**Géli’s Team: “Telomeres and Chromatin”**

**Project title: Dynamic of replication of telomeric sequences**

**Supervisor: Stéphane COULON, PhD, HDR**

**email address:** stephane.coulon@inserm.fr

**Concept and Objectives.**

Telomeres are key features of linear chromosomes that preserve genome stability. In mammals, they are composed of short tandemly TTAGGG repeated DNA sequences ending with a 3′ single-stranded DNA overhang on the G-rich strand. The telomeric sequences are protected by the shelterin complex. In the absence of special telomere maintenance mechanisms, linear chromosomes shorten with every round of DNA replication, leading to replicative senescence or apoptosis. Thus, telomere replication is a crucial step in maintenance of chromosomes ends, genome stability and tumorigenesis.

In the laboratory, we are particularly interested in the molecular mechanisms involved in the maintenance of telomeres in dividing cells. The yeast *Schizosaccharomyces pombe* is an excellent model organism because it has a telomeric structure similar to that described in humans. As in mammalian cells the replication forks slow down in the proximity of telomeric repeats in fission yeast. Stalled forks can eventually break and thus are a threat for genome stability. These mechanisms are largely unknown and the dynamic of replication has not been investigated so far. In the past, we showed that RPA, Stn1-Ten1 complex and the telomerase are required for efficient replication and maintenance of telomeric sequences (Ref 1, 2, 3 and 4).

Recently, we have determined the dynamic profile of replication of the end of chromosome II using next generation sequencing (NGS). We found that the last active origin is located at 25kb from the end and is responsible for the unidirectional progression of the fork towards the telomeric repeats. We showed that RFs naturally stalled at native barriers within subtelomeric regions, possibly to provide time to the cells to remove obstacles that impede the progression of the fork. We identified stalling sites that match with internal Taz1 binding sites (the main telomeric protein) that likely act as blocking element. The RFs stall at Taz1 binding sites and then possibly resume. Stn1-Ten1 complex is important for telomere replication, likely by stabilizing stalled RF and preventing accumulation of single-stranded DNA.

The aim of this project is to further investigate the molecular mechanisms which ensure the stability of these repeated sequences in the yeast *S. pombe,* focusing on the mechanism of fork stabilization and fork restart. The main techniques used in the laboratory are: the genetics of the yeast *S. pombe*, PCR, cloning, Western blot, Southern blot, co-immuniprecipitation (CoIP), chromatin immunoprecipitation (ChIP), two-dimensional DNA gel, yeast two-hybrid,….

**References:**

1. Audry et al. 2015. **EMBO Journal**. July 34: 1942–1958
2. Matmati et al. 2018. **Science Advances**. May 16;4(5):eaar2740
3. Escandell et al. 2019. **EMBO Journal**. Apr 1;38(7). pii: e100476
4. Matmati et al. 2020. **Cell reports**. Mar 10;30(10):3312-3322

Les télomères sont des structures clés qui assurent la protection des extrémités des chromosomes linéaires et préservent la stabilité du génome. Chez les mammifères, ils sont composés de courtes séquences d'ADN répétées en tandem (TTAGGG) se terminant par une extrémité d'ADN simple brin 3' sur le brin riche en G. Les séquences télomériques sont protégées par le complexe Shelterin. En l'absence de mécanismes spécifiques de maintien des télomères, les chromosomes linéaires se raccourcissent à chaque cycle de réplication de l'ADN, conduisant à la sénescence réplicative ou à l’apoptose. La réplication des télomères est une étape cruciale dans le maintien des extrémités chromosomiques, la stabilité du génome et la tumorigenèse.

Au laboratoire, nous nous intéressons particulièrement aux mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien des télomères dans les cellules en division. La levure *Schizosaccharomyces pombe* est un excellent organisme modèle car elle possède une structure télomérique similaire à celle décrite chez l'homme. Comme dans les cellules de mammifères, les fourches de réplication ralentissent à proximité de répétitions télomériques. Les fourches bloquées peuvent éventuellement se casser et constituent donc une menace pour la stabilité du génome. Ces mécanismes sont largement inconnus et la dynamique de réplication n'a pas été étudiée. Dans le passé, nous avons montré que RPA, le complexe Stn1-Ten1 et la télomérase sont nécessaires pour assurer la réplication et le maintien des séquences télomériques (Réf 1, 2, 3 et 4).

Récemment, nous avons déterminé la dynamique de réplication de l’extrémité du chromosome II en utilisant le séquençage de nouvelle génération (NGS). Nous avons constaté que la dernière origine active se situe à 25kb de l'extrémité et est responsable de la progression unidirectionnelle de la fourche vers les répétitions télomériques. Nous avons montré que les fourches de réplication se bloquaient naturellement au niveau des barrières naturelles dans les régions subtélomériques, peut-être pour donner le temps aux cellules d'éliminer les obstacles qui entravent la progression de la fourche. Nous avons identifié des sites de blocage qui correspondent aux sites de liaison internes de Taz1 (la protéine télomérique principale) qui agissent probablement comme un élément de blocage. Les fourches de réplication ralentissent sur les sites de liaison de Taz1, puis éventuellement redémarrent. Le complexe Stn1-Ten1 est important pour la réplication des télomères, probablement en stabilisant les fourches de réplication bloquées et en empêchant l'accumulation d'ADN simple brin.

Le but de ce projet est d'étudier plus précisément les mécanismes moléculaires qui assurent la stabilité de ces séquences répétées chez la levure *S. pombe*, en se concentrant sur le mécanisme de stabilisation de la fourche et de son redémarrage. Les principales techniques utilisées en laboratoire sont: la génétique de la levure *S.pombe*, PCR, clonage, Western blot, Southern blot, co-immuniprécipitation (CoIP), immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), gel d'ADN bidimensionnel, double-hybride,….

Etudiant sérieux et motivé ayant acquis des connaissances en biologie moléculaire et cellulaire.

Motivated student with strong background in molecular biology and cellular biology.

Objectif : publication dans les journaux scientifiques de renom