

Proposition de stage

Identification des partenaires protéiques de Hef impliqués dans le redémarrage de la réplication chez l'archée *H. volcanii*

Il a été établi chez différents organismes, des bactéries aux eucaryotes, que des défauts de réplication de l'ADN induisent une augmentation de la fréquence de recombinaison, et sont ainsi une source importante de réarrangements chromosomiques. De plus, des liens entre défauts de réplication et cancer ont désormais été identifiés. Ainsi comprendre les mécanismes moléculaires préservant l'intégrité du génome est un enjeu majeur. Beaucoup d'études tendent à identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu chez les bactéries et les eucaryotes pour détecter les fourches de réplication arrêtées et permettre leur redémarrage. Or ces processus sont encore très mal connus chez les archées, qui constituent également des modèles d'étude pertinents, notamment de par la similitude des protéines archées avec les protéines eucaryotes. C'est pourquoi nous utilisons l'archée halophile *H. volcanii* comme modèle d'étude.

Afin de comprendre comment se fait le maintien de la stabilité génétique chez cet organisme, nous nous intéressons plus particulièrement au rôle de la protéine Hef. Hef est une hélicase/nucléase de la famille XPF/MUS81/FANCM trouvée chez les eucaryotes et les archées, mais absente chez les bactéries. L'étude fonctionnelle de Hef chez *H. volcanii* a permis de proposer un rôle dans le redémarrage des fourches de réplication arrêtées (Lestini *et al.*, 2010). Puis l'étude de sa localisation cellulaire et dynamique de diffusion au sein des cellules vivantes, grâce à l'expression de Hef fusionnée à la protéine verte fluorescente GFP et l'utilisation de différentes techniques d'imagerie, nous a permis de montrer que Hef est recrutée aux fourches de réplication arrêtées (Fig. 1) (Lestini *et al.*, 2013). Afin de mieux comprendre le rôle de Hef dans le redémarrage des fourches de réplication, nous nous sommes intéressés à la dynamique de la réplication chez *H. volcanii* et avons développé de nouveaux outils nous permettant de mieux comprendre ce processus fondamental chez cet organisme (Delpech *et al.*, 2018).

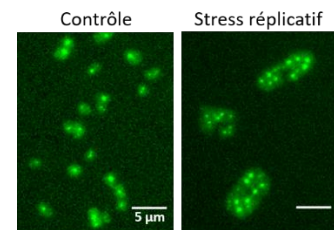


Figure 1 : Localisation de Hef::GFP

Nous souhaiterions désormais comprendre quel est le rôle de Hef aux fourches de réplication arrêtées, et comment elle est recrutée. Dans ce contexte, le projet de Master 2 vise à identifier les partenaires protéiques de Hef en exprimant la protéine fusionnée à l'étiquette FLAG afin de réaliser une co-immunoprécipitation. L'identification des protéines présentes en conditions normales de croissance, et en réponse à des stress réplcatifs induisant l'arrêt de la réplication, nous permettra d'identifier les principaux acteurs de la réplication et du redémarrage, qu'ils soient conservés chez les bactéries et/ou les eucaryotes ou spécifiques des archées.

Ce travail pourra être poursuivi dans le cadre d'un doctorat visant à appréhender les bases moléculaires du redémarrage des fourches de réplication chez *H. volcanii* par l'étude des différentes protéines identifiées en alliant des techniques de biologie moléculaire, de génétique et de microscopie de fluorescence.

Publications sur le sujet :

- 1- Delpech F., Collien Y., Mahou P., Beaurepaire E., Myllykallio M., Lestini R. (2018) Snapshots of archaeal DNA replication and repair in living cells using super-resolution imaging, *Nucleic Acids Research*, 46(20), 10757–10770. DOI: 10.1093/nar/gky829
- 2- Lestini, R., Delpech, F. and Myllykallio, H. (2015) DNA replication restart and cellular dynamics of Hef helicase/nuclease protein in *Haloferax volcanii*. *Biochimie*, 118, 254-263. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.07.022
- 3- Lestini, R., Laptенок, S.P., Kuhn, J., Hink, M.A., Schanne-Klein, M.C., Liebl, U. and Myllykallio, H. (2013) Intracellular dynamics of archaeal FANCM homologue Hef in response to halted DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 41, 10358-10370. DOI: 10.1093/nar/gkt816

Contact : Dr Roxane Lestini, Maîtres de Conférences, Ecole polytechnique
01 69 33 50 28 / roxane.lestini@polytechnique.edu
Page personnelle : <https://portail.polytechnique.edu/lob/fr/node/566>