation and Composition ». *Genome Research* 24 (11) : 1751-1764.
- Lujan, S., J. Williams, A. Clausen, A. Clark et T. Kunkel. 2013. « Ribonucleotides Are Signals for Mismatch Repair of Leading-Strand Replication Errors ». *Molecular Cell* 50 (3) : 437-443.
- Lujan, S. A., J. S. Williams et T. A. Kunkel. 2016. « DNA Polymerases Divide the Labor of Genome Replication ». *Trends in Cell Biology* 26 (9) : 640-654.
- Lynch, M., W. Sung, K. Morris, N. Coffey, C. R. Landry, E. B. Dopman, W. J. Dickinson et al. 2008. « A Genome-Wide View of the Spectrum of Spontaneous Mutations in Yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (27) : 9272-9277.
- Madru, C., G. Henneke, P. Raia, I. Hugonneau-Beaufet, G. Pehau-Arnaudet, P. England, E. Lindahl, M. Delarue, M. Carroni et L. Sauguet. 2020. « Structural Basis for the Increased Processivity of D-family DNA Polymerases in Complex with PCNA ». *Nature Communications* 11 (1) : 1591.
- Maga, G., G. Villani, V. Tillement, M. Stucki, G. A. Locatelli, I. Frouin, S. Spadari et U. Hubscher. 2001. « Okazaki Fragment Processing: Modulation of the Strand Displacement Activity of DNA Polymerase by the Concerted Action of Replication Protein A, Proliferating Cell Nuclear Antigen, and Flap Endonuclease-1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (25) : 14298-14303.
- Magnusson, G., V. Pigiet, E. L. Winnacker, R. Abrams et P. Reichard. 1973. « RNA-Linked Short DNA Fragments During Polyoma Replication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 (2) : 412-415.
- Malfatti, M. C., S. Balachander, G. Antoniali, K. D. Koh, C. Saint-Pierre, D. Gasparutto, H. Chon, R. J. Crouch, F. Storici et G. Tell. 2017. « Abasic and Oxidized Ribonucleotides Embedded in DNA Are Processed by Human APE1 and Not by RNase H2 ». *Nucleic Acids Research* 45 (19) : 11193-11212.
- Malfatti, M. C., G. Henneke, S. Balachander, K. D. Koh, G. Newnam, R. Uehara, R. J. Crouch, F. Storici et G. Tell. 2019. « Unlike the *Escherichia Coli* Counterpart, Archaeal RNase HII Cannot Process Ribose Monophosphate Abasic Sites and Oxidized Ribonucleotides Embedded in DNA ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (35) : 13061-13072.
- Marshall, C. J., et T. J. Santangelo. 2020. « Archaeal DNA Repair Mechanisms ». *Biomolecules* 10 (11) : 1472.
- Marteinsson, V. T., J. L. Birrien, A. L. Reysenbach, M. Vernet, D. Marie, A. Gambacorta, P. Messner, U. B. Sleytr et D. Prieur. 1999. « *Thermococcus Barophilus* Sp. Nov., a New Barophilic and Hyperthermophilic Archaeon Isolated under High Hydrostatic Pressure from a Deep-Sea Hydrothermal Vent ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 2 : 351-359.

- Martin, M. J., M. V. Garcia-Ortiz, V. Esteban et L. Blanco. 2013. « Ribonucleotides and Manganese Ions Improve Non-Homologous End Joining by Human Pol μ ». *Nucleic Acids Research* 41 (4) : 2428-2436.
- Mathews, C. K. 2006. « DNA Precursor Metabolism and Genomic Stability ». *The FASEB Journal* 20 (9) : 1300-1314.
- Matsui, E., Y. Urushibata, J. Abe et I. Matsui. 2014. « Serial Intermediates with a 1 Nt 3'-Flap and 5' Variable-Length Flaps Are Formed by Cooperative Functioning of Pyrococcus Horikoshii FEN-1 with Either B or D DNA Polymerases ». *Extremophiles* 18 (2) : 415-427.
- Matsunaga, F., C. Norais, P. Forterre et H. Myllykallio. 2003. « Identification of Short 'eukaryotic' Okazaki Fragments Synthesized from a Prokaryotic Replication Origin ». *EMBO reports* 4 (2) : 154-158.
- McCulloch, S. D., et T. A. Kunkel. 2008. « The Fidelity of DNA Synthesis by Eukaryotic Replicative and Translesion Synthesis Polymerases ». *Cell Research* 18 (1) : 148-161.
- McDonald, J. P., A. Vaisman, W. Kuban, M. F. Goodman et R. Woodgate. 2012. « Mechanisms Employed by *Escherichia Coli* to Prevent Ribonucleotide Incorporation into Genomic DNA by Pol V ». Sous la direction d'I. Matic. *PLoS Genetics* 8 (11) : e1003030.
- McElhinny, S. A. N., D. Kumar, A. B. Clark, D. L. Watt, B. E. Watts, E.-B. Lundström, E. Johansson, A. Chabes et T. A. Kunkel. 2010. « Genome Instability Due to Ribonucleotide Incorporation into DNA ». *Nature Chemical Biology* 6 (10) : 774-781.
- Meslet-Cladière, L., C. Norais, J. Kuhn, J. Briffotiaux, J. W. Sloostra, E. Ferrari, U. Hübscher, D. Flament et H. Myllykallio. 2007. « A Novel Proteomic Approach Identifies New Interaction Partners for Proliferating Cell Nuclear Antigen ». *Journal of Molecular Biology* 372 (5) : 1137-1148.
- Miyabayashi, H., R. Jain, S. Suzuki, D. W. Grogan et N. Kurosawa. 2020. « PolB1 Is Sufficient for DNA Replication and Repair Under Normal Growth Conditions in the Extremely Thermophilic Crenarchaeon *Sulfolobus Acidocaldarius* ». *Frontiers in Microbiology* 11 : 613375.
- Montecucco, A., R. Rossi, D. S. Levin, R. Gary, M. S. Park, T. A. Motycka, G. Ciarrocchi, A. Villa, G. Biamonti et A. E. Tomkinson. 1998. « DNA Ligase I Is Recruited to Sites of DNA Replication by an Interaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen: Identification of a Common Targeting Mechanism for the Assembly of Replication Factories ». *The EMBO journal* 17 (13) : 3786-3795.
- Moon, A. F., J. M. Pryor, D. A. Ramsden, T. A. Kunkel, K. Bebenek et L. C. Pedersen. 2017. « Structural Accommodation of Ribonucleotide Incorporation by the DNA Repair Enzyme Polymerase Mu ». *Nucleic Acids Research* 45 (15) : 9138-9148.
- Mullakhanbhai, M. F., et H. Larsen. 1975. « *Halobacterium Volcanii* Spec. Nov., a Dead Sea Halobacterium with a Moderate Salt Requirement ». *Archives of Microbiology* 104 (3) : 207-214.
- Murakami, Y., C. R. Wobe, L. Weissbach, F. B. Dean et J. Hurwitz. 1986. « Role of DNA Polymerase α and DNA Primase in Simian Virus 40 DNA Replication *in Vitro* ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 2869-2873.

- Murante, R. S., L. A. Henricksen et R. A. Bambara. 1998. « Junction Ribonuclease: An Activity in Okazaki Fragment Processing ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (5) : 2244-2249.
- Myllykallio, H., P. Lopez, P. López-García, R. Heilig, W. Saurin, Y. Zivanovic, H. Philippe et P. Forterre. 2000. « Bacterial Mode of Replication with Eukaryotic-like Machinery in a Hyperthermophilic Archaeon ». *Science (New York, N.Y.)* 288 (5474) : 2212-2215.
- Nagata, M., S. Ishino, T. Yamagami, H. Ogino, J.-R. Simons, T. Kanai, H. Atomi et Y. Ishino. 2017. « The Cdc45/RecJ-like Protein Forms a Complex with GINS and MCM, and Is Important for DNA Replication in *Thermococcus kodakarensis* ». *Nucleic Acids Research* 45 (18) : 10693-10705.
- Nethanel, T., et G. Kaufmann. 1990. « Two DNA Polymerases May Be Required for Synthesis of the Lagging DNA Strand of Simian Virus 40 ». *Journal of Virology* 64 (12) : 5912-5918.
- Nick McElhinny, S. A., D. A. Gordenin, C. M. Stith, P. M. Burgers et T. A. Kunkel. 2008. « Division of Labor at the Eukaryotic Replication Fork ». *Molecular Cell* 30 (2) : 137-144.
- Nick McElhinny, S. A., B. E. Watts, D. Kumar, D. L. Watt, E.-B. Lundström, P. M. J. Burgers, E. Johansson, A. Chabes et T. A. Kunkel. 2010. « Abundant Ribonucleotide Incorporation into DNA by Yeast Replicative Polymerases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11) : 4949-4954.
- Niranjanakumari, S., et K. P. Gopinathan. 1993. « Isolation and Characterization of DNA Polymerase Epsilon from the Silk Glands of *Bombyx Mori* . » *Journal of Biological Chemistry* 268 (21) : 15557-15564.
- Nishida, H., S. Kiyonari, Y. Ishino et K. Morikawa. 2006. « The Closed Structure of an Archaeal DNA Ligase from *Pyrococcus Furiosus* ». *Journal of Molecular Biology* 360 (5) : 956-967.
- O'Donnell, M., L. Langston et B. Stillman. 2013. « Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (7) : a010108.
- Ogawa, T., S. Hirose, T. Okazaki et R. Okazaki. 1977. « Mechanism of DNA Chain Growth ». *Journal of Molecular Biology* 112 (1) : 121-140.
- Ohmori, H., E. C. Friedberg, R. P. P. Fuchs, M. F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T. A. Kunkel et al. 2001. « The Y-Family of DNA Polymerases ». *Molecular Cell* 8 (1) : 7-8.
- Oivanen, M., S. Kuusela et H. Lönnberg. 1998. « Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the Phosphodiester Bonds of RNA by Brønsted Acids and Bases ». *Chemical Reviews* 98 (3) : 961-990.
- Okazaki, R., T. Okazaki, K. Sakabe, K. Sugimoto et A. Sugino. 1968. « Mechanism of DNA Chain Growth. I. Possible Discontinuity and Unusual Secondary Structure of Newly Synthesized Chains. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 59 (2) : 598-605.
- Okazaki, T., et R. Okazaki. 1969. « Mechanism of DNA Chain Growth, IV. Direction of Synthesis of T4 Short DNA Chains as Revealed by Exonucleolytic Degradation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 64 (4) : 1242-1248.

- Ordóñez, H., M. L. Uson et S. Shuman. 2014. « Characterization of Three Mycobacterial DinB (DNA Polymerase IV) Paralogs Highlights DinB2 as Naturally Adept at Ribonucleotide Incorporation ». *Nucleic Acids Research* 42 (17) : 11056-11070.
- Palmer, S., et S. Cox. 1994. « Comparison of Extraction Procedures for High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Cellular Deoxynucleotides ». *Journal of Chromatography A* 667 (1-2) : 316-321.
- Palud, A., G. Villani, S. L'Haridon, J. Querellou, J.-P. Raffin et G. Henneke. 2008. « Intrinsic Properties of the Two Replicative DNA Polymerases of *Pyrococcus Abyssii* in Replicating Abasic Sites: Possible Role in DNA Damage Tolerance? ». *Molecular Microbiology* 70 (3) : 746-761.
- Pavlov, Y., C. Frahm, S. N. McElhinny, A. Niimi, M. Suzuki et T. Kunkel. 2006. « Evidence That Errors Made by DNA Polymerase α Are Corrected by DNA Polymerase δ ». *Current Biology* 16 (2) : 202-207.
- Pergolizzi, G., G. Wagner et R. Bowater. 2016. « Biochemical and Structural Characterization of DNA Ligases from Bacteria and Archaea ». *Bioscience Reports* 36 (5) : e00391.
- Pizzi, S., S. Sertic, S. Orcesi, C. Cereda, M. Bianchi, A. P. Jackson, F. Lazzaro, P. Plevani et M. Muzi-Falconi. 2015. « Reduction of hRNase H2 Activity in Aicardi-Goutières Syndrome Cells Leads to Replication Stress and Genome Instability ». *Human Molecular Genetics* 24 (3) : 649-658.
- Pogolotti, A. L., et D. V. Santi. 1982. « High-Pressure Liquid Chromatography-Ultraviolet Analysis of Intracellular Nucleotides ». *Analytical Biochemistry* 126 (2) : 335-345.
- Poli, J., O. Tsaponina, L. Crabbé, A. Keszthelyi, V. Pantesco, A. Chabes, A. Lengronne et P. Pasero. 2012. « dNTP Pools Determine Fork Progression and Origin Usage under Replication Stress: S-phase Progression under Replication Stress ». *The EMBO Journal* 31 (4) : 883-894.
- Potenski, C. J., et H. L. Klein. 2014. « How the Misincorporation of Ribonucleotides into Genomic DNA Can Be Both Harmful and Helpful to Cells ». *Nucleic Acids Research* 42 (16) : 10226-10234.
- Prelich, G., M. Kostura, D. R. Marshak, M. B. Mathews et B. Stillman. 1987. « The Cell-Cycle Regulated Proliferating Cell Nuclear Antigen Is Required for SV40 DNA Replication *in Vitro* ». *Nature* 326 (6112) : 471-475.
- Prelich, G., et B. Stillman. 1988. « Coordinated Leading and Lagging Strand Synthesis during SV40 DNA Replication *in Vitro* Requires PCNA ». *Cell* 53 (1) : 117-126.
- Prieur, D., G. Erauso et C. Jeanthon. 1995. « Hyperthermophilic Life at Deep-Sea Hydrothermal Vents ». *Planetary and Space Science* 43 (1-2) : 115-122.
- Pryor, J. M., M. P. Conlin, J. Carvajal-Garcia, M. E. Luedeman, A. J. Luthman, G. W. Small et D. A. Ramsden. 2018. « Ribonucleotide Incorporation Enables Repair of Chromosome Breaks by Nonhomologous End Joining ». *Science* 361 (6407) : 1126-1129.
- Pursell, Z. F., I. Isoz, E.-B. Lundström, E. Johansson et T. A. Kunkel. 2007. « Yeast DNA Polymerase Epsilon Participates in Leading-Strand DNA Replication ». *Science (New York, N.Y.)* 317 (5834) : 127-130.

- Rabinowitz, J. D., et E. Kimball. 2007. « Acidic Acetonitrile for Cellular Metabolome Extraction from *Escherichia Coli* ». *Analytical Chemistry* 79 (16) : 6167-6173.
- Raia, P., M. Carroni, E. Henry, G. Pehau-Arnaudet, S. Brûlé, P. Béguin, G. Henneke, E. Lindahl, M. Delarue et L. Sauguet. 2019. « Structure of the DP1–DP2 PolD Complex Bound with DNA and Its Implications for the Evolutionary History of DNA and RNA Polymerases ». *PLOS Biology* 17 (1) : e3000122.
- Raia, P., M. Delarue et L. Sauguet. 2019. « An Updated Structural Classification of Replicative DNA Polymerases ». *Biochemical Society Transactions* 47 (1) : 239-249.
- Ralec, C. 2013. « ADN polymérase et acides nucléiques endommagés chez les Archaea : maintenance génomique et Biotechnologies ». Thèse de doct., Université de Bretagne occidentale - Brest.
- Ramírez, M., R. Velázquez, M. Maqueda, A. López-Piñero et J. C. Ribas. 2015. « A New Wine *Torulaspota Delbrueckii* Killer Strain with Broad Antifungal Activity and Its Toxin-Encoding Double-Stranded RNA Virus ». *Frontiers in Microbiology* 6 : 983.
- Randerath, K., R. Reddy, T. F. Danna, W. P. Watson, A. E. Crane et E. Randerath. 1992. « Formation of Ribonucleotides in DNA Modified by Oxidative Damage in Vitro and in Vivo. Characterization by 32P-postlabeling ». *Mutation Research* 275 (3-6) : 355-366.
- Ranjbarian, F., S. Sharma, G. Falappa, W. Taruschio, A. Chabes et A. Hofer. 2021. « Isocratic HPLC Analysis for the Simultaneous Determination of dNTPs, rNTPs and ADP in Biological Samples ». *Nucleic Acids Research*, n° gkab1117.
- Raven, N., N. Ladwa, D. Cossar et R. Sharp. 1992. « Continuous Culture of the Hyperthermophilic Archaeum *Pyrococcus Furiosus* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (2) : 263-267.
- Raven, N., et R. J. Sharp. 1997. « Development of Defined and Minimal Media for the Growth of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus* Vc1 ». *FEMS Microbiology Letters* 146 (1) : 135-141.
- Reichard, P. 1988. « Interactions Between Deoxyribonucleotide and Dna Synthesis ». *Annual Review of Biochemistry* 57 (1) : 349-374.
- Reijns, M., B. Rabe, R. Rigby, P. Mill, K. Astell, L. Lettice, S. Boyle et al. 2012. « Enzymatic Removal of Ribonucleotides from DNA Is Essential for Mammalian Genome Integrity and Development ». *Cell* 149 (5) : 1008-1022.
- Richardson, T. T., L. Gilroy, Y. Ishino, B. A. Connolly et G. Henneke. 2013. « Novel Inhibition of Archaeal Family-D DNA Polymerase by Uracil ». *Nucleic Acids Research* 41 (7) : 4207-4218.
- Riondet, C., S. Morel et G. Alcaraz. 2005. « Determination of Total Ribonucleotide Pool in Plant Materials by High-pH Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography Following Extraction with Potassium Hydroxide ». *Journal of Chromatography A* 1077 (2) : 120-127.
- Robertson, C. E., J. K. Harris, J. R. Spear et N. R. Pace. 2005. « Phylogenetic Diversity and Ecology of Environmental Archaea ». *Current Opinion in Microbiology*, Growth Development / Edited by John N Reeve and Ruth A Schmitz, 8 (6) : 638-642.

- Robinson, N. P., et S. D. Bell. 2005. « Origins of DNA Replication in the Three Domains of Life: Origins of DNA Replication ». *FEBS Journal* 272 (15) : 3757-3766.
- Rouillon, C., G. Henneke, D. Flament, J. Querellou et J.-P. Raffin. 2007. « DNA Polymerase Switching on Homotrimeric PCNA at the Replication Fork of the Euryarchaea *Pyrococcus Abyssi* ». *Journal of Molecular Biology* 369 (2) : 343-355.
- Rumbaugh, J. A., R. S. Murante, S. Shi et R. A. Bambara. 1997. « Creation and Removal of Embedded Ribonucleotides in Chromosomal DNA during Mammalian Okazaki Fragment Processing ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (36) : 22591-22599.
- Rydberg, B., et J. Game. 2002. « Excision of Misincorporated Ribonucleotides in DNA by RNase H (Type 2) and FEN-1 in Cell-Free Extracts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (26) : 16654-16659.
- Sarmiento, F., F. Long, I. Cann et W. B. Whitman. 2014. « Diversity of the DNA Replication System in the *Archaea* Domain ». *Archaea* 2014 : 1-15.
- Sato, A., A. Kanai, M. Itaya et M. Tomita. 2003. « Cooperative Regulation for Okazaki Fragment Processing by RNase HIII and FEN-1 Purified from a Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus Furiosus* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309 (1) : 247-252.
- Sauguet, L., P. Raia, G. Henneke et M. Delarue. 2016. « Shared Active Site Architecture between Archaeal PolD and Multi-Subunit RNA Polymerases Revealed by X-ray Crystallography ». *Nature Communications* 7 : 12227.
- El-Sayed, W. M., A. L. Gombolay, P. Xu, T. Yang, Y. Jeon, S. Balachander, G. Newnam et al. 2021. « Disproportionate Presence of Adenosine in Mitochondrial and Chloroplast DNA of *Chlamydomonas Reinhardtii* ». *iScience* 24 (1) : 102005.
- Schmittgen, T. D., et K. J. Livak. 2008. « Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method ». *Nature Protocols* 3 (6) : 1101-1108.
- Setlow, P. 1974. « [1] DNA Polymerase I from *Escherichia Coli* ». In *Methods in Enzymology*, 29 : 3-12. Nucleic Acids and Protein Synthesis Part E. Academic Press.
- Shcherbakova, P. V., Y. I. Pavlov, O. Chilkova, I. B. Rogozin, E. Johansson et T. A. Kunkel. 2003. « Unique Error Signature of the Four-Subunit Yeast DNA Polymerase Epsilon ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (44) : 43770-43780.
- Shen, Y., K. D. Koh, B. Weiss et F. Storici. 2012. « Mispaired rNMPs in DNA Are Mutagenic and Are Targets of Mismatch Repair and RNases H ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (1) : 98-104.
- Shuttleworth, G., M. J. Fogg, M. R. Kurpiewski, L. Jen-Jacobson et B. A. Connolly. 2004. « Recognition of the Pro-mutagenic Base Uracil by Family B DNA Polymerases from Archaea ». *Journal of Molecular Biology* 337 (3) : 621-634.
- Son, T. D., M. Roux et M. Ellenberger. 1975. « Interaction of Mg²⁺ Ions with Nucleoside Triphosphates by Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy ». *Nucleic Acids Research* 2 (7) : 1101-1110.

- Spang, A., E. F. Caceres et T. J. G. Ettema. 2017. « Genomic Exploration of the Diversity, Ecology, and Evolution of the Archaeal Domain of Life ». *Science* 357 (6351) : eaaf3883.
- Sparks, J. L., et P. M. Burgers. 2015. « Error-Free and Mutagenic Processing of Topoisomerase 1-Provoked Damage at Genomic Ribonucleotides ». *The EMBO journal* 34 (9) : 1259-1269.
- Sparks, J., H. Chon, S. Cerritelli, T. Kunkel, E. Johansson, R. Crouch et P. Burgers. 2012. « RNase H2-Initiated Ribonucleotide Excision Repair ». *Molecular Cell* 47 (6) : 980-986.
- Sporbert, A. 2005. « PCNA Acts as a Stationary Loading Platform for Transiently Interacting Okazaki Fragment Maturation Proteins ». *Nucleic Acids Research* 33 (11) : 3521-3528.
- St Charles, J. A., S. E. Liberti, J. S. Williams, S. A. Lujan et T. A. Kunkel. 2015. « Quantifying the Contributions of Base Selectivity, Proofreading and Mismatch Repair to Nuclear DNA Replication in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *DNA repair* 31 : 41-51.
- Stuer-Lauridsen, B., et P. Nygaard. 1998. « Purine Salvage in Two Halophilic Archaea: Characterization of Salvage Pathways and Isolation of Mutants Resistant to Purine Analogs ». *Journal of Bacteriology* 180 (3) : 457-463.
- Sugimoto, K., T. Okazaki et R. Okazaki. 1968. « Mechanism of DNA Chain Growth, II. Accumulation of Newly Synthesized Short Chains in *E. Coli* Infected with Ligase-Defective T4 Phages. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 60 (4) : 1356-1362.
- Tahirov, T. H., K. S. Makarova, I. B. Rogozin, Y. I. Pavlov et E. V. Koonin. 2009. « Evolution of DNA Polymerases: An Inactivated Polymerase-Exonuclease Module in Pol ϵ and a Chimeric Origin of Eukaryotic Polymerases from Two Classes of Archaeal Ancestors ». *Biology Direct* 4 (1) : 11.
- Takemata, N., et S. D. Bell. 2021. « Multi-Scale Architecture of Archaeal Chromosomes ». *Molecular Cell* 81 (3) : 473-487.e6.
- Thiel, A., G. Michoud, Y. Moalic, D. Flament et M. Jebbar. 2014. « Genetic Manipulations of the Hyperthermophilic Piezophilic Archaeon *Thermococcus Barophilus* ». *Applied and Environmental Microbiology* 80 (7) : 2299-2306.
- Tom, S., L. A. Henriksen, M. S. Park et R. A. Bambara. 2001. « DNA Ligase I and Proliferating Cell Nuclear Antigen Form a Functional Complex * ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (27) : 24817-24825.
- Tomkinson, A. E., et D. S. Levin. 1997. « Mammalian DNA Ligases ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 19 (10) : 893-901.
- Tomkinson, A. E., S. Vijayakumar, J. M. Pascal et T. Ellenberger. 2006. « DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function ». *Chemical Reviews* 106 (2) : 687-699.
- Tran, P. T., N. Erdeniz, S. Dudley et R. M. Liskay. 2002. « Characterization of Nuclease-Dependent Functions of Exo1p in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *DNA Repair* 1 (11) : 895-912.
- Traut, T. W. 1994. « Physiological Concentrations of Purines and Pyrimidines ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 140 (1) : 1-22.

- Tsurimoto, T., et B. Stillman. 1991. « Replication Factors Required for SV40 DNA Replication in Vitro. II. Switching of DNA Polymerase Alpha and Delta during Initiation of Leading and Lagging Strand Synthesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (3) : 1961-1968.
- Tumbale, P., J. S. Williams, M. J. Schellenberg, T. A. Kunkel et R. S. Williams. 2014. « Aprataxin Resolves Adenylated RNA–DNA Junctions to Maintain Genome Integrity ». *Nature* 506 (7486) : 111-115.
- Turchi, J. J., L. Huang, R. S. Murante, Y. Kim et R. A. Bambara. 1994. « Enzymatic Completion of Mammalian Lagging-Strand DNA Replication. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (21) : 9803-9807.
- Uemori, T., Y. Sato, I. Kato, H. Doi et Y. Ishino. 1997. « A Novel DNA Polymerase in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus Furiosus*: Gene Cloning, Expression, and Characterization ». *Genes to Cells* 2 (8) : 499-512.
- Vaisman, A., W. Kuban, J. P. McDonald, K. Karata, W. Yang, M. F. Goodman et R. Woodgate. 2012. « Critical Amino Acids in *Escherichia Coli* UmuC Responsible for Sugar Discrimination and Base-Substitution Fidelity ». *Nucleic Acids Research* 40 (13) : 6144-6157.
- Vaisman, A., J. P. McDonald, D. Huston, W. Kuban, L. Liu, B. V. Houten et R. Woodgate. 2013. « Removal of Misincorporated Ribonucleotides from Prokaryotic Genomes: An Unexpected Role for Nucleotide Excision Repair ». *PLOS Genetics* 9 (11) : e1003878.
- Vaisman, A., J. P. McDonald, S. Noll, D. Huston, G. Loeb, M. F. Goodman et R. Woodgate. 2014. « Investigating the Mechanisms of Ribonucleotide Excision Repair in *Escherichia Coli* ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 761 : 21-33.
- Vaisman, A., et R. Woodgate. 2015. « Redundancy in Ribonucleotide Excision Repair: Competition, Compensation, and Cooperation ». *DNA Repair* 29 : 74-82.
- Vannier, P., V. T. Marteinson, O. H. Fridjonsson, P. Oger et M. Jebbar. 2011. « Complete Genome Sequence of the Hyperthermophilic, Piezophilic, Heterotrophic, and Carboxydrotrophic Archaeon *Thermococcus Barophilus* MP ». *Journal of Bacteriology* 193 (6) : 1481-1482.
- Varik, V., S. R. A. Oliveira, V. Hauryliuk et T. Tenson. 2017. « HPLC-based Quantification of Bacterial Housekeeping Nucleotides and Alarmone Messengers ppGpp and pppGpp ». *Scientific Reports* 7 (1) : 11022.
- Vengrova, S., et J. Z. Dalgaard. 2006. « The Wild-Type *Schizosaccharomyces Pombe* Mat1 Imprint Consists of Two Ribonucleotides ». *EMBO Reports* 7 (1) : 59-65.
- Vengrova, S., et J. Z. Dalgaard. 2004. « RNase-sensitive DNA Modification(s) Initiates *S. Pombe* Mating-Type Switching ». *Genes & Development* 18 (7) : 794-804.
- Vijayakumar, S., B. R. Chapados, K. H. Schmidt, R. D. Kolodner, J. A. Tainer et A. E. Tomkinson. 2007. « The C-terminal Domain of Yeast PCNA Is Required for Physical and Functional Interactions with Cdc9 DNA Ligase ». *Nucleic Acids Research* 35 (5) : 1624-1637.
- Waga, S., G. Bauer et B. Stillman. 1994. « Reconstitution of Complete SV40 DNA Replication with Purified Replication Factors ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (14) : 10923-10934.

- Walsh, E., S. S. Henrikus, A. Vaisman, K. Makiela-Dzbenka, T. J. Armstrong, K. Łazowski, J. P. McDonald et al. 2019. « Role of RNase H Enzymes in Maintaining Genome Stability in *Escherichia Coli* Expressing a Steric-Gate Mutant of Pol VICE391 ». *DNA Repair* 84 : 102685.
- Wanrooij, P. H., M. K. M. Engqvist, J. M. E. Forslund, C. Navarrete, A. K. Nilsson, J. Sedman, S. Wanrooij, A. R. Clausen et A. Chabes. 2017. « Ribonucleotides Incorporated by the Yeast Mitochondrial DNA Polymerase Are Not Repaired ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (47) : 12466-12471.
- Wardle, J., P. M. J. Burgers, I. K. O. Cann, K. Darley, P. Heslop, E. Johansson, L.-J. Lin et al. 2008. « Uracil Recognition by Replicative DNA Polymerases Is Limited to the Archaea, Not Occurring with Bacteria and Eukarya ». *Nucleic Acids Research* 36 (3) : 705-711.
- Watson, J. D., et F. H. Crick. 1953. « Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid ». *Nature* 171 (4356) : 737-738.
- Watt, D. L., E. Johansson, P. M. Burgers et T. A. Kunkel. 2011. « Replication of Ribonucleotide-Containing DNA Templates by Yeast Replicative Polymerases ». *DNA Repair* 10 (8) : 897-902.
- Westergaard, O., et B. Johnson. 1973. « Isolation of a Replication-Complex from Eukaryotes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 55 (2) : 341-349.
- White, M. F., et T. Allers. 2018. « DNA Repair in the Archaea—an Emerging Picture ». *FEMS Microbiology Reviews* 42 (4) : 514-526.
- Williams, J. S., A. R. Clausen, S. A. Nick McElhinny, B. E. Watts, E. Johansson et T. A. Kunkel. 2012. « Proofreading of Ribonucleotides Inserted into DNA by Yeast DNA Polymerase ϵ ». *DNA Repair* 11 (8) : 649-656.
- Williams, J. S., D. B. Gehle et T. A. Kunkel. 2017. « The Role of RNase H2 in Processing Ribonucleotides Incorporated during DNA Replication ». *DNA Repair* 53 : 52-58.
- Williams, J. S., et T. A. Kunkel. 2014. « Ribonucleotides in DNA: Origins, Repair and Consequences ». *DNA Repair* 19 : 27-37.
- Williams, J. S., S. A. Lujan et T. A. Kunkel. 2016. « Processing Ribonucleotides Incorporated during Eukaryotic DNA Replication ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (6) : 350-363.
- Williams, J., D. Smith, L. Marjavaara, S. Lujan, A. Chabes et T. Kunkel. 2013. « Topoisomerase 1-Mediated Removal of Ribonucleotides from Nascent Leading-Strand DNA ». *Molecular Cell* 49 (5) : 1010-1015.
- Woese, C. R., et G. E. Fox. 1977. « Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (11) : 5088-5090.
- Woese, C. R., O. Kandler et M. L. Wheelis. 1990. « Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12) : 4576-4579.

- Wu, S., W. A. Beard, L. G. Pedersen et S. H. Wilson. 2014. « Structural Comparison of DNA Polymerase Architecture Suggests a Nucleotide Gateway to the Polymerase Active Site ». *Chemical Reviews* 114 (5) : 2759-2774.
- Yamasaki, K., Y. Urushibata, T. Yamasaki, F. Arisaka et I. Matsui. 2010. « Solution Structure of the N-terminal Domain of the Archaeal D-family DNA Polymerase Small Subunit Reveals Evolutionary Relationship to Eukaryotic B-family Polymerases ». *FEBS Letters* 584 (15) : 3370-3375.
- Yang, G., M. Franklin, J. Li, T.-C. Lin et W. Konigsberg. 2002. « A Conserved Tyr Residue Is Required for Sugar Selectivity in a Pol α DNA Polymerase ». *Biochemistry* 41 (32) : 10256-10261.
- Yang, J., B. Li, X. Liu, H. Tang, X. Zhuang, M. Yang, Y. Xu, H. Zhang et C. Yang. 2018. « General Misincorporation Frequency: Re-evaluation of the Fidelity of DNA Polymerases ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496 (4) : 1076-1081.
- Yang, S. W., et J. Y. Chan. 1992. « Analysis of the Formation of AMP-DNA Intermediate and the Successive Reaction by Human DNA Ligases I and II. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (12) : 8117-8122.
- Yao, N. Y., J. W. Schroeder, O. Yurieva, L. A. Simmons et M. E. O'Donnell. 2013. « Cost of rNTP/dNTP Pool Imbalance at the Replication Fork ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (32) : 12942-12947.
- Zatopek, K. M., E. Alpaslan, T. Evans Jr., L. Sauguet et A. Gardner. 2020. « Novel Ribonucleotide Discrimination in the RNA Polymerase-like Two-Barrel Catalytic Core of Family D DNA Polymerases ». *Nucleic Acids Research* 48 (21) : 12204-12218.
- Zeng, X., J.-L. Birrien, Y. Fouquet, G. Cherkashov, M. Jebbar, J. Querellou, P. Oger, M.-A. Cambon-Bonavita, X. Xiao et D. Prieur. 2009. « *Pyrococcus* CH1, an Obligate Piezophilic Hyperthermophile: Extending the Upper Pressure-Temperature Limits for Life ». *The ISME Journal* 3 (7) : 873-876.
- Zhang, L., H. Lou, L. Guo, Z. Zhan, Z. Duan, X. Guo et L. Huang. 2010. « Accurate DNA Synthesis by *Sulfolobus Solfataricus* DNA Polymerase B1 at High Temperature ». *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* 14 (1) : 107-117.
- Zheng, L., et B. Shen. 2011. « Okazaki Fragment Maturation: Nucleases Take Centre Stage ». *Journal of Molecular Cell Biology* 3 (1) : 23-30.
- Zhu, H., et S. Shuman. 2008. « Bacterial Nonhomologous End Joining Ligases Preferentially Seal Breaks with a 3'-OH Monoribonucleotide ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (13) : 8331-8339.
- Zlotkin, T., G. Kaufmann, Y. Jiang, M. Y. Lee, L. Uitto, J. Syväoja, I. Dornreiter, E. Fanning et T. Nethanel. 1996. « DNA Polymerase Epsilon May Be Dispensable for SV40- but Not Cellular-DNA Replication ». *The EMBO journal* 15 (9) : 2298-2305.
- Zou, Z., Z. Chen, Y. Cai, H. Yang, K. Du, B. Li, Y. Jiang et H. Zhang. 2018. « Consecutive Ribonucleoside Monophosphates on Template Inhibit DNA Replication by T7 DNA Polymerase or by T7 Polymerase and Helicase Complex ». *Biochimie* 151 : 128-138.

Titre : Mécanismes d'élimination des ribonucléotides de l'ADN chez les *Archaea*

Mot clés : Ribonucléotides, ADN polymérase, RER, contenu en nucléotides, maintenance génomique

Résumé : Les ribonucléotides (rNMPs) sont les dommages à l'ADN les plus fréquents. Lorsqu'ils sont incorporés dans l'ADN les rNMPs peuvent avoir un rôle bénéfique de signal. En revanche, s'ils ne sont pas éliminés de l'ADN, ils peuvent causer des instabilités génomiques. Une des principales sources d'incorporation des rNMPs dans l'ADN sont les ADN polymérase dans les trois domaines du vivant. Nos modèles, les *Archaea Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus barophilus*, possèdent 2 ADN polymérase répliquatives appartenant à la famille B (PolB) et à la famille D (PolD). Notre objectif est d'étudier les mécanismes permettant l'élimination des rNMPs de l'ADN. Premièrement, nous avons étudié la contribution de l'activité exonucléase de PolB et PolD pour l'élimination des rNMPs. Les résultats montrent que l'activité 3'-5' exonucléase de PolD est plus efficace pour corriger des rNMPs nouvellement incorporés à l'ex-

trémité des amorces comparativement à PolB. Selon nos données de structure, cette différence n'est pas due à une contrainte physique du rNMP dans le site actif exonucléase. Nous avons ensuite étudié la voie de réparation par excision des ribonucléotides (RER) des *Archaea in vitro* et *in vivo*. Nos résultats démontrent que la voie RER est efficace pour corriger les rNMPs appariés et mésappariés. PolB et PolD peuvent être impliquées dans la voie RER, PolB est plus efficace pour l'élimination d'un rNMP apparié alors que PolD serait plus efficace pour corriger un rNMP mésapparié. Nous avons également proposé une voie RER alternative impliquant l'activité 5'-3' exonucléase de Fen1. Pour finir, nous avons déterminé les concentrations des nucléotides intracellulaires de *Thermococcus barophilus*, *Haloferax volcanii* et de leur mutants RNase H afin d'évaluer une possible variation du contenu en nucléotides.

Title: Removal mechanisms of embedded ribonucleotides in archaeal DNA

Keywords: Ribonucleotides, DNA polymerases, RER, nucleotide pool, genomic maintenance

Abstract: Ribonucleotides (rNMPs) are the main non-canonical nucleotides into genomic DNA. Embedded rNMPs in DNA can be used as a positive signal. However, if rNMPs are not removed from the DNA they can cause genomic instabilities. One of the main rNMP incorporation source into DNA are the DNA polymerases of the three domains of life. Our models, the *Archaea Pyrococcus abyssi* and *Thermococcus barophilus* possess 2 replicative DNA polymerases belonging to the B-family (PolB) and the D-family (PolD). We aimed to study the removal mechanisms of embedded ribonucleotides in DNA. First, we studied the contribution of proofreading exonuclease activity of PolB and PolD on rNMP processing. The results indicate that the 3'-5' exonuclease activity of PolD is more efficient in editing newly inserted rNMP at terminal primers than PolB. According to our struc-

tural data, this difference cannot be accounted by physical constraint of rNMP into the exonuclease active site. We then studied the archaeal Ribonucleotide Excision Repair (RER) pathway *in vitro* and *in vivo*. Our data demonstrate that RER pathway is efficient to correct both matched and mismatched rNMP. Both PolB and PolD can be involved in RER, PolB is more efficient for matched rNMP removal whereas PolD seems more efficient to correct mismatched rNMP. We also suggested an alternative RER pathway involving the 5'-3' exonuclease activity of Fen1. Finally, we determined the intracellular nucleotide concentration of *Thermococcus barophilus*, *Haloferax volcanii* and their relative RNase H mutants to assess the effect of RNase HIII deletion on the nucleotide pool variation.