

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Laboratoire d'optique et biosciences, Ecole polytechnique
Adresse : Route de Saclay, 91 128 Palaiseau
Responsable du Laboratoire / Entreprise : François Hache
Responsable de l'encadrement : Roxane Lestini
Téléphone : 01 69 33 50 28
E-mail : roxane.lestini@polytechnique.edu
Co-encadrant éventuel : /

2. Description du stage (2 pages maximum) :

Titre : Identification des partenaires protéiques de Hef impliqués dans le redémarrage de la réplication chez l'archée *Haloferrax volcanii*

Mots clés : Réplication, Stabilité des génomes, Archées, *H. volcanii*

Contexte et objectifs généraux :

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 (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).

Projet de stage :

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.

Les objectifs de ce stage M2 sont :

- Réaliser les expériences de coimmunoprécipitation en suivant le protocole établi par des collaborateurs (Van tran *et al.*, 2018 – DOI : 10.1093/nar/gky638)
- Analyse des résultats et sélection des partenaires d'intérêt
- Validation des interactions d'intérêt en co-exprimant le(s) partenaire(s) individuellement avec une étiquette histidine pour détecter chacun des partenaires spécifiquement et tester l'interaction *in vivo*
- Construire les souches d'*H. volcanii* permettant de surexprimer chacun des partenaires afin de purifier les protéines d'intérêt
- Validation et étude des interactions d'intérêt *in vitro*

Bibliographie :

- 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
- van Tran N., Muller L., Ross R. L., Lestini R., Létoquart J., Ulryck N., Limbach P. A., de Crécy-Lagard V., Cianférani S., Graille M. (2018). Evolutionary insights into Trm112-methyltransferase holoenzymes involved in translation between archaea and eukaryotes. *Nucleic acids research*, 46(16), 8483-8499. DOI: 10.1093/nar/gky638
- Lestini, R., Laptanok, 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
- Lestini, R., Duan, Z. and Allers, T. (2010) The archaeal Xpf/Mus81/FANCM homolog Hef and the Holliday junction resolvase Hjc define alternative pathways that are essential for cell viability in *Haloferax volcanii*. *DNA Repair (Amst)*, 9, 994-1002. DOI: 10.1016/j.dnarep.2010.06.012.

Sélection d'autres publications de l'équipe sur le sujet:

- 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
- Lestini, R., Delpech, F. and Myllykallio, H. (2015) DNA Replication Restart in Archaea, *Advances in DNA Repair*, Prof. Clark Chen (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/59994.

Ce stage peut-il se poursuivre par une thèse ? : Oui