amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

# THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 8 avril 2025 par

**Chaïnez Bouabboune**

*Dynamique de réplication des séquences télomériques chez la levure Schizosaccharomyces pombe*

***Discipline***
*Recherches Biomédicales*

***Spécialité***
*Oncologie*

***École doctorale***
*ED 659*
*École Doctorale Recherches biomédicales*

***Laboratoire/Partenaires de recherche***
*Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille*

***Composition du jury***

| | |
|---|---|
| **Sylvie TOURNIER**<br>*CBI, Toulouse* | **Rapporteuse** |
| **Stefano MATTAROCCI**<br>*CEA- Int. De Bio. F. Jacob, Paris* | **Rapporteur** |
| **Mauro MODESTI**<br>*CRCM, Marseille* | **Président du jury** |
| **Pierre-Marie DEHE**<br>*CRCM, Marseille* | **Invité** |
| **Stéphane COULON**<br>*AMU, CRCM, Marseille* | **Directeur de thèse** |

CRCM Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille 50 ans de recherche et d'innovation

Fondation pour la recherche sur le cancer

INSTITUT PAOLI-CALMETTES unicancer Marseille

# Affidavit

Je soussigné, Chaïnez Bouabboune, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Stéphane Coulon, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 4 février 2025



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

# Liste de publications

1. Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast *(Vaurs et al., Cell Reports, 2023)*

2. Pot1 promotes telomere DNA replication via the Stn1-Ten1 complex in fission yeast *(Carvalho Borges et al., Nucleic Acids Research, 2023)*

3. Rad3ATR-dependent phosphorylation of Taz1 facilitates lagging strand synthesis *(Bouabboune et al., To be submitted)*

# Résumé

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques présentes aux extrémités des chromosomes. Ils sont constitués de séquences répétées d'ADN qui sont protégées par un ensemble protéique appelé shelterin. Ces séquences raccourcissent progressivement et naturellement à chaque cycle de réplication de l'ADN, un phénomène connu sous le nom de sénescence réplicative. Un raccourcissement prématuré des télomères peut être à l'origine de maladies génétiques nommées téloméropathies telles que la dyskératose congénitale, l'anémie aplasique et la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)…. Les télomères sont des régions difficiles à répliquer, car de nombreux obstacles entravent la progression de la fourche de réplication. Ces barrières génèrent un stress réplicatif important et des accidents survenant lors de la réplication peuvent provoquer la perte de séquences télomériques et accélérer leur raccourcissement. Depuis une dizaine d'années, des études ont montré que les protéines du complexe de la shelterin participaient activement à la réplication des télomères pour en faciliter le processus et en assurer le maintien. C'est le cas notamment de la protéine TRF1 et aussi de POT1-TPP1 (Sfeir et al., 2009 ; Zimmermann et al., 2014 ; Pinzaru et al., 2016), cependant les mécanismes précis dans lesquels ces facteurs sont impliqués restent à élucider.

Au laboratoire, nous utilisons le modèle de levure *Schizosaccharomyces pombe* car les télomères sont structurellement semblables aux télomères humains. Les mécanismes qui en assurent leur maintien sont aussi assez conservés de la levure à l'homme. Mes recherches se sont focalisées sur le rôle de Pot 1 et de Taz1, l'homologue de TRF1, dans la réplication des séquences terminales.

Pour étudier le rôle de Pot1 dans la réplication des régions terminales, nous avons utilisé, un mutant hypomorphe et thermosensible *pot1-1*, décrit précédemment par le groupe de Julie Cooper. Nous avons montré que *pot1-1* altère la réplication de l'ADN terminal et entraîne l'accumulation d'ADNsb. À température restrictive, cette mutation conduit à la perte complète de l'ADN télomérique. Dans les cellules *pot1-1*, nous avons constaté une diminution du recrutement de Stn1, un facteur associé à Ten1, qui est important pour recruter Polα (Pol1)

et initier de la synthèse d'ADN. La surexpression de Stn1 et de la sous-unité catalytique de Polα restaure partiellement les pertes de fonction de *pot1-1*. Nos résultats suggèrent que Pot1 par l'intermédiaire de son partenaire Tpz1 participe au recrutement de Stn1-Ten1 pour initier la synthèse d'ADN au niveau du brin retardé (lagging strand). Ces résultats sont en accord avec nos travaux précédents (Vaurs et al., 2023).

Un autre axe de mon projet de thèse a porté sur l'étude de la fonction de Taz1 et de son mode de régulation dans la réplication des séquences terminales. Nous avons démontré que le domaine de dimérisation de Taz1 est phosphorylé par Rad3 (ATR) spécifiquement en fin de phase S. Nous avons montré aussi que cette phosphorylation module la capacité de Taz1 à se dimériser et à se lier efficacement aux régions télomériques et subtélomériques. Des expériences de ChIP ont révélé que le recrutement de Taz1 est contrôlé en fonction du cycle cellulaire. En effet, nous avons observé que Taz1 est recruté aux séquences terminales en phase S et correspond au recrutement de Pol α suggérant que Taz1 joue un rôle dans le processing du fragment d'Okazaki. L'analyse des interacteurs de Taz1 par spectrométrie de masse a permis d'identifier Lig1, la ligase responsable de la liaison des fragments d'Okazaki entre eux. Ces résultats restent encore à confirmer, mais ils suggèrent que la fonction de Taz1 serait de participer à la synthèse et la maturation du brin retardé pendant la réplication des séquences terminales.

En conclusion, nos résultats apportent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliquant les protéines télomériques dans la réplication de l'ADN terminal.

Mots clés : Pot1, Taz1, télomère, régions subtélomériques, réplication des télomères.

# Abstract

Telomeres are nucleoprotein structures found at the ends of chromosomes. They consist of repeated DNA sequences that are protected by a protein complex called shelterin. These sequences shorten progressively and naturally with each cycle of DNA replication, a phenomenon known as replicative senescence. Premature telomere shortening can be the cause of genetic diseases known as telomeropathies, such as dyskeratosis congenita, aplastic anemia and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).... Telomeres are difficult regions to replicate, as numerous barriers impede the progression of the replication fork. These barriers generate significant replicative stress, and accidents occurring during replication can cause the loss of telomeric sequences and accelerate their shortening. Over the last ten years or so, studies have shown that proteins in the shelterin complex actively participate in telomere replication, facilitating the process and ensuring its maintenance. This is notably the case for the TRF1 protein and also POT1-TPP1 (Sfeir et al., 2009 ; Zimmermann et al., 2014 ; Pinzaru et al., 2016), however the precise mechanisms in which these factors are involved remain to be elucidated.

In the laboratory, we use the yeast model *Schizosaccharomyces pombe* because telomeres are structurally similar to human telomeres. The mechanisms by which telomeres are maintained are also quite conserved between yeast and humans. My research has focused on the role of Pot1 and Taz1, the TRF1 homolog, in terminal sequence replication.

To investigate the role of Pot1 in terminal replication, we used a hypomorphic, heat-sensitive *pot1-1* mutant previously described by Julie Cooper's group. We showed that *pot1-1* impairs terminal DNA replication and leads to the accumulation of single-stranded DNA. At restrictive temperatures, this mutation leads to the complete loss of telomeric DNA. In *pot1-1* cells, we found reduced recruitment of Stn1, a Ten1-associated factor important for recruiting Polα (Pol1) and initiating DNA synthesis. Overexpression of Stn1 and the catalytic subunit of Polα partially restores loss-of-function of *Pot1-1*. Our results suggest that Pot1 via its partner Tpz1 participates in the recruitment of Stn1-Ten1 to initiate DNA synthesis at the lagging strand. These results are in line with our previous work (Vaurs et al., 2023).

Another aspect of my thesis project was to study the function of Taz1 and its mode of regulation in terminal sequence replication. We demonstrated that the dimerization domain of Taz1 is phosphorylated by Rad3 (ATR) specifically at the end of S phase. We have also shown that this phosphorylation modulates the ability of Taz1 to dimerize and bind efficiently to telomeric and subtelomeric regions. ChIP experiments revealed that Taz1 recruitment is controlled as a function of the cell cycle. Indeed, we observed that Taz1 is recruited to terminal sequences in S phase and corresponds to Pol α recruitment suggesting that Taz1 plays a role in Okazaki fragment processing. Analysis of Taz1 interactors by mass spectrometry identified Lig1, the ligase responsible for binding Okazaki fragments together. These results have yet to be confirmed, but they suggest that Taz1's function is to participate in the synthesis and maturation of the delayed strand during terminal sequence replication.

In conclusion, our results provide an understanding of the molecular mechanisms involving telomeric proteins in terminal DNA replication.

Key words: Pot1, Taz1, telomere, subtelomeric regions, telomere replication

# Remerciements

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à toutes celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin, à mes années de thèse. Bien que je ne puisse pas mentionner chaque personne individuellement, je souhaite adresser ma reconnaissance à chacun d'entre vous.
Votre contribution a été précieuse tout au long de ce parcours.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr Sylvie Tournier, au Dr Mauro Modesti, au Dr Pierre-Marie Dehé et au Dr Stefano Mattarocci, qui ont bien voulu accepter de siéger au sein de mon jury et consacrer leur temps à l'évaluation de mon travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres de mon comité de thèse, le Dr Pierre-Marie Dehé, le Dr Karel Naiman et le Dr Stéphane Marcand, pour leurs contributions, leurs réflexions et leurs conseils, qui ont grandement enrichi l'avancement de mon projet doctoral.

Je remercie le Dr Vincent Géli de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance au Pr Jean-Paul Borg de m'avoir accordé l'opportunité d'intégrer son centre de recherche.

À mon directeur de thèse, le Dr Stéphane Coulon. Je vous suis reconnaissante pour votre encadrement constant, tant sur le plan expérimental que théorique. Votre soutien dans la réflexion et le développement de ma maturité scientifique a été essentiel, et ces qualités, j'en suis convaincu, seront précieuses pour la suite de ma carrière.

À mon équipe — Karel, Frédérique, Asako, Dmitri, Christelle, Christophe, Valérie, Pierre, Marie-Noëlle, François, Rima, Mohamad, Valéria, Yves, Léa, Coline, Lucas, Jérôme et Alexandre — Un grand merci pour vos précieux conseils, vos encouragements et nos échanges tout au long de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements au département des 3Rs.

Une pensée particulière également pour tous les étudiants en thèse que j'ai eu la chance de rencontrer : Inès, Bashir, Cédric, Nagham, Mathilde, Alix, Aya, Nassim, Yanis, Jack et Asmaa.

À Mohamad et Rima, avec qui j'ai partagé ces précieuses années, je vous remercie du fond du cœur pour les souvenirs inoubliables que nous avons créés ensemble. Vous êtes des personnes extraordinaires. Je n'ai aucun doute que l'avenir vous réservera encore de belles réussites.

Je tiens à remercier mes financeurs, l'École doctorale ainsi que la Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer

À ma famille,

Papa, Maman, merci pour l'éducation et le savoir que vous m'avez transmis. Vous avez été des parents exemplaires, et les mots ne suffiront jamais à exprimer toute ma reconnaissance et mon amour pour vous. Je vous remercie de m'avoir offert un cadre de vie idéal, propice à notre réussite.

Maman, je tiens à te remercier profondément. Tu as toujours été une source d'inspiration et de soutien constant à chaque étape de mon parcours. Tu es un exemple de femme, courageuse, accomplie et de persévérance.

À mon frère Adem, malgré la distance qui nous sépare, tu as toujours été une présence constante à mes côtés, m'encourageant sans relâche et suivant avec attention l'évolution de mes travaux de recherche.

À mon frère Reyasse, tu as toujours manifesté un grand intérêt pour la science, faisant preuve de rigueur et d'application. Ta passion et ta détermination, qui t'ont mené si loin, font de toi un véritable exemple de réussite. Je suis fier de toi.

À ma petite sœur Maïssa, qui a vécu cette thèse à mes côtés. J'espère que ce travail pourra être pour toi un exemple de persévérance, de détermination et de volonté à ne jamais renoncer, quels que soient les obstacles de la vie. Au-delà du fait que tu sois une petite sœur exemplaire, ta douceur et ta gentillesse font de toi une personne formidable, sans oublier ton intelligence qui continue toujours de me surprendre. Je te souhaite une belle réussite, à la hauteur de la personne exceptionnelle que tu es.

À Rylès, sans qui cette fin de thèse n'aurait pas été la même, merci pour ton soutien précieux et ta présence constante.

À ma meilleure amie Aylin, tu as toujours été présente, m'apportant ton soutien et croyant en moi à chaque étape. Merci pour ta bienveillance et pour ton amitié sans faille.

À toutes mes amies qui m'ont soutenue, encouragée, et qui m'ont toujours témoigné leur fierté

Je terminerai ces remerciements en adressant une pensée particulière à mes grands-parents, véritables exemples de persévérance, de motivation et de sacrifice : Mariem, Mohamad, Bakir et Aicha. Vous resterez à jamais gravés dans mon cœur.

**Ce parcours est une mosaïque façonnée par vos encouragements, vos inspirations et votre bienveillance. À chacun d'entre vous, je dédie une part de cette réussite, avec toute ma reconnaissance et mon profond respect.**

# Table des matières


**Affidavit** **1**

**Liste de publications** **2**

**Résumé** **3**

**Abstract** **5**

**Remerciements** **7**

**Table des matières** **9**

**Table des figures** **12**

**Liste des abréviations** **13**

**I. Introduction** **16**

**1. Les télomères : une structure protectrice dotée de propriétés de signalisation** **17**

1.1. Structure et fonctions liées aux télomères 18

1.1.1. Structure des télomères 18

1.1.2. Mécanismes de protection des télomères 21

1.1.2.1. Le complexe de la shelterin 21

1.1.2.2. Le complexe CTC1-STN1-TEN1 (CTC) 25

1.1.2.3. La télomérase 27

1.2. Raccourcissement des télomères et mécanismes de maintenance 30

1.2.1. Formation de l'extrémité 3' sortante 31

1.2.2. Le rallongement des télomères par la télomérase 33

1.2.3. La réplication des télomères 35

1.2.3.1. Stress réplicatif : « Problème de réplication des télomères » 35

1.2.3.2. Rôles des protéines télomériques dans la gestion du stress réplicatif 38

**2. Un modèle d'étude des télomères : la levure *Schizosaccharomyces pombe*** **42**

2.1. Cycle de vie 43

2.1.1. Cycle cellulaire 43

2.1.2. Cycle sexuel 46

2.2. L'organisation du génome de *S. pombe* 48

2.2.1. Le génome de *S. pombe* 48
2.2.2. Structure des séquences terminales chez *S. pombe* 49
2.2.2.1. Structure des régions télomérique 49
2.2.2.2. Structure des régions subtélomériques 51
2.2.3. L'épigénome de S. pombe : organisation chromatinienne 53
2.2.3.1. L'établissement de l'hétérochromatine aux régions télomériques et subtélomériques 54
2.2.3.2. Équilibre entre stabilité et dynamisme chromatinien 58
2.3. Les protéines télomériques chez *S. pombe* 60
2.3.1. Rôles fonctionnels des principaux 61
sous-complexes de la shelterin chez *S. pombe* 61
2.3.1.1. Le complexe Taz1-Rap1-Rif1 60
2.3.1.1.A. Taz1 61
2.3.1.1.B. Rap1 66
2.3.1.1.C. Rif1 67
2.3.1.2. Le complexe Pot1-Tpz1-Ccq1 67
2.3.1.2.A. Pot1 68
2.3.1.2.B Tpz1 70
2.3.1.2.C. Ccq1 74
2.3.1.3. La protéine Poz1 75
2.3.1.4. Le complexe Stn1-Ten1 76
2.3.1.5. La télomérase 78
2.3.1.6. Autres composants clés du maintien des télomères 83
2.3.1.6.A. Le Complexe Ku70/Ku80 83
2.3.1.6.B. La kinase Rad3 85
2.3.1.6.C. Tel1 86
2.3.1.6.D. Le complexe MRN 87
2.4. La transcription des télomères chez *S. pombe* 88
2.4.1. Les transcrits télomériques 88
2.4.2. Mécanisme de régulation 91
2.4.3. Rôle du transcriptome télomérique 93
2.5.La réplication des régions télomériques et subtélomériques chez *S. pombe* 95

2.5.1. Le redémarrage des fourches de réplication bloquées par recombinaison homologue 98
2.5.2. L'implication des protéines télomériques dans la réplication 99
2.5.2.1. Taz1 98
2.5.2.2. Stn1-Ten1 100
2.5.2.3. La télomérase 101
2.5.2.4. Rif1 102
2.5.2.5. Autres partenaires protéiques 102
**II. Résultats** **106**
**1. Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast** **107**
**2. Pot1 promotes telomere DNA replication via the Stn1-Ten1 complex in fission yeast** **109**
**3. Article en préparation : Bouabboune et al,** **123**
**III. Discussion/conclusion** **159**
**Bibliographie** **175**
**ANNEXES** **200**

# Table des figures

**Figure 1** : Représentation de la structure des télomères humains **19**
**Figure 2** : Analyse comparative des séquences, de la longueur et de la structure des télomères à travers les espèces **20**
**Figure 3** : Fonction des protéines télomériques chez l'homme **25**
**Figure 4** : Modèle de maintenance des télomères par la télomérase et le complexe CST **29**
**Figure 5** : Schéma illustrant le raccourcissement des télomères et l'immortalisation **30**
**Figure 6** : Formation de l'extrémité 3' sortante lors de la réplication des télomères **32**
**Figure 7** : Fonctionnement de la télomérase humaine **34**
**Figure 8** : Obstacles à la réplication des télomères et stress réplicatif associé **41**
**Figure 9** : Observation de *S. pombe* en phase S du cycle cellulaire **42**
**Figure 10** : Schéma du cycle cellulaire de *S. pombe* **44**
**Figure 11** : Points de contrôle chez *S. pombe* **46**
**Figure 12** : Développement sexuel de *S. pombe* **48**
**Figure 13** : Le complexe de la shelterin chez *S. pombe* **50**
**Figure 14** : Organisation des régions télomériques et subtélomériques de *S. pombe* **53**
**Figure 15** : L'établissement de l'hétérochromatine aux régions télomériques et subtélomériques **57**
**Figure 16** : Représentation des différents domaines de la protéine Taz1 **64**
**Figure 17** : La configuration « fermée » des télomères est caractéristique des télomères longs **72**
**Figure 18** : Action de la télomérase chez *S. pombe* **82**
**Figure 19** : Régulation des transcrits issus des régions terminales **90**
**Figure 20** : Régulation dynamique de l'élongation des télomères par TERRA **94**
**Figure 21** : Mécanismes de redémarrage des fourches de réplication bloquées ou cassées **97**
**Figure 22 :** Pot1 favorise la réplication de l'ADN télomérique via le complexe Stn1-Ten1 **163**
**Figure 23** : Modèle illustrant les modes de liaison de Taz1 aux régions subtélomériques lors de la synthèse du brin retardé **168**
**Figure 24** : Modèle de la maturation non conventionnelle des fragments d'Okazaki impliquant Taz1, Stn1-Ten1 et le complexe Pot1-Tpz1-Poz1 **172**

# Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléotide

ADNdb : ADN double brin

ADNr : Acide DésoxyriboNucléotide ribosomal

ADNsb : ADN simple brin

ARN : Acide ribonucléique

ARNnc : Acide Ribonucléotide non codant

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related

ATRIP : ATR Interacting Protein

BIR : Break-Induced Replication

BLM : Bloom Syndrome RecQ like helicase

Ccq1 : Coiled-Coil Quantitatively protein 1

Cdc2 : Cell Division Cycle 2

Cdc45 : Cell Cycle Division 45

CDC25 : Cell division cycle 25c

CDT1 : Chromatin licensing and DNA replication factor 1

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CDK : Kinase dépendant des cyclines

ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation

CHK1 : Checkpoint kinase 1

CHK2 : Checkpoint kinase 2

CTC1 : CST Telomere replication Complex component

D-loop : Displacement loop

DBD : DNA binding domain

DDR : DNA damage response

DRC : DNA Replication Checkpoint

DSB : Double-Strand Break

EST2 : Ever Shorter Telomere 2

EXO1 : Exonuclease 1

G1/2 : phase Gap 1/2 phase

G4 : G-quadruplex

GAP : GTPase Activating Protein

HDR : Homology-Directed Repair

HP1 : Heterochromatin Protein 1

HR : Homologous Recombination

ITS : Interstitial Telomeric Sequences

Ku : Ku70/Ku80 complex

MCM2-7 : Minichromosome maintenance protein complex 2-7

Mre11 : Meiotic recombination 11

MRN : Mre11 Rad50 Nbs1

MUS81 : MUS81

NHEJ : Non-Homologous End-Joining

OB-fold : Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding fold

ORC : Origin Recognition Complex

PB : paire de bases

Pol : Polymerase

POT1 : Protection of telomeres 1

Pol1: catalytic subunit of Polα

PuSeq : polymerase usage sequencing

PP1 : Protein Phosphatase 1

Prim-Polα : Primase-Polymerase α

RAP1 : Repressor/Activator Protein 1

RH : Recombinaison homologue

RITS : RNA-induced Initiation of Transcriptionnal Silencing

RnaseH1 : Ribonucléase H1

RPA : Replication protein A

RTEL1 : Regulator of telomere elongation helicase 1

Sae2 : Sporulation in the Absence of Spo11 2

SIM : SUMO Interacting Motif

SMC : Structural Maintenance Complex

SRHEC : Snf2/HDAC Repressive Complex

ST : Stn1-Ten1

STE : SubTElomères

STE1/2/3 : Subtelomeric elements 1 (STE1), 2 (STE2), and 3 (STE3)

TERT : Telomerase reverse transcriptase

Tel1 : Telomere length regulation protein 1

TERRA : Telomeric Repeat containing RNA

TS : thermo-sensitive

TIF : Telomere dysfunction-Induced Focus

TIN2 : TRF1-and TRF2-Interacting Nuclear Protein 2

TPE : Telomere Positionning Effect

Trt1 : Telomerase Reverse Transcriptase 1 protein

TurboID : Turbo Biotinylation Identification

UV : Ultraviolet

WRN : Werner

WT : Wild Type

# I. Introduction

# 1. Les télomères : une structure protectrice dotée de propriétés de signalisation

La découverte des télomères remonte à 1938, lorsque le généticien Hermann Müller identifia une structure au niveau des extrémités des chromosomes, résistant aux effets des rayonnements X sur les chromosomes de la drosophile. Il a décrit cette structure comme un élément protecteur essentiel, prévenant la fusion des séquences terminaisons linéaires des chromosomes eucaryotes, qu'il a nommée « télomères », dérivé du grec « telos », signifiant « fin », et « meros », signifiant « partie » (Muller et al., 1938). Cette découverte a été suivie par les travaux de la cytogénéticienne Barbara McClintock, qui, en observant des cassures chromosomiques dans les cellules de maïs, démontra que ces ruptures entraînaient l'adhésion et la fusion des extrémités endommagées, conduisant à la formation de chromosomes dicentriques. Ses travaux permirent de montrer l'existence d'une structure particulière aux extrémités des chromosomes, empêchant leur fusion. Elle mit ainsi en évidence le rôle crucial des télomères dans la stabilité du génome et la protection des extrémités chromosomiques (McClintock, 1939). Ce phénomène est étroitement lié à la limite de Hayflick, découverte par Leonard Hayflick en 1961, qui démontre que les cellules fœtales humaines ont une capacité de division limitée à 50-60 doublements avant d'entrer en sénescence (Hayflick et al., 1965 ; Hayflick et Moorhead., 1961).

Dans les années 1970, Aleksei Olovnikov et James Watson ont identifié le problème de réplication terminale « end replication problem », montrant que l'ADN linéaire ne peut être entièrement répliqué à ses extrémités (Olovnikov et al., 1971 ; Watson et al., 1972). Cela fut suivi par la découverte par AM Olovnikov qui proposa l'existence d'une enzyme capable de contrer l'érosion des télomères dans les cellules germinales et cancéreuses. Cette enzyme, appelée télomérase, fut identifiée quelques années plus tard par Elizabeth Blackburn et Jack Szostak chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* (Blackburn et al., 1985).

En reconnaissance de cette découverte fondamentale, Elizabeth Blackburn, Carol Greider et Jack Szostak reçurent le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2009. Grâce aux avancées remarquables dans le domaine de la génétique, les premières séquences télomériques ont été identifiées chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* par Elizabeth Blackburn et Joseph Gall (Blackburn et Gall., 1978). Par la suite, les télomères de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été séquencés grâce à la collaboration d'Elizabeth Blackburn avec Jack Szostak et Janis Shampay (Shampay et al., 1984). Plus récemment, le séquençage complet des télomères humains a été réalisé dans le cadre du Projet du génome humain, initié il y a 32 ans (Nurk et al., 2022).

# 1.1. Structure et fonctions liées aux télomères

## 1.1.1. Structure des télomères

Historiquement, David M. Prescott a identifié les séquences télomériques chez quatre espèces de protozoaires ciliés et a émis l'hypothèse que le brin riche en guanine des télomères s'étendait au-delà du brin riche en cytosine, formant ainsi une extrémité 3' sortante dans l'ADN. En 1997, deux études ont confirmé cette hypothèse démontrant que les télomères humains se terminent par une extrémité 3' sortante d'environ 300 nucléotides (Wright et al., 1997; Makarov et al., 1997). Cette extrémité sortante joue un rôle crucial dans la conformation des télomères humains, notamment dans la formation de la boucle-T (T-loop), comme démontré par Griffith et al. en 1999. Cette boucle T ou T-loop se forme lorsque le brin d'ADN simple brin (ADNsb) qui est présent à l'extrémité d'un télomère peut envahir l'ADN télomérique double brin créant une structure en boucle qui protège les extrémités du chromosome et empêche potentiellement les mécanismes de réparation de l'ADN de reconnaître ces extrémités comme des cassures d'ADN (De Lange et al., 2005 ; Doksani et al., 2013) **(Figure 1)**.

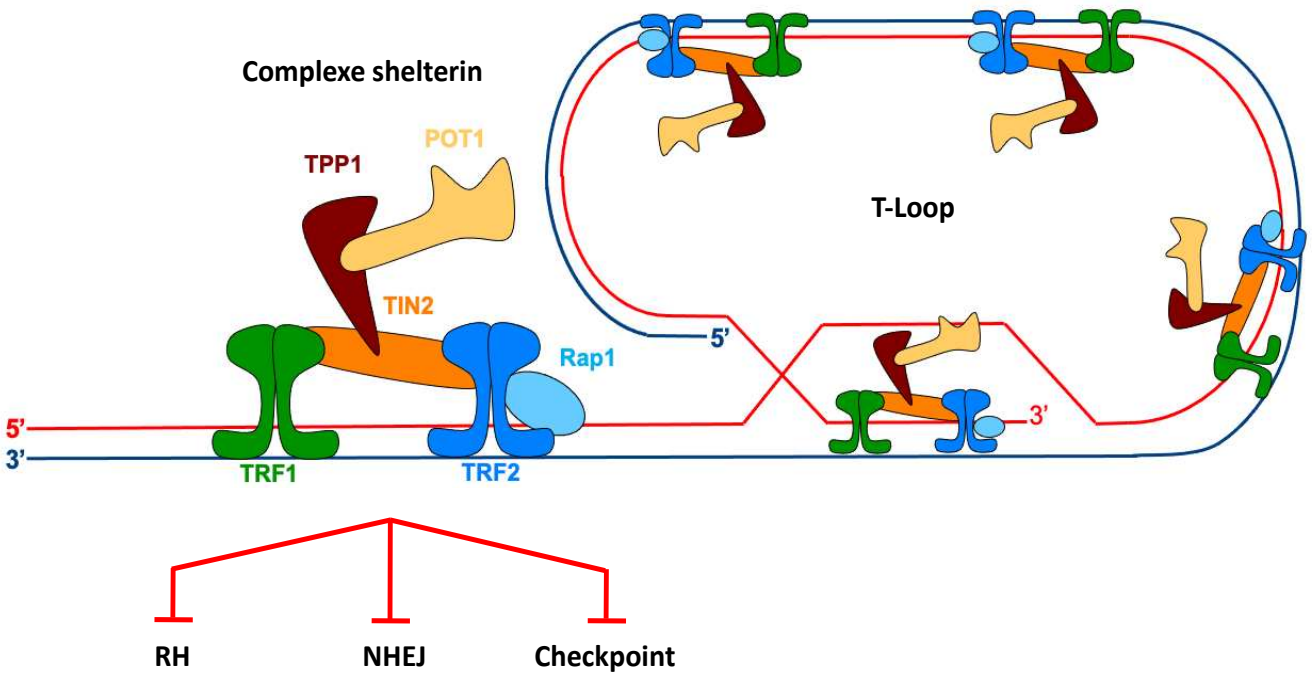



**Figure 1 : Représentation de la structure des télomères humains**

*Les télomères sont constitués de répétitions télomériques TTAGGG, recouvertes par six protéines : TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 et POT1.*

*TRF1 et TRF2, associées à RAP1, se lient à l'ADN double brin. TIN2 connecte TRF1 et TRF2 et se lie à TPP1, qui les relie à POT1 fixé à la région d'ADNsb. Cette extrémité, appelée 3'G-overhang, s'hybride dans la région double brin des télomères pour former une structure appelée boucle télomérique, ou T-Loop. TRF2 participe à la formation de la T-Loop.*

*Ces protéines s'associent pour former le complexe shelterin qui protège principalement contre l'activation des réponses aux dommage à l'ADN et les voies de réparation associées.*

Cette structure télomérique a ensuite été observée chez divers organismes eucaryotes, présentant un motif répétitif similaire mais avec des compositions nucléotidiques variables selon les espèces (Shampay et al., 1984 ; Cooke & Smith., 1986). Chez l'humain, les télomères sont constitués de répétitions en tandem de la séquence 5'-TTAGGG-3', avec une longueur allant de 10 à 15 kilobases (Moyzis et al., 1988 ; de Lange et al., 1990). Cette longueur varie considérablement entre les organismes. Par exemple, chez la levure bourgeonnante, les télomères sont relativement courts, mesurant de 300 à 350 paires de bases (Shampay et al.,

1984). À l'opposé, les souris de laboratoire possèdent des télomères particulièrement longs, s'étendant de 40 à 80 kilobases (Kipling et Cooke., 1990) **(Figure 2)**.

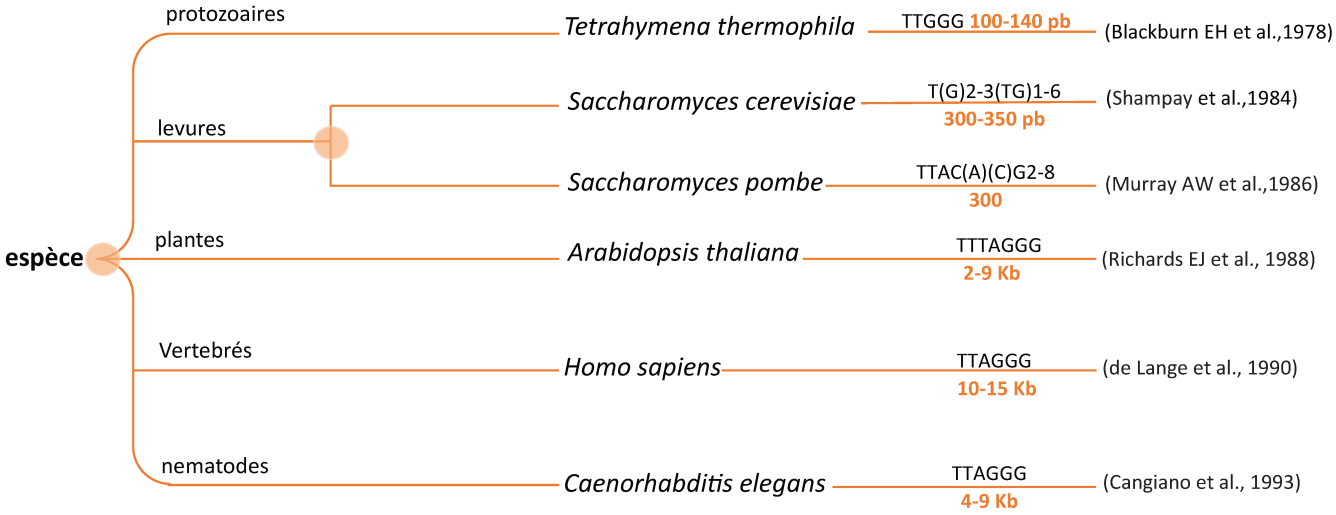



***Figure 2 : Analyse comparative des séquences et de la longueur des télomères à travers les espèces***

*Les télomères, localisés aux extrémités des chromosomes, sont des structures protéiques composées de séquences répétées riches en guanine. Depuis leur découverte, l'analyse de la séquence et de la structure des télomères dans divers organismes eucaryotes a révélé des variations significatives dans leur composition et leur taille selon les espèces. Ces différences reflètent des adaptations spécifiques aux besoins biologiques de chaque espèce tout en conservant une fonction commune essentielle dans le maintien de l'intégrité du génome.*

## 1.1.2. Mécanismes de protection des télomères

### 1.1.2.1. Le complexe de la shelterin

Les télomères sont recouverts par un ensemble de six protéines spécifiques nommé shelterin qui protègent les extrémités des chromosomes de la dégradation (O'Connor et al. 2004 ; De Lange et al., 2005). La shelterin humaine se compose de TRF1 (Telomeric Repeat binding Factor 1), TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 2), RAP1 (Repressor/Activator Protein 1), TIN2 (TRF1-and TRF2-Interacting Nuclear protein 2), TPP1 (Telomeric Protection Protein 1) et POT1 (Protection Of Telomeres 1) (Palm et al., 2008; De Lange et al., 2018) **(Figure 1 Gauche)**. Les protéines TRF1 et TRF2 s'associent aux répétitions télomériques double brin (Z. Zhong et al. 1992) et la protéine POT1 s'associe quant à elle à l'extrémité 3' sortante (Peter Baumann and Cech, 2001). Les protéines TRF1-2 et POT1 sont reliées par un pont protéique formé par TPP1-TIN2 (Loayza et al., 2003 ; S. H. Kim et al. 2004 ; Liu et al. 2004 ; Hockemeyer, et al. 2004 ; O'Connor et al., 2006). À la différence de la protéine TIN2 qui relie les protéines TRF1 et TRF2 entre elles (Kim et al., 1999 ; He et al. 2004), la protéine RAP1 est seulement associée à TRF2 (Li et al., 2000) **(Figure 1)**.

Les protéines TRF1 et TRF2 présentent une architecture similaire qui leur permet de se dimériser grâce à leur domaine TRFH, facilitant ainsi leur liaison aux séquences répétées d'ADN télomérique double brin (Bianchi et al., 1997 ; Broccoli et al., 1997). Elles jouent un rôle crucial dans la régulation des voies de signalisation des points de contrôle des dommages à l'ADN, en inhibant respectivement les voies ATR et ATM (Karlseder et al., 2004 ; Giannone et al., 2010 ; Sfeir et al., 2012). Cette inhibition est essentielle pour empêcher la reconnaissance des extrémités chromosomiques comme des cassures d'ADN. Par ailleurs, ces protéines exercent un contrôle négatif sur l'activité de la télomérase, l'enzyme responsable de l'allongement des télomères (Van et al., 1997 ; Smogorzewska et al., 2000). Bien que TRF1 et TRF2 partagent une architecture similaire leur permettant d'assurer des fonctions communes au niveau des télomères, leurs différences structurelles, notamment au niveau de leurs domaines N-

terminaux (Saint-Léger et al., 2014), leur confèrent des rôles spécifiques et distincts au sein des télomères (Benarroch-Popivker et al., 2016).

Tout d'abord, TRF2 exerce une fonction indépendante de TRF1 dans la formation et la stabilisation de la boucle T (T-loop) (Griffith et al., 1999 ; Doksani et al., 2013 ; Benarroch-Popivker et al., 2016 ; Timashev & De Lange, 2020). De plus, TRF2 inhibe l'activation du checkpoint par la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), qui est responsable de la détection des cassures double brin (CDB) de l'ADN (Karlseder et al., 1999). Une étude récente a révélé qu'ATR phosphoryle TRF2 sur la sérine 410, facilitant ainsi l'association de TIN2, ce qui limite le recrutement du facteur de réparation 53BP1 aux cassures télomériques. Ce mécanisme joue un rôle essentiel dans la prévention des fusions télomériques inappropriées en modulant la réponse aux dommages de l'ADN au niveau des télomères (Storchova et al., 2023).

Enfin, TRF2 bloque la voie de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) qui pourrait provoquer la fusion des télomères avec d'autres chromosomes (van Steensel et al., 1998). Une étude récente a approfondi ce mécanisme en révélant une interaction directe entre le domaine iDDR (Inhibitor of DNA Damage Response) de TRF2 et la sous-unité RAD50 du complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Cette liaison spécifique bloque l'association de RAD50 à l'ADN, empêchant ainsi l'activation du complexe MRN au niveau des télomères. Ce mécanisme protège les extrémités chromosomiques en inhibant l'activation inappropriée des voies de réponse aux dommages de l'ADN, ainsi que la résection des télomères par le complexe MRN (Okamoto et al., 2013 ; Khayat et al., 2024 ; Myler et al., 2023).

De son côté, TRF1 joue un rôle déterminant dans l'inhibition de l'activation de la kinase ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related) en facilitant le recrutement d'autres composants du complexe shelterin tels que TIN2-TPP1-POT1, en particulier durant la phase S du cycle cellulaire (Sfeir et al., 2009a ; Zimmermann et al., 2014). En outre, TRF1 joue un rôle essentiel dans la réplication des télomères (Sfeir et al., 2009a). À l'instar de TRF2, TRF1 recrute divers facteurs pour faciliter la progression de la fourche de réplication au niveau des télomères (Maestroni et al., 2017), un aspect que nous détaillerons dans la section 1.4 du manuscrit.

POT1 lie directement et protège l'ADN télomérique simple brin via ses deux domaines « OB-fold » présents dans sa partie N-terminale (Peter Baumann et al., 2001 ; Lei et al., 2004 ; Loayza et al. 2004). Son troisième domaine OB-fold contient un domaine de type Holliday Junction Resolvase-like (HJR) inactif (Lei et al., 2004) lui permettant d'interagir avec la protéine TPP1 (Lei et al., 2004 ; Aramburu et al., 2020). L'affinité de POT1 à l'ADNsb télomérique est renforcée par sa liaison avec TPP1 (Xin et al., 2007), ce qui confère à POT1 un rôle protecteur en prévenant la dégradation de l'ADN télomérique et en empêchant sa reconnaissance comme une cassure d'ADN (Baumann et al., 2001). La protection des télomères par POT1 repose sur plusieurs mécanismes clés. D'abord, POT1 se lie directement à l'ADNsb télomérique sans déclencher l'activation du point de contrôle ATR (Denchi et de Lange., 2007), en bloquant la liaison de RPA à l'ADNsb (Gong et al., 2010) qui partagent le même substrat et présentent une affinité similaire pour l'ADNsb télomérique (Takai et al., 2011). De plus, POT1 protège les extrémités télomériques des fusions en inhibant l'Alt-NHEJ qui est une voie alternative de NHEJ, et en préservant l'ADNsb des attaques par les nucléases (Rai et al., 2010).

TPP1 joue principalement un rôle structurel en stabilisant la liaison de POT1 à l'ADN, en participant à la formation du complexe protéique TRF1-TIN2-TPP1-POT1 (Liu et al., 2004) et en renforçant les interactions entre TIN2 et TRF2, ainsi qu'entre TRF2, TIN2 et TRF1 (O'Connor et al., 2006). En plus de sa fonction structurante, grâce à son domaine « TEL patch », qui lui permet d'interagir avec la partie N-terminale de la sous-unité catalytique TERT de la télomérase, TPP1 joue un rôle essentiel dans le contrôle de la télomérase (Xin et al., 2007 ; Nandakumar et al., 2012 ; Sexton et al., 2012 ; Zhong et al., 2012).

TIN2 joue un rôle structurel central au sein des télomères. En tant que protéine pivot, elle est essentielle à la formation du complexe protéique qui relie POT1 à TRF1-2 (O'Connor et al., 2006). En outre, TIN2 favorise l'association de TRF1 aux télomères, renforçant ainsi la stabilité de cette interaction (S. Kim, Kaminker et Campisi, 1999 ; S.-H. Kim et al., 2003). De plus, TIN2 stabilise également l'association de TRF2 et, par conséquent, celle de RAP1 aux télomères (J. Z. S. Ye, Donigian et al., 2004). En médiant les liaisons des différentes protéines de la shelterin, TIN2 contribue de manière significative à la protection et à l'homéostasie des télomères (S. H. Kim et al., 2004).

La protéine RAP1 interagit avec TRF2 pour se lier aux télomères (Li et al., 2000). RAP1 est essentielle pour la protection des télomères, particulièrement en l'absence de télomérase et lorsque les télomères sont courts (Martínez et al., 2016 ; Lototska et al., 2020). Des études récentes ont démontré que la délétion de RAP1 dans des modèles murins déficients en télomérase accélère le raccourcissement des télomères, augmente les dommages à l'ADN et exacerbe les pathologies dégénératives. Chez l'homme, bien que la déplétion de RAP1 n'affecte pas la longueur des télomères dans les fibroblastes pulmonaires primaires, elle induit des fusions télomériques dans les fibroblastes sénescents (Lototska et al., 2020). De plus, elle inhibe la voie de la recombinaison homologue (RH) en interagissant avec TRF2 évitant le risque de fusions télomériques (Rai et al., 2016 ; 2023 ; Khayat et al., 2024). Elle bloque également la voie NHEJ en empêchant la fixation des protéines Ku et DNA-PK, deux acteurs majeurs de cette voie de réparation (Ns & P, 2007 ; Bombarde et al., 2010 ; Sarthy et al., 2009).

Grâce à sa structure et ses multiples fonctions, le complexe shelterin joue un rôle crucial dans la protection des télomères en empêchant leur reconnaissance en tant que CDB. Ce complexe régule les voies de signalisation en inhibant les points de contrôle ATM et ATR, ainsi que les voies de réparation de l'ADN (NHEJ, Alt-NHEJ et RH) **(Figure 1)**. De plus, le complexe shelterin, notamment via les protéines télomériques TRF1, TRF2 et RAP1, est également impliqué dans la réplication des télomères. TRF1, par exemple, joue un rôle clé dans la réplication télomérique en facilitant la progression de la fourche de réplication vers les télomères, garantissant ainsi leur intégrité tout au long du cycle cellulaire (Sfeir et al., 2009a).
Ainsi, le complexe shelterin assure non seulement la protection des télomères contre les mécanismes de réparation de l'ADN, mais joue également un rôle fondamental dans leur réplication et leur stabilité **(Figure 3)**.

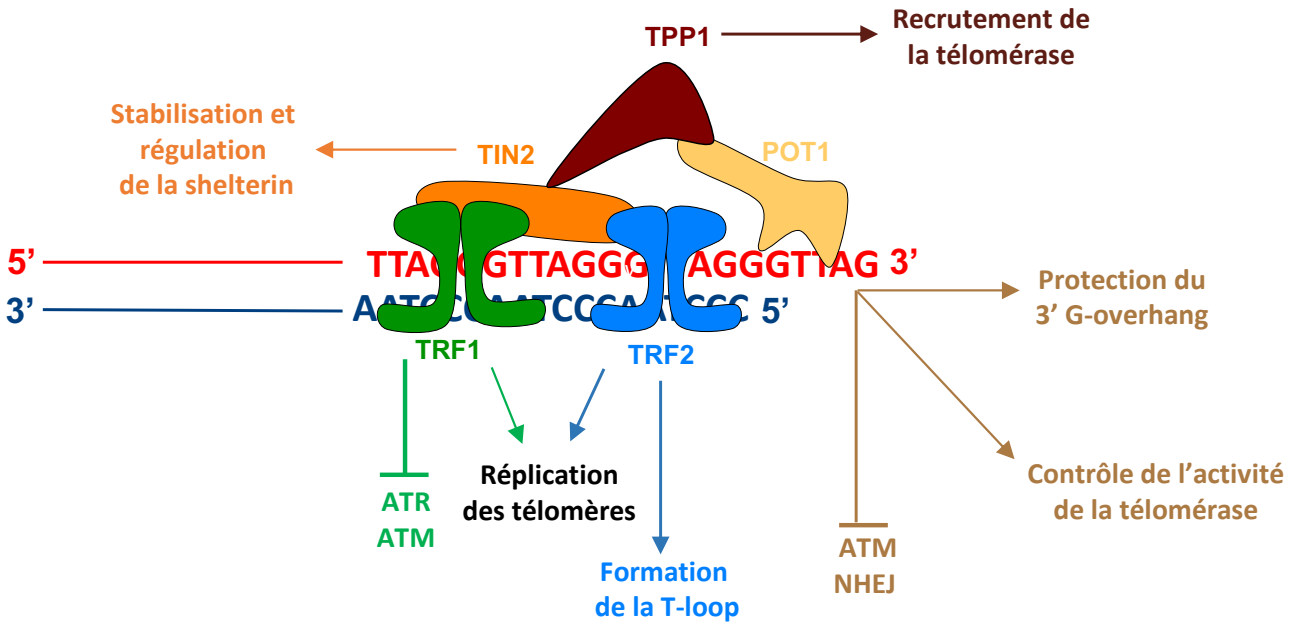



***Figure 3 : Fonction des protéines télomériques chez l’homme***

*Les télomères, composés de répétitions TTAGGG, sont protégés par le complexe shelterin, constitué de six protéines : TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, POT1 et TPP1. Ces protéines télomériques agissent ensemble pour garantir le maintien de l’intégrité des extrémités des chromosomes. Les fonctions principales des protéines du complexe shelterin sont présentées ci-dessous.*

### 1.1.2.2. Le complexe CTC1-STN1-TEN1 (CTC)

Historiquement, le complexe CST a été identifié comme un cofacteur de l'ADN polymérase α dans des cellules murines (Miyake et al., 2009) où il stimule l'activité de la primase au sein du complexe Primase-Polymérase α (Primase-POL α) et facilite la transition de la primase vers la polymérase (Casteel et al., 2009 ; Miyake et al., 2009). Ce rôle est également conservé chez l’homme, où l'interaction entre STN1 et POLA2, la sous-unité régulatrice de POLα, permet de stimuler l'activité du complexe Primase-POLα (Ganduri et al., 2017). Récemment, des recherches ont mis en évidence une interaction supplémentaire entre CTC1 et POLA1 (Kelich et al., 2021).

Le complexe CST, constitué des protéines CTC1, STN1 et TEN1, forme un hétérotrimère. Il est constitué de domaines OB-fold : CTC1 possède sept domaines OB-fold, tandis que STN1 et TEN1 n'en possèdent qu'un (Lim et al., 2021). La présence de ces domaines confère au CST une forte affinité pour l'ADNsb (Miyake et al., 2009).

Ce complexe exerce deux fonctions aux télomères humains :
Premièrement, il joue le rôle d'inhibiteur de la télomérase (Chen, Redon, and Lingner., 2012). Une étude récente suggère que POT1 phosphorylé positionne le complexe CST-POLα/primase au niveau des télomères et le maintien inactif jusqu'à l'achèvement de la réplication de l'ADN, la résection de l'extrémité 5' et l'extension des télomères par la télomérase. La déphosphorylation de POT1 permet alors de libérer le complexe CST- POLα /primase, activant l'enzyme pour effectuer la synthèse du brin complémentaire une fois que la télomérase a rallongé les télomères (Cai SW., 2023 ; 2024). Ainsi, le complexe CST stimule la synthèse du brin complémentaire par Pol α-primase (Chen et al., 2012 ; Zaug et al., 2022).
Cette synthèse empêche l'accumulation d'ADNsb au niveau des télomères (Stewart et al., 2012 ; Huang, Dai et Chai., 2012 ; Lyu et al., 2021).

Deuxièmement, le complexe CST joue un rôle dans la réplication des télomères grâce à sa capacité à s'associer et à démanteler des structures secondaires adopté par l'ADN télomérique, riche en guanine, appelées G-quadruplexes (G4s) (Bhattacharjee et al., 2017 ; M. Zhang et al., 2019 ; Tracy M. Bryan 2020 ; Li et al., 2023). Ce complexe est non seulement crucial pour la réplication des télomères, mais aussi pour la réplication du génome dans son ensemble. En effet, il a été montré que le CST favorise le redémarrage des fourches de réplication bloquées après un stress réplicatif (HU) sur le génome et aussi aux télomères (J. A. Stewart et al., 2012). Bien que son rôle dans la gestion des fourches bloquées ne soit pas entièrement compris, un modèle suggère que le complexe CST facilite le recrutement de la recombinase RAD51 en réponse au stress réplicatif, notamment au niveau des séquences riches en GC, de manière dépendante de l'ATR (Chastain et al., 2016). Ce mécanisme favoriserait ainsi le redémarrage des fourches de réplication bloquées (Chastain et al., 2016 ; Lyu et al., 2021). Par ailleurs, une autre étude indique que CST pourrait jouer un rôle dans la régulation de la nucléase MRE11 en inhibant son action sur les fourches de réplication inversées, empêchant ainsi la résection prématurée du brin naissant (Lyu et al., 2021).

Par ailleurs, il a été proposé que le CST contribue au maintien de la cohésion chromosomique en s'associant directement aux cohésines, ce qui permettrait de préserver l'intégrité des fourches de réplication bloquées (Schuck et al., 2021).

Le complexe CST, bien connu pour son rôle aux télomères, se révèle être un acteur polyvalent dont les fonctions s'étendent bien au-delà des télomères. Bien que ces aspects ne soient pas explorés en détail dans ce manuscrit, certaines fonctions du CST, telles que la synthèse de l'ADN, la protection de l'ADNsb et l'interaction avec RAD51, se chevauchent avec celles de RPA (J. Sun et al., 2009). Il serait donc essentiel d'explorer pourquoi, dans certaines conditions, le complexe CST est favorisé par rapport à RPA, et vice versa.
De plus, le mode d'association du complexe CST à l'ADN, décrit par Lim et al., implique la formation d'un supercomplexe décamérique autour duquel l'ADN simple brin s'enroule de manière analogue à l'enroulement de l'ADNdb autour d'un nucléosome (Lim et al., 2020), ce qui le distingue clairement de RPA. Cette différence structurale pourrait expliquer les variations fonctionnelles observées entre RPA et le CST.

#### 1.1.2.3. La télomérase

La télomérase est une enzyme qui permet aux cellules embryonnaires, germinales et souches de maintenir la longueur de leurs télomères, compensant ainsi le raccourcissement naturel qui se produit à chaque division cellulaire. Sans télomérase, les télomères raccourcissent progressivement, menant à la sénescence cellulaire ou à l'apoptose. Ce point sera abordé plus en détail dans la section 2.1 du manuscrit.
La télomérase est une ribonucléoprotéine composée de deux éléments principaux (Autexier et Lue, 2006) :

- **TERT** (telomerase reverse transcriptase) : la sous-unité catalytique est une transcriptase inverse, permettant d'allonger l'extrémité simple brin 3' des télomères (Nakamura et al., 1997).
- **hTR** : la sous-unité ARN sert de matrice pour TERT lors de l'ajout de nucléotides. Elle contient une séquence complémentaire aux répétitions télomériques (Feng et al., 1995).

Un complexe protéique appelé dyskérine, composé de TCAB1, NHP2, NOP10, GAR1 et DKC1, se lie à hTR pour stabiliser le complexe hTR-TERT et assurer son bon fonctionnement (Venteicher et al., 2009). Pendant la phase S, la télomérase est recrutée aux télomères dans les 30 minutes suivant leur réplication, lorsque ceux-ci deviennent accessibles après le passage de la fourche de réplication (Y. Zhao et al., 2009). Le recrutement de la télomérase aux télomères est facilité par l'interaction spécifique entre le domaine TEL-patch de TPP1, activé par sa phosphorylation, et le domaine N-terminal (TEN) de TERT **(Figure 7)**.

Il a été démontré que le complexe POT1-TPP1 renforce la processivité de la télomérase en limitant sa dissociation des télomères et en facilitant l'étape de translocation (Wang et al., 2007). Plus précisément, l'état de phosphorylation de la protéine POT1 joue un rôle clé dans la régulation de l'activité de la télomérase (Cai et al. 2024). En condition phosphorylée, POT1 maintient le complexe CST- POLα/primase dans un état inactif et auto-inhibé jusqu'à ce que la télomérase ait achevé l'extension des extrémités des télomères. À la fin de l'élongation des télomères, la déphosphorylation de POT1 entraîne la libération du complexe CST-POLα/primase dans un état actif qui achève la synthèse du brin complémentaire (Cai et al., 2024) **(Figure 4)**.

En conclusion, bien que certains mécanismes de recrutement et d'action de la télomérase aient été identifiés, la régulation de cette enzyme reste néanmoins incomprise. Les recherches actuelles soulignent l'importance des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation de TPP1 et de POT1. Des études approfondies sont nécessaires pour comprendre et identifier les différentes protéines impliquées dans la régulation de l'activité de la télomérase aux télomères

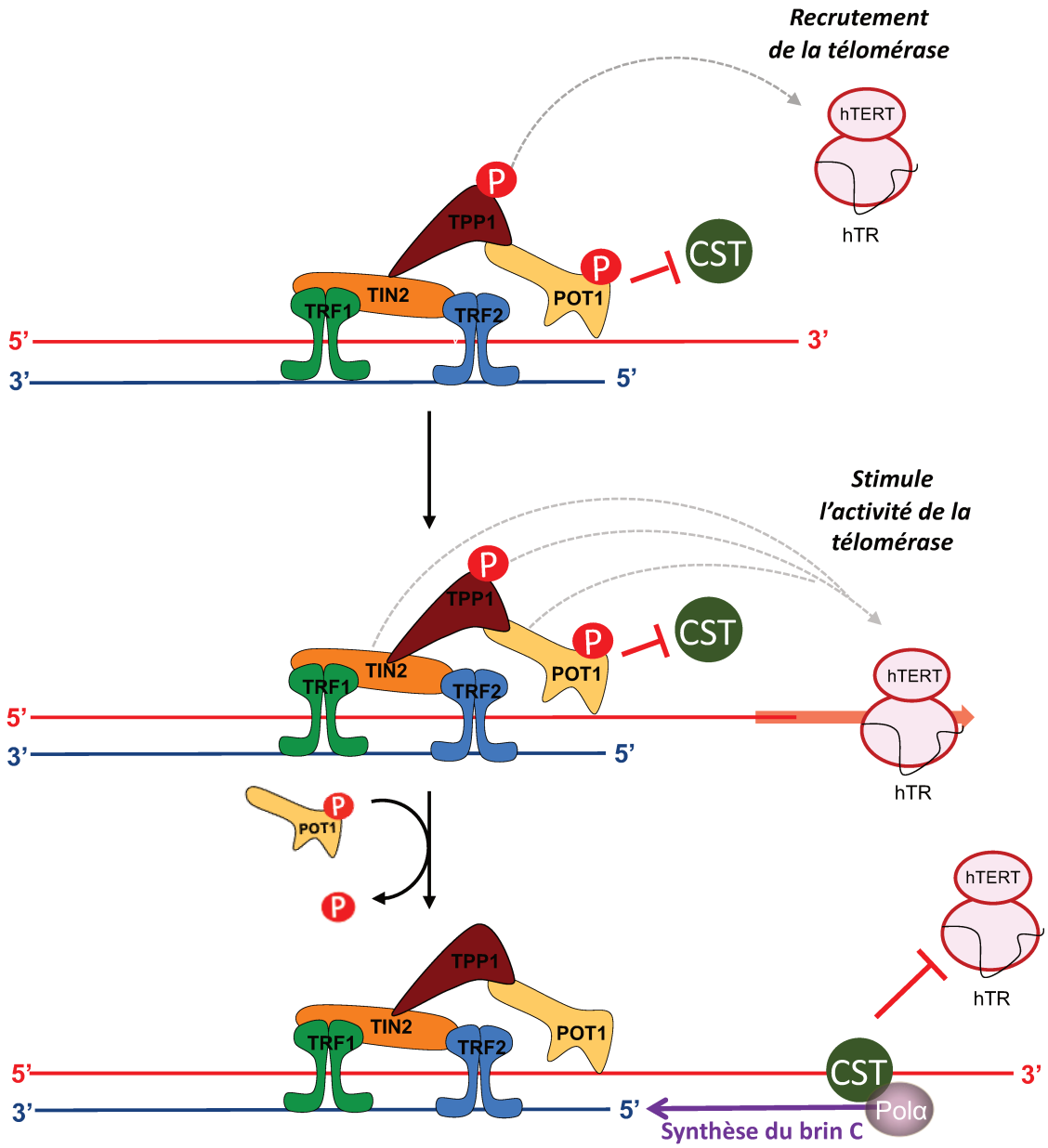



***Figure 4 : Modèle de maintenance des télomères par la télomérase et le complexe CST***

*POT1-TPP1 joue un rôle clé dans le recrutement et la régulation de deux enzymes essentielles à la maintenance des télomères : la télomérase et le complexe CST-POLα/primase.*

*La télomérase assure l'extension des télomères en étant spécifiquement recrutée à l'extrémité 3' simple brin grâce à son interaction avec la protéine TPP1. Par ailleurs, la phosphorylation de POT1 maintient le complexe CST dans un état auto-inhibé, empêchant ainsi l'activation prématurée de CST-POLα/primase jusqu'à ce que la télomérase ait achevé l'extension des extrémités des télomères. Une fois l'extension télomérique achevée, la déphosphorylation de POT1 entraîne la libération du complexe CST-POLα/primase dans un état actif qui intervient pour arrêter l'activité de la télomérase. Il joue ensuite un rôle essentiel dans la synthèse du brin complémentaire en recrutant le complexe Primase-POLα, permettant ainsi la synthèse de remplissage, ultime étape de la réplication des télomères.*

## 1.2. Raccourcissement des télomères et mécanismes de maintenance

Les télomères raccourcissent progressivement à chaque division cellulaire. Ce raccourcissement est observé dans les cellules somatiques dans lesquelles la télomérase n'est pas active. En revanche, les cellules embryonnaires et germinales parviennent à conserver des télomères de taille constante grâce à l'action de la télomérase (Hiyama et al., 2007 ; Roake et al., 2020). Ce raccourcissement est dû à deux problèmes : le « problème de réplication terminale » (Hayflick et al., 1961 ; Olovnikov et al., 1973b ; Watson et al., 1972, Muraki et al., 2012), où la machinerie de réplication ne parvient pas à répliquer complètement les télomères, et le « problème de réplication des télomères », qui est causé par la complexité de ces régions à être répliquées. En effet, les télomères représentent l'une des régions du génome les plus difficiles à répliquer, car ils comportent de multiples obstacles qui entravent la progression de la fourche de réplication, altérant ainsi l'homéostasie de la longueur des télomères **(Figure 5)**. Le « problème de réplication des télomères » sera décrit dans la partie suivante. D'autres facteurs comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent également accélérer ce processus de raccourcissement (Coluzzi, Leone et al., 2019).

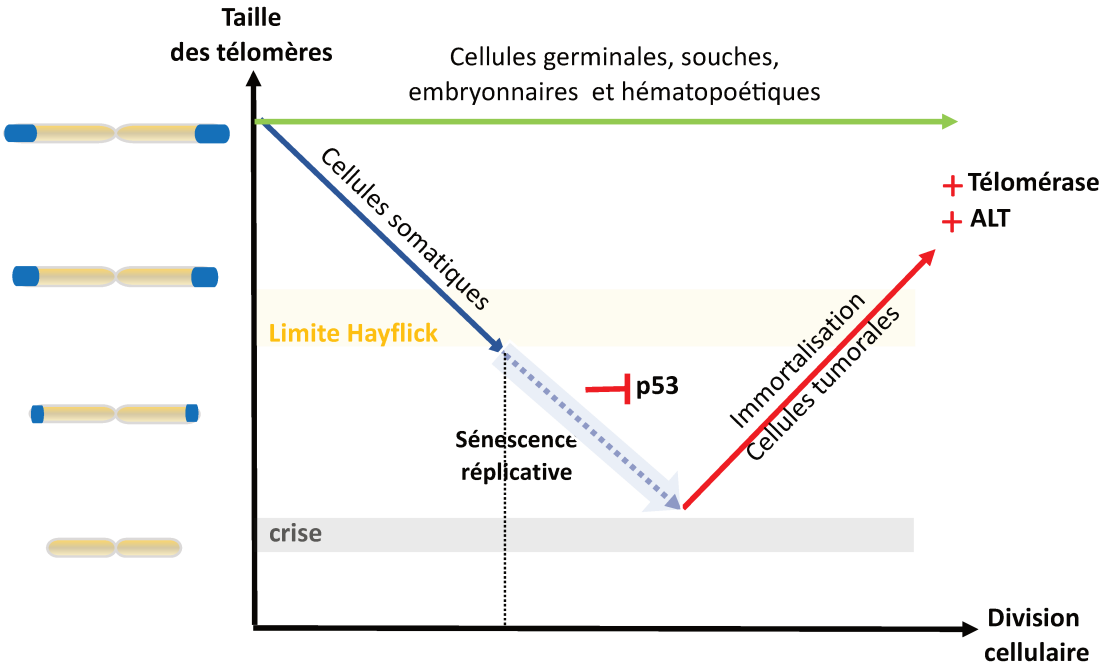


***Figure 5 : Schéma illustrant le raccourcissement des télomères et l'immortalisation cellulaire***

*Les télomères raccourcissent au fil des divisions dans les cellules somatiques. Lorsqu'ils deviennent trop courts, les cellules arrêtent de se diviser, c'est la sénescence. En l'absence de p53, certaines cellules peuvent échapper à la sénescence, entrer en crise et devenir instables. Cette instabilité génétique peut conduire à l'immortalisation tumorale par réactivation de la télomérase ou par le mécanisme ALT de rallongement des télomères. Dans les cellules souches et germinales, la télomérase maintient la longueur des télomères, empêchant leur raccourcissement.*

### 1.2.1. Formation de l'extrémité 3' sortante

Lors de chaque cycle de réplication, une extrémité 3' sortante (3'-overhang) est formé sur les deux brins néosynthétisés. Cette structure est essentielle pour l'accès de la télomérase à l'ADN télomérique et éventuellement pour la formation de la T-loop (De Lange et al., 2018).

Les mécanismes de formation de cette extrémité diffèrent selon le brin continu et discontinu (Dai et al., 2010). Dans le cas du brin discontinu, la synthèse des fragments d'Okazaki par la machinerie de réplication produit naturellement une extrémité 3' saillante. À l'inverse, le brin continu se termine de manière franche. Une étape de résection est nécessaire, impliquant la nucléase Apollo (Lenain et al. 2006) et l'exonucléase EXO1 (Wu et al. 2010), recrutées par TRF2 pour initier la résection du brin continu afin de générer l'extrémité 3' sortante (Dai et al., 2010, Takai, et De Lange., 2012). La télomérase allonge le brin riche en guanine. Ensuite, le complexe CST-POLα/primase est recruté pour compenser d'une part la perte du brin C due à la résection sur le brin continu, et d'autre part, il remplace les nucléotides perdus lors de l'élimination de la dernière amorce durant la synthèse du brin discontinu (H. Takai et al., 2024) **(Figure 6)**.

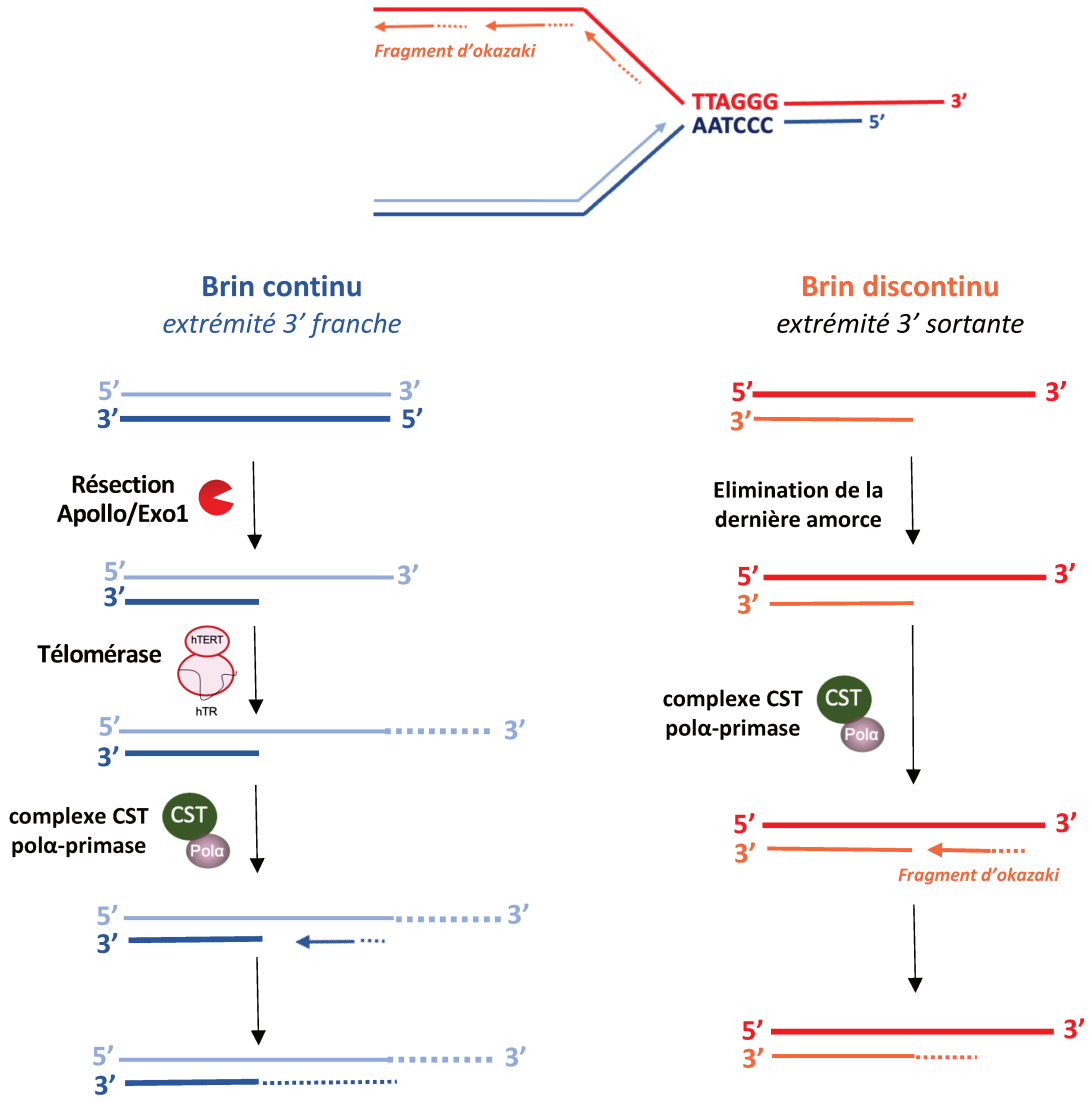



***Figure 6 : Formation de l'extrémité 3' sortante lors de la réplication des télomères***

*La réplication des télomères diffère entre le brin continu et le brin discontinu. Pour le brin discontinu (rouge), les primases synthétisent une amorce ARN (orange) pour initier l'action de l'ADN polymérase α. Une fois la dernière amorce éliminée, le complexe CST/POLα-primase remplit le brin complémentaire manquant à la position du dernier fragment d'Okazaki. Le brin continu (bleu) est synthétisé par l'ADN polymérase ε, formant une extrémité franche. Celle-ci est ensuite résectée par Apollo et EXO1 pour exposer une extrémité 3' sortante, rallongée par la télomérase. Le complexe CST/POL α-primase compense la perte du brin complémentaire C. (Adapté de Takai et al., 2024)*

## 1.2.2. Le rallongement des télomères par la télomérase

Comme mentionné précédemment, la télomérase est recrutée aux télomères lors de la phase S, dans un intervalle de 30 minutes post-réplication, lorsque les télomères deviennent accessibles suite au passage de la fourche de réplication (Y. Zhao et al., 2009).

Le mécanisme de synthèse des nouvelles séquences télomériques par la télomérase se décompose en trois phases distinctes (Roake et Artandi., 2020) **(Figure 7)**.

Premièrement la phase d'association : Grâce à la matrice hTR, la télomérase reconnaît et se fixe à l'extrémité 3' simple brin. Ensuite la phase d'élongation, la sous-unité catalytique TERT procède à l'addition séquentielle de nucléotides à l'extrémité 3' du télomère. Chaque cycle d'extension permet l'incorporation de jusqu'à six nucléotides complémentaires. Après un cycle, la télomérase transloque le long de l'ADNsb et initie un nouveau cycle de synthèse constituant la dernière étape. Ce processus itératif, désigné sous le terme de "processivité d'ajout de répétitions" (RAP) est une caractéristique intrinsèque de la télomérase. Il permet à la télomérase d'allonger les télomères de manière répétitive et efficiente (Welfer et al., 2023).

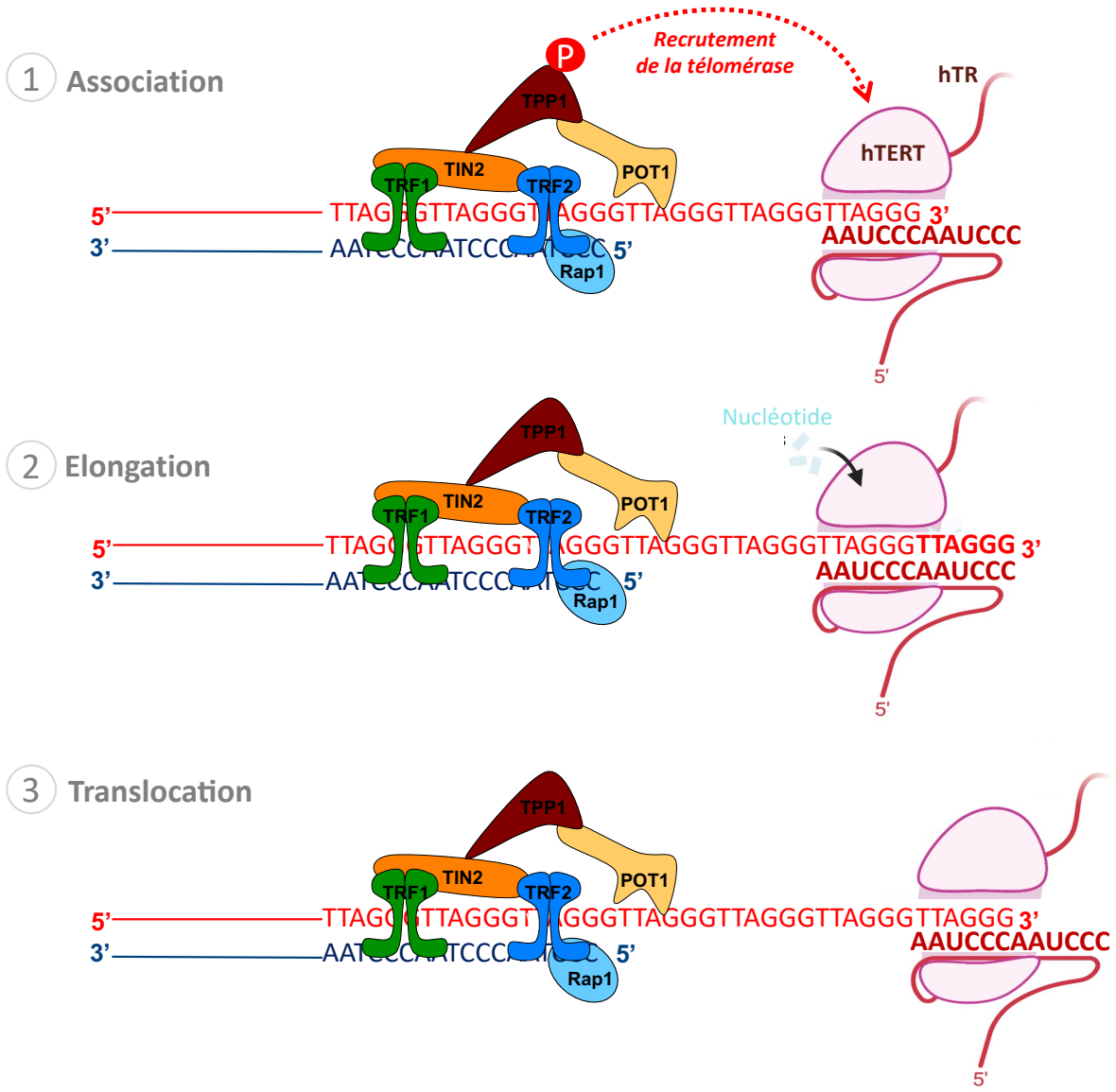



***Figure 7 : Fonctionnement de la télomérase humaine***

*Phase d'association (1) : cette étape correspond au recrutement de la télomérase aux télomères pendant la phase S. La phosphorylation de TPP1 permet une interaction spécifique entre le domaine patch-TEL de TPP1 et le domaine N-terminal (TEN) de TERT de la télomérase, assurant ainsi son recrutement pendant les phases S et G2/M. La télomérase s'associe à l'extrémité simple brin 3' grâce à son ARN matrice, qui porte des séquences complémentaires aux répétitions télomériques. Phase d'élongation (2) : cette étape correspond à la synthèse d'une nouvelle séquence télomérique. Phase de translocation (3) : cette étape permet à la télomérase de repositionner l'extrémité 3' pour amorcer la synthèse d'une nouvelle répétition TTAGGG.*

## 1.2.3. La réplication des télomères

Chez l'homme, la réplication des télomères se déroule pendant la phase S du cycle cellulaire, contrairement à la levure où elle s'effectue plutôt en fin de phase S (Bonnell et al., 2021 ; Wright et al., 1999). Les mécanismes de la réplication des séquences télomériques chez *S. pombe* seront abordés plus en détail dans la seconde section de ce manuscrit. Il a été établi que les régions télomériques sont reconnues comme des sites fragiles, difficiles à répliquer, où les fourches de réplication ralentissent (Sfeir et al., 2009). Cette difficulté de réplication est due à la présence de multiples obstacles pouvant entraver la progression de la fourche de réplication (Maestroni, Matmati, et Coulon., 2017).

Ce phénomène, connu sous le nom de "stress réplicatif aux télomères", constitue un défi majeur pour la cellule. Si ce stress n'est pas correctement géré, il peut provoquer le blocage de la fourche de réplication et, dans des cas extrêmes, son effondrement. En conséquence, la fourche peut se casser, libérant une extrémité d'ADNdb **(Figure 8)**.

### 1.2.3.1. Stress réplicatif : « Problème de réplication des télomères »

La réplication des télomères constitue un défi pour les cellules en raison de la présence des structures d'ADN (R-loop, surenroulement d'ADN, G4, T-Loop) et de protéines liées à l'ADN qui sont des obstacles à la progression de la fourche de réplication (Maestroni, Matmati, et Coulon., 2017). Chez l'homme, ce stress réplicatif peut engendrer de nombreuses anomalies télomériques, notamment des fusions ou des réarrangements chromosomiques au niveau des télomères.

Pour faire face au stress réplicatif, la cellule recrute des protéines afin d'éliminer les obstacles rencontrés lors de la réplication des télomères. Parmi ces obstacles, le démantèlement de la T-loop est crucial pour permettre à la télomérase d'accéder à l'extrémité 3' G-overhang et pour éviter la collision avec le réplisome pendant la phase S. Ce démantèlement peut être effectué

par l'hélicase RTEL1, recrutée aux télomères par l'intermédiaire de la protéine TRF2 (Vannier et al., 2012 ; Sarek et al., 2015) La régulation de cette interaction est finement orchestrée. Pendant les phases G1, G2 et M du cycle cellulaire, TRF2 est phosphorylé sur le site Ser365 par la kinase 2 dépendante de la cycline (CDK2) (Wang Z et al., 2021). Au cours de la phase S, la déphosphorylation de TRF2 sur le résidu Ser365, par la phosphatase PP6R3, facilite le recrutement de RTEL1 aux télomères, permettant le déroulement transitoire de la T-loop (Sarek et al., 2015 ; 2019 ; Wang Z et al., 2021). En l'absence de RTEL1, la résolution de la T-loop devient défectueuse, un processus pris en charge de manière inappropriée par les nucléases SLX1-SLX4, entraînant des pertes de télomères et la formation d'ADN télomériques circulaires (Vannier et al., 2012).

En plus de son interaction avec RTEL1, TRF2 facilite également le recrutement des hélicases WRN et BLM pour la résolution de la T-loop (Opresko et al., 2002). Les mécanismes régulant la résolution de la T-Loop reposent probablement sur un réseau complexe de modifications post-traductionnelles des protéines de la shelterin. Ce domaine est encore largement inexploré. Quels sont les signaux moléculaires qui orchestrent ces modifications ? Comment ces modifications influencent-elles la coordination entre les différents acteurs de la machinerie de réplication ? de nombreuses questions qui nécessitent encore d'être explorées.

Les hélicases BLM et WRN jouent également un rôle dans la résolution des structures G4 (H. Sun et al., 1998 ; Mohaghegh et al., 2001 ; Huber et al., 2002). Il a été démontré que le complexe CST (M. Zhang et al., 2019), la protéine RPA (Salas et al., 2006) et la protéine POT1 (M. Zhang et al., 2019), peuvent inhiber la formation de ces structures en se liant à l'ADNsb *in vitro*. Bien que la protéine PIF1, une hélicase, soit capable de résoudre les structures G4 *in vitro*, son rôle physiologique *in vivo* demeure encore à clarifier (Sanders., 2010).
Enfin, l'hélicase RTEL1 contribue également à la résolution des structures G4 aux télomères, grâce à son interaction avec PCNA (Vannier et al., 2012).
L'importance de ces protéines est mise en évidence par le fait qu'une mutation dans ces gènes est associée aux téloméropathies (Walne et al., 2013a ; Le Guen et al., 2013 ; Jullien et al., 2016, Kannengiesser et al., 2015).

Un autre défi majeur dans la réplication des télomères réside dans la dissolution des structure appelée boucle R (R-loop), qui peuvent également compromettre l'intégrité du génome. Les télomères sont transcrits en ARN non codants, appelés TERRA, par l'ARN polymérase II (Azzalin et al., 2007). Lors de cette transcription, les molécules d'ARN peuvent s'apparier à leur matrice génomique générant des hybrides ARN/ADN. Le déplacement du brin par ces hybrides forme ces R-loop (Costantino et Koshland, 2015). Elles constituent des barrières naturelles à la progression de la fourche de réplication (Rippe et Luke., 2015). Par ailleurs, ces structures provoquent l'ouverture du duplex d'ADN, exposant un brin d'ADNsb riche en guanine, susceptible de former des structures G4 (Costantino et Koshland., 2015). La résolution des R-Loops peut être assurée par l'endonucléase RNaseH1 (Arora et al., 2014) qui dégrade la partie ARN du duplex (Arudchandran et al., 2000). La phosphoprotéine UPF1 est recrutée aux télomères par son interaction physique avec TPP1, et sa déplétion induit des aberrations télomériques sévères et une accumulation de TERRA (Azzalin et al., 2007 ; Chawla et al., 2011) principalement causée par une réplication incomplète du brin continu (Chawla et al., 2011). UPF1 pourrait déplacer les molécules de TERRA pour éviter l'accumulation des R-loop, ce qui pourrait induire un stress réplicatif (Chawla et al.,2011).
Enfin, des endonucléases, telles que l'endonucléase FEN1 (flap endonuclease 1) peuvent intervenir dans la gestion des hybrides ARN/ADN (Teasley et al., 2015).

La progression de la fourche vers la structure nucléoprotéique terminale entraîne un surenroulement positif de l'ADN qui peut engendrer un stress supplémentaire aux télomères (Sfeir et al., 2009). Une étude a mis en lumière le rôle crucial de la nucléase Apollo, qui est recrutée aux télomères par la protéine TRF2. Apollo contribue à relâcher le superenroulement, facilitant ainsi la réplication des régions télomériques (J. Ye et al., 2010). De plus, ils semblent agir en synergie avec la topoisomérase 2α (TOP2α) en éliminant la barrière topologique générée par la progression de la fourche à travers la chromatine télomérique (de Lange et al., 2010). Notons que TOP2α est également recrutée aux télomères par TRF1, soulignant ainsi l'interaction entre ces protéines dans la régulation de l'état topologique de l'ADN télomérique (d'Alcontres et al., 2014).

Ainsi, il est bien établi que les protéines télomériques du complexe shelterin, telles que TRF1, TRF2, ainsi que le complexe CST, jouent un rôle essentiel dans la gestion du stress réplicatif au niveau des télomères **(Figure 8)**. Les mécanismes sous-jacents à leur fonction seront détaillés dans la section suivante.

### 1.2.3.2. Rôles des protéines télomériques dans la gestion du stress réplicatif

Comme décrit précédemment, pour permettre le passage de la fourche de réplication, les séquences d'ADN télomériques doivent devenir accessibles, ce qui nécessite le déplacement temporaire des protéines du complexe shelterin. Cependant, ce processus comporte un risque majeur : l'exposition et la déprotection des extrémités des chromosomes, rendant celles-ci vulnérables à la dégradation, ce qui peut entraîner un raccourcissement prématuré des télomères. Ainsi, la réplication des télomères est un processus complexe qui mobilise de nombreux facteurs de réplication conventionnels (tels que les hélicases MCM, le réplisome et les ADN polymérases) ainsi que des protéines spécifiques aux télomères, en particulier le complexe shelterin **(Figure 8)**.

La protéine TRF1 est nécessaire à la réplication de l'ADN télomérique et sa perte entraîne d'importants défauts télomériques (fusions, pertes de séquences, etc..). En effet, TRF1 peut recruter l'hélicase BLM pour faciliter la réplication des télomères (Zimmermann et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs proposent que BLM pourrait dérouler les quadruplexes G ou d'autres structures secondaires riches en appariements de bases GG, susceptibles de se former dans les séquences répétées TTAGGG caractéristiques des télomères.
Par ailleurs, la protéine TRF1 inhibe l'activation des voies de checkpoint via ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) en recrutant le complexe TIN2-TPP1-POT1 durant la phase S du cycle cellulaire (Sfeir et al., 2009).
La régulation de TRF1 dans ces processus est contrôlée par des modifications post-traductionnelles. Par exemple, la phosphorylation de TRF1 par ATR et ATM sur la thréonine 271 entraîne son déplacement des télomères et module négativement la capacité de TRF1 à inhiber l'élongation des télomères médiée par la télomérase (Tong et al., 2015).

Par ailleurs, TRF1 pourrait aussi agir comme une barrière à la progression de la fourche (Ohki R et al., 2004) et il a été montré également que ATR/ATM phosphoryle TRF1 et que cette modification post-traductionnelle déplacerai TRF1 des télomères (Tong et al., 2015).

Plus récemment, il a été proposé que la poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) interagit et PARyle de manière covalente TRF1 en phase S, modifiant ainsi son affinité à l'ADN. Cette interaction TRF1/PARP1 permet le recrutement des hélicases WRN et BLM sur le brin riche en G pour résoudre les structures secondaires, permettant la progression de la fourche de réplication (Maresca et al., 2023).

À l'instar de TRF1, TRF2 joue également un rôle crucial dans la réplication des télomères. En l'absence de TRF2, les télomères perdent leur protection et sont reconnus comme des cassures d'ADN par les facteurs impliqués dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response, DDR). De plus, TRF2 est soumis à une régulation par des modifications post-traductionnelles. Sa déphosphorylation par la phosphatase PP6, durant la phase S du cycle cellulaire, crée une fenêtre temporelle étroite permettant l'accès de l'hélicase RTEL1 aux télomères. RTEL1 est une hélicase essentielle impliquée dans la réplication et la recombinaison de l'ADN, et elle est nécessaire au maintien de l'intégrité des télomères (Vannier and al., 2014). L'interaction entre TRF2 et RTEL1 facilite le déroulement transitoire des T-loops et, par conséquent, la progression de la réplication (Sarek et al., 2019). Inversement, la phosphorylation de TRF2 par la kinase CDK sur la sérine 365 empêche le recrutement de l'hélicase RTEL1 aux télomères. Cette régulation empêche non seulement le déroulement inapproprié des boucles T, évitant ainsi l'activation intempestive de la voie ATM et elle contrecarre également les conflits de réplication induits par les structures secondaires de l'ADN, tant au niveau des télomères que dans le reste du génome (Sarek et al*.,* 2019).

De plus, l'hétérodimère POT1/TPP1 favorise la synthèse des brins retardés des télomères en recrutant le complexe CST aux télomères pour promouvoir la synthèse d'ADN, probablement au niveau du brin retardé. Cependant, le mécanisme précis par lequel POT1 régule ce processus reste encore à élucider complètement (Pinzaru., et al 2016).

Dans la section antérieure du manuscrit, (1.1.2.2 le complexe CST) j'ai présenté le rôle du CST dans la gestion du stress réplicatif. Bien que son rôle dans la gestion des fourches bloquées ne soit pas entièrement compris, un modèle suggère que le complexe CST facilite le recrutement de la recombinase RAD51 en réponse au stress réplicatif, notamment au niveau des séquences riches en GC, de manière dépendante de l'ATR (Chastain et al., 2016 ; Lyu et al., 2021).

Il a été proposé que le CST contribue probablement à la reprise de la fourche en facilitant la synthèse du fragment d'Okazaki par la résolution ou la prévention des structures G4 sur l'ADN simple brin riche en G ou qu'il agirait en amont de la fourche de réplication pour empêcher la formation de G4, évitant ainsi l'arrêt de la fourche (Zhang et al., 2019). Enfin, le CST semble protéger les fourches de réplication bloquées en bloquant directement la dégradation de l'ADN de brin naissant par MRE11 (Lyu et al., 2020).

D'après la littérature, il est bien établi que les protéines télomériques du complexe shelterin, notamment POT1-TPP1, TRF1, TRF2, ainsi que le complexe CST, comme décrit précédemment, participent à la réplication des télomères. Toutefois, la compréhension détaillée des mécanismes impliqués reste incomplète. Par exemple, il est encore mal compris comment TRF1 peut simultanément faciliter et entraver la réplication des télomères. Bien que TRF1 soit reconnu pour son rôle majeur dans la réplication des télomères (Sfeir et al., 2009), il peut également agir comme une barrière à cette progression (Ohki & Ishikawa., 2004). Une autre question cruciale concerne le réassemblage de la shelterin après le passage de la fourche de réplication. Une fois la réplication terminée, la shelterin doit être recrutée à nouveau aux télomères pour permettre l'intervention de la télomérase. Cependant, la chronologie et la régulation précise de ce réassemblage restent largement inconnues. Ces interrogations soulignent la complexité des mécanismes impliqués dans la maintenance des télomères et mettent en évidence la nécessité de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre ces processus fondamentaux.

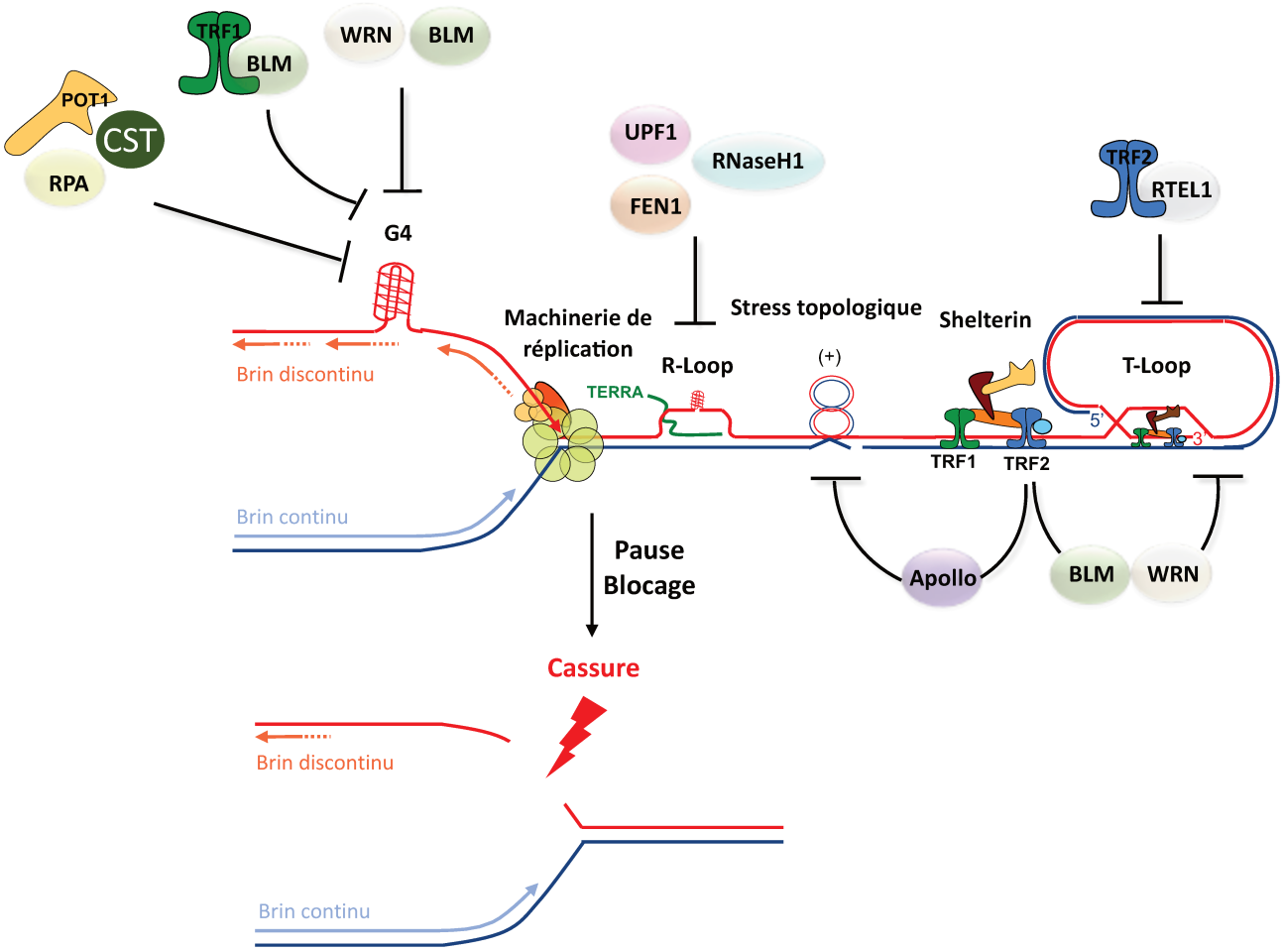



***Figure 8 : Obstacles à la réplication des télomères et stress réplicatif associé***

*La réplication des télomères représente un défi pour les cellules en raison de la présence de structures complexes dans l'ADN, telles que les R-loop, le surenroulement d'ADN, les structures G4 et les T-loop. Ces structures, ainsi que les protéines associées à l'ADN, agissent comme des obstacles à la progression de la fourche de réplication. Ce stress réplicatif peut entraîner le blocage de la fourche, et, dans les cas extrêmes, provoquer une cassure de celle-ci. De nombreuses protéines sont recrutées par des facteurs télomériques et non télomériques pour faciliter le passage de la fourche de réplication à travers les séquences télomériques.*

# 2. Un modèle d'étude des télomères : la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Isolée pour la première fois en 1890 en Afrique de l'Est, la levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) a été décrite pour la première fois par le biologiste allemand Paul Lindner en 1893. Le nom *Schizosaccharomyces* vient des racines grecques "saccharo" (sucre) et "myces" (champignon), en référence à des caractéristiques similaires à celles du genre *Saccharomyces*, comme la fermentation et la capacité à former des spores. Le préfixe grec "schizo" signifie "fendre", ce qui fait allusion à la morphologie unique de cette levure. L'espèce *pombe* tire son nom du mot swahili désignant la bière, en lien avec son utilisation traditionnelle dans la production de bière de millet (Fantes & Hoffman., 2016 ; Gomes et al., 2002 ; Hayles & Nurse., 2016 ; Hoffman, Wood, & Fantes., 2015).

Morphologiquement, *S. pombe* présente des variations de taille selon son stade de croissance. En phase végétative, elle apparaît sous la forme d'un cylindre mesurant entre 7 µm et 15 µm de long. La cellule mère s'allonge jusqu'à atteindre environ 15 µm avant de se diviser en deux cellules filles par formation d'un septum, une structure visible au microscope optique. Cette méthode de division a valu à *S. pombe* le surnom de "levure fissipare" **(Figure 9)**. Ce modèle s'est imposé comme un outil incontournable dans la recherche scientifique, offrant des perspectives cruciales pour élucider une multitude de mécanismes moléculaires et cellulaires fondamentaux chez les eucaryotes (Hayles & Nurse., 2016 ; Kim et al., 2010).

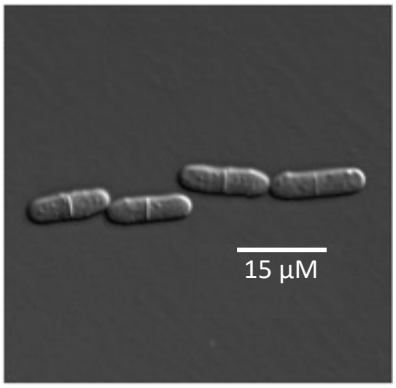



***Figure 9 : Observation de S. pombe en phase S du cycle cellulaire***

*Image obtenue par microscopie à contraste de phase, montrant des cellules en phase S de croissance, caractérisées par la présence d'un septum distinct. Adapté de C. Hoffman et al., Genetics (2015).*

# 2.1. Cycle de vie

## 2.1.1. Cycle cellulaire

En milieu riche, *S. pombe* se divise par fission, produisant deux cellules filles identiques sur le plan génotypique. Le cycle mitotique de cette levure suit un schéma similaire à celui des autres eucaryotes et comprend quatre phases distinctes. La phase S est celle de la réplication de l'ADN, suivie de la phase G2 (Gap 2), où chaque chromosome est constitué de deux chromatides. Ensuite, la phase M permet la ségrégation des chromosomes et la séparation des deux cellules. Enfin, la phase G1 (Gap 1), relativement courte, est la période au cours de laquelle la cellule, toujours haploïde, se prépare pour la prochaine duplication de son génome (Hayles et al., 2016 ; Tang et al., 2016, Forsburg et al., 2006) **(Figure 10)**.

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire est régulée par plusieurs niveaux de contrôle. Un premier niveau de régulation est assuré par des protéines spécifiques appelées CDK (Cyclin-Dependent Kinases), qui sont conservées de la levure à l'homme. Chez *S. pombe*, le cycle cellulaire est contrôlé par une seule CDK, nommée Cdc2, qui est essentielle pour les transitions G1/S et G2/M. L'interaction de Cdc2 avec les cyclines Cig2 et Cdc13 déclenche respectivement la réplication de l'ADN et la mitose. De plus, d'autres cyclines, telles que Cig1 et Puc1, jouent un rôle secondaire durant la phase G1 (Coudreuse et al., 2010 ; Gutiérrez-Escribano et al., 2015 ; Swaffer et al., 2016 ; Hayles et al., 2016).

Un second niveau de régulation des CDK est assuré par des modifications post-traductionnelles. Il a été démontré que la phosphorylation de la thréonine 167 est indispensable pour l'activité Cdc2/CDK1 (Lee et al., 1999). Chez *S. pombe*, deux kinases activatrices de CDK (CAK) sont responsables de l'activation de Cdc2 : le complexe Mcs6/Mcs2/Pmh1 et la kinase Csk1 (Lee et al., 1999). À l'inverse des CAK, d'autres kinases peuvent également phosphoryler les CDK, mais avec un effet négatif sur leur activité. Par exemple, la phosphorylation de Cdc2/CDK1 sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 par les kinases Wee1 et Mik1/Myt1 est inhibitrice, empêchant ainsi la transition G2/M (Liu et al., 1997 ; Lundgren et al., 1991 ; Mueller et al., 1995). Cette inhibition peut être contrecarrée par

l'action de phosphatases de la famille de Cdc25, dont l'expression et l'activité sont contrôlées au cours du cycle cellulaire (Millar et al., 1991 ; Russell et al., 1986).

Un troisième niveau de régulation repose sur l'action d'inhibiteurs spécifiques qui se lient directement à la sous-unité CDK, modifiant ainsi l'activité du complexe CDK-cycline. Chez *S. pombe*, la protéine Rum1 illustre parfaitement ce mécanisme. En se fixant au complexe formé par Cdc2 et Cig2, Rum1 empêche la transition de la phase G1 à la phase S, un point critique du cycle cellulaire. Cette inhibition permet de retarder la réplication de l'ADN jusqu'à ce que la cellule soit prête à entrer en phase S, assurant ainsi une progression ordonnée et contrôlée du cycle cellulaire (Benito et al., 1998) **(Figure 10)**.

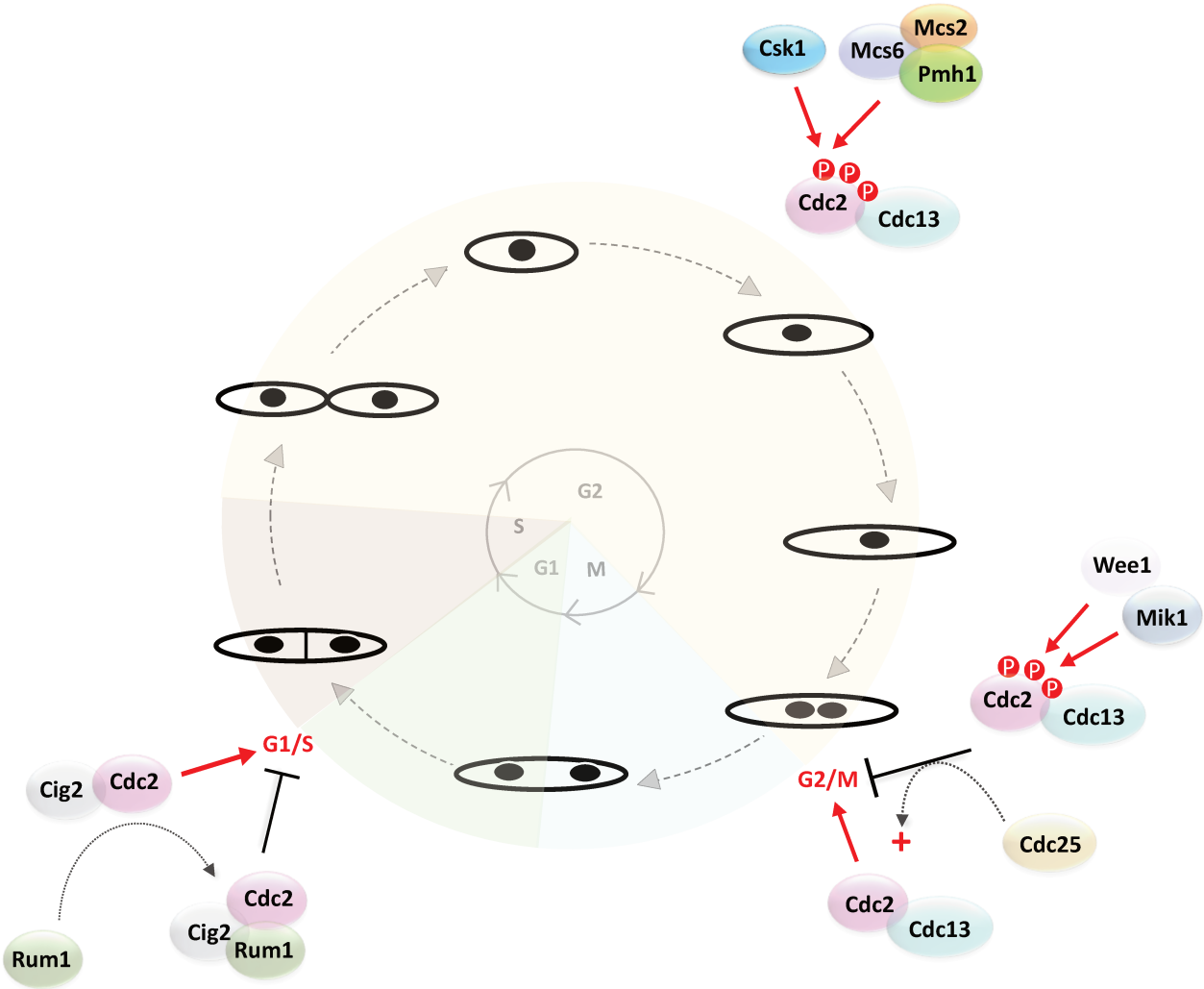


***Figure 10 : Schéma du cycle cellulaire de S. pombe***

*Diagramme circulaire représentant les phases du cycle mitotique, comprenant la phase G1, la phase S (réplication de l'ADN), la phase G2, et la phase M, où la cellule mère se divise en deux cellules filles. La progression dans ce cycle est régulée par une kinase dépendante des cyclines. La morphologie des cellules à chaque phase est schématisée, et les noyaux, représentés par des points sombres, indiquent les étapes clés de la division cellulaire.*

*Dans des conditions de croissance exponentielle dans un milieu nutritif, la phase G2 est particulièrement prédominante chez S. pombe, représentant à elle seule environ 70 % de la durée totale du cycle cellulaire. Cette caractéristique souligne l'importance de cette étape dans le cycle de cette levure. La présence des différents complexes cycline-CDK promeuvent les différentes transitions du cycle cellulaire.*

La transition entre chacune des phases du cycle cellulaire est sous le contrôle des mécanismes de surveillance moléculaire ou « checkpoint » (Weinert et al., 1988). Chez *S. pombe*, deux checkpoints assurent le bon déroulement du cycle mitotique, l'un à la transition G1/S (checkpoint intra-S) et l'autre à la transition G2/M (Fisher et al., 1996; Moser et al., 2000 ; Hagan et al., 2016).

L'activation des points de contrôle des dommages à l'ADN (DDR) entraîne l'activation de la kinase Rad3, qui est l'homologue fonctionnel de la kinase ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related) et qui phosphoryle les kinases Chk1 et Cds1 (Furuya et al., 2003). Cette phosphorylation permet non seulement la réparation des dommages mais aussi la prévention de la progression du cycle cellulaire jusqu'à ce que la cellule soit prête à avancer sans risque d'anomalies **(Figure 11)**. Nous analyserons en détail, dans la suite de ce manuscrit, le rôle et la fonctionnalité de ces kinases.

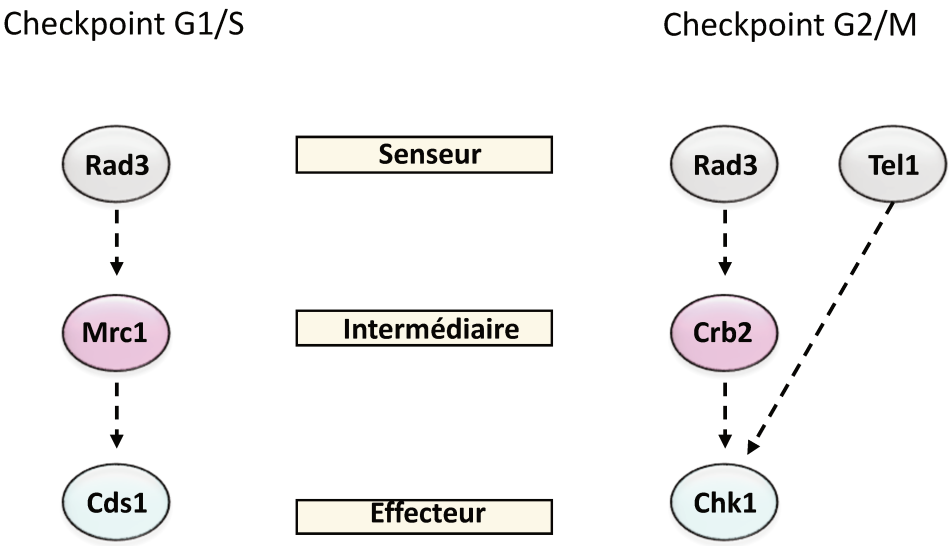



***Figure 11 : Points de contrôle chez S. pombe***

*La progression du cycle cellulaire est régulée par des mécanismes de surveillance appelés checkpoints. Deux points de contrôle ou checkpoint majeurs assurent le bon déroulement du cycle mitotique : le checkpoint situé à la transition G1/S, et le checkpoint G2/M. Lorsqu'un dommage à l'ADN est détecté, ces points de contrôle activent la kinase Rad3, qui phosphoryle les kinases Chk1 et Cds1. Cette activation permet la réparation des dommages et bloque temporairement la progression du cycle cellulaire afin de prévenir toute anomalie.*

### 2.1.2. Cycle sexuel

Les propriétés sexuelles de *S. pombe* peuvent être observées en milieu carencé en azote. Cette privation déclenche un arrêt immédiat du métabolisme cellulaire, poussant la cellule à entrer dans un état de quiescence appelé phase G0. Durant cet état de quiescence, deux cellules de types sexuels opposés peuvent conjuguer et former un diploïde transitoire. Ce diploïde sporule et forme une structure en asque à quatre spores. Les asques persistent jusqu'à ce que l'environnement devienne favorable et permette la germination des spores qui entrent alors dans un nouveau cycle végétatif **(Figure 11)**. Ce processus de différenciation est étroitement régulé par plusieurs voies de signalisation : la voie de détection du glucose cAMP-PKA (adénosine monophosphate cyclique-protéine kinase A), la voie de détection de l'azote TOR (cible de la rapamycine) la voie SAPK (protéine kinase activatrice du stress), et la cascade de

signalisation MAPK (protéine kinase activatrice des mitogènes) essentielle pour la détection des phéromones. La différenciation sexuelle est principalement contrôlée par le facteur de transcription Ste11 (Makoto Kawamukai et al., 2024, Methods in Molecular Biology 2862).
Les mécanismes détaillés de ces voies ne seront pas abordés dans ce manuscrit.

Cette levure peut être haploïde (1N) ou diploïde (2N), et hétérothallique (*h+ ou h-*) ou homothallique (h90) (Leupold et al., 1949). L'identité sexuelle de *S. pombe* de type *h+* ou *h-*, est déterminée par des informations génétiques situées sur un locus spécifique, appelé *mat1*. Ce locus peut contenir l'un des deux allèles : *mat1-P* pour le type sexuel h+, ou *mat1-M* pour le type sexuel *h-*, chacun définissant un type sexuel distinct. La capacité de la levure à changer de type sexuel repose sur l'interaction de deux loci supplémentaires, *mat2-P* et *mat3-M*. Ce mécanisme repose sur la présence d'une séquence d'homologie spécifique, appelée H1, qui est partagée entre les trois loci *mat1, mat2, et mat3*. Cette séquence H1 permet un transfert unidirectionnel de l'information génétique depuis *mat2-P* ou *mat3-M* vers *mat1*, provoquant ainsi un changement de type sexuel. Grâce à ce processus, la levure peut alterner entre les types *h+* et *h-,* lui permettant de se conjuguer avec des cellules de type sexuel opposé.

Récemment, il a été démontré que la protéine Cig2, une cycline de type B G1/S, joue un rôle essentiel dans la régulation de la différenciation sexuelle. Les cellules *cig2Δ* s'arrêtent en phase G1 et entament la différenciation sexuelle, même en l'absence de carence nutritionnelle (Makoto Kawamukai et al., 2024). La régulation précise de Cig2 est donc cruciale pour contrôler l'entrée en différenciation sexuelle : en conditions nutritionnelles favorables, l'activité élevée de Cig2-Cdc2 bloque la différenciation sexuelle. En revanche, lors d'une carence en azote, l'inhibition de Cig2-Cdc2 par Rum1 et d'autres mécanismes permet l'arrêt en G1 et l'initiation de la différenciation sexuelle (Cohen et al., 2016) **(Figure 10)**. Ce mécanisme de changement de type sexuel joue un rôle clé dans l'adaptation de la levure aux variations environnementales, tout en lui permettant de se reproduire efficacement.

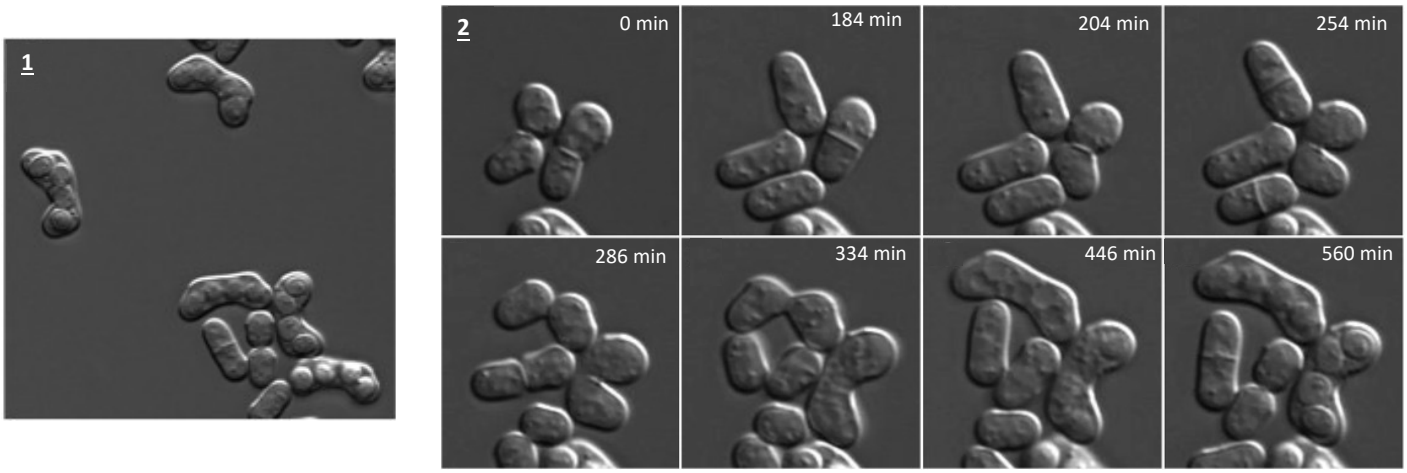



***Figure 12 : Développement sexuel de S. pombe***

*(1) Formation des asques résultant du croisement de deux cellules haploïdes.*

*(2) Développement sexuel observé chez des cellules de S. pombe h90 placées sur des blocs d'agar à 30°C, photographiées à différents intervalles de temps.*

*Adapté de C. Hoffman et al., Genetics (2015).*

# 2.2. L'organisation du génome de *S. pombe*

## 2.2.1. Le génome de *S. pombe*

Le génome de *S. pombe* a été séquencé en 2002 (Wood et al., 2002) et se compose de 13,8 Mb répartis sur trois chromosomes : I (5,7 Mb), II (4,6 Mb) et III (3,5 Mb), ainsi que d'un génome mitochondrial relativement petit (20 kb) comparé à celui d'autres levures. Des études récentes ont révélé une grande diversité dans les mitogénomes de *S. pombe*, avec 69 types de séquences distinctes allant de 17 618 à 26 910 pb en longueur. Cette diversité suggère que les isolats actuels de *S. pombe* proviennent de deux lignées ancestrales séparées depuis longtemps (Yu-Tian Tao et al., 2019).

Chaque chromosome possède un centromère, identifié par CENI, CENII et CENIII, dont la taille varie entre 35 kb et 110 kb. Aux extrémités de chaque chromosome se trouvent des séquences télomériques, décrites pour la première fois en 1980 (N. Sugawara et al., 1980).

La structure de ces séquences télomériques sera analysée en détail dans les sections suivantes de ce manuscrit.

Les télomères de *S. pombe* présentent plusieurs caractéristiques distinctives. Il s'agit de séquences répétées, dont la structure est décrite par le motif G2-6 TTAC(A) (Szostak et al., 1982), et dont la longueur est d'environ 300 pb (Matsumoto et al., 1987 ; Allshire et al., 1988). Ces séquences se terminent par une extrémité 3'-sortante d'ADNsb, dont la taille exacte reste encore à déterminer (Palm et de Lange, 2008) **(Figure 13)**. Les chromosomes I et II renferment des séquences subtélomériques. En revanche, le chromosome III contient deux répétitions en tandem de l'ADN ribosomal (ADNr) flanquant les télomères et peut, de manière ponctuelle, présenter des régions subtélomériques STE (Schaak et al., 1982) **(Figure 14)**.

## 2.2.2. Structure des séquences terminales chez *S. pombe*

### 2.2.2.1. Structure des régions télomérique

Les télomères de *S. pombe* se terminent par une extrémité 3'-sortante (environ 10-15 pb), formant une structure spécifique qui est essentielle pour le maintien et la protection des télomères (Sugawara et al., 1986). Ces séquences télomériques interagissent avec un complexe protéique appelé shelterin qui présente des similitudes structurales et fonctionnelles avec la shelterin humaine. Elle possède six protéines Taz1, Rap1, Poz1, Tpz1, Pot1 et Ccq1 (Dehé & Cooper., 2010) qui seront détaillées dans la section 2.3 du manuscrit **(Figure 13)**.

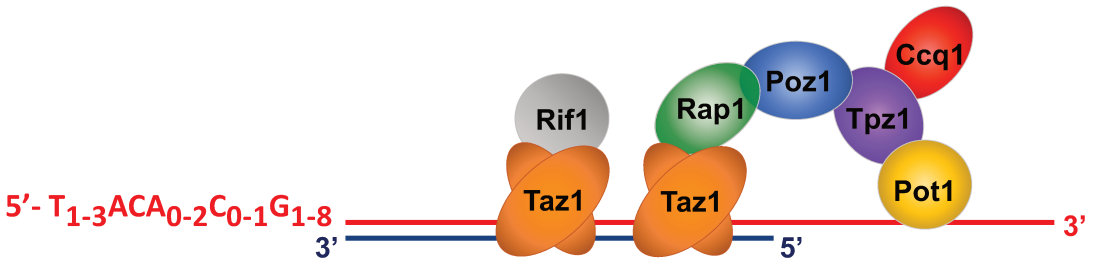



***Figure 13 : Le complexe de la shelterin chez S. pombe***

*La shelterin chez S. pombe est organisée en deux sous-complexes : Taz1, Rap1 et Rif1 forment un sous-complexe qui se lie à l'ADN télomérique double brin, tandis que Tpz1, Ccq1 et Pot1 forment un autre sous-complexe associé à l'ADN télomérique simple brin. Ces deux sous-complexes sont connectés par une interaction physique entre Rap1 et Poz1, assurant ainsi la stabilité et la régulation des extrémités télomériques.*

Le complexe de la shelterin joue un rôle clé dans la prévention et la protection des chromosomes. Tout d'abord, la shelterin empêche la dégradation des séquences terminales par les exonucléases. En l'absence de cette protection, les télomères seraient exposés à l'action des exonucléases, ce qui entraînerait un raccourcissement progressif des chromosomes ou des fusions et compromettrait leur intégrité et leur stabilité (Nandakumar J et al., 2013). Par ailleurs, lorsqu'un chromosome subit une cassure, le système de réparation de l'ADN pourrait potentiellement lier les extrémités des chromosomes entre elles, créant ainsi des chromosomes fusionnés (Glousker et al., 2021). Ces fusions peuvent entraîner des anomalies chromosomiques graves, comme des dicentriques (chromosomes avec deux centromères), qui sont instables et peuvent causer des erreurs lors de la division cellulaire.

La shelterin inhibe ces mécanismes de recombinaison, maintenant ainsi les chromosomes séparés et intacts. Les kinases ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related), qui sont des protéines clés dans la signalisation des CDB (Denchi et al., 2007) sont normalement activées en réponse aux dommages de l'ADN pour déclencher des mécanismes de réparation et arrêter le cycle cellulaire, permettant aux cellules de corriger les anomalies avant de se diviser.

Il est crucial que les extrémités chromosomiques ne soient pas reconnues comme des cassures d'ADN, car une telle reconnaissance pourrait conduire à une instabilité génomique.

### 2.2.2.2. Structure des régions subtélomériques

Les séquences répétées télomériques sont juxtaposées par des régions appelées subtélomères qui jouent un rôle important dans la structure et la protection des chromosomes.

Sur les chromosomes I et II, ces régions s'étendent sur une longueur d'environ 100 kilobases (kb), formant une interface entre les télomères et les bras des chromosomes. En revanche, le chromosome III (CIII) présente une organisation distincte, avec des répétitions en tandem de l'ADN ribosomal (ADNr) flanquant les télomères de chaque bras du CIII (Schaak et al., 1982).

Cette juxtaposition de l'ADNr aux télomères sur le CIII confère à cette région une structure unique, susceptible d'influencer la régulation des gènes et la stabilité chromosomique (J. Kanoh et al., 2017 ; V. Wood et al., 2002). Il est important de noter que, selon la souche de *S. pombe* étudiée, les télomères et l'ADNr sur le CIII peuvent être séparés par des séquences subtélomériques d'environ 15 kb. Cette variation montre la diversité génomique parmi les différentes souches de *S. pombe* et suggère que la région subtélomérique entre les télomères et l'ADNr pourrait avoir des fonctions spécifiques, potentiellement en lien avec la régulation de la transcription ou la stabilisation structurelle du chromosome (Ohno et al., 2016).

Les régions subtélomériques des chromosomes 1 et 2 se divisent en deux domaines distincts **(Figure 14)** :

**Domaine unique subtélomérique (SU)** :

Le domaine SU s'étend sur environ 50 kb du côté centromérique. Il adopte une structure chromatinienne condensée appelée « Knob » (Matsuda et al., 2015 ; Tashiro et al., 2016). La formation et le maintien de cette structure dépend de la shugoshin Sgo2, qui joue un rôle essentiel dans l'établissement de l'hétérochromatine au niveau de cette région (Tashiro et al., 2016).

**Domaine homologue subtélomérique (SH)** :

Le domaine SH s'étend sur environ 50 kb immédiatement adjacents aux séquences télomériques et se distingue par son homologie avec d'autres séquences terminales. Cette

région peut faciliter des échanges d'informations génétiques via la RH (Oizumi et al., 2021). Le domaine SH se subdivise en deux régions :
SH-D (distal des télomères) et SH-P (proximal, s'étendant sur 5 à 10 kb). Cette dernière contient plusieurs éléments spécifiques :

- Régions répétées STE1, STE2, et STE3 : Également appelées TAS1, TAS2, et TAS3 (Telomeric Associated Sequences) (Oizumi et al., 2021)
- Un site contenant un ORF : Il inclut notamment les gènes d'une hélicase de type RecQ (*tlh1+ et tlh2+*) (Tashiro et al., 2017)

L'analyse des régions subtélomériques est particulièrement complexe en raison de leur composition, qui comprend de longues séquences répétées homologues entre les chromosomes. Récemment, le groupe de Junko Kanoh a révélé que les séquences SH sont hautement polymorphes et agissent comme des points chauds de variation génomique (Oizumi et al., 2021). Des études ont suggéré que la voie de réparation BIR est une réparation très imprécise et peut provoquer des taux élevés de mutations et de réarrangements chromosomiques dans les régions *SH* (Sakofsky et al., 2015).

Enfin, il est intéressant de noter que dans certaines souches de laboratoire, autres que la souche de référence 972, une portion d'environ 15 kb de la séquence SH est présente entre les répétitions d'ADNr et les télomères du CIII (Kanoh et al., 2023). Cette particularité de l'organisation du chromosome 3 soulève plusieurs hypothèses intrigantes. Tout d'abord, il est plausible que cette disposition unique influence la localisation du chromosome dans le noyau, modifiant ainsi les interactions spatiales entre chromosomes et pouvant potentiellement affecter la régulation de l'expression génétique. Cette différence pourrait également être le reflet d'adaptations à des conditions environnementales spécifiques, permettant à la levure de mieux s'ajuster à des environnements changeants ou stressants (Kanoh et al., 2023).
De plus, les séquences SH pourraient jouer un rôle bien plus crucial qu'anticipé : en stabilisant les extrémités chromosomiques, elles pourraient non seulement maintenir l'intégrité du chromosome 3, mais aussi influencer ses interactions avec d'autres chromosomes, modifiant ainsi la dynamique de l'ensemble du génome. Ces mécanismes, encore à découvrir, pourraient bien remodeler l'organisation globale du génome, apportant une perspective nouvelle sur la fonction et la stabilité du CIII, et peut-être même ouvrir la voie à des découvertes majeures sur la régulation et la maintenance du génome **(Figure 14)**.

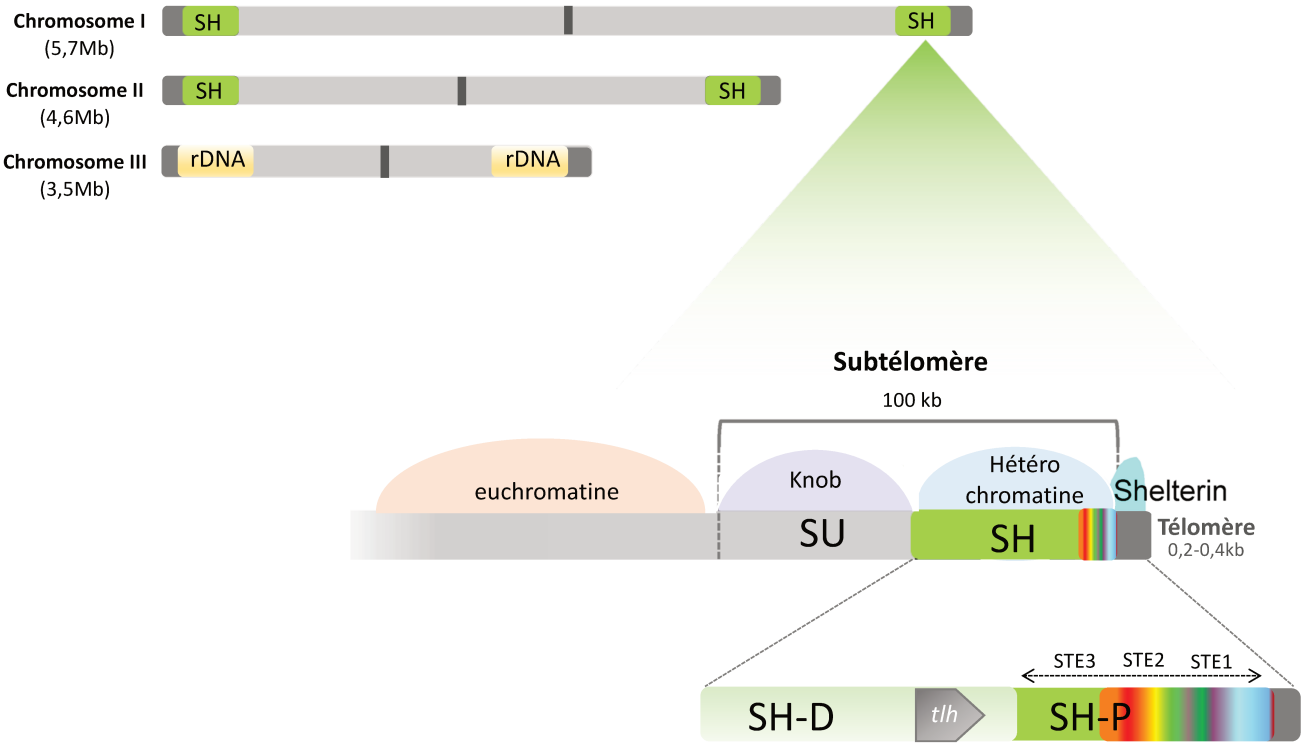



***Figure 14 : Organisation des régions télomériques et subétélomériques de S. pombe***

*Le génome de S. pombe est composé de trois chromosomes. Les chromosomes I et II possèdent des séquences subtélomèriques. Le chromosome III possède des séquences d'ADNr adjacentes aux séquences télomériques. Les régions subtélomériques couvrent environ 100 kb et se divisent en deux segments distincts : une région unique (SU) située sur les 50 kb distaux et une région homologuée (SH) d'environ 50 kb, qui est localisée près des télomères.*

*Adapté de Oizumi Y et al., 2021*

### 2.2.3. Épigénome de *S. pombe* : organisation chromatinienne

L'organisation tridimensionnelle de la molécule d'ADN se caractérise par son enroulement autour d'un complexe protéique constitué de huit histones, formant ainsi le nucléosome, qui constitue l'unité fondamentale de la chromatine. Les nucléosomes sont constitués d'environ 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones, comprenant deux

exemplaires de chaque histone (H2A, H2B, H3 et H4). Cette structure nucléosomique remplit deux fonctions principales : d'une part, elle permet la compaction de la molécule d'ADN, et d'autre part, elle régule divers mécanismes cellulaires (Bird et al., 2007 ; Chikashige et al., 1989). Deux structures épigénétiques majeures ont été définies : l'hétérochromatine et l'euchromatine. Chez *S. pombe*, les régions hétérochromatiniennes sont situées principalement au niveau des télomères, des centromères, de l'ADNr et de la région mat (Allshire et al., 1994 ; Cooper et al., 1991997 ; mmo et al., 1994 ; Thon et al., 1992). La formation de l'hétérochromatine chez *S. pombe* dépend de l'action conjointe de la machinerie des ARN interférents (ARNi) et d'enzymes responsables de modifications chimiques des queues des histones (Cam et al., 2005 ; Noma et al., 2001 ; Thon et al., 2002 ; Thon et Klar, 1992 ; Thon et Verhein-Hansen., 2000).

#### 2.2.3.1. Établissement de l'hétérochromatine aux régions télomériques et subtélomériques

La tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) joue un rôle essentiel dans l'établissement de l'hétérochromatine. Ce processus est catalysé par Clr4, la seule méthyltransférase identifiée chez *S. pombe*. Clr4 appartient à la famille des méthyltransférases SUV39H, connue pour sa conservation évolutive et son rôle dans la formation de l'hétérochromatine (Cam et al., 2005). La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) ne se limite pas à un rôle de signal d'inactivation transcriptionnelle. Elle sert également de site d'ancrage pour les protéines de la famille HP1 (Heterochromatin Protein 1), telles que Swi6, Chp1 et Chp2 (Motamedi et al., 2008). Ces protéines HP1, une fois recrutées, jouent un rôle crucial dans la stabilisation de l'hétérochromatine. En retour, elles recrutent davantage de Clr4, établissant ainsi une boucle de rétroaction positive qui amplifie la méthylation de H3K9 (Cam et al., 2005 ; Job G et al., 2016).

Ce mécanisme de rétroaction entraîne plusieurs effets majeurs :

1. **Méthylation continue de H3K9** dans les régions adjacentes, assurant la propagation de l'hétérochromatine.
2. **Propagation des protéines HP1** le long de la chromatine, renforçant la stabilité de l'hétérochromatine.
3. **Compaction accrue de la chromatine**, favorisant l'extension et son maintien.

Le complexe SHREC (Swi6-H3K9me2 Read-Complex) joue un rôle crucial dans l'équilibre entre la répression et l'activation transcriptionnelle en modulant le niveau d'acétylation des histones. Il est recruté aux télomères par la protéine télomérique Ccq1 (Sugiyama et al., 2007) et la protéine Chp2 (Sugiyama et al., 2007 ; Motamedi et al., 2008). La déacétylase Clr3 joue un rôle essentiel au sein de ce complexe en retirant les groupes acétyles des lysines 9 et 4 des histones H3, modifiant ainsi les marques H3K9ac (acétylation de la lysine 9) et H3K4ac (acétylation de la lysine 4) (Hall et al., 2002 ; Sugiyama et al., 2007 ; Yamada et al., 2005). Cette déacétylation favorise un état plus condensé de la chromatine, réduisant son accessibilité et influençant la régulation transcriptionnelle. Il a été proposé que la déacétylation de H4K16 par Sir2 augmente la compaction des histones, facilitant ainsi la propagation de l'hétérochromatine, en particulier dans les régions centromériques (Wang et al., 2013). Cette observation est renforcée par la présence continue de Swi6 et de H3K9me2/3 dans les régions subtélomériques (Cam et al., 2005 ; Kanoh et al., 2005) **(Figure 15)**.

Chez *S. pombe*, l'organisation de l'hétérochromatine des régions télomériques et subtélomériques résulte de l'interaction de deux mécanismes complémentaires : 1_le complexe shelterin et 2_la voie de l'interférence de l'ARN (ARNi) (Cooper et al., 1997 ; Kanoh et al., 2005).

**1_le complexe shelterin (Figure 15 partie droite)**

Taz1, Ccq1 et Rap1 recrutent la méthyltransférase Clr4, qui catalyse la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) et permet le recrutement des protéines Chp1, Chp2 et Swi6 (Sugiyama et al., 2007 ; Motamedi et al., 2008). Ces protéines forment une boucle rétroactive nécessaire à l'établissement de l'hétérochromatine. Ensuite, les protéines HP1 stabilisent l'hétérochromatine et renforcent la compaction de la chromatine, ce qui favorise son extension et son maintien. Chp2 et Ccq1 recrutent le complexe SHREC, responsable de la régulation de l'acétylation des histones et du positionnement des nucléosomes (Sugiyama et al., 2007 ; Zofall et al., 2016).

**2_la voie de l'interférence de l'ARN (ARNi) (Figure 15 partie gauche)**

La seconde voie impliquée dans l'établissement de l'hétérochromatine repose sur le mécanisme d'interférence par ARN (ARNi), tel que décrit par J. Kanoh et al. (2005) et Cooper et al. (1997). Au niveau des séquences SH des régions subtélomériques des chromosomes 1 et 2, on observe la présence des gènes d'ADN hélicase de type RecQ, désignés *tlh* contenant des segments de la séquence répétée *dh*. Le processus d'ARNi cible spécifiquement les séquences *dh* au sein des transcrits dérivés des gènes *tlh*, conduisant à la production de petits ARN interférents (siRNA). Pour cela, les séquences répétées des télomères sont d'abord transcrites en ARN double brin, qui sont clivés par l'enzyme Dcr1 (Dicer) en petits ARN interférents (siARN). Ces siARN sont ensuite incorporés dans le complexe RITS (RNA-induced transcriptional silencing), incluant la protéine Chp1, qui cible les régions homologues sur la chromatine (Gerace et al., 2010 ; Elias Akoury et al., 2019).

Le complexe RITS participe au recrutement de Clr4, catalysant la méthylation de H3K9 et favorisant ainsi l'établissement de l'hétérochromatine des régions *dh* des sous-télomères. Cette boucle est renforcée par le complexe RDRC (RNA-dependent RNA polymerase complex), qui amplifie le signal en générant davantage d'ARN double brin (Saab, C et al., 2024).

L'établissement de l'hétérochromatine par l'ARNi est un mécanisme fondamental, omniprésent dans les régions d'hétérochromatine constitutive telles que les péricentromères, les subtélomères et le locus *mat*. Une fois enclenchée, cette structure répressive ne se limite pas à son point d'origine : elle se propage aux régions voisines. Ces séquences ne sont pas de simples spectatrices ; elles jouent un rôle crucial dans la consolidation de la structure chromatinienne et la sauvegarde de l'intégrité génomique. Cependant, la propagation incontrôlée de l'hétérochromatine pose un défi majeur pour la cellule. Une extension excessive pourrait menacer l'équilibre délicat entre l'hétérochromatine silencieuse et l'euchromatine active, potentiellement en réprimant des gènes essentiels. Pour contrer ce risque, des mécanismes de régulation sophistiqués ont évolué, parmi lesquels les barrières épigénétiques jouent un rôle crucial. Ces éléments agissent comme des frontières moléculaires, assurant une délimitation précise entre les domaines chromatiniens actifs et répressifs.

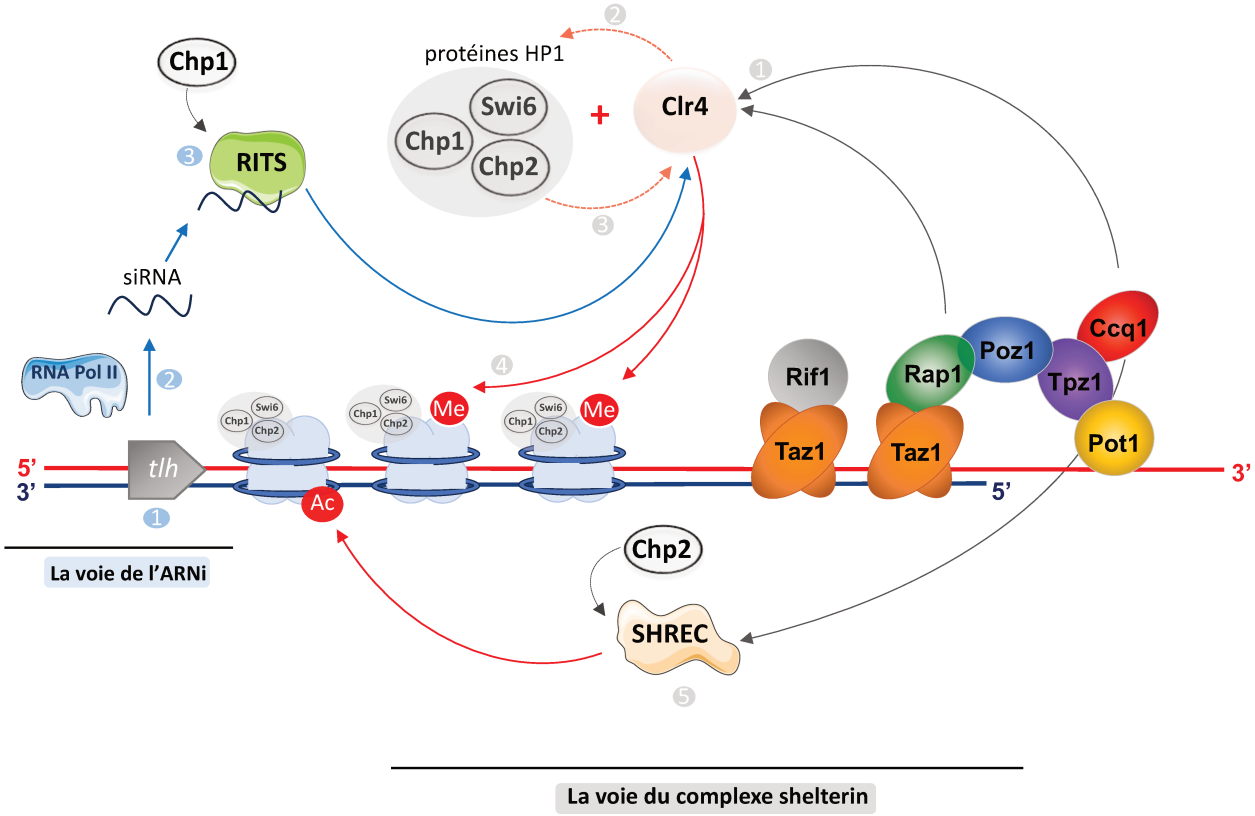



***Figure 15 : L'établissement de l'hétérochromatine aux régions télomériques et subtélomériques***

*L'organisation de l'hétérochromatine des régions télomériques et subtélomériques résulte de l'interaction de deux mécanismes complémentaires. Le complexe shelterin (partie droite du schéma) : Taz1 et Ccq1 recrutent la méthyltransférase Clr4, qui catalyse la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) et permet le recrutement des protéines Chp1, Chp2 et Swi6. Ces protéines forment une boucle rétroactive nécessaire à l'établissement de l'hétérochromatine (1). Les protéines HP1 se propagent le long de la chromatine, stabilisant l'hétérochromatine et renforçant la compaction de la chromatine, ce qui favorise son extension et son maintien (2). Chp2 et Ccq1 recrutent le complexe SHREC, responsable de la régulation de l'acétylation des histones et du positionnement des nucléosomes (3). La voie de l'interférence ARN (ARNi) (partie gauche du schéma) : La transcription de longs ARN non-codants est initiée par l'ARN polymérase II (1). Ces ARN non-codants sont pris en charge par plusieurs complexes pour générer des petits ARN interférents (ARNi) (2). Les ARNi s'associent au complexe RITS (constitué de Ago1, Chp1 et Tas3) (3), qui médie le recrutement de Clr4 et s'associe de manière stable à la marque H3K9me via Chp1, participant ainsi à la boucle rétroactive pour maintenir l'état hétérochromatique.*

### 2.2.3.2. Équilibre entre stabilité et dynamisme chromatinien : Rôle des barrières épigénétiques

Comme mentionné précédemment, la propagation incontrôlée de l'hétérochromatine pourrait menacer l'équilibre entre l'hétérochromatine silencieuse et l'euchromatine active. Pour contrer ce risque, plusieurs mécanismes de régulation ont évolué, parmi lesquels les barrières épigénétiques jouent un rôle prépondérant.
Ces barrières épigénétiques agissent comme des frontières moléculaires cruciales dans l'organisation du génome. Leur fonction principale est double :

- Elles limitent efficacement la propagation de l'hétérochromatine, empêchant ainsi son extension dans des régions où elle pourrait avoir des effets délétères sur l'expression génique.
- Simultanément, elles maintiennent des zones d'euchromatine actives, essentielles à l'expression normale des gènes.

La première barrière se situe dans les régions subtélomériques elles-mêmes. Elles sont caractérisées par des éléments spécifiques qui limitent la propagation de l'hétérochromatine télomérique. Par exemple, chez la levure *S. cerevisiae*, on trouve des éléments STAR (subtelomeric antisilencing region) qui agissent comme barrières.

La seconde barrière se trouve à la transition entre les régions subtélomériques et l'euchromatine, où les niveaux de compaction de la chromatine changent de manière drastique passant d'une structure hétérochromatique dense à une structure euchromatique plus ouverte.
Ces barrières agissent en tant que frontières épigénétiques, empêchant la diffusion anarchique de l'hétérochromatine dans les régions euchromatiques adjacentes, ce qui pourrait entraîner une répression non souhaitée de gènes essentiels (Tashiro et al., 2017).

Par ailleurs, il a été montré que les nucléosomes dans les régions télomériques sont moins stables que ceux des régions plus centrales du chromosome (Cacchione et al., 1997). Cette instabilité est encore plus marquée dans les régions subtélomériques, comme l'ont démontré Emden et ses collaborateurs (Emden et al., 2019). Ces régions, dont le pourcentage en AT est élevé, pourraient être le site de liaison d'autres protéines qui pourraient rentrer en compétition avec les histones mais cette hypothèse reste à confirmer. Le maintien de la structure nucléosomique dans les régions télomériques et subtélomériques est en partie assuré par la protéine Ccq1. Cette protéine recrute deux complexes essentiels : SHREC (Silencing of Heterochromatin by Remodeling and Deacetylation Complex) et CLRC (Clr4 RITS Complex). Cependant, le mécanisme exact par lequel Ccq1 stabilise les nucléosomes et prévient leur dissociation reste encore à élucider.
Il est possible que Ccq1 interagisse directement avec les histones ou d'autres composants du nucléosome, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier ce processus.

En conclusion, les régions subtélomériques possèdent deux barrières pour restreindre l'extension de l'hétérochromatine dans les régions voisines riches en gènes. Cependant, la nature exacte de ces barrières demeure à ce jour inconnue (Tashiro et al., 2017). Par ailleurs, les séquences STE présentent un mécanisme unique de stabilisation des nucléosomes, suggérant qu'elles possèdent des propriétés intrinsèques spécifiques nécessitant des mécanismes moléculaires particuliers pour garantir leur stabilité et leur maintien. Ces questions méritent d'être explorées pour mieux comprendre leur fonction dans le maintien de l'intégrité génomique.

# 2.3. Les protéines télomériques chez *S. pombe*

Les télomères de *S. pombe* présentent une structure protéique semblable à celle retrouvée chez les mammifères faisant de la levure fissipare un excellent modèle d'étude pour la maintenance des télomères (Nandakumar and Cech., 2013). Sa structure télomérique est très similaire à la shelterin humaine comprenant six protéines Taz1, Rap1, Poz1, Tpz1, Pot1 et Ccq1 **(Figure 1)** (Dehé et al., 2010) **(Figure 13)**.

Taz1 a été la première protéine télomérique caractérisée chez *S. pombe*, identifiée en raison de son homologie de séquence avec les protéines humaines TRF1 et TRF2, impliquées dans la protection des télomères (Cooper et al., 1997). Cette protéine multifonctionnelle interagit avec Rap1 et Rif1, dont la découverte repose sur leur homologie de séquences avec les protéines télomériques de *Saccharomyces cerevisiae* (Kanoh et al., 2001).
Ensemble, Taz1, Rap1 et Rif1 forment un complexe essentiel pour la protection des télomères, jouant un rôle central dans la protection des télomères (Chikashige et Hiraoka, 2001 ; Kanoh et Ishikawa., 2001). La protéine Pot1 se lie à l'ADN simple brin et protège l'extrémité 3' des télomères (Baumann et al., 2001). Identifiée en 2001 grâce à un alignement de séquence avec son orthologue TEBPα chez le protozoaire (Baumann et Cech., 2001), elle a permis l'identification d'autres protéines télomériques du complexe shelterin : Tpz1, Poz1, et Ccq1 (Miyoshi et al., 2008).

La shelterin chez *S. pombe* est un assemblage de sous complexe, Taz1, Rap1 et Rif1 forment un sous-complexe qui se lie à l'ADN télomérique double brin, tandis que Tpz1, Ccq1, et Pot1 constituent un autre sous-complexe associé à l'ADN télomérique simple brin. Ces deux sous-complexes liés respectivement à l'ADNdb et simple brin sont connectés par une interaction physique entre Rap1 et Poz1 (Harland et al., 2014).

## 2.3.1. Rôles fonctionnels des principaux sous-complexes de la shelterin chez *S. pombe*

### 2.3.1.1. Le complexe Taz1-Rap1-Rif1

#### 2.3.1.1.A. Taz1

Protéine centrale du complexe de la shelterin Taz1 est la seule protéine à se lier directement à l'ADN télomérique double brin. Cette liaison, médiée par son domaine MYB (Tomita et al., 2007), permet d'une part la reconnaissance spécifique des séquences télomériques, et d'autre part l'interaction avec d'autres composants du complexe de la shelterin, tels que Rap1, Rif1, et Poz1, pour former une structure protectrice multi-protéique.

Les fonctions de Taz1 dépendent étroitement de sa structure **(Figure 16)**. À l'image de ses homologues humains TRF1 et TRF2, Taz1 possède un domaine central d'homologie non structuré TRF (TRFH) situé dans sa région N-terminale et un domaine MYB de liaison à l'ADN dans sa région C-terminale. La capacité de ce domaine MYB à se lier efficacement à l'ADN repose sur l'intégrité du domaine de dimérisation de Taz1, car Taz1 forme naturellement un dimère.

La dimérisation de Taz1 est essentielle pour son ancrage aux télomères. Les études sur des mutations spécifiques au sein du domaine de dimérisation de Taz1, telles que L431R, V434W et L445R, ont montré que ces altérations entraînent une perte complète de l'interaction dimérique, compromettant ainsi sa fonctionnalité et la capacité de Taz1 à se lier efficacement à l'ADN (Wei Deng et al., 2015).

Une autre fonction de Taz1 est la régulation négative de l'activité de la télomérase. Les études pionnières menées par Cooper et al. (1997) ont démontré que la délétion du gène *taz1+* entraîne un allongement significatif des télomères (+2,5 kb), suggérant ainsi un rôle inhibiteur de Taz1 sur la télomérase. La régulation temporelle de l'inhibition de la télomérase par Taz1 est essentielle pour maintenir la taille des télomères (J. Kanoh et

Ishikawa., 2001 ; Dehe et al., 2012, Wei Deng et al., 2015). L'absence du gène *taz1+* entraîne un allongement anormal des télomères, associé à une sensibilité aux basses températures (18 °C). Cette sensibilité au froid s'expliquerait en partie par des enchevêtrements d'ADN, résultant de défauts de réplication probablement liés à l'allongement excessif des télomères en l'absence de Taz1 (Miller et al., 2003 ; Miller et *al.,* 2006 ; Zaaijer et al., 2016). Fait intéressant, la suppression du gène *rif1+* compense la sensibilité au froid des cellules dépourvues de Taz1, ce qui indique que Rif1 est impliqué dans la résolution des enchevêtrements des télomères (Miller et al., 2005). Récemment, une étude a révélé que la perte de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique de l'enveloppe nucléaire inverse la capacité de la délétion *rif1+* à supprimer la sensibilité au froid *des cellules taz1Δ* (Nageshan et al., 2024). Les auteurs ont montré que les pores nucléaires (NPC) aident à résoudre les enchevêtrements mitotiques chez *S. pombe*, réduisant la sensibilité au froid des cellules *taz1Δ* (Nageshan et al., 2024). La suppression du gène *Erg28* diminue les niveaux d'ergostérol, provoque l'accumulation de stérols anormaux et réduit la fluidité de la membrane cellulaire (Gachotte et al., 2001 ; Mo et Bard, 2005). Cette interaction génétique suggère que la fluidité membranaire est un facteur clé dans la résolution des enchevêtrements télomériques (Nageshan et al., 2024).

Un autre rôle de Taz1 est de protéger les télomères en inhibant les mécanismes de réparation des CDB via la voie NHEJ. Les fusions de télomères observées dans les cellules *taz1Δ* privées d'azote sont spécifiquement médiées par cette voie, car la suppression de *pku70+* ou de *lig4+* empêche leur formation (Ferreira MG et al., 2001). Le rôle du complexe Ku sera détaillé dans la section 2.3.1.6.A du manuscrit.

Ainsi, la protéine Taz1 empêche le complexe Ku de promouvoir le NHEJ au niveau des télomères. Cette inhibition pourrait être médiée notamment par le domaine MIN (MRN/X-inhibitory motif) de Taz1, qui régule l'activité du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) (Khayat, F. et al., 2021). Le mécanisme précis par lequel le domaine MIN bloque la voie NHEJ reste à clarifier.

Par analogie au mécanisme d'action de Rif2 chez *S.cerevisiea* (Roisné-Hamelin F et al., 2021) et au domaine iDDR de TRF2 chez l'homme (Myler LR et al., 2023 ; Freddy Khayat et al., 2024) Taz1, grâce à son domaine MIN, empêcherait l'accès et la fonction du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) en inhibant l'hydrolyse de l'ATP, et de Rad50, tout en limitant la résection dépendante des complexes MRN et Dna2, une nucléase impliquée dans la réparation des DSB

(Ferreira et al., 2001 ; Tomita et al., 2004). Les sites de mutations identifiés dans le domaine MIN (F511A et P513N), constituent des outils précieux pour étudier ces interactions. L'un des projets de notre laboratoire repose sur l'étude des mécanismes des voies moléculaires impliquées dans l'inhibition du NHEJ par les protéines télomériques.

Enfin, Taz1 joue un rôle essentiel dans la progression efficace des fourches de réplication à travers les télomères (Miller et al., 2006). Miller et al ont montré que, l'absence de Taz1 entraîne un blocage des fourches de réplication au niveau des télomères (Miller et al., 2006). Ce blocage semble avoir plusieurs conséquences, notamment une perte rapide des télomères en l'absence de télomérase et une augmentation significative du taux de recombinaison homologue télomérique (HR) (Miller et al., 2006 ; Rog et al., 2009). Ces fonctions sont également observées chez son homologue humain, TRF1, qui joue un rôle clé dans la réplication des télomères (Sfeir et al., 2009) et peut également inhiber la progression de la fourche de réplication in vitro (Ohki & Ishikawa., 2004).

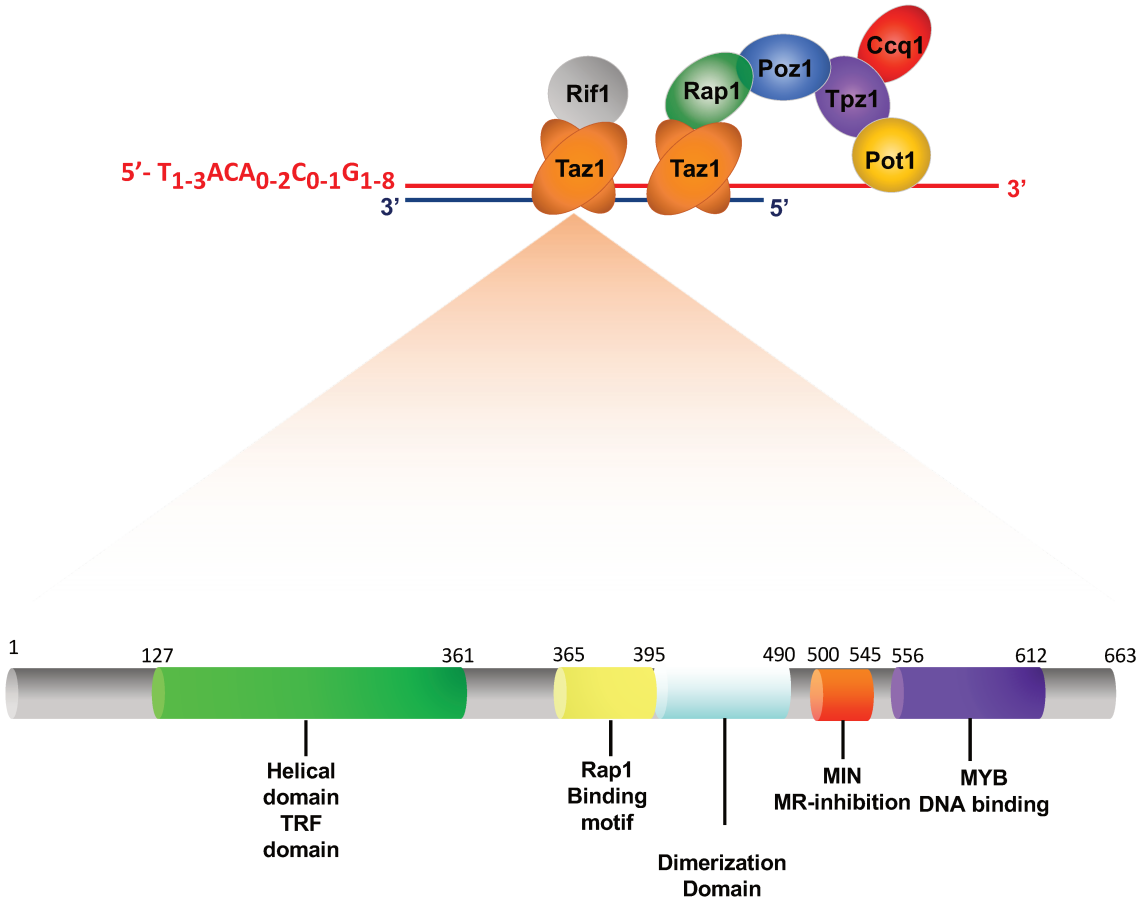



***Figure 16 : Représentation des différents domaines de la protéine Taz1***

*La protéine Taz1 est composée de 663 acides aminés et comprend un domaine structurel commun avec TRF1 ainsi que quatre domaines fonctionnels. Le domaine MYB est impliqué dans la liaison à l'ADN télomérique double brin, le domaine MIN (MRN/X-inhibitory motif) régule l'activité du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à Rap1.*

Par ailleurs, les séquences télomériques internes en tandem, qui servent de sites de liaison pour Taz1 dans les bras des chromosomes, lui permettent de moduler l'activation des origines de réplication et de participer à l'établissement de l'hétérochromatine. Bien que les mécanismes ne soient pas totalement compris, il semble que Taz1 joue un rôle dans l'inhibition du recrutement de Sld3, une protéine essentielle à l'initiation de la réplication de l'ADN. Sld3, qui fait partie du complexe Dbf4-Dependent Kinase (DDK), est nécessaire à la formation du complexe de pré-réplication, notamment en phosphorylant les protéines MCM (Minichromosome Maintenance). Cette phosphorylation est une étape cruciale pour amorcer la réplication (Zofall et al., 2016). Ainsi, Taz1 agit comme un régulateur essentiel, assurant une réplication coordonnée et évitant la suractivation des origines de réplication.

Ces résultats posent des questions fondamentales quant au rôle spécifique de Taz1 dans la réplication des séquences terminales. On pourrait envisager, en comparaison avec les travaux in vitro sur TRF1, que Taz1 joue un rôle antagoniste dans la réplication des télomères : à la fois constituer une barrière à la progression des fourches de réplication et faciliter leur réplication. Il est envisageable que des mécanismes de contrôle soient indispensables pour réguler l'activité de Taz1 au cours du cycle cellulaire, à l'image de ses homologues humains TRF1 et TRF2 (Sarek et al., 2019). Ainsi, les modifications post-traductionnelles sont-elles nécessaires pour moduler l'activité de Taz1 et pour moduler son recrutement aux télomères ?

Pour explorer ces mécanismes, nous avons mené des analyses approfondies visant à décrypter la régulation post-traductionnelle de Taz1. Cela a constitué un aspect important de mon travail de thèse.

### 2.3.1.1.B. Rap1

Rap1 est recrutée spécifiquement aux télomères par Taz1, où elle joue un rôle essentiel dans la protection des télomères et la régulation de leur fonction. (Kanoh & Ishikawa., 2001 ; Chikashige et al., 2001). La partie N-terminale de Rap1 contient trois domaines essentiels : un domaine BRCT (BRCA1 C-terminal), un domaine Myb, et un domaine Myb-Like (Chikashige & Hiraoka., 2001 ; Kanoh & Ishikawa., 2001). Du côté C-terminal, Rap1 possède un domaine d'interaction avec Poz1 (domaine PI, Pan et al., 2015) et une région C-terminale conservée (RCT), qui interagit avec Taz1 chez *S. pombe.* Entre les domaines PI et RCT, une région majoritairement non structurée de 150 acides aminés est présente.

Rap1 joue un rôle dans la prévention des fusions des extrémités chromosomiques. En effet, en l'absence de Rap1 on observe des fusions des chromosomes lorsque les cellules sont bloquées en G0, (Ferreira & Cooper, 2001 ; Miller et al., 2005). Récemment, il a été démontré que Rap1 empêche les fusions entre les télomères allongés (Pan L et al., 2022). Cette protection est cruciale, car, sans Rap1, les télomères longs deviennent vulnérables aux événements de fusion, ce qui peut entraîner des réarrangements chromosomiques et des anomalies génétiques graves. De plus, Rap1 garantit également que les extrémités chromosomiques ne soient pas reconnues comme des cassures d'ADN nécessitant réparation.

Dans les cellules cyclantes, l'absence de Rap1 est associée à un allongement des télomères, à une perte de répression des gènes situés à proximité des télomères, ainsi qu'à des anomalies durant la méiose. (Chikashige et al., 2001 ; Kanoh et al., 2001 ; Miller et al., 2005).

Ce rallongement télomérique excessif (+2,5) est étroitement lié à une augmentation de l'activité de la télomérase (Dehé et al., 2012) suggérant que, tout comme Taz1, Rap1 régule négativement la télomérase (J. Kanoh and Ishikawa., 2001 ; Cooper et al., 1997). Son rôle majeur dans la régulation de la longueur des télomères repose a priori principalement sur sa capacité à former un pont moléculaire, constitué des interactions entre Rap1, Taz1, Tpz1 et Poz1, qui bloquerait l'activité de la télomérase (Pan et al., 2015 ; Liu J et al., 2015, Kim et al., 2017).

Ce pont joue un rôle essentiel pour maintenir l'intégrité des télomères et assurer leur stabilité.

Ainsi, Rap1 se révèle être un acteur clé dans le maintien de la stabilité génomique en protégeant les télomères contre les fusions indésirables et en régulant leur longueur.

#### 2.3.1.1.C. Rif1

La protéine Rif1, à l'instar de Rap1, est recrutée aux télomères par Taz1 (J. Kanoh et Ishikawa., 2001 ; Miller, Ferreira et Cooper., 2005). Comme Taz1, Rif1 exerce une fonction similaire en tant qu'inhibiteur de l'activité de la télomérase, comme en témoigne l'allongement des télomères de 300 pb observé suite à la délétion du gène *rif1* (J. Kanoh et Ishikawa., 2001 ; Miller, Ferreira et Cooper., 2005). Il a été démontré que l'absence de Rif1 entraîne une réplication précoce des télomères au début de la phase S, alors qu'en conditions normales, les télomères sont répliqués en fin de phase S (Hayano et al., 2012). Ce changement dans la temporalité de la réplication met en lumière le rôle essentiel de Rif1 dans la régulation et la répression de l'activation des origines de réplication. Dans cette perspective, des études ont montré que Rif1 contrôle certaines origines de réplication de deux manières distinctes : d'une part, par un mécanisme dépendant de Taz1 (Tazumi et al., 2012), qui se lie à des séquences télomériques internes comme expliqué dans la section précédente, et d'autre part, de façon indépendante de Taz1, où Rif1 reconnaît directement des G4 dans l'ADN (Kanoh et al., 2015).

En effet, Rif1 contient des motifs canoniques d'interaction RVxF et SILK qui lui permettent de se lier aux phosphatases PP1 (Protein Phosphatases 1, Sds21 et Dis2 chez S. *pombe*) (Davé et al., 2014). Grâce à ces motifs, Rif1 recrute ces phosphatases pour exercer un contrôle précis sur l'initiation de la réplication en empêchant la phosphorylation du complexe Mcm par la kinase Hsk1 au niveau de certaines origines. Cette phosphorylation est une étape critique car elle conditionne le recrutement de Cdc45, une protéine indispensable à l'initiation des origines de réplication. En bloquant cette modification post-traductionnelle, Rif1 joue un rôle essentiel dans la répression de l'activation des origines de réplication des régions subtélomériques (Davé et al., 2014). De nombreux travaux ont tenté d'expliquer le lien, direct ou indirect, entre l'activité phosphatase associée à Rif1 et la longueur des télomères observée chez *S. cerevisiae*, mais aucune cible précise n'a été identifiée à ce jour (Kedziora et al., 2018 ; Shubin and Greider ., 2020). Chez *S. pombe*, il a été démontré que le mutant *rif1-PP1*, dans lequel l'interaction entre Rif1 et les phosphatases PP1 est perturbée, présente des télomères significativement

plus longs que ceux d'une souche sauvage. Les travaux de notre laboratoire ont permis de décrypter les mécanismes sous-jacents à ce phénotype et d'identifier *Ccq1* comme une cible potentielle des phosphatases PP1. Il convient de rappeler que la phosphorylation de Ccq1 est essentielle pour activer le recrutement de la télomérase, grâce à une interaction directe entre Ccq1 et la sous-unité Est1 de la télomérase (X. Hu et al., 2016). Ainsi, ces résultats établissent un lien entre la fonction de Rif1 et l'inhibition directe de la télomérase (Vaurs et al., 2022).

Fait intéressant, la perte de Rif1 rétablit la viabilité à 20°C des cellules dépourvues du gène *taz1+*, ce qui indique que Rif1 est d'une manière ou d'une autre responsable de cette mortalité. Cependant, le rôle de Rif1 dans la résolution des enchevêtrements télomériques reste encore à élucider (Miller, Ferreira, and Cooper., 2005). Il a été démontré que dans un contexte *taz1Δ*, Rif1 masquerait les enchevêtrements télomériques, empêchant leurs résolutions et contribue ainsi au blocage des fourches de réplication observé (Zaaijer et al., 2016). Récemment, une étude a suggéré que la perte de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique de l'enveloppe nucléaire inverse la capacité de la délétion *rif1+* à supprimer la sensibilité au froid *des cellules taz1Δ* (Nageshan et al., 2024).

### 2.3.1.2. Le complexe Pot1-Tpz1-Ccq1

#### 2.3.1.2.A. Pot1

La protéine Pot1 possède deux motifs OB-fold situés à son extrémité N-terminale (OB1 et OB2), qui lui confèrent la capacité de se lier directement à l'extrémité 3' simple brin de l'ADN télomérique (Miyoshi et al., 2008). Sa région C-terminale interagit spécifiquement avec la protéine Tpz1. Cette interaction est essentielle pour l'intégration de Pot1 au sein du complexe shelterin, ce qui permet aussi le recrutement de la télomérase (Jun et al., 2013 ; Harland et al., 2014). Pot1 joue un rôle fondamental dans la protection des télomères et la régulation de leur longueur (Baumann & Cech., 2001 ; Miyoshi et al., 2008 ; Sun et al., 2022). Il a été démontré que la suppression du gène *pot1+* entraîne une perte des télomères ainsi que des fusions des extrémités chromosomiques. Ce phénomène résulte d'une résection massive des extrémités 5', qui progresse jusqu'aux séquences homologues flanquant les télomères (Wang &

Baumann., 2008 ; Pitt & Cooper., 2010). Cette résection permet la fusion des chromosomes via le mécanisme de SSA (single-strand annealing), grâce à l'invasion de l'ADNsb (Wang & Baumann., 2008 ; Pitt & Cooper., 2010).

Pot1 joue un rôle clé dans l'inhibition de la réponse aux dommages de l'ADN. Plus précisément, Pot1 protège les extrémités chromosomiques contre une activation inappropriée de la réponse aux dommages de l'ADN en inhibant l'activation de Chk1 (Pitt and Cooper., 2010). Chez l'humain, POT1 bloque la liaison de RPA à l'ADNsb (Gong et de Lange., 2010) inhibant ainsi le recrutement de la kinase ATR (Rad3) (Flynn et al., 2011).

Une autre fonction de Pot1 est la régulation négative de l'activité de la télomérase en interagissant avec l'extrémité N-terminale de Tpz1. Cette interaction renforce la régulation négative exercée sur la télomérase (Jun *et al.*, 2013 ; Harland *et al.*, 2014). Par ailleurs, Tpz1 interagit avec Ccq1, une protéine essentielle au recrutement de la télomérase, grâce à son association avec Est1 (Jun et al., 2013 ; Harland et al., 2014). De manière analogue, chez l'homme le complexe POT1-TPP1 est également décrit comme un régulateur négatif de la télomérase, notamment en favorisant le recrutement du complexe CST après l'action de nucléases, facilitant ainsi la synthèse du brin complémentaire (Loayza et al., 2003 ; Chen et al., 2012). Cependant, le mécanisme précis par lequel POT1 régule ce processus reste encore à élucider.

Les travaux récents du laboratoire, réalisés chez *S. pombe*, suggèrent que Pot1 joue également un rôle clé dans la réplication des télomères (Vaurs et al., 2023). Nos travaux ont montré que dans les régions subtélomériques STE3-2, le recrutement de Stn1 dépend de l'intégrité du complexe Pot1-Tpz1-Poz1 (Vaurs et al., 2023). Ces résultats indiquent donc que Pot1 est impliqué dans la réplication des télomères et des régions subtélomériques, en permettant le recrutement du complexe Stn1-Ten1 par sa liaison aux régions subtélomériques. Dans son étude, Pinzaru (2016) a démontré que, chez l'homme, l'inhibition de POT1 entraîne des défauts majeurs dans la réplication des télomères, provoquant un blocage des fourches de réplication et une instabilité génomique. Il a proposé que le complexe POT1-TPP1 pourrait favoriser la synthèse des brins retardés des télomères en recrutant le complexe CST pour

faciliter le redémarrage des fourches de réplication, comme cela avait été suggéré par le groupe de C. Price (Stewart et al., 2012). À l'inverse du CST, le mécanisme exact par lequel POT1 régule ce processus demeure encore à élucider.

Cette problématique a constitué un axe central de mes travaux de thèse. Pour étudier le rôle de Pot1 et son implication dans la réplication des régions terminales, j'ai utilisé un mutant thermosensible (ts) de *pot1+*, désigné *pot1-1*, identifié par le laboratoire de J. Cooper (Pitt et al., 2010). Ce mutant subit une perte rapide des télomères et accumule de l'ADNsb pendant la phase S à température restrictive, ce qui indique que Pot1 remplit des fonctions cruciales lors de la réplication de l'ADN.

#### 2.3.1.2.B Tpz1

Tpz1 est l'homologue de la protéine TPP1 chez l'humain (Miyoshi et al., 2008). Il participe à l'établissement du pont protéique : son extrémité C-terminale se lie à Poz1 et Ccq1, tandis que son extrémité N-terminale interagit avec Pot1 (Miyoshi et al., 2008 ; Jun et al., 2013 ; Harland et al., 2014). Comme TPP1, La protéine Tpz1 possède un domaine « TEL patch » dans sa région N-terminale, permettant son interaction avec la sous-unité catalytique Trt1 de la télomérase (Christine Anne Armstrong et al. 2014). Cette interaction est essentielle pour le recrutement efficace de la télomérase aux télomères, optimisant ainsi son activité et sa processivité. La phosphorylation de Ccq1 sur la thréonine 93 par les kinases $Rad3^{ATR}$ et $Tel1^{ATM}$, favorise l'interaction entre la sous-unité Est1 de la télomérase et Ccq1 (Moser et al., 2011 ; Yamazaki et al., 2011). Cette interaction permettrait de positionner la télomérase aux télomères pour promouvoir l'interaction entre Tpz1-Trt1 (X. Hu et al., 2016). C'est cette interaction spécifique entre Tpz1 et Ccq1 qui permet l'activation de la télomérase. La régulation négative de la télomérase est assurée par les modifications post-traductionnelles de Tpz1. Plus précisément, la SUMOylation de Tpz1 au niveau du résidu lysine 242 par l'E3 ligase Pli1 inhibe l'activité de la télomérase en facilitant le recrutement du complexe Stn1-Ten1 aux télomères (Garg et al., 2014 ; Miyagawa et al., 2014). Un autre motif régulateur nommé « SWSSS » a été identifié chez Tpz1 (Mennie et al., 2019). Ce motif agit indépendamment de la SUMOylation de Tpz1 et facilite la liaison du complexe Stn1-Ten1 aux télomères. Il joue également un rôle crucial en

limitant l'accumulation de la télomérase aux extrémités télomériques pendant les phases tardives S/G2 du cycle cellulaire.

Le groupe de Fuyuki Ishikawa a proposé un modèle de contrôle de la taille des télomères selon lequel, lorsque les télomères sont longs, l'interaction entre les protéines de la shelterin induit un repliement des télomères qui inhibe l'activité de la télomérase, correspondant à une configuration "fermée" **(Figure 17.A)**. En revanche, lorsque les télomères sont courts, cette configuration ne peut pas être adoptée, libérant l'accès à la télomérase et définissant une configuration "semi-ouverte" **(Figure 17.B)**.

Feng Qiao et son équipe ont complété ce modèle en proposant une structure dimérique où les télomères oscillent entre un état extensible (configuration semi-ouverte) et un état non-extensible (configuration fermée) (Jun et al., 2013) **(Figure 17.C)**. Dans ce modèle, la protéine Tpz1 joue un rôle central. En effet, une perturbation de l'interaction entre Tpz1 et Pot1 (mutation tpz1-I200R) ou entre Tpz1 et Poz1 (mutation tpz1-I501R) entraîne un allongement des télomères, soulignant l'importance du pont protéique pour l'inhibition de la télomérase. Plus précisément, l'interaction Tpz1-Poz1 induit un changement conformationnel de Poz1 qui renforce son interaction avec Rap1 (J. K. Kim et al., 2017). Les travaux récents de Feng Qiao ont suggéré que le désassemblage dynamique de la shelterin agit comme un "minuteur moléculaire". Ce mécanisme contrôle précisément la durée de l'état "ouvert", permettant un accès limité dans le temps de la télomérase aux extrémités chromosomiques (Liu J. et al., 2021). Une perte de régulation entre l'état extensible (configuration semi-ouverte) et l'état non-extensible (configuration fermée) entraîne un allongement massif et incontrôlé des télomères. Cette transition est régulée par l'interaction Tpz1-Poz1. Cette interaction provoque un changement conformationnel de Poz1, renforçant son interaction avec Rap1 et modulant ainsi l'activité de la télomérase **(Figure 17)**.

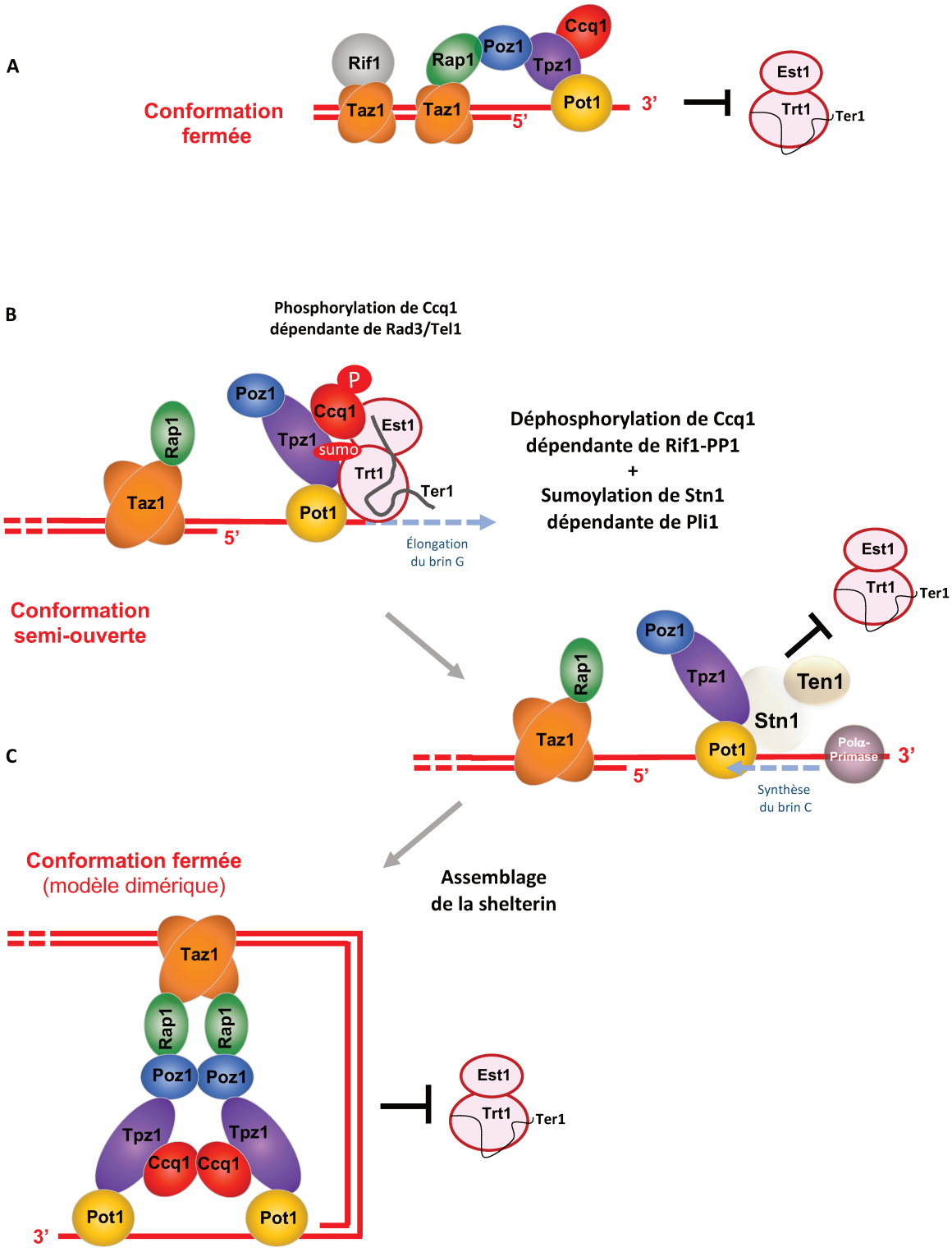



***Figure 17 : La configuration « fermée » des télomères est caractéristique des télomères longs***

*Les interactions entre les composants du complexe shelterin induisent un repliement structural des télomères, limitant l'accès de la télomérase et inhibant son activité (A). Dans le cas de télomères courts, cette configuration ne peut être maintenue, menant à une configuration « semi-ouverte » qui libère l'accès à la télomérase (B). La déphosphorylation de Ccq1 par Rif1-*

*PP1 et la SUMOylation de Stn1 par Pli1 facilitent le recrutement du complexe Stn1-Ten1 aux télomères, renforçant l'inhibition de la télomérase (modèle proposé par le groupe de Fuyuki Ishikawa). (C) La représentation du modèle dimérique suggère une dynamique oscillatoire entre un état extensible (configuration semi-ouverte) et un état non-extensible (configuration fermée) des télomères. Cette transition est médiée par l'interaction Tpz1-Poz1, qui induit un changement conformationnel de Poz1, augmentant son interaction avec Rap1 et modulant l'activité de la télomérase (adapté de Coulon CSHL 2025 in press).*

Une autre fonction essentielle de Tpz1 réside dans son rôle dans l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine subtélomérique. Par son interaction avec Ccq1, Tpz1 facilite le recrutement du complexe méthyltransférase Clr4 dans les régions télomériques (Tanaka H et al., 2007). Cette interaction contribue à la propagation de l'état hétérochromatinien, crucial pour la stabilité génomique (Christine Anne Armstrong et al., 2014).

Ainsi, Tpz1 apparaît comme un régulateur central dans le maintien de l'homéostasie des télomères ainsi que dans la régulation positive et négative de la télomérase. Ce rôle est assuré par ses interactions avec divers partenaires télomériques, tels que le recrutement du complexe Stn1-Ten1, qui agit comme un inhibiteur de la télomérase tout en stimulant la synthèse du brin complémentaire, ainsi que par des modifications post-traductionnelles.

### 2.3.1.2.C. Ccq1

La protéine Ccq1 contient un domaine TAD (Tpz1-associating domain) qui interagit avec Tpz1 et permet son recrutement au télomère (Christine A. Armstrong et al., 2018). Cependant, il a également été suggéré que Ccq1 pouvait être recrutée indépendamment de cette interaction, ce qui indiquerait l'existence d'un autre mécanisme d'ancrage aux extrémités télomériques (Jun et al., 2013 ; Harland et al., 2014). Il a été démontré que Ccq1 interagit directement avec Clr3, une sous-unité du complexe SHREC. Cette interaction pourrait fournir un moyen alternatif à Ccq1 d'être recutée aux régions télomériques (Harland et al., 2014).

Ccq1 exerce plusieurs fonctions, tout d'abord, elle agit comme un régulateur positif de la télomérase, comme le démontre la délétion du gène *ccq1+*, qui entraîne un raccourcissement des télomères (Miyoshi et al., 2008). Ce rôle dépend de la phosphorylation de Ccq1 sur le résidu thréonine 93, catalysée par les kinases $Rad3^{ATR}$ et/ou $Tel1^{ATM}$. Cette modification post-traductionnelle favorise l'interaction de Ccq1 avec la sous-unité Est1 de la télomérase. (Moser et al., 2011 ; Yamazaki, Tarumoto et Ishikawa., 2012). Fait intéressant, les cellules *ccq1Δ* parviennent à maintenir des télomères courts grâce à la recombinaison, malgré le raccourcissement des télomères observé. Cela suggère que Ccq1 joue également un rôle dans l'inhibition de l'activation des points de contrôle. En effet, Ccq1 inhibe l'activation des checkpoints puisque la délétion de *ccq1+* induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, via l'activation de la kinase Chk1, dépendante de *Rad3*. Cependant, le mécanisme exact de cette activité reste encore à définir (Kazunori Tomita et Cooper., 2008).

Une autre fonction de Ccq1 réside dans son rôle clé dans l'établissement de l'hétérochromatine. Ccq1 interagit directement avec la déacétylase d'histone Clr3, composante du complexe SHREC et avec Clr4 grâce à sa région C-terminale (Miyoshi et al., 2008 ; Christine A. Armstrong et al., 2018). Plus récemment, il a été démontré que Ccq1 se lie à Raf2, une sous-unité du complexe CLRC (composé de Clr4, Cul4, Rik1, Raf1 et Raf2). Cette interaction facilite le recrutement du complexe CLRC aux télomères, où il catalyse la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9). Cette modification épigénétique est cruciale pour la stabilisation des nucléosomes et pour renforcer l'association de la chromatine avec le

complexe shelterin. Ce processus crée une boucle de rétroaction positive entre la shelterin et le CLRC, favorisant ainsi la nucléation et la propagation de l'hétérochromatine (Shi et al., 2021).

Une étude récente a mis en évidence une nouvelle fonction cruciale de la protéine Ccq1 dans la protection des extrémités télomériques contre la dégradation de l'ADN. En l'absence de Ccq1, les extrémités télomériques sont traitées comme des CDB et subissent une dégradation rapide médiée par la nucléase Mre11. Les cellules *ccq1Δ* recrutent des quantités significativement plus élevées de Mre11 au télomère court inductible, indiquant qu'une des fonctions de Ccq1 est de limiter la localisation et l'activité de Mre11 (Audry et al., 2024). Cette découverte met en évidence un nouveau mode de protection des télomères, différent des fonctions déjà établies de Ccq1 dans le recrutement de la télomérase et l'établissement de l'hétérochromatine, soulignant ainsi la complexité des mécanismes de maintenance des extrémités chromosomiques. Une question qui demeure est de savoir comment Ccq1 coordonne ses diverses fonctions au niveau des télomères, et des recherches supplémentaires seront indispensables pour en saisir l'ensemble des mécanismes.

### 2.3.1.3. La protéine Poz1

Poz1 est l'homologue de TIN2 chez l'homme. Bien que la séquence primaire de Poz1 diffère de celle de TIN2, leur fonction est conservée (Xue et al., 2017). Poz1 est un élément structurel de la shelterin. Il relie le complexe Pot1-Tpz1, au complexe Taz1-Rap1 (Miyoshi et al., 2008). Cette fonction est essentielle pour maintenir l'intégrité du complexe shelterin, dont l'assemblage joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie des télomères et la formation de l'hétérochromatine (Jiyong Wang et al., 2016 ; Kim et al., 2017 ; Xue et al., 2017). La délétion de *poz1+* entraîne un rallongement des télomères, ce qui indique que Poz1 agit comme un régulateur négatif de l'activité de la télomérase (Miyoshi et al., 2008). La nécessité de Poz1 pour la stabilité des télomères devient encore plus évidente lorsque le gène *ccq1+* est également délété. En effet, la perte simultanée de *poz1+* et *ccq1+* conduit à une disparition complète des régions télomériques, et les cellules *ccq1Δ poz1Δ* survivent en formant des chromosomes circularisés (Xue et al., 2017).

Par ailleurs, il a été proposé que Poz1 possède un motif de liaison (PBM) avec Rap1 (au niveau des résidus 466-491), essentiel à la maintenance des télomères par recombinaison homologue, notamment en l'absence de *ccq1* (Xue et al., 2017).

Les travaux de Liu et al. (2017), ont révélé que Poz1 peut former un dimère ce qui peut laisser supposer que la shelterin s'assemble en une structure complexe. Ce complexe Tpz1-Poz1-Rap1 régule l'accès de la télomérase en modulant les états « ouvert » et « fermé » des télomères, offrant ainsi un contrôle précis de leur élongation (Liu J. et al., 2017 ; Sun H. et al., 2022). Conformément à ce modèle, Pot1 se lie à l'ADNsb télomérique dans un état non extensible, tandis que le complexe Tpz1-Poz1-Rap1 s'assemble de manière hiérarchique sur les régions d'ADN simple et double brin des télomères. Ce processus transforme les télomères en une structure de protection appelée « coiffe télomérique », essentielle pour leur stabilité et leur intégrité (Nandakumar et al., 2012 ; Han X. et al., 2013).

Ainsi, Poz1 est une protéine multifonctionnelle, dont les rôles structurel et régulateur sont essentiels pour la protection et le maintien des télomères.

### 2.3.1.4. Le complexe Stn1-Ten1

La protéine Stn1 possède un domaine OB-fold dans sa partie N-terminale, essentiel pour son interaction avec Ten1, ainsi que deux motifs WH (Winged-Helix) (Sun et al., 2009). Elle forme un complexe indispensable à la protection des télomères (Martín et al., 2007). En effet, la délétion des gènes *stn1* ou *ten1* entraîne une mortalité cellulaire à l'exception de rares cellules capables de survivre grâce à la circularisation de leurs chromosomes. Cependant, cette circularisation a des conséquences importantes, notamment la perte de la structure télomérique normale, une altération possible de l'expression des gènes situés à proximité des anciennes régions télomériques, et des modifications dans la dynamique de réplication et de ségrégation des chromosomes (Martin et al., 2007).

Les travaux des groupes dirigés par Alessandro Bianchi et Toru Nakamura ont démontré que le recrutement du complexe Stn1-Ten1 dépend de la SUMOylation de la protéine Tpz1. Le laboratoire a montré que Stn1 possède un motif d'interaction SUMO (SIM), qui lui permet d'interagir avec le polypeptide SUMO attaché à Tpz1 (Matmati et al., 2018). La SUMOylation de Tpz1 sur la lysine 242, catalysée par la ligase SUMO Pli1, est cruciale pour un recrutement efficace du complexe Stn1-Ten1 aux télomères (Garg et al., 2014 ; Miyagawa et al., 2014). La mutation du motif $^{226}$*ILAL*$^{229}$ dans le domaine SIM, correspondant à l'allèle nommé *stn1-226*, altère significativement le recrutement du complexe Stn1-Ten1 aux séquences terminales, entraînant un allongement anormal des télomères. Ce phénotype est similaire à celui observé dans le mutant *stn1-1*, comme rapporté par Takikawa et al. (2017). Ainsi, le complexe Stn1-Ten1 agit comme un inhibiteur de la télomérase**,** en stimulant la synthèse du brin complémentaire par le recrutement du complexe primase-polymérase α (Primase-Polα) (Miyagawa et al., 2014 ; Garg et al., 2014 ; Escandell et al., 2019).

Il a été montré par le laboratoire de F Ishikawa et notre laboratoire que le complexe Stn1-Ten1 joue aussi un rôle essentiel dans la réplication des régions terminales (télomères et subtélomères) (Takikawa., 2016 ; Matmati et al., 2018). En effet, à température non permissive, les séquences terminales sont perdues dans les mutants *stn1-1* et *stn1-226*. Le laboratoire a aussi montré par gel2D (*2D gel electrophoresis*) des défauts importants de la réplication associés à une accumulation d'ADNsb. De façon intéressante, la surexpression de

la sous-unité catalytique de Polα (Pol1) permet de restaurer, au moins partiellement, la viabilité et la stabilité des télomères dans le mutant *stn1-226* à la température restrictive. Par ailleurs, la délétion d'*exo1* corrige le défaut de croissance des cellules *stn1-226* dans ces conditions. Ces résultats suggèrent que, dans ce contexte mutant, le processus de synthèse de l'ADN est altéré (Matmati et al., 2018). Ces résultats indiquent que Stn1-Ten1 pourrait promouvoir la synthèse d'ADN au niveau de fourches bloquées par exemple grâce au recrutement de Polα.
Une étude plus récente du laboratoire à laquelle j'ai participé a permis de confirmer cette hypothèse. En effet, STn1-Ten1 est recruté aux régions subtélomériques par le sous-complexe Poz1-Tpz1-Pot1 pour initier de la synthèse d'ADN, probablement sur le brin retardé au niveau des fourches bloquées pour éviter la RH (Vaurs et al., 2023). Ce travail a permis de mettre en évidence qu'il existait une région particulièrement difficile à répliquer au niveau des élément STE3 et STE2.

L'étude du mutant *stn1-226* a révélé aussi l'implication du complexe *Stn1-Ten1* dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, le mutant *stn1-226* est sensible aux agents génotoxiques, suggérant un rôle similaire à celui du complexe CST chez l'Homme dans la DDR (Stewart JA et al., 2012 ; Chastain et al., 2016 ; M. Zhang et al., 2019).
Fait intéressant, cette sensibilité aux agents génotoxiques et la thermo-sensibilité du mutant *stn1-226* peuvent être restaurées par la délétion du gène *rif1+* (Vaurs et al., 2023). L'ouverture d'une origine de réplication régulée par *Rif1* en aval des régions STE2-3 permet de restaurer un profil de réplication conventionnel dans le mutant *stn1-226* à température semi-restrictive.

Ainsi, Stn1-Ten1 remplit une double fonction. D'une part, aux télomères, il limite l'activité de la télomérase et favorise la synthèse du brin complémentaire. D'autre part, dans les régions subtélomériques, notamment STE3-2, il facilite la progression des fourches de réplication. Cette dualité fonctionnelle suggère que Stn1-Ten1 utilise un mécanisme similaire pour promouvoir la synthèse d'ADN dans ces deux contextes, en recrutant le complexe Polα-Primase aux fourches de réplication bloquées. Ce rôle souligne l'importance de Stn1-Ten1 dans le maintien de l'intégrité du génome, tant aux extrémités chromosomiques que dans les régions subtélomériques adjacentes.

### 2.3.1.5. La télomérase

Chez *S. pombe*, la télomérase est exprimée de manière constitutive et se compose de deux sous-unités essentielles Trt1**,** et Est1 (et un ARN (*TER1)*).

*TER1* constitue l'ARN matrice de la télomérase, indispensable pour l'activité enzymatique (Leonardi et al., 2008 ; Webb et Zakian., 2008 ; Kannan et al., 2015). Cet ARN mesure 1213 nucléotides et présente une structure particulière incluant un site de liaison *Sm* et une coiffe 5' 2,2,7-triméthylguanosine (TGM) (Leonardi et al., 2008 ; Webb et Zakian., 2008). Bien que seulement une faible portion de *TER1* soit polyadénylée, son ARN nécessite une maturation, assurée par les protéines Sm**.** Ces dernières favorisent l'épissage du précurseur et recrutent une méthyltransférase pour l'ajout de la coiffe 5' TGM, ce qui stabilise l'ARN (Tang et al., 2012). Après cette étape, les protéines Sm sont remplacées par le complexe *Lsm2-8**,*** qui stabilise davantage *TER1* et facilite son association avec *Trt1* tout en le protégeant de la dégradation (Tang et al., 2012).

*Trt1*, la sous-unité catalytique de la télomérase, est responsable de l'activité enzymatique proprement dite, permettant l'extension des télomères par l'addition de nouvelles séquences d'ADN (Nakamura et al., 1997, Leonardi et al., 2008 ; Webb et Zakian., 2008). La délétion du gène *trt1+* entraîne un raccourcissement des télomères (Nakamura et al., 1997). *Est1* est une protéine accessoire cruciale pour le recrutement de l'enzyme aux télomères. Elle se lie spécifiquement à la région 415-507 de l'ARN *TER1* et interagit avec Trt1 (Beernink et al. 2003).

L'activité de la télomérase nécessite l'intégrité des trois sous-unités. La suppression de l'une de ces sous-unités entraîne un raccourcissement des télomères et conduit à la sénescence réplicative (Nakamura et al., 1997 ; Beernink et al., 2003 ; Leonardi et al., 2008).
Des études récentes ont mis en évidence le rôle crucial de la protéine *Pof8*, également connue sous le nom de *Lar7*, dans la biogenèse et la régulation de la télomérase chez *S. pombe* (Collopy et al., 2018 ; Paez-Moscoso et al., 2018 ; Mennie et al., 2018). Par sa liaison directe avec le TER1, Pof8 stabilise cet ARN, facilite son accumulation au sein des cellules et favorise son association avec Trt1 la sous-unité catalytique de la télomérase (Paez-Moscoso *et al.*,

2018). Un rôle essentiel de *Pof8* consiste également à recruter le complexe de protéines Lsm2-8, qui intervient dans la maturation de *TER1* en orchestrant les étapes de traitement de l'ARN de manière hiérarchisée.

Ce mécanisme est indispensable pour la formation d'un complexe de télomérase actif, assurant ainsi la maintenance des télomères et retardant la sénescence réplicative. De façon intéressante, Pof8 est aussi conservée chez *Tetrahymena*, ce qui suggère une conservation évolutive de ce mécanisme de régulation de la télomérase, potentiellement applicable à d'autres eucaryotes (Basu R et al., 2021, Mennie et al., 2018)

Le recrutement de la télomérase au 3' overhang du télomère se produit lors de la transition entre les phases S et G2 (Moser et al., 2009a). Ce processus est initié par la phosphorylation de Ccq1 par les kinases Rad3 et Tel1**,** *(*Moser et al., 2011 ; Yamazaki, Tarumoto, and Ishikawa., 2012*)*. La SUMOylation de la protéine Tpz1 joue un rôle clé dans l'inhibition de l'activité de la télomérase en recrutant le complexe Stn1-Ten1, qui agit comme un inhibiteur de la télomérase (Garg et al., 2014 ; Miyagawa et al., 2014 ; Matmati et al., 2018*)*. De plus, ce complexe stimule le recrutement de Polα, indispensable à la synthèse du brin complémentaire des télomères (Matmati et al., 2018 ; Escandell et al., 2019) **(Figure 18)**.

Dehé et al. (2012) ont montré que l'effondrement de la fourche dans les répétitions télomériques, observé chez le mutant *taz1Δ*, est associé à une augmentation du recrutement et de l'activité de la télomérase, suggérant que les fourches effondrées pourraient constituer un substrat propice à l'action de la télomérase (Dehé et al., 2012). Dans ce contexte, il a été démontré que l'inversion des fourches peut stabiliser la fourche bloquée et fournir un simple brin riche en guanine permettant le recrutement de la télomérase et le maintien des télomères (Matmati et al., 2020). Il convient de noter que les extrémités ADNdb riche en guanine constituent un substrat compétitif pour le complexe Ku et la télomérase au niveau des fourches inversées. Cette compétition conduit à deux résultats possibles : soit la réparation des télomères par la télomérase via la synthèse de nouveaux télomères, soit la résection des extrémités et le redémarrage de la fourche de réplication par RH, sous le contrôle du complexe Ku. Ainsi, la télomérase joue un rôle protecteur contre la recombinaison des télomères en agissant comme une enzyme de réparation des fourches inversées (Matmati et al., 2020). Ces résultats confirment les modèles observés chez *S. cerevisiae* suggérant que la télomérase

fonctionne comme une enzyme de réparation au niveau des télomères cassés (Simon et al., 2016).

Ainsi, chez *S. pombe*, la télomérase est capable d'étendre l'ADNsb riche en G de l'extrémité 3' au niveau d'une fourche inversée, permettant ainsi de compléter la réplication des télomères et utilisant les fourches télomériques inversées comme substrat pour la télomérase lors de la réplication. Un scénario similaire pourrait être envisagé pour les cellules de mammifères possédant de longs télomères, dans lequel le recrutement de la télomérase et/ou l'inversion de la fourche se produirait près de l'extrémité 3' du chromosome, de manière analogue à ce qui a été proposé pour les fourches de réplication rencontrant une CDB (Doksani et al., 2009).

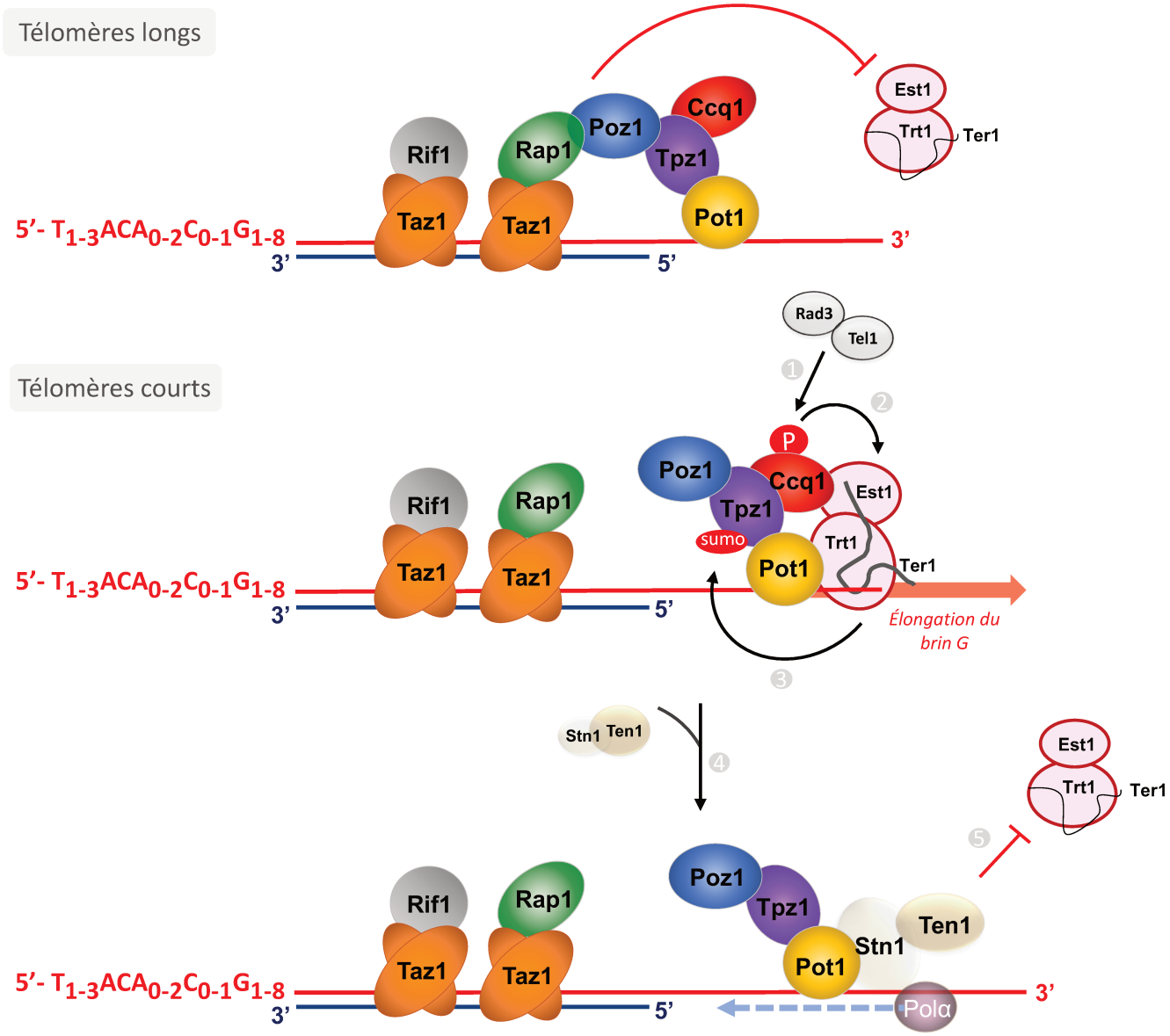



***Figure 18 : Action de la télomérase chez S. pombe***

*Aux télomères longs, le recrutement de la télomérase est inhibé.*

*Aux télomères courts, en fin de phase S, la phosphorylation de Ccq1 par les kinases Rad3/Tel1 facilite son interaction avec Est1 (1), ce qui favorise l'interaction entre Trt1 et Tpz1 et permet ainsi le recrutement de la télomérase aux télomères (2). Une fois les télomères rallongés par la télomérase, Tpz1 est SUMOylée (3). Cette modification post-traductionnelle favorise le recrutement du complexe Stn1-Ten1 (4). Le complexe Stn1-Ten1 agit comme un inhibiteur de la télomérase (5). Il recrute également le complexe primase-polymérase α, qui intervient dans la synthèse du brin complémentaire.*

### 2.3.1.6. Autres composants clés du maintien des télomères

Dans la section précédente de ce manuscrit, nous avons présenté les composants impliqués dans la régulation et le maintien des télomères. D'autres facteurs contribuent aussi au maintien des télomères notamment des facteurs impliqués dans les voies de réparation et de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN, ce qui peut paraître surprenant car ces voies sont inhibées au niveau des télomères.

#### 2.3.1.6.A. Le Complexe Ku70/Ku80

Le complexe Ku, composé des sous-unités Ku70 et Ku80, est un facteur essentiel de la réparation des CDB de l'ADN. Son rôle principal est de reconnaître les CDB et de coordonner le recrutement des facteurs de la voie de réparation NHEJ (Manolis et al., 2001 ; Miyoshi et al., 2003). Bien que la voie NHEJ soit inhibée au niveau des télomères par les protéines télomériques Taz1 et Rap1, le complexe Ku, est néanmoins présent aux télomères de manière indépendant à Taz1 (Miyoshi et al., 2003).

Chez *S. cerevisiae* le complexe Ku participe au recrutement de la télomérase via des interactions avec la sous-unité ARN TLC1 de la télomérase et Sir4 (Boulton & Jackson., 1996 ; Porter et al., 1996 ; Zahid et al., 2021). Il prévient la résection des télomères en inhibant les actions du complexe MRX, Sae2, Exo1, Sgs1 et Dna2 (Mimitou et al., 2008 ; Bonetti et al., 2010 ; J. Hardy et al., 2014).

Contrairement à *S. cerevisiae*, la délétion de *pku70* ou *pku80* chez *S. pombe* n'affecte que très légèrement la taille des télomères (Baumann et al., 2000). Cependant, son absence provoque une augmentation des réarrangements dans les régions subtélomériques, indiquant que Ku inhibe la RH dans ces régions (Baumann et al., 2000, Miyoshi et al., 2003). Il est possible d'envisager que Ku, en limitant la résection dépendante de Exo1/MRN, inhibe des évènements probables de recombinaison générer pendant la réplication. Toutefois, son rôle précis dans ce processus reste à ce jour non identifié. En utilisant un système artificiel de barrière de réplication (RTS1-RFB), le groupe de S. Lambert a démontré que Ku pourrait intervenir dans la réparation des fourches bloquées en se fixant sur l'extrémité de l'ADNdb générée par la réversion d'une fourche de réplication (Teixeira-Silva et al., 2017). Plus précisément, Ku

pourrait limiter la résection excessive et faciliter ainsi le redémarrage des fourches par recombinaison.

Une hypothèse récente étend le modèle proposé par S. Lambert, en appuyant le rôle du complexe Ku dans la réplication (Teixeira-Silva et al., 2017). Les auteurs ont développé une version légèrement modifiée de ce modèle dans lequel la fourche reversée contient un hybride ARN:ADN, auquel Ku peut se lier spécifiquement (Audoynaud et al., 2023).
Cette interaction potentielle du complexe Ku avec les hybrides ARN:ADN pourrait conférer une protection contre la dégradation nucléolytique en agissant comme une barrière stérique, restreignant l'accès des nucléases telles qu'Exo1 aux brins d'ADN néosynthétisés.
Ce mécanisme de protection serait particulièrement crucial lors de l'arrêt des fourches ou en conditions de stress réplicatif. Deuxièmement, en se liant à ces structures, Ku pourrait stabiliser les fourches de réplication, en particulier dans des situations de blocage ou de stress réplicatif, contribuant ainsi à maintenir l'intégrité et la progression du processus de réplication (Audoynaud et al., 2023).

En accord avec ces travaux, notre laboratoire a montré qu'en l'absence de la télomérase, le complexe Ku pourrait reconnaître les extrémités libres d'ADNdb au niveau des fourches régressées ou cassées. Ce mécanisme pourrait être crucial pour prévenir l'effondrement des fourches de réplication et favoriser leur redémarrage (Matmati et al., 2020) Par ailleurs, les travaux du laboratoire ont révélé que les extrémités libres de l'ADN riche en guanine constituent un substrat compétitif pour le complexe Ku et la télomérase au niveau des fourches inversées. Cette compétition conduit à deux résultats possibles : soit la réparation des télomères par la télomérase via la synthèse de nouveaux télomères, soit la résection des extrémités et le redémarrage de la fourche de réplication par RH, sous le contrôle du complexe Ku (Matmati et al., 2020).

Ainsi, le complexe Ku joue un rôle multifonctionnel en intervenant au niveau des CDB mais aussi dans le maintien de l'intégrité des télomères.

### 2.3.1.6.B. La kinase Rad3

Rad3, homologue de la kinase ATR chez les mammifères et de Mec1 chez *Saccharomyces cerevisiae*, appartient à la famille des kinases PI3K-like (phosphatidylinositol 3-kinase-like). Ces kinases jouent un rôle essentiel dans l'activation des voies de signalisation en réponse aux lésions de l'ADN et aux blocages de la réplication (Bentley et al., 1996 ; Alao et al., 2000). En réponse aux dommages à l'ADN, Rad3 active principalement deux effecteurs clés : Chk1, un régulateur central de la détection et de la réponse aux lésions, et Cds1, qui contrôle le point de surveillance de la réplication (Tarumoto and Ishikawa., 2012) **(Figure 11)**. Il a été montré que la délétion de rad3 entraîne une hypersensibilité marquée des cellules aux agents génotoxiques et aux perturbations réplicatives, soulignant son rôle central dans le maintien de l'intégrité génomique (Naito et al., 1998).

De plus, Rad3 est important pour la stabilité des extrémités chromosomiques puisque son absence entraîne un raccourcissement significatif des télomères (Matsuura et al., 1999). Yamazaki et al. (2012) ont démontré que Rad3 phosphoryle directement la protéine télomérique Ccq1 sur la thréonine 93 (Thr93), une modification essentielle pour le recrutement de la télomérase et l'élongation des télomères (Yamazaki et al., 2012 ; Moser et al., 2011). L'absence de Rad3 se traduit par des télomères extrêmement courts (Naito et al., 1998). Le mutant de Ccq1, dans lequel la Thr93 est remplacée par une alanine, échoue à recruter la télomérase aux télomères et présente un raccourcissement progressif des télomères, soulignant l'importance de cette phosphorylation dans le maintien de la longueur télomérique (Yamazaki et al., 2012).

Chez l'homme l'ADNsb recouvert de RPA recrute le complexe ATR-ATRIP et facilite sa reconnaissance des substrats pour la phosphorylation et l'initiation de la signalisation des points de contrôle (Zou et al., 2003). De manière analogue, le groupe de Toru Nakamura a proposé que le découplage entre la synthèse des brins continu et discontinu aux télomères entraîne une accumulation d'ADNsb reconnu par RPA, favorisant ainsi le recrutement du complexe Rad3-Rad26 (Moser et al., 2009). Ce mécanisme pourrait expliquer comment Rad3 est recruté aux télomères et serait capable de phosphoryler Ccq1. Un mécanisme similaire a également été proposé chez l'homme (Harman et al., 2024), où ATR semble jouer un rôle crucial dans la maintenance des télomères, notamment via le recrutement de la télomérase

et la réplication des télomères (Pennarun et al., 2010 ; Tong et al., 2015). Mes travaux de thèse ont permis de découvrir que Taz1 est un substrat de Rad3 et que la phosphorylation de Taz1 module sa capacité à lier l'ADN. Ces travaux seront présentés dans la section Résultats.

#### 2.3.1.6.C. Tel1

La protéine Tel1 est une kinase centrale impliquée dans les voies de surveillance moléculaire de l'intégrité du génome **(Figure 11)**. Tel1 peut interagir avec le complexe Mre11-Rad50 grâce à son interaction avec Nbs1 (You et al., 2005). Cette interaction joue un rôle clé dans la signalisation des dommages à l'ADN, notamment au niveau des CDB et des télomères (Limbo et al., 2018). Tel1 peut également interagir directement avec le complexe Mre11-Rad50, via son interaction avec Nbs1 (You et al., 2005), qui joue un rôle significatif dans la signalisation des dommages à l'ADN, en particulier au niveau des CDB et des télomères (Limbo et al., 2018). Il a été démontré que dans des cellules surexprimant Tel1, le complexe Mre11-Rad50 facilite la phosphorylation de l'histone H2A associée à la chromatine. Cette phosphorylation est une étape essentielle pour signaler les dommages à l'ADN et initier une réponse efficace, notamment en favorisant le recrutement des facteurs de réparation (Limbo et al., 2018).

Il a été observé que l'absence de Tel1 n'impacte pas la taille des télomères (Moser et al., 2009). En revanche, Tel1 devient essentielle quand Rad3 n'est plus là puisque leur absence simultanée dirige les cellules vers la sénescence réplicative, mimant l'absence d'activité télomérase. Cette interdépendance s'explique par la capacité de Tel1 à phosphoryler directement la protéine télomérique *Ccq1* sur la thréonine 93 (Moser et al., 2011 ; Yamazaki et al., 2012).

En ce qui concerne le recrutement de Tel1, le groupe de Toru Nakamura a mis en lumière le rôle central du complexe MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) aux télomères, comme aux CDB (Nakamura et al., 2002). L'absence du complexe MRN dans une souche *rad3Δ* produit un phénotype similaire à celui observé lors de la délétion de *tel1+* dans un contexte *rad3Δ* (Nakamura et al., 2002). Ces observations suggèrent que le complexe MRN est essentiel au recrutement de Tel1 aux télomères. En accord avec cela, le groupe de Paul Russell a montré que la surexpression de Tel1 peut compenser l'absence de Nbs1, mais pas celle de Mre11 confirmant l'implication du complexe MRN dans le recrutement de Tel1 aux télomères (Limbo et al., 2018).

### 2.3.1.6.D. Le complexe MRN

Le complexe MRN, homologue du complexe MRN chez les mammifères et du complexe MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) chez *S. cerevisiae*, joue un rôle essentiel dans la résection des extrémités d'ADN. Il est le premier à reconnaître les CDB et intervient dans le processus de résection aussi bien en mitose qu'en méiose (Paull et al., 1998). Ce complexe est constitué des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1 (Ueno et al., 2003 ; Chahwan et al., 2003). La nucléase Mre11 constitue le cœur enzymatique du complexe. Elle possède une double activité nucléase, endo- et exonucléase, permettant la génération de courts fragments d'ADNsb indispensables à l'amorçage de la HR (Zhao et al., 2020 ; Wang et al., 2022). Rad50, un partenaire structural du complexe, contient des domaines ATPase et des régions de liaison à l'ADN, nécessaires à la stabilisation et au traitement des extrémités d'ADN (Lammens et al., 2016). Nbs1 (appelée Xrs2 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*) joue quant à elle un rôle clé dans la signalisation des dommages à l'ADN, en recrutant d'autres facteurs de réparation au site de la cassure (Bian et al., 2019). Contrairement à *S. cerevisiae*, l'absence de l'un des composants du complexe MRN n'affecte pas significativement la longueur des télomères de *S. pombe* (Nakamura, Moser, & Russell., 2002).

Le groupe de Paul Russell a démontré que le complexe MRN joue un rôle crucial dans le recrutement de Tel1 aux CDB de l'ADN (Limbo et al., 2018). Cette fonction s'étend également aux télomères, où l'absence du complexe MRN dans un contexte *rad3Δ* reproduit le phénotype associé à la délétion de *tel1+* dans des cellules *rad3Δ*. Ces observations soutiennent fortement l'idée que le complexe MRN est responsable du recrutement de Tel1 non seulement aux CDB, mais aussi aux télomères (Nakamura et al., 2002).

Au télomère, le complexe contribue à la maintenance des télomères par RH en absence de Taz1 ou de la télomérase (Subramanian et al., 2008 ; Matmati et al., 2020). De plus, MRN est impliqué dans la formation de fusions télomériques via la voie du NHEJ observée en absence de Taz1 (Reis, Batista, and Ferreira., 2012). Enfin, les protéines Rad50 et Mre11 composantes essentielles du complexe MRN, sont nécessaires pour générer l'extrémité 3' sortante des télomères (Tomita et al., 2003 ; 2004).

Ainsi, le complexe MRN émerge comme un acteur central dans le maintien de la stabilité génomique, intervenant à la fois dans la réparation des CDB et dans probablement la maintenance des télomères. Son importance est soulignée par les conséquences pathologiques des mutations dans ses composants. Ces mutations sont associées à des syndromes d'instabilité génomique, tels que l'ataxie-télangiectasie-like disorder (ATLD), ainsi qu'à une prédisposition accrue au cancer (Bian et al., 2019).

Malgré les progrès significatifs, de nombreux aspects de ses mécanismes moléculaires, notamment aux télomères, restent à clarifier. Des études futures permettront de mieux comprendre ces processus et leurs implications biologiques et cliniques.

# 2.4. La transcription des télomères chez *S. pombe*

## 2.4.1. Les transcrits télomériques

Chez *S. pombe*, comme chez l'homme, les régions télomériques et subtélomériques sont transcrites en une variété d'ARN non codants (ARNnc) (Bah et al., 2012). Les travaux des groupes de Claus Azzalin et Julia Cooper ont permis d'identifier quatre espèces distinctes d'ARN télomériques chez *S. pombe* : TERRA, ARIA, ARRET et αARRET (Bah et al., 2012 ; Greenwood and Cooper., 2012). TERRA *(telomeric repeat-containing RNA*), transcrit à partir du brin C-riche des télomères par l'ARN polymérase II, est initié à partir d'un site d'initiation dans les régions subtélomériques. Ce transcrit joue un rôle central dans la formation de l'hétérochromatine télomérique. Son absence entraîne une perte de la marque épigénétique H3K9me aux télomères suggérant que TERRA contribue à l'établissement et au maintien de l'hétérochromatine télomérique (Moravec et al., 2016 ; Hu et al., 2019).

ARIA, complémentaire à TERRA, est transcrit à partir du brin G-riche et pourrait moduler les niveaux de TERRA par appariement. ARRET, uniquement composé de séquences subtélomériques, αARRET est complémentaire à ARRET (Greenwood et al., 2012) **(Figure 19)**.

La maturation et la régulation de ces ARN télomériques présentent des caractéristiques spécifiques. Alors que la majorité des transcrits ARRET et αARRET sont polyadénylés à leur extrémité 3', seulement 10% des TERRA le sont (polyA+ -TERRA). Chez *S. pombe*, les mécanismes précis de maturation et de polyadénylation de ces ARN restent largement méconnus. Cependant, il a été démontré que les poly(A) polymérases non canoniques Cid12 et Cid14 sont impliquées dans la régulation des transcrits TERRA, ARIA, ARRET et αARRET (Bah et al., 2012). En l'absence de Cid12, les niveaux des ARN TERRA et ARIA sont augmentés, tandis que cela n'affecte pas de manière significative les transcrits ARRET et αARRET. L'absence de Cid14, augmente les transcrits TERRA, tout en n'ayant qu'un effet marginal sur les niveaux des ARN ARIA, ARRET et αARRET (Bah et al., 2012). Cette régulation différentielle de la polyadénylation pourrait avoir des implications importantes pour la stabilité et la fonction de ces ARN, comme cela a été observé chez l'humain où la polyadénylation influence la stabilité et la localisation de TERRA (Matos-Perdomo et al., 2023) **(Figure 19)**.

Il est important de noter que les sites d'initiation de la transcription à l'origine des ARNnc ARRET, αARRET et ARIA n'ont pas encore été identifiés, ce qui limite la compréhension de la régulation de ces transcrits. De plus, le transcrit ARIA, dépourvu de séquences subtélomériques souligne la capacité de ces séquences télomérique à promouvoir la transcription. Ces observations soulignent la complexité et la spécificité de la régulation transcriptionnelle dans les régions télomériques et subtélomériques.

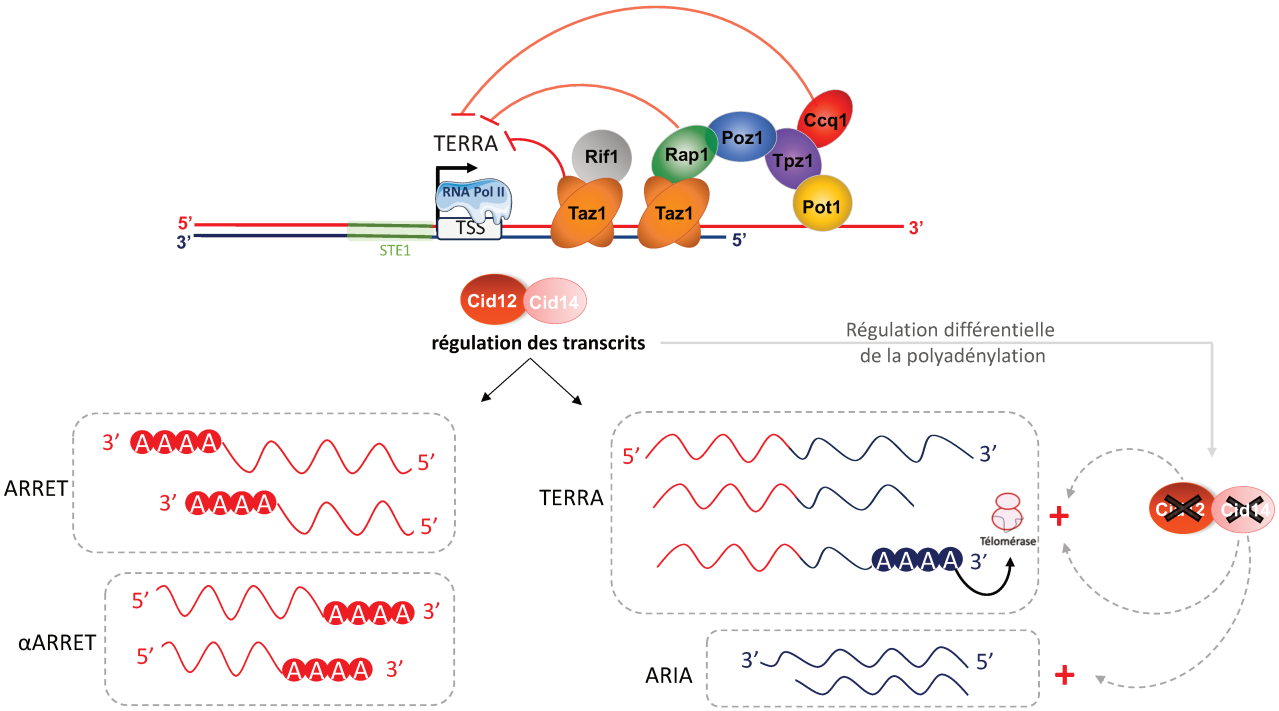



***Figure 19 : Régulation des transcrits issus des régions terminales***

*Le transcrit TERRA est initié à partir d'un unique site d'initiation de la transcription situé dans la région STE1 et est négativement régulé par les protéines Taz1, Rap1 et Poz1. Une fois polyadénylé, TERRA peut s'associer à la télomérase. D'autres transcrits provenant des régions terminales, tels que ARRET, αARRET et ARIA, sont également produits. Les poly(A) polymérases non canoniques Cid12 et Cid14 jouent un rôle clé dans leur régulation : l'absence de Cid12 entraîne une augmentation des ARN TERRA et ARIA, sans affecter de manière significative ARRET et αARRET. En revanche, l'absence de Cid14 augmente spécifiquement les niveaux de TERRA, tout en ayant un effet marginal sur ARIA, ARRET et αARRET. Les sites de démarrage de la transcription de TERRA (TSS) sont indiqués et soulignent l'importance des mécanismes de régulation dans ces régions terminales.*

## 2.4.2. Mécanisme de régulation

Les protéines télomériques jouent un rôle dans la régulation de l'expression des transcrits télomériques. Ces ARNnc sont réprimés par les protéines télomériques Ccq1, Taz1, Rap1, Poz1 et Rif1. Seules Ccq1, Taz1 et Rap1 contrôlent la transcription de TERRA (Bah et al., 2012 ; Greenwood et al., 2012). Ccq1, en interagissant avec le complexe SHREC, agit comme un répresseur de la transcription de TERRA en stabilisant les nucléosomes dans les régions subtélomériques, ce qui restreint l'accès à l'ADN et limite la transcription de TERRA (Emden et al., 2019). À l'instar de Ccq1, Rap1 exerce un rôle polyvalent en régulant à la fois la longueur des télomères et l'expression de TERRA. En effet, dans les souches mutantes de Rap1, les niveaux de TERRA sont augmentés et l'ARN polymérase II (PolII) est enrichie aux télomères, ce qui suggère que Rap1 a un effet de régulation positive indirecte sur l'expression de TERRA (Pfeiffer et al., 2012). De plus, la stabilité de Rap1 est régulée par Cay1, un membre de la famille des Cactines, ce qui implique Cay1 dans la régulation indirecte de TERRA (Lorenzi et al., 2015). La protéine Taz1, quant à elle, est impliquée dans la répression de l'expression de TERRA (Greenwood et Cooper, 2012). Enfin, Pof8, impliquée dans l'assemblage de la télomérase, régule également négativement l'expression du TERRA polyadénylé (Mennie, Moser, and Nakamura., 2018) **(Figure 19)**.

Bien que la régulation des transcrits télomériques reste encore mal définie chez *S. pombe*, il est établi que la suppression de *taz1+* ou *rap1+* entraîne une augmentation des niveaux de transcrits contenant des répétitions télomériques et sous-télomériques (Greenwood et al., 2012).

Par ailleurs, Bah et al. (2012) ont observé que la polyadénylation ne semble pas avoir la même fonction pour toutes les espèces de transcrits. En l'absence de Cid12, une ARN poly(A)-polymérase, les niveaux de TERRA et d'ARIA augmentent, tandis que les autres transcrits tels que ARRET et αARRET ne sont pas affectés. De plus, l'absence de Cid14, une autre ARN poly(A)-polymérase, conduit à une accumulation marquée de TERRA sans altérer les autres ARN télomériques. Ces résultats suggèrent que les différents transcrits télomériques peuvent être régulés de manière indépendante par des mécanismes de polyadénylation spécifiques (Bah et

al., 2012). Cependant, il est surprenant de constater que la perte du facteur hétérochromatique Swi6, homologue de HP1 humain, ou de la méthyltransférase d'histone H3K9 (Clr4) ne modifie pas les niveaux de TERRA. Ces observations suggèrent que ces régulateurs de la chromatine ne sont pas impliqués dans la régulation directe de l'expression de TERRA (Greenwood et Cooper., 2012) **(Figure 19)**.

Un autre mécanisme de régulation implique la longueur des télomères, qui modulerait l'expression de TERRA. Selon un modèle récent, les télomères longs adoptent une configuration fermée avec une faible marque d'activation H3K9ac, tandis que les télomères raccourcis présentent une configuration ouverte caractérisée par un niveau élevé de H3K9ac, favorisant ainsi la transcription active de polyA+ -TERRA (Moravec et al., 2016) **(Figure 20)**.
Cela suggère que H3K9ac favorise l'accès de l'ARN polymérase II à la région promotrice de TERRA et stimule ainsi sa transcription (Lorenzi et al., 2015). En revanche, la triméthylation de cette même lysine (H3K9me3), une marque caractéristique de l'hétérochromatine répressive, est liée à une diminution de l'expression de TERRA **(Figure 20)**. Toutefois, cette répression ne semble pas s'opérer par un blocage direct de l'accès de l'ARN polymérase II, mais pourrait impliquer des mécanismes épigénétiques supplémentaires ou des changements dans l'organisation chromatinienne (Arnoult et al., 2012 ; Lorenzi et al., 2015 ; Jezek et al., 2019).

Le laboratoire a montré que, en quiescence, les cellules de *S. pombe* présentent une augmentation de l'expression de TERRA malgré une réduction générale de l'activité transcriptionnelle (Maestroni et al., 2017). Cela suggère que des signaux environnementaux ou des changements dans la structure chromatinienne peuvent spécifiquement favoriser l'expression de TERRA en quiescence. En outre, une diminution de la marque H3K9me a été observée en quiescence, soutenant l'hypothèse d'une modulation transcriptionnelle distincte entre les cellules en quiescence et celles en cycle actif. En effet, l'augmentation des niveaux de TERRA était corrélée à un réarrangement subtélomérique et un raccourcissement des télomères. (Maestroni et al., 2017 ; Oya et al., 2019).

Ces observations soulignent la complexité de la régulation des télomères en fonction de l'état métabolique de la cellule et suggèrent un rôle potentiellement important de TERRA dans le maintien de l'intégrité génomique pendant la quiescence.

## 2.4.3. Rôle du transcriptome télomérique

Les fonctions du transcriptome télomérique chez *S. pombe* sont essentielles au maintien de l'intégrité des télomères ainsi qu'à la régulation de l'activité de la télomérase. Il est désormais établi que l'ARNnc TERRA joue un rôle dans le recrutement de la télomérase aux télomères courts (Moravec et al*.,* 2016). En accord avec ces résultats, une étude a confirmé le rôle de TERRA en tant que régulateur positif de la télomérase. Cette étude a démontré une interaction entre TERRA et la sous-unité catalytique de la télomérase Trt1 dans un modèle de télomère inductible. En effet, les complexes télomérase/TERRA polyA+ ne sont pas affectés par la délétion du gène *ter1+* (Moravec et al., 2016). Ces résultats concordent avec les observations réalisées chez *S. cerevisiae* par le groupe de P. Chartrand, qui ont mis en évidence une corrélation entre le raccourcissement des télomères et l'accumulation de molécules TERRA (Cusanelli *et al.*, 2013).

Une autre fonction attribuée à TERRA est la maintenance des télomères. Bien que le mécanisme précis reste inconnu, il a été démontré qu'en l'absence de Ccq1, la présence d'hybrides ARN/ADN pourrait stimuler la recombinaison (Hu et al., 2019). De manière similaire, chez *S. cerevisiae*, il a été décrit que les hybrides ARN/ADN (R-loops), en l'absence de télomérase, favorisent la RH pour maintenir les télomères (Balk et al*.,* 2013).

Des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier le rôle exact de TERRA dans la dynamique télomérique, ainsi que son implication dans les mécanismes de maintenance des télomères.

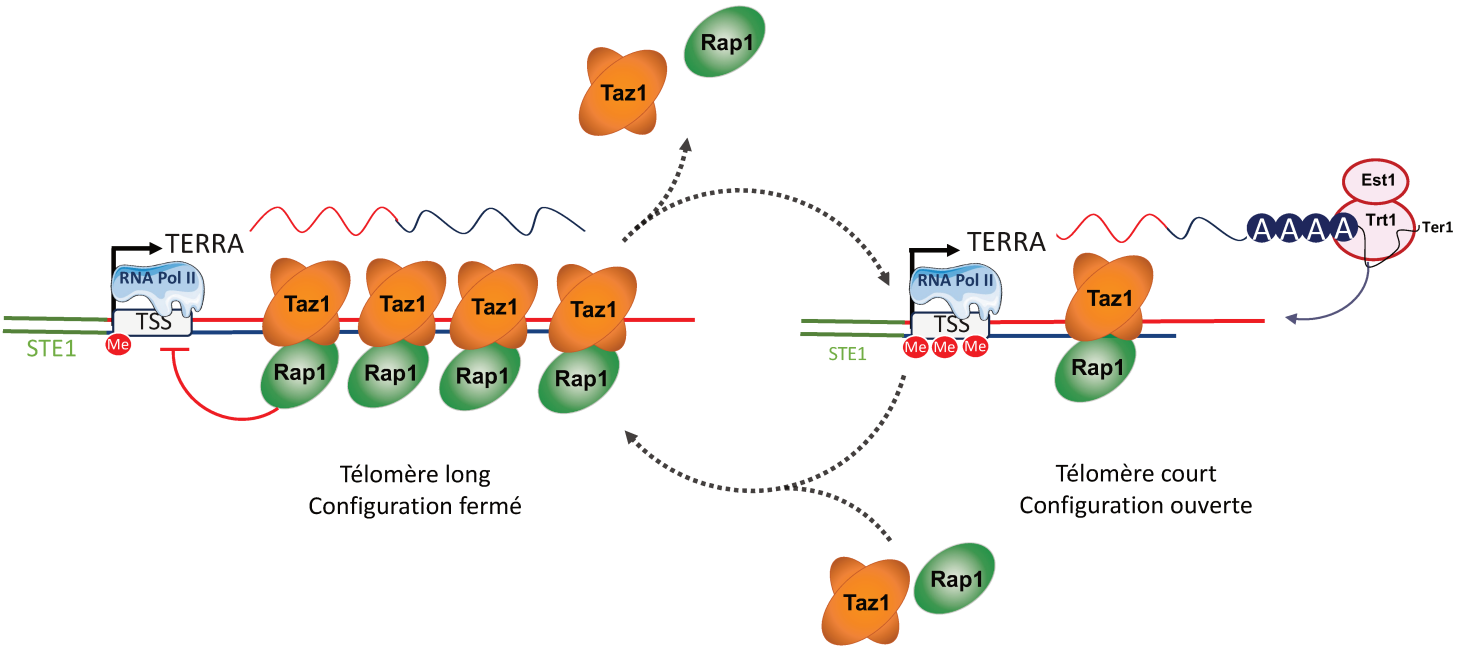



***Figure 20 : Régulation dynamique de l'élongation des télomères par TERRA***

*Lorsque les télomères sont longs, les protéines Taz1 et Rap1 répriment la transcription de TERRA. En revanche, lorsque les télomères sont courts, l'expression de TERRA augmente, en particulier celle de la forme polyadénylée (polyA+ TERRA), qui se détache de la chromatine. Cette forme favorise le recrutement de la télomérase en s'associant directement avec elle, permettant ainsi l'élongation des télomères courts.*

*Adapté de Moravec et al., 2016.*

## 2.5. La réplication des régions télomériques et subtélomériques chez *S. pombe*

Les télomères sont répliqués au cours de la phase S du cycle cellulaire (Kim, Dubey, et Huberman., 2003). Cette observation, rapportée initialement par le laboratoire de J. Huberman, a montré que l'abondance maximale des intermédiaires de réplication (RIs) des télomères se produit après l'initiation de la phase S, contrairement aux régions centromériques qui se répliquent plus tôt dans la phase S (Kim, Dubey, et Huberman., 2003). Cette réplication tardive des télomères a été confirmée par le laboratoire de T. Nakamura, qui a démontré que les télomères sont répliqués en fin de phase S (Moser et al., 2009). Une des hypothèses expliquant cette observation serait dû au fait que l'origine de réplication soit ouverte tardivement et sous le contrôle des protéines Taz1 et Rif1 (Kanoh et al., 2001). Il a été démontré que les origines de réplication impliquées dans ce processus sont localisées dans les régions subtélomériques (Hayano et al., 2012 ; Tazumi et al., 2012).

Les analyses par électrophorèse bidimensionnelle ont révélé que la réplication des télomères est unidirectionnelle depuis les régions subtélomériques jusqu'aux extrémités chromosomiques (Miller, Rog, et Cooper., 2006). En accord avec ces observations, notre laboratoire a identifié une origine principale de réplication située à 25 kb des séquences télomériques (Vaurs et al., 2023). Dans cette étude, la dynamique de réplication des séquences terminales a été établie grâce à la cartographie de l'utilisation des polymérases par la méthode Pu-Seq (Polymerase Usage Sequencing). Nos travaux ont montré que l'ADN polymérase ε (Polε) est responsable de la synthèse du brin continu (le brin G), tandis que les polymérases α (Polα) et δ (Polδ) interviennent dans la synthèse du brin discontinu (le brin C) à partir de l'origine principale (Vaurs et al., 2023). Il avait été établi aussi qu'il existait un découplage entre Polε et Polα/δ pour la réplication des séquences répétées, Polε précédant l'arrivée de Polα/δ (Moser et al., 2009 ; Audry et al., 2015). Ce découplage renforce l'idée que les télomères constituent des régions particulièrement difficiles à répliquer comme cela a été montré par électrophorèse en gel d'ADN bidimensionnelle où les fourches de réplication ralentissent et marquent des pauses à l'approche de ces régions (Miller, Rog, and Cooper., 2006). Il est probable que la présence d'obstacles en amont de la fourche entrave leur progression. Parmi eux, les G4 et les R-loops formés par les ARN TERRA, peuvent bloquer les fourches de

réplication. De plus, les surenroulements positifs et l'interaction des protéines télomériques compliquent également la réplication des télomères. Ces obstacles peuvent ralentir la progression des fourches et, si non résolus, provoquer des cassures de l'ADN (Sabouri et al., 2014 ; Magdalou et al., 2014).

Les modèles actuels de réponse au stress réplicatif chez l'Homme et *S. pombe* révèlent des mécanismes complexes de protection et de redémarrage des fourches de réplication. Chez l'Homme, les fourches confrontées à un obstacle peuvent régresser et s'inverser, formant une structure à quatre voies appelée "patte de poulet" (Berti et al., 2020a ; Carr et Lambert, 2013). Ce phénomène entraîne un rappariement des brins nouvellement synthétisés, constituant une étape préliminaire à la protection de la fourche de réplication. Chez *S. pombe* le stress engendré peut conduire au blocage de la fourche de réplication qui peut être stabilisée par divers acteurs protéiques pour promouvoir le redémarrage de la réplication. Dans des cas extrêmes, les fourches de réplication bloquées aux répétitions télomériques peuvent éventuellement s'effondrer et se casser. La prise en charge de ces fourches cassées pourrait s'effectuer par deux voies : la voie de la télomérase, où celle-ci peut réparer une fourche cassée en synthétisant un télomère *de novo* à partir d'une extrémité d'ADN libre (Matmati et al., 2020), et la voie de la RH (**Figure 21)**.

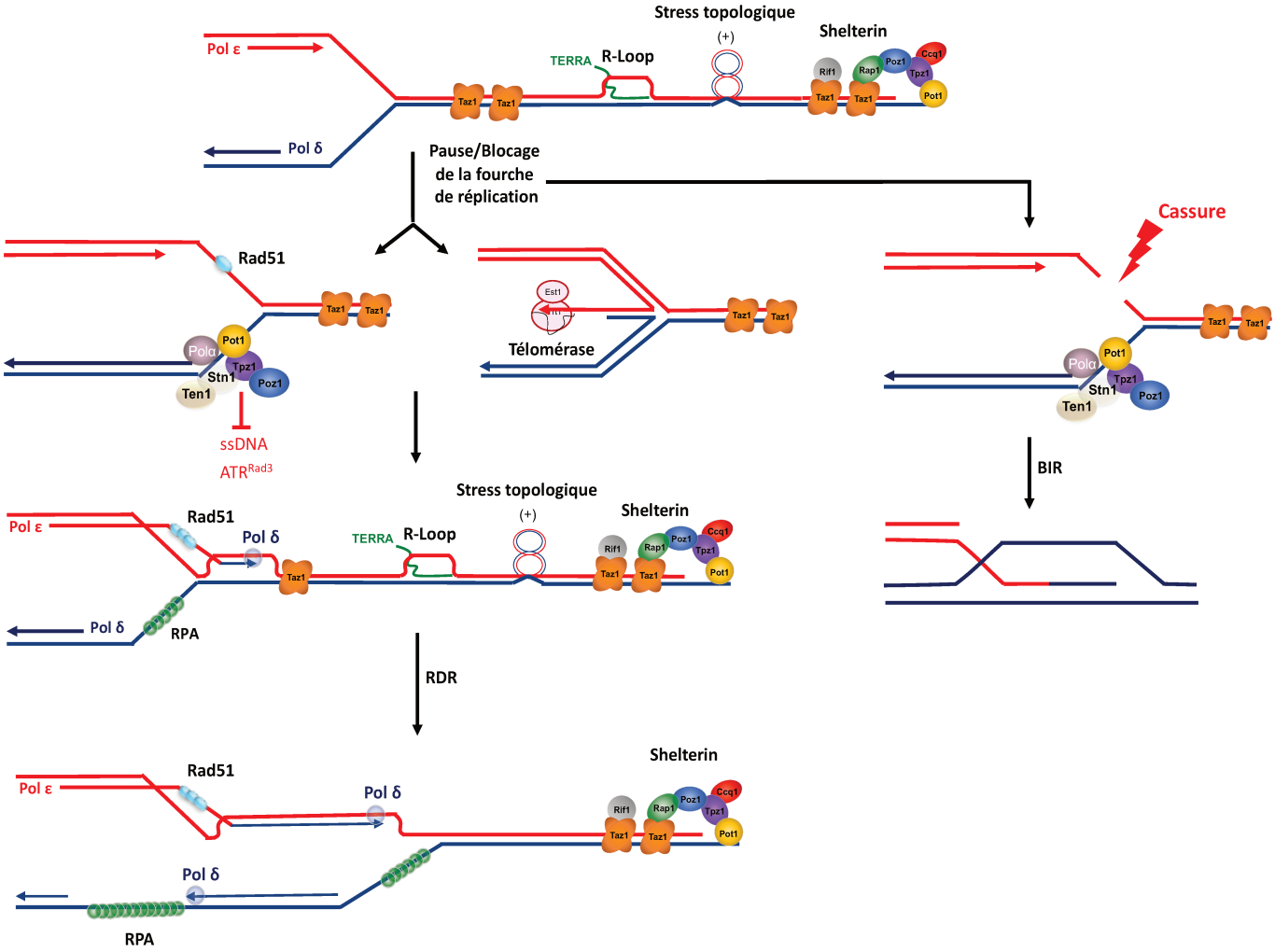



***Figure 21 : Mécanismes de redémarrage des fourches de réplication bloquées ou cassées***

*Les fourches de réplication bloquées aux répétitions télomériques peuvent être réparées par deux voies principales. La première est la voie de la télomérase, dans laquelle cette enzyme synthétise un télomère de novo à partir d'une extrémité d'ADN libre. La seconde repose sur des mécanismes de recombinaison homologue (RH), incluant : (1) la réplication dépendante de la recombinaison (RDR), qui implique l'invasion d'un ADN intact par une extrémité cassée pour copier le reste du bras chromosomique ; et (2) la réparation par recombinaison (BIR), qui permet le redémarrage des fourches cassées et l'allongement des télomères dans les cellules dépourvues de télomérase.*

### 2.5.1. Le redémarrage des fourches de réplication bloquées par recombinaison homologue

Les études récentes ont mis en lumière un mécanisme de redémarrage des fourches de réplication bloquées, appelé RDR (Replication-Dependent Recombination). Ce processus, observé notamment chez *S. pombe*, permet la reprise de la synthèse d'ADN sans nécessiter la formation d'une CDB. Dans ce contexte, il a été démontré que la polymérase δ est capable de synthétiser les deux brins d'ADN sur une distance allant jusqu'à 30 kb, sans transition vers la configuration δ/ε (Carr A et al., 2021). La polymérase α ne semble pas jouer un rôle significatif dans ce processus, que ce soit sur le brin continu ou discontinu. Il est possible que ce mécanisme soit utilisé aux télomères chez *S. pombe* ou des barrières naturelles existent (Vaurs et al, 2023). La RDR apparaît comme une voie alternative cruciale pour assurer la reprise de la réplication et maintenir l'intégrité génomique face aux obstacles rencontrés par les fourches de réplication (Vaurs et al., 2021 ; Lee et al., 2024).

À l'inverse, le BIR contribue au redémarrage des fourches cassées (Lee et al., 2024) et à l'allongement des télomères dans les cellules sans télomérase (McEachern & Haber, 2006).
Le mécanisme de réplication induite par les cassures (BIR) aux télomères est bien documenté chez *S.cerevisiae* (Lydeard et al., 2007). Ce processus joue un rôle essentiel dans le maintien des télomères en l'absence de télomérase, notamment chez les cellules survivantes après la sénescence (Claussin et al., 2016). Ce mécanisme repose sur l'invasion d'ADN intacte par l'extrémité cassée, permettant ainsi de copier le reste du bras chromosomique **(Figure 21)**.

Par ailleurs, la visualisation de la dynamique de réplication par électrophorèse en gel d'ADN bidimensionnelle a permis de caractériser le rôle de plusieurs protéines impliquées dans la réplication des télomères. L'ensemble des protéines participant à la réplication chez *S. pombe* sera présenté en détail dans la section suivante.

## 2.5.2. L'implication des protéines télomériques dans la réplication chez *S. pombe*

### 2.5.2.1. Taz1

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication cruciale de Taz1 dans la régulation de la réplication de l'ADN. À l'échelle du génome, Taz1, comme Rif1, joue un rôle fondamental dans le contrôle du timing de la réplication. Cette fonction est assurée par sa liaison à des séquences télomériques internes organisées en tandem le long des bras des chromosomes (Tazumi et al., 2012). Bien que les mécanismes exacts ne soient pas entièrement compris, il a été suggéré que Taz1, via Rif1, inhibe le recrutement de Sld3, une protéine clé dans l'initiation de la réplication de l'ADN (Zofall et al., 2016). Sld3 est nécessaire pour activer le complexe de pré-réplication via la phosphorylation des protéines MCM (Minichromosome Maintenance), une étape essentielle pour amorcer la réplication. (Zofall et al., 2016).

Au niveau des télomères et des régions subtélomériques, Taz1 est indispensable pour assurer une progression efficace des fourches de réplication (Miller et al., 2006 ; Vaurs et al., 2023). L'absence de Taz1 induit des défauts majeurs dans la réplication des télomères, notamment un blocage des fourches au niveau des séquences télomériques (Miller et al., 2006). Ce blocage entraîne plusieurs conséquences significatives, telles qu'une perte accélérée des télomères en l'absence de télomérase, une augmentation du taux de RH télomérique, et une dérégulation du cycle cellulaire, caractérisée par une réplication prématurée en phase S (Dehé et al., 2012). Ces observations mettent en évidence le rôle protecteur de Taz1 dans le maintien de l'intégrité des télomères. Toutefois, la fonction précise de Taz1 dans le processus de réplication reste inconnue.

Récemment, nous avons identifié une région subtélomérique au niveau des éléments STE3 et STE2 du chromosome II côté droit (C2-R pour Chromosome 2 Right), appelée STE3-2, située approximativement à 7 kb des séquences répétées télomériques, qui présente des difficultés de réplication. Nous avons montré que Taz1 est recruté spécifiquement aux subtélomères, dans la région STE3-2, possiblement sur trois sites de liaison (Taz1 BS) proches de la région

STE3, situés à −7,3, −7 et −6,3 kb des répétitions télomériques. Nos travaux suggèrent que Taz1 intervient aussi pour faciliter la réplication de la région STE3-2 et que son action est essentielle dans ces régions (Vaurs et al., 2023).

L'analyse Pu-Seq n'a montré aucune modification significative de la dynamique de réplication sur le génome dans les cellules *taz1Δ* à 30°C. Cependant, les résultats concernant les régions C2-R dans les cellules *taz1Δ* sont restés non concluants (Vaurs et al., 2023). Cette observation met en évidence l'instabilité des régions subtélomériques dans les cellules dépourvues de Taz1, soulignant ainsi le rôle crucial de cette protéine dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des extrémités chromosomiques. Ces observations font écho aux travaux antérieurs du laboratoire de J. Cooper, qui ont mis en évidence une instabilité des régions subtélomériques (STE) dans les cellules *taz1Δ* et ont souligné le rôle essentiel de Taz1 dans la réplication des télomères (Miller, KM et al., 2006).

Malgré ces études, le rôle précis de Taz1 dans la réplication des séquences terminales reste encore mal compris. Ces observations posent des questions fondamentales quant au rôle spécifique de Taz1 dans la coordination de la machinerie de réplication. On pourrait penser que, comme TRF1, Taz1 pourrait constituer une barrière à la progression des fourches de réplication et faciliter leur réplication (Zimmermann et al., 2014 ; Ohki & Ishikawa., 2004). Il est envisageable que des mécanismes de contrôle soient indispensables pour réguler l'activité de Taz1 au cours du cycle cellulaire, à l'image de ses homologues humains TRF1 et TRF2 (Sarek et al., 2019). Il a été montré également que ATR/ATM phosphoryle TRF1 et que cette modification post-traductionnelle déplacerait TRF1 des télomères (Tong et al., 2015).

De manière similaire, les modifications post-traductionnelles sont-elles nécessaires pour moduler l'activité de Taz1 et pour moduler son recrutement aux télomères ? Pour explorer ces mécanismes, nous avons mené des analyses approfondies visant à décrypter la régulation post-traductionnelle de Taz1. Mon travail de thèse s'est concentré sur l'élucidation de ces questions, et les résultats obtenus seront présentés dans la section Résultat du manuscrit.

#### 2.5.2.2. Stn1-Ten1

Les travaux du laboratoire menés en 2018 ont révélé le rôle crucial du complexe Stn1-Ten1 dans la réplication des régions télomériques et subtélomériques. Ce complexe facilite la synthèse de l'ADN lors de la réplication en recrutant le complexe primase-polymérase α. Ces résultats reposent sur des données montrant que la surexpression de Pol1, la sous-unité catalytique de la polymérase α, atténue partiellement la perte des séquences télomériques du mutant *stn1-226* à température restrictive (Matmati et al., 2018). Une étude ultérieure (Escandell et al., 2019) a renforcé ce modèle en identifiant une interaction physique directe entre Stn1 et Pol1, corroborant ainsi l'hypothèse du rôle essentiel du complexe Stn1-Ten1 dans le recrutement de la machinerie de réplication aux télomères. Le mécanisme proposé suggère que le complexe Stn1-Ten1 favorise la synthèse du brin retardé aux télomères en recrutant le complexe Polα-primase, contribuant ainsi à limiter l'accumulation d'ADNsb et à maintenir l'intégrité des télomères.

Ces observations ont soulevé des questions fondamentales sur les mécanismes sous-jacents au fonctionnement du complexe Stn1-Ten1. Comment, précisément, le complexe Stn1-Ten1 est-il recruté pour remplir ses fonctions de réplication ? Son rôle se limite-t-il aux télomères, ou agit-il, comme son homologue humain, à une échelle plus globale, dans l'ensemble du génome ? Pourrait-il intervenir dans des situations spécifiques, comme le redémarrage des fourches de réplication bloquées ?

Pour mieux comprendre le rôle du complexe Stn1-Ten1 dans la réplication, nous avons étudié la dynamique de réplication à l'échelle du génome dans les cellules mutantes *stn1-226* en utilisant l'approche Pu-Seq. Les résultats de cette étude ont révélé que, bien que ce complexe n'exerce pas d'influence significative sur la réplication à l'échelle globale du génome, il joue un rôle essentiel dans la réplication des régions subtélomériques (Vaurs et al., 2023). Le mécanisme de recrutement du complexe Stn1-Ten1 aux télomères n'avait pas été identifié. Nous avons montré que le recrutement de Stn1 dépend de l'intégrité du complexe Pot1-Tpz1-Poz1 mais ne semble pas dépendre de Taz1 qui lui aussi est recruté au niveau de la région STE3-2 (Vaurs et al., 2023).

Ainsi, le complexe Stn1-Ten1 utilise un mécanisme similaire pour promouvoir la synthèse d'ADN dans deux régions distinctes aux télomères et aux subtélomères. D'une part, il limite l'action de la télomérase et promeut la synthèse du brin complémentaire, et d'autre part, il participe à la réplication des régions télomériques et subtélomériques en facilitant la synthèse en recrutant le complexe Primase-Polα pour initier la synthèse d'ADN (Escandell et al., 2019).

De plus, cette fonction dans la synthèse du brin complémentaire joue aussi un rôle de protection puisqu'il limite l'exposition de l'ADNsb télomérique, évitant ainsi l'activation des voies de surveillance moléculaires ATR-dépendante et l'éventuelle résection par des nucléases (Gu et al., 2012).

Ce rôle souligne l'importance de Stn1-Ten1 dans le maintien de l'intégrité du génome, tant aux extrémités chromosomiques que dans les régions subtélomériques adjacentes.

#### 2.5.2.3. Télomérase

Dehé et al. (2012) ont montré que, chez le mutant *taz1*Δ, l'effondrement des fourches de réplication dans les régions télomériques entraîne une augmentation de l'activité de la télomérase suggérant que les intermédiaires de réplication pourraient constituer un substrat propice à l'action de la télomérase (Dehé et al., 2012). Dans ce contexte, notre laboratoire a proposé que la télomérase puisse agir directement sur les fourches de réplication inversées ou des fourches cassées (Matmati et al., 2020). Cette fonction de la télomérase a ensuite été proposée chez l'homme (Huda et al., 2023). Il a été observé que la télomérase peut rallonger l'ADNsb riche en G à partir de l'extrémité 3' au niveau des fourches inversées. Ce mécanisme pourrait être important pour préserver le maintien des séquences répétées et/ou protéger les fourches de réplication avant leur redémarrage (Huda et al., 2023). De manière similaire, des modèles proposés chez la levure bourgeonnante (Simon et al., 2016) et la levure fissipare (Dehé et al., 2012 ; Matmati et al., 2020) suggèrent que la télomérase agit comme une enzyme de réparation aux télomères endommagés, soulignant son rôle peut être conservé dans la résolution des stress de réplication télomérique.

Ainsi, chez *S. pombe*, la télomérase peut allonger l'extrémité 3' riche en G des fourches de réplication inversées aux télomères, complétant ainsi leur réplication. Ce mécanisme pourrait également s'appliquer aux cellules de mammifères avec de longs télomères, où la télomérase serait recrutée près de l'extrémité chromosomique, de manière similaire à ce qui se produit lors de la réparation des CDB (Doksani et al., 2009 ; Huda et al., 2023).

#### 2.5.2.4. Rif1

Rif1 joue un rôle clé dans le contrôle global du timing de la réplication (Hayano et al., 2012). Une analyse à l'échelle du génome a révélé des similitudes et des différences dans le contrôle du timing de la réplication entre les cellules *taz1Δ* et *rif1Δ*. Dans les deux mutants, 72 origines tardives, normalement réprimées, sont activées, ce qui souligne un rôle commun de Taz1 et Rif1 dans leur régulation. Cependant, une distinction importante a été observée : 47 origines tardives, qui ne s'activent pas dans les cellules *taz1Δ*, sont néanmoins activées dans les cellules *rif1Δ*. Cette différence suggère que certaines voies de régulation du timing de la réplication sont indépendantes de Taz1 et nécessitent uniquement Rif1, mettant en évidence des mécanismes de contrôle spécifiques à Rif1 (Tazumi et al., 2012). Ce contrôle semble s'appuyer sur le recrutement des phosphatases PP1 (Protein Phosphatases 1, Sds21 et Dis2 chez *S. pombe*) (Davé *et al.*, 2014), qui contrecarre la phosphorylation de l'hélicase MCM par Cdc7. Cette déphosphorylation est une étape essentielle pour le recrutement de Cdc45, une protéine indispensable à l'activation des origines de réplication.

En inhibant cette modification post-traductionnelle, Rif1 réprime l'activation prématurée des origines, en particulier dans les régions subtélomériques (Davé et al., 2014).

Notre laboratoire a démontré que la fonction d'inhibition des origines de réplication de Rif1 joue un rôle crucial dans la survie des mutants *stn1-226* et *stn1-1*, ce dernier ayant été isolé par le groupe de F. Ishikawa (Matmati et al., 2020). Le groupe de F. Ishikawa a proposé que l'absence de Rif1 pourrait favoriser l'activation d'origines de réplication dormantes à proximité des régions télomériques, compensant ainsi les défauts de réplication associés à ces mutants. Cette hypothèse a été récemment confirmée par notre laboratoire montrant que l'ouverture d'une origine de réplication régulée par Rif1 en aval des régions STE2-3 permet de restaurer

un profil de réplication conventionnel dans le mutant *stn1-226* à température semi-restrictive (Vaurs et al.,2023). Ces résultats soulignent l'importance de la régulation fine des origines de réplication par Rif1 dans le maintien de l'intégrité des télomères.

### 2.5.2.5. Autres partenaires protéiques

Plusieurs études, dont deux de notre laboratoire, ont révélé l'importance d'autres partenaires télomérique dans la gestion du stress réplicatif aux télomères. Les travaux antérieurs du laboratoire suggèrent que le recrutement de RPA en fin de phase S limite la formation de G4, facilitant ainsi la progression de la fourche de réplication à travers les régions riches en guanine (Luciano et al., 2012 ; J. Audry et al., 2015). De plus le groupe de V. Zakian, a proposé que RPA participerait au recrutement de l'hélicase Pfh1 pour résoudre les G4s (McDonald et al., 2014) et ainsi faciliter la progression de la fourche de réplication dans les séquences terminales chez *S. pombe*.

La protéine Swi1, sous-unité du complexe de protection de la fourche de réplication (FPC), est essentielle pour maintenir l'intégrité et favoriser la progression des fourches de réplication dans les séquences télomériques. En effet, une étude récente a révélé que l'absence de Swi1 induit un raccourcissement des télomères, en raison d'une instabilité significative des télomères durant la réplication (Gadaleta et al., 2016).

Ainsi les protéines télomériques jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réplication aux extrémités chromosomiques, en favorisant la réplication de ces régions tel que la protéine Taz1 (Miller, Rog, and Cooper 2006). En plus de Taz1, d'autres composants, notamment l'hétérotrimère RPA (Luciano et al., 2012), le complexe Stn1-Ten1 (Takikawa et al., 2016 ; Matmati et al., 2018, Vaurs et al., 2023) et la télomérase (Dehé et al., 2012) contribuent à favoriser une réplication efficace des télomères

Toutefois, au-delà des télomères, nos travaux ont mis en évidence que les régions subtélomériques, notamment STE2-3, est une région difficile à répliquer, mais nous devons encore déterminer quelles caractéristiques de cette région sont à l'origine du stress de réplication observé à ce site spécifique (Vaurs et a.l, 2021). La présence de séquences répétées

formant une mosaïque favorise la RH, ce qui rend ces régions particulièrement propices à des mécanismes tels que la réplication dépendante de la recombinaison (RDR) et la réparation par recombinaison (BIR) (Sakofsky et al., 2015).

Toutefois, la dynamique et la cinétique de la réplication dans ces régions restent mal comprises. Bien que des outils tels que l'analyse Pu-seq aient permis des avancées importantes dans la cartographie des événements réplicatifs, cette approche présente des limites majeures : elle ne fournit qu'une vue statique de l'activation des origines et de la progression des fourches. Par conséquent, elle ne permet pas d'étudier les variations temporelles et la dynamique réplicative des régions subtélomériques ouvrant ainsi la voie à une compréhension plus approfondie des mécanismes subtils opérant dans ces zones complexes du génome.

# II. Résultats

# 1. Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast

Dans des travaux antérieurs, notre laboratoire a montré que le complexe Stn1-Ten1 (ST) semble avoir une double fonction dans le maintien des télomères (Matmati et al., 2018). D'une part, il limite l'action de la télomérase et promeut la synthèse du brin complémentaire, et d'autre part, il participe à la réplication des régions télomériques et subtélomériques en facilitant la synthèse d'ADN probablement au niveau du brin retardé. Ces deux fonctions reposent sur le fait que ST recrute le complexe Primase-Polα pour initier la synthèse d'ADN (Escandell et al., 2019). Au niveau du télomère le recrutement de ST s'appuie sur la SUMOylation de Tpz1, mais au niveau des séquences subtelomériques le mécanisme de recrutement de ST n'était pas établi. De plus, le laboratoire avait montré que le mutant *stn1-226* était sensible à des agents génotoxiques (HU, MMS...) ce qui suggérait que le complexe ST pouvait agir ailleurs dans le génome en réponse à un dommage à l'ADN. Pour approfondir le rôle de ST dans la réplication, nous avons étudié la dynamique de réplication à l'échelle du génome dans les cellules mutantes *stn1-226* en utilisant l'approche PuSeq (Polymerase usage sequencing). Cette méthode permet de visualiser les origines de réplication, les sites de terminaison et la vitesse des fourches de réplication grâce à a cartographie de l'utilisation des polymérases δ et ε à travers le génome (Daigaku et al., 2015). En comparaison à des cellules sauvages nous n'avons pas observé de défaut de la dynamique de réplication au niveau des bras du chromosome. En revanche, nos résultats ont révélé que la région subtélomérique aux niveaux des éléments STE3 et STE2 du chromosome II côté droit (C2-R), appelée STE3-2, était difficile à répliquer. En effet, lorsque la fonction de ST est compromise, nous avons mis en évidence l'existence d'un mécanisme de redémarrage basé sur la recombinaison homologue (HR) qui utilise la polymérases δ sur les deux brins, continu et retardé. En accord avec cette observation, nous montrons que Stn1 se lie à la région STE3-2 par ChIP. Le recrutement de Stn1 dépend de l'intégrité du complexe Pot1-Tpz1-Poz1 mais ne semble pas dépendre de Taz1 qui lui aussi est recruté au niveau de la région STE3-2. Enfin, nous démontrons que l'activation

d'une origine normalement inhibée par Rif1 peut contourner le défaut de réplication des régions subtélomériques lorsque la fonction ST est compromise. Ainsi ces découvertes aident à comprendre pourquoi les télomères de *S. pombe* sont des sites fragiles et élargissent notre compréhension de la régulation des régions télomériques et subtélomriques. Les similitudes structurelles et fonctionnelles entre les séquences terminales de *S. pombe* et celles des chromosomes des mammifères renforcent la pertinence de ce modèle pour l'étude des processus de maintenance des télomères dans les cellules eucaryotes **(Article en Annexe : Vaurs et al., Cell Reports, 2023)**.

# 2. Pot1 promotes telomere DNA replication via the Stn1-Ten1 complex in fission yeast

POT1 est un facteur clé de la shelterin et se lie à l'extension simple brin riche en guanine. Il joue un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse aux dommages de l'ADN. Chez *S. pombe*, Pot1 inhibe l'activation de Chk1 (Cooper et al., 2010) et chez l'homme, POT1 limite l'activation de la kinase ATR en remplaçant RPA aux télomères qui est recruté pendant la réplication (De Lange et al., 2010 ; Flynn et al., 2011). Cette fonction protectrice dépend de son interaction directe avec TPP1 (Tpz1) (Hockemeyer et al., 2005 ; Chen et al., 2012). POT1-TPP1 est également décrit comme un régulateur négatif de la télomérase notamment en promouvant le recrutement du complexe CTC1-STN1-TEN1 (CST) pour la synthèse du brin complémentaire (Loayza et al., 2003 ; Chen et al., 2012). Chez l'homme, il a aussi été montré que l'inhibition de POT1 engendre des défauts majeurs dans la réplication des télomères, entraînant un blocage de la fourche de réplication et une instabilité génomique (Pinzaru et al., 2016). Il a été proposé que POT1-TPP1 pourrait favoriser la synthèse des brins retardés des télomères en recrutant le complexe CST pour faciliter le redémarrage des fourches comme cela avait été proposé par le groupe de C. Price (Stewart et al., 2012). Cependant, le mécanisme précis par lequel POT1 régule ce processus reste encore à élucider.

Nos travaux réalisés chez *S. pombe* suggèrent que Pot1 joue également un rôle clé dans la réplication des télomères (Vaurs et al., 2023). En effet, nous avons démontré que, dans les régions subtélomériques, notamment STE3-2, le recrutement de Stn1 dépend de l'intégrité du complexe Pot1-Tpz1-Poz1 (Vaurs et al., 2023). Ce recrutement est essentiel à la réplication des régions télomériques et subtélomériques, où Stn1 contribue à la synthèse de l'ADN du brin retardé en recrutant le complexe Primase-Polα pour initier la synthèse d'ADN (Escandell et al., 2019). Ces résultats indiquent donc que Pot1 est impliqué dans la réplication des télomères et des régions subtélomériques, en permettant le recrutement du complexe Stn1-Ten1 par sa liaison aux régions subtélomériques. Néanmoins, la démonstration du rôle de Pot1 dans ces mécanismes n'avait pas été établie.

Chez *S. pombe*, les cellules en absence de Pot1 peuvent survivre éventuellement en circularisant leurs chromosomes (Baumann et al., 2001 ; Pitt et al., 2010). Pour étudier le rôle de Pot1 et son implication dans la réplication des régions terminales, nous avons utilisé, un mutant thermosensible de *pot1*, décrit précédemment par le groupe de Julie Cooper (*pot1-1*). À la température permissive (25 °C), ce mutant conserve partiellement ses fonctions, permettant l'étude de ses fonctions. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Miguel Ferreira et sa doctorante Pâmela C. Carvalho Borges.

Nous avons montré que *pot1-1* altère la réplication de l'ADN des télomères et entraîne l'accumulation d'ADN simple brin. A température restrictive, cette mutation conduit à la perte complète de l'ADN télomérique. Dans les cellules *pot1-1*, nous avons constaté une diminution du recrutement de Stn1, un facteur associé à Ten1 qui est important pour recruter Pol α et initier la synthèse d'ADN. La surexpression de Stn1 de la sous unité catalytique de Pol α restaure partiellement les pertes de fonctions de Pot1-1. Nos résultats suggèrent que Pot1 par l'intermédiaire de son partenaire Tpz1 participe au recrutement de Stn1-Ten1 pour initier la synthèse d'ADN au niveau du brin retardé (lagging strand). Ces résultats sont en accord avec nos travaux précédents (Vaurs et al., 2023).

De plus nous avons observé que la délétion de *rif1* restaure la viabilité et la perte de télomères du mutant *pot1-1*, imitant l'effet observé dans les mutants *stn1-1* et *stn1-226* (Vaurs et al., 2023). Cela indique que l'ouverture d'origines de réplication peut contourner les défauts de réplication de *pot1-1* en sauvant les fourches de réplication bloquées.

Ainsi, cette étude souligne l'importance de Pot1 dans la réplication de l'ADN terminal, indiquant que sa fonction est de recruter avec ses partenaires Tpz1 et Poz1, le complexe ST pour promouvoir la synthèse d'ADN, probablement au niveau du brin retardé (lagging strand). Cette fonction pourrait être conservée chez l'homme (Pinzaru et al., 2016).

*Nucleic Acids Research*, 2023, **51**, 12325–12336
https://doi.org/10.1093/nar/gkad1036
Advance access publication date: 11 November 2023
**Genome integrity, repair and replication**

# Pot1 promotes telomere DNA replication via the Stn1-Ten1 complex in fission yeast

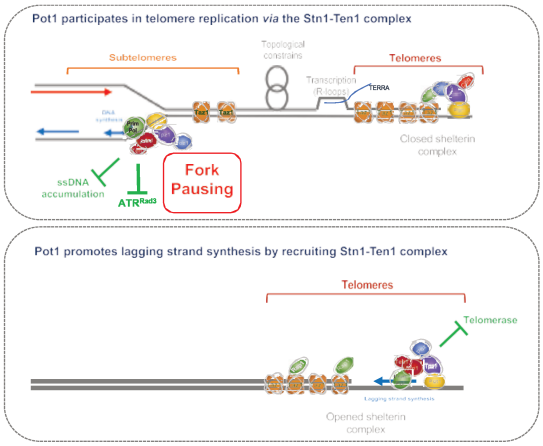
**Pâmela C. Carvalho Borges**[1,†], **Chaïnez Bouabboune**[2,†], **Jose Miguel Escandell**[1], **Samah Matmati**[2], **Stéphane Coulon**[2,*] and **Miguel Godinho Ferreira**[1,3,*]

[1]Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, 2781-901, Portugal
[2]CNRS, INSERM, Aix Marseille Univ, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Marseille, F-13009, France
[3]Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), INSERM U1081 UMR7284 CNRS, 06107 Nice, France
[*]To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 7 61 43 14 05; Email: Miguel-Godinho.FERREIRA@unice.fr
Correspondence may also be addressed to Stéphane Coulon. Tel: +33 4 86 97 74 07; Fax: +33 4 86 97 74 99; Email: stephane.coulon@inserm.fr
[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.
Present address: Jose Miguel Escandell, iBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, Oeiras, 2780-901, Portugal.

## Abstract

Telomeres are nucleoprotein complexes that protect the chromosome-ends from eliciting DNA repair while ensuring their complete duplication. Pot1 is a subunit of telomere capping complex that binds to the G-rich overhang and inhibits the activation of DNA damage checkpoints. In this study, we explore new functions of fission yeast Pot1 by using a *pot1-1* temperature sensitive mutant. We show that *pot1* inactivation impairs telomere DNA replication resulting in the accumulation of ssDNA leading to the complete loss of telomeric DNA. Recruitment of Stn1 to telomeres, an auxiliary factor of DNA lagging strand synthesis, is reduced in *pot1-1* mutants and overexpression of Stn1 rescues loss of telomeres and cell viability at restrictive temperature. We propose that Pot1 plays a crucial function in telomere DNA replication by recruiting Stn1-Ten1 and Polα-primase complex to telomeres via Tpz1, thus promoting lagging-strand DNA synthesis at stalled replication forks.

## Graphical abstract




## Introduction

Telomeres, the ends of eukaryotic chromosomes, contain short double-stranded tandem repeats that terminates in a single-stranded DNA (ssDNA) overhang. They are bound by a protein complex, termed Shelterin, which ensures their protection (1–3). In humans, Shelterin is composed by TRF1 and TRF2 that directly bind to the telomeric duplex DNA and recruit RAP1. Telomeric ssDNA is bound by POT1, which recruits TPP1, and the two subcomplexes are bridged by TIN2. Shelterin prevents inappropriate DNA repair at chromosome-ends, checkpoint activation and facilitates replication of telomeric DNA (4,5). Telomeres shortening occurs with successive cell divisions caused by the inability of replicative DNA polymerases to fully replicate terminal DNA. This process is known as 'end replication problem' (6). The slow telomere erosion is counteracted by the action of telomerase,

**Received:** January 20, 2023. **Revised:** October 19, 2023. **Editorial Decision:** October 19, 2023. **Accepted:** October 31, 2023
© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

a reverse transcriptase that uses the telomere 3$^{r}$ overhang to extend chromosome-ends (1,7). However, abrupt loss of telomeric DNA can occur during telomeric DNA replica- tion. Indeed, telomeres are genome fragile sites hard to repli- cate as they contain several DNA replication barriers (DNA secondary structures, R-loop containing RNA:DNA hybrids, bound proteins and topological constrains). These barriers im- pede the progression of the replication fork through telom- eric repeat sequences leading to fork collapse and, potentially, DNA double strand breaks (DSBs) (8,9). Thus, unidirectional replication forks that progress toward the end of the chromo- some frequently slow down and stall when entering telomeric tracks (10,11).

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* contains a shelterin-like complex that is evolutionary conserved between fission yeast and humans (12). Taz1, the homolog of both mammalian TRF1 and TRF2, binds to duplex telomeric DNA wherease the 3$^{r}$ overhang is protected by Pot1. Both factors are physically bridged by Rap1, Poz1 and Tpz1 and ensure the full protection of telomeres (13,14). *S. pombe* shelterin plays a major function in recruiting telomerase that includes the catalytic subunit Trt1 and the RNA subunit *ter1* (15,16). Phosphorylation of Shelterin by the Rad3$^{ATR}$ kinase promotes the recruitment of telomerase to fission yeast telomeres via Tpz1 (17,18) resulting in telomere elongation (19). The cycle of elongation is terminated through the SUMOylation of Tpz1 on lysine 242, which promotes the recruitment of the Stn1-Ten1 complex (20–22). Stn1-Ten1 fulfils an important func- tion in telomere protection (25) by recruiting Polα-Primase complex and lagging strand synthesis (22,23).

As in mammals, fission yeast Shelterin regulates telomere replication. Taz1 is a major factor in this process although its precise function has not yet been established (10). Addi- tional components, such as the RPA heterotrimer, the Pfh1 helicase and telomerase itself, contribute to promoting effi- cient replication of telomeres (24–27). Recently, we and others have shown that the Stn1-Ten1 complex is required for telom- ere and subtelomere replication (22,28). More recently, we showed that Stn1-Ten1 is recruited to the subtelomeric STE3- 2 region (58). This region requires a fully functional Stn1-Ten1 complex to be efficiently replicated and maintained. Remark- ably, Stn1-Ten1 recruitment to STE3-2 requires Pot1-Tpz1- Poz1 but not Taz1. All together, these experiments indicate that Stn1-Ten1 prevents the accumulation of ssDNA by pro- moting lagging strand DNA synthesis through the recruitment of Polα-Primase complex to stalled replication forks. In mam- mals, the CST complex is composed by CTC1, STN1 and TEN1 and is not only required for telomere replication (29– 31) but also global genome replication (32,33). The CST com- plex may also act as a terminator of telomerase elongation by promoting lagging strand synthesis and blocking the 3$^{r}$- overhang (34,35).

Pot1 is an essential subunit of the Shelterin complex. It rec- ognizes the 3$^{r}$ single-stranded overhang and plays a major role in the protection of telomeres (36,37). This function is rein- forced by its interaction with TPP1$^{Tpz1}$ (38). Pot1 is also de- scribed to act as a negative regulator of telomerase (39). In- deed, mammalian POT1 is thought to promote telomere lag- ging strand synthesis by the recruitment of the CST complex to telomeres (40,41). Thus, functions of POT1 seems to be in- timately linked to CST complex. However, in contrast to CST, a role of POT1 in telomere replication has not been estab- lished so far. A thermosensitive (*ts*) mutant of *pot1*$^{+}$ (*pot1-1)* was identified by the Cooper laboratory (42). This mutant loses telomeres rapidly and accumulate ssDNA during S-phase at restrictive temperature, indicating that Pot1 fulfils crucial functions during DNA replication (42). Using *pot1-1* mutants, we further explore the role of Pot1 in telomere replication. We show that Pot1 acts with the Stn1-Ten1 complex via Tpz1 to promote DNA replication of telomeric and subtelomeric DNA. Our results indicate that Pot1 stabilizes Stn1-Ten1 at telomeres and promotes Polα—dependent DNA replication to ensure efficient replication of chromosome ends.

## Materials and methods

### Yeast strains and media

The strains used during this work can be found listed in Sup- plementary Table S1. *De novo* strains were constructed using commonly used techniques (43). These include yeast mating combined with tetrad dissection and yeast transformation. In- tended mutants were screened using appropriate selective me- dia combined with Polymerase Chain Reaction (PCR) tests. Gene knockouts were made by substituting entire Open Read- ing Frames (ORF) with kanMX6, hphMX6 or natMX6 cas- settes while gene tagging was made using GFP, HA or Myc epitopes. *pot1-1* strain generated in the Cooper lab resulted from integration of GFP-KanMX cassette at the C-terminal part of endogenous *pot1* + carrying E158G and D456N mu- tations (42).

Standard media and growth condition were used, unless stated otherwise. The growth media used for most of the strains was Yeast Extract Supplemented (YES) and the nor- mal growth temperature was 32°C. Temperature sensitive strains were cultured at 25°C for non-conditioned protein (permissive temperature) and at 37°C to inactivate the protein being studied (restrictive temperature). Strains that have genes under *nmt* promoter were grown in Pombe Minimal Gluta- mate medium (PMG), which lacks thiamine to induce over- expression of the target gene. The media was complemented with the required amino acids.

### Spot viability assay

Cells were grown in YES or PMG liquid media in a shacking incubator (200 rpm) until mid-logarithmic growth phase is reached (OD≈ 0.7). Incubation temperature was 32°C while temperature sensitive strains were incubated at 25°C. Five- fold serial dilution were made from 0.7 × $10^{6}$ cells and each dilution were spotted in YES or PMG solid media. Plates were incubated at 25°C to control for the loading while others were incubated at 37°C for 3–5 days before imaging.

### Microscopy and cell length measurement

Cells were grown in liquid media at 25°C for temperature sen- sitive strains (permissive temperature) and 32°C for remaining strains until mid-logarithmical growth phase. They were then incubated in a 37°C shaking water bath. Eight hours after tem- perature shift cells were fixed in 70% ethanol and imaged us- ing Delta Vision Core System Microscope (100 × 1.4 numer- ical aperture UplanSApo objective and a cascade2 EMCCD camera). Deconvolution was performed using the enhanced ratio method in softWoRx software. Lengths of 400 cells per strain were assessed using FIJI Software and analyzed using PRISM Software.

### Southern blotting

Cells were grown in liquid media and genomic DNA was extracted from exponentially growing yeast cells using phenol-chloroform technique. DNA samples were digested using *EcoR*I enzyme and resolved by electrophoresis in a 0.7% agarose gel. The gel was quantified using REDSAFE signal (Supplementary Figure S2) and treated for 15 min in 0.25M HCl, 30 min in denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) and 1 h in the neutralizing solution (1 M NH4Ac, 20 mM NaOH). DNA was transferred from the agarose gel to a positively charged membrane (Hybond-XL membranes from GE healthcare) using capillarity technique. After being exposed to UV radiation to induce DNA cross-link the membrane was pre-hybridized in Church-Gilbert solution (1% BSA, 1 mM EDTA, 7% SDS, 0.5 M $Na_2HPO_4$, 4 ml $H_3PO_4$ 85%, upto 1 L with $H_2O$) at 65°C and probed using Telom- ere oligo radiolabeled with radioactive phosphate $^{32}P$ to visualize the telomeres. To measure the loading the membrane was probe with radiolabeled Rad4 oligo that was created using 5$^r$-tcataatttcccccaaacca-3$^r$ and 5$^r$ accgtattttagccgacgtg-3$^r$ primers. We also probed subtelomeric region that is 5Kbp (subtelo-5K probe) from telomere using $^{32}P$-labeled PCR products amplified with 5$^r$-acactcaattcaaatcaacttc-3$^r$ and 5$^r$-gtgtttgaaaattgagcttatg-3$^r$ primers (28).

### Overhang assay

Yeast cultured in liquid media was used to extract DNA using phenol-chloroform technique after Zymolyase treatment. In-gel telomeric overhang assay was performed on *EcoR*I-HF digested DNA samples. DNA was resolved by electrophoresis in a 0.7% agarose gel which was dried for 2 h at 50°C using 583 gel dryer model from Bio-Rad. Dried gel was hybridized in Church-Gilbert solution (1% BSA, 1 mM EDTA, 7% SDS, 0.5 M $Na_2HPO_4$, 4 ml of $H_3PO_4$ 85%, upto 1 L with $H_2O$) at 50°C for one hour and probed overnight using telomeric C-rich oligo radiolabeled with γ-ATP.

### Two-dimensional (2D) gel electrophoresis

2D gel electrophoresis assay was implemented as described by Noguchi *et al.* (44). 60 U of *Nsi*I enzyme was used to digest 10 μg of DNA, which was used to access telomeres. The first dimension DNA was run on 0.4% agarose gel while the second dimension was run in a 1% agarose gel. Gels were transferred to positively charged membranes (Hybond-XL membranes) and probed with the STE1 probe.

### Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Cells cultured in liquid media were collected when they reached mid-logarithmic phase, washed twice with SP1 (1.2 M d-sorbitol, 50 mM sodium citrate, 50 mM $Na_2HPO_4{\cdot}7H_2O$, 40 mM EDTA, pH 6.5) and treated for 40 min with Zymolase- 20T (30 mg/100 μl). Spheroplasts were then spun down and resuspended in 1% low melting point agarose in TSE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.9 M sorbitol, 45 mM EDTA) to have a final concentration of $1x10^8$cells in 100 μl. The mix was dispensed in 90 μl plugs molds and let to solidify at 4°C. Plugs were then incubated for 90 min in 0.25 M EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 1% SDS and then in 0.5 M EDTA 10 mM Tris (pH 9.5), 1% lauryl sarcosine and 1–2 mg/ml pro- teinase K for 24 h at 55°C. Three washes of 30 min in 10 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl at 25°C were made and then plugs were treated for 1 h with 10 mM EDTA,10 mM Tris-HCl and 0.04 mg/ml PMSF at 55°C. Three other 30 min washes were made with 10 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl at 25°C and plugs were digested over night with *Not*I enzyme after being treated with *Not*I buffer for 1 h at 37°C. We loaded the plugs into 1% pulse-field certified agarose gel dissolved in 0.5X TBE and used CHEF Mapper Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) System to run the gel at 14°C, 6 V/cm with pulse time of 60–120 s. We then transferred the DNA to a positively charged membrane (Hybond-XL membranes), pre-hybridized with Church-Gilbert solution (1% BSA, 1 mM EDTA, 7% SDS, 0.5 M $Na_2HPO_4$, 4 ml $H_3PO_4$ 85%, up 1 L with $H_2O$) at 65°C for 1 h and probed using Telo and LMIC oligos radiolabeled with $^{32}P$.

### Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Protocol described by Moser *et al.* (45) was used to per- form Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay. Cells at mid-log growth phase were collected and fixed with 11% formaldehyde (dilution was made with 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5) for 20 min at room temperature. About 0.25 M glycine was used to quench the solution for 5 min. Cells were pelleted, washed twice with cold PBS and lysed with 2x lysis buffer (100 mM Hepes- KOH pH 7.5, 2 mM EDTA, 2% Triton X-100, 0.2% Na deoxycholate) by mechanical disruption method. QSonica Sonicator Q800R3 was used to shear the chromatin and then equal amounts of DNA were used for immunoprecipitation protocol with anti-Myc (9E10; Santa Cruz biotechnology) or anti-GFP (Invitrogen) with magnetic Protein A beads. The DNA–protein complexes were washed with lysis buffer (0.1% SDS, 275 mM NaCl), then lysis buffer (0.1% SDS, 500 mM NaCl) and last with TE-buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Na deoxycholate) . DNA was precipitated using sodium acetate, 2-propanol and glycogen. DNA was resuspended with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS, de-crosslinked, purified used to in triplicate together with SYBR-Green-based to perform a quantitative real-time PCR (Bio-Rad) using the primers described in Carneiro *et al.* (46) and Vaurs *et al.* (58).

## Results

### Pot1 inactivation prevents Stn1 recruitment to telomere

Deletion of *S. pombe pot1*$^+$ leads to rapid telomere loss and survival through chromosome circularization (32). To circumvent this terminal phenotype, we used a *pot1* tempera- ture sensitive mutant previously described by the group of Julie Cooper (*pot1-1*) (42). At the permissive temperature (25°C), *pot1-1* cells grow normally although with slightly longer telomeres (42). When temperature is raised to 37°C (restrictive temperature), *pot1* function is inactivated and vi- ability of *pot1-1* mutant is severely reduced (Figure 1A). In fission yeast, checkpoints delay cell cycle progression result- ing in cell elongation (47). To investigate if *pot1-1* reduced viability at 37°C was due to checkpoint activation, we mea- sured cell length and observed that, at permissive tempera- ture, WT and *pot1-1* cells length averaged 10 μm (Figure 1B). However, when the temperature was raised to 37°C for 8 h, *pot1-1* elongated to an average length of 20 μm (Figure 1B). As previously shown (42), *pot1-1* cells arrest at the restrictive

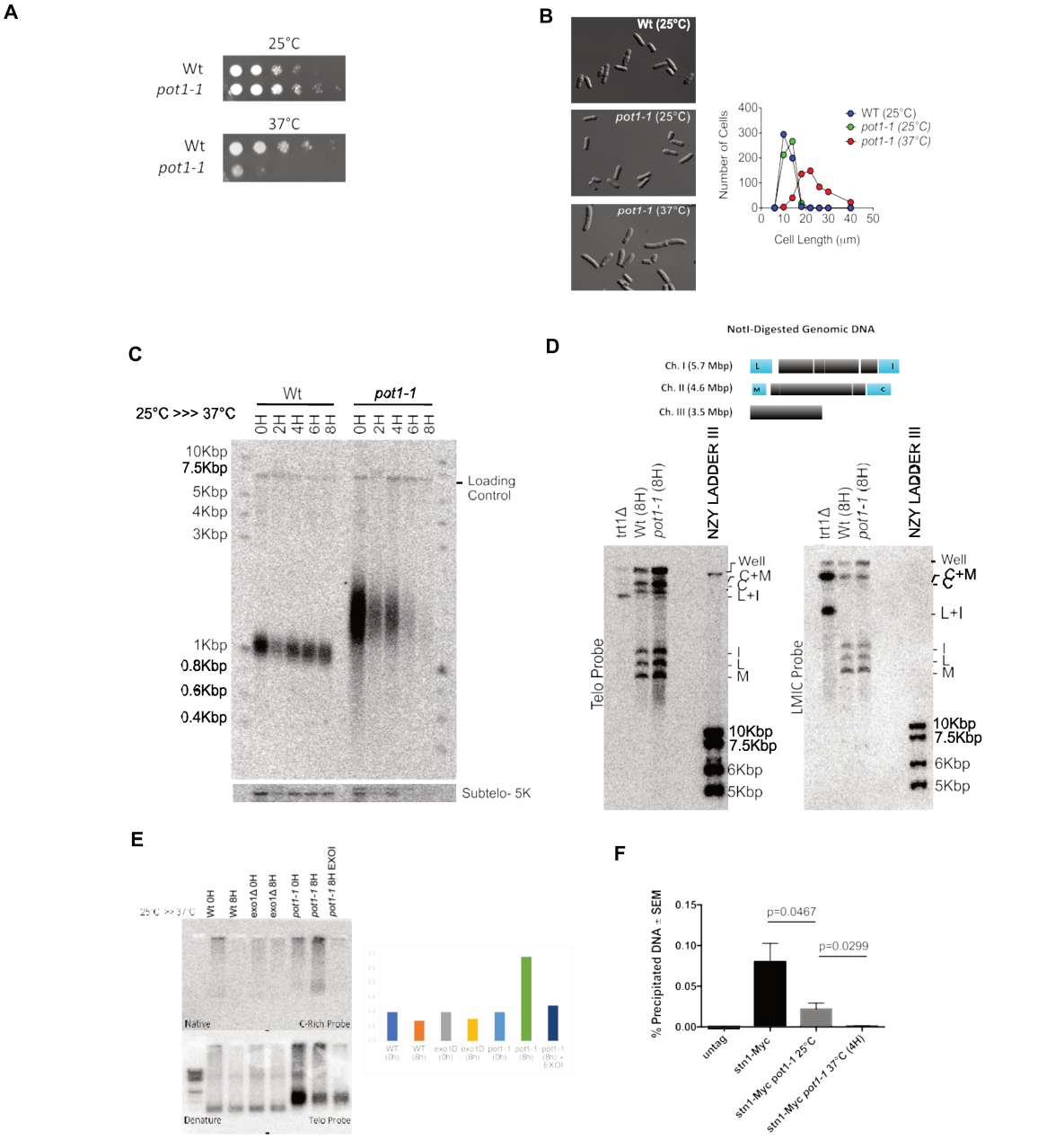



**Figure 1.** Pot1 inactivation reduces Stn1 recruitment to telomeres. (**A**) *pot1-1* inactivation compromises cell viability. Cell viability was assessed through spot dilution assay. (**B**) Cell elongation is triggered upon *pot1-1* inactivation. Delta Vision Core System were used to image the cells and their length were assessed using FIJI software. (**C**) *pot1-1* deficiency leads to rapid telomere loss. Chromosomes loose telomeres upon *pot1-1* inactivation. Cells were collected at 0, 2, 4 and 8 h after temperature shift and DNA samples were digested with *EcoR*I enzyme. (**D**) PFGE shows no chromosome circularization upon 8 h of *pot1-1* inactivation. Samples were digested with *Not*I enzyme and Southern blots were radiolabeled with telomeric and LMIC probes. Mutants for telomerase (*trt1Δ*) controlled for cells containing circular chromosomes. The top band is the well and shows unresolved genomic DNA. (**E**) *pot1-1* cells have longer G-rich overhang when Pot1 is inactive. In-gel hybridization assay was performed to access telomeric ssDNA. Samples were digested with *EcoR*I enzyme and radiolabeled with C-rich probe when native and telomeric probe when denatured. Mutants for fission yeast *exo1Δ* were used as cells deficient for telomere end-resection. *Escherichia coli* exonuclease (EXOI) enzyme was added to digest all the ssDNA of *pot1-1* samples collected at the restricted temperature. (**F**) Stn1 recruitment to *pot1-1* telomere is significantly reduced at permissive temperature and Pot1 inactivation abolishes Stn1-myc binding to telomeres. ChIP analysis was used to quantify Stn1-myc recruitment to telomere. $n \geq 3$; P-values are indicated and calculated based on a two-tailed Student's *t*-test to control sample. Error bars represent standard error of the mean (SEM).

temperature through a DNA-damage response (DDR) pathway. To assess the telomeric effects of *pot1-1* inactivation, we performed a Southern blot probing for telomeric sequences. Whereas *pot1-1* have longer telomeres than WT at 25°C, after 8 h of incubation at 37°C, we observed a significant loss of telomeres , revealed by the disappearance of telomeric signal (Figure 1C and Supplementary Figure S3A), confirming previous results by the Cooper lab (42). This is accompanied by loss of subtelomere sequences 5 kb upstream of the chromosome-end (Figure 1C, Subtelo 5K), as previously observed in *stn1-1* mutants (28). To investigate if *pot1-1* inactivation led to chromosomes circularization as *pot1Δ*, we performed a PFGE of *NotI*-digested genomic DNA followed by Southern blotting (Figure 1D). In contrast to telomerase mutants (*trt1Δ*) and to *pot1Δ* mutant that circularize their chromosomes (48,49), we were unable to detect chromosome fusion bands (L + l and C + M) in *pot1-1* mutants, indicating that chromosomes remained linear after 8 h at 37°C despite the inability to detect telomere sequences.

In fission yeast, the presence of RPA-coated ssDNA induces Rad3-dependent checkpoint activation (50). Because *pot1-1* cells activate DDR at restrictive temperature, we hypothesized that *pot1* deficiency leads to an increase in telomeric ssDNA. Thus, we performed native in-gel hybridization assay with a C-rich telomeric probe to detect the G-rich strand. As previously shown (42), we observed that *pot1-1* inactivation led to an increased in telomeric ssDNA (Figure 1E). We treated *pot1-1* genomic DNA with EXOI, an exogenous exonuclease that degrades linear ssDNA in the $3^1$ to $5^1$ direction. As seen on native gels, telomeric ssDNA of *pot1-1* grown at 37°C was lost upon treatment with *Escherichia coli* EXOI (Figure 1E). These observations indicate that telomeric G-rich ssDNA formed upon *pot1* inactivation exhibits a $3^1$end.

The Stn1-Ten1 complex was shown to inhibit telomerase binding at telomeres and to promote lagging-strand synthesis through its interaction with Tpz1 and the recruitment of Polα-Primase (20–23). Thus, we analyzed the pattern of Stn1 recruitment to telomeres in *pot1-1* cells by performing a ChIP. ChIP of myc-tagged Stn1 revealed a significant reduction of Stn1 present at telomeres of *pot1-1* already at the permissive temperature (Figure 1F). This reduction was further exacerbated by growing *pot1-1* cells for 4 h at the restrictive temperature (Figure 1F). The observation that Stn1 recruitment to telomeres was significantly reduced in *pot1-1* mutants, even at the permissive temperature, shows that Pot1 is important for Stn1 recruitment to telomeres. At restrictive temperature, the absence of Stn1 binding at telomeres is likely to be a com- pound result from both Pot1 inactivation and loss of telomeric DNA. Importantly, the reduction of Stn1 binding to telom- eres at the permissive temperature can explain the presence of longer telomeres in *pot1-1*. Reduction of Stn1-Ten1 com- plex results in the retainment of telomerase at telomeres and longer telomere extension. The same phenotype can be ob- served in *stn1* mutants (see below). Although no direct interac- tion has been detected between Pot1 and Stn1 (or Ten1) (51), our data suggest that Pot1 participates to Stn1 recruitment to telomeres, likely by stabilizing Tpz1 and favoring Tpz1–Stn1 interaction.

## *pot1* and *stn1* function in the same genetic pathway for telomere length maintenance

Like *pot1-1* mutants, *stn1-1* temperature sensitive mutants have longer telomeres than WT even at permissive temperature (25°C) and its inactivation results in loss of telomeres and cell cycle arrest at restrictive temperature (28). In addition, *stn1* inactivation leads to increased $3^1$overhang extension (28). Taking into consideration these striking similarities and the observation that Pot1 is important for Stn1 recruitment to telomeres, we hypothesized that Pot1 controls Stn1 function in telomere maintenance, possibly acting upstream of Stn1. To test this hypothesis, we generated a *pot1-1 stn1-1* double mutant. At 25°C, WT and mutants grew similarly well, while at restrictive temperature the combination of both alleles is synthetically lethal (Figure 2A). Confirming the synergistic effect on growth, *pot1-1 stn1-1* cells elongated up to 30μm while the single mutants ranged from 15 to 20 μm when grown at 37°C for 8 h (Figure 2B). The combination of *pot1-1* and *stn1-1* mutations on telomere length appeared to be additive as derived from crossing both parental strains. *pot1-1 stn1-1* cells displayed a compound of longer telomeres similar to *stn1-1* sin- gle mutants and shorter telomeres like *pot1-1* single mutants (Figure 2C,D). This result indicates that Pot1 and Stn1 act together regarding the regulation of telomere length. However, *pot1-1 stn1-1* cells lose their telomeres at restrictive temperature faster than either single mutant (Figure 2C and Supplementary Figure S3B). Thus, in contrast, *pot1* and *stn1* appear to participate independently in telomere protection, not be- ing able to compensate for the loss of each other's deficiency. Taken together, our data indicate that *pot1* and *stn1* function in the same pathway in telomere length regulation and that both fulfil independent functions to protect telomeric DNA.

Previous studies showed that *rif1*$^+$ deletion restored *stn1-1* viability and reduces the rate of telomere loss at the restrictive temperature (22,28). Similarly, we wondered if the lack of Rif1 could also rescue *pot1-1* deficiency. Thus, we combined *rif1*□ deletion with *pot1-1* allele. Strikingly, we observed a rescue of *pot1-1* growth defects by *rif1*□ mutants (Figure 2E). In addition, *rif1*□ partially suppressed the loss of telomeres of *pot1-1* cells at restrictive temperature (Figure 2F and Supplementary Figure S3C). These observations suggest that the function of Rif1, known to repress subtelomeric replication origin firing, is deleterious for *pot1-1* cells, further linking Pot1 to telomere replication.

## Pot1 promotes efficient telomere DNA replication

Because loss of telomeric DNA occurs in S-phase in *pot1-1* cells (42) and our observed genetic interactions between *rif1*□ and *pot1-1*, we investigated the replication dynamics of *pot1-1* using 2D gel electrophoresis (2D-gel) at telomeres, as previously described (10,22,23). Genomic DNA samples, from the parental WT and *pot1-1*, grown at permissive and restrictive temperatures, were analyzed after *Nsi*I digestion by Southern blotting using a subtelomeric (STE1) probe (Figure 3A). In the first dimension, we observed four distinct bands for the parental WT (*pot1+)* whereas *pot1-1* mutants possessed only one thick band (Figure 3B). This suggests that subtelomeric regions of *pot1-1* are highly rearranged, reminiscent to *taz1*□, *ssu72*□ and *stn1-226* mutants (10,22,23). Y-structures, corresponding to the unidirectional moving of the replication forks within the *Nsi*I fragment, were visualized in the WT strain at both temperatures (Figure 3C). However, these structures were not detected in *pot1-1* cells in either condition (Figure 3C). We concluded that replication of telomeric regions is severely affected in *pot1-1* at 25°C, leading to superimposed Y arcs that spread into higher molecular weight intermediates, mimicking the phenotype observed in *taz1*□ (10). At

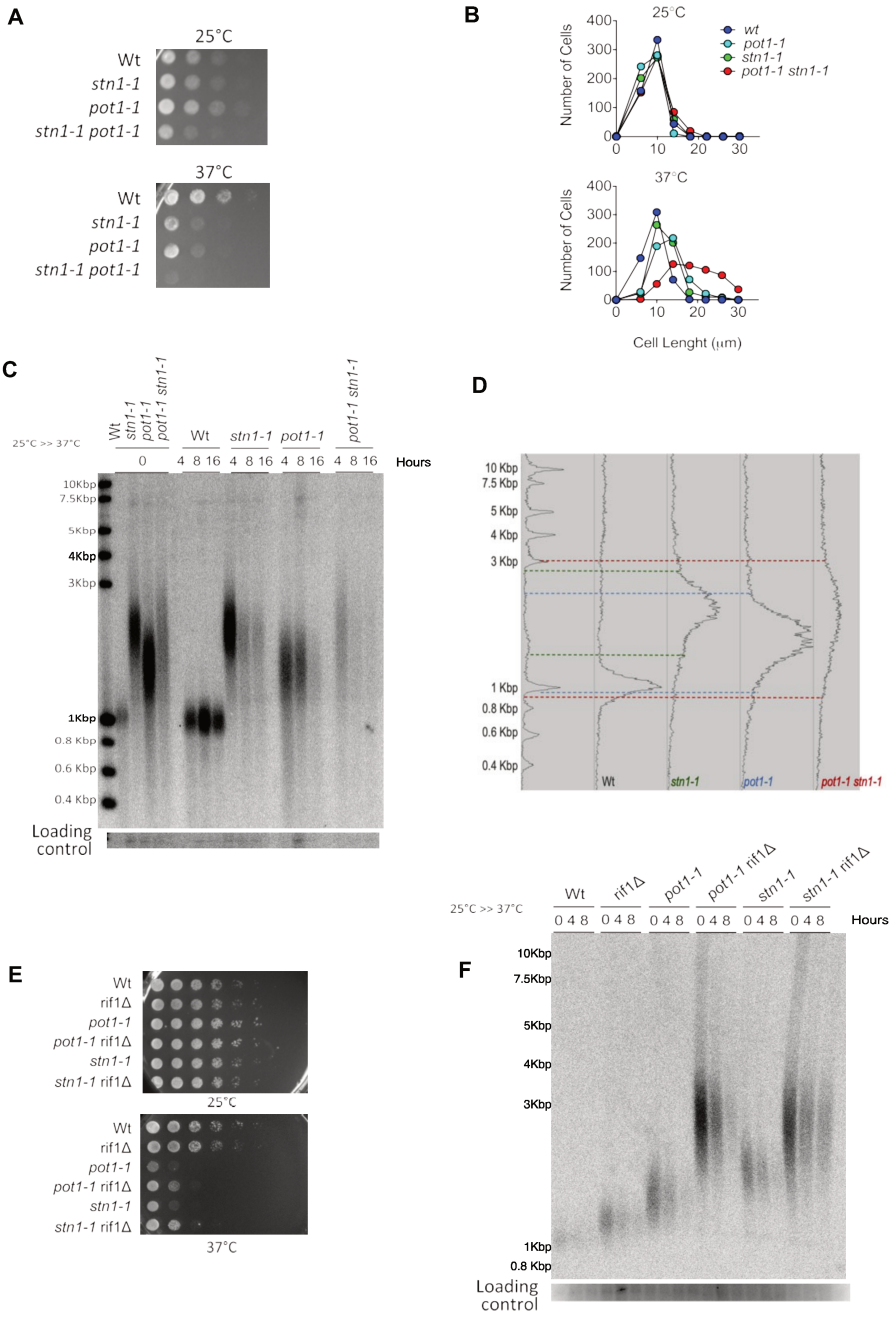



**Figure 2.** Phenotypic analysis of *pot1-1 stn1-1* double mutant. (**A**) Spot Assay revealed that *pot1-1 stn1-1* double mutant cells display lower cell viability upon inactivation than either *pot1-1* or *stn1-1* single mutants. (**B**) *pot1-1 stn1-1* double mutants elongate more at the restrictive temperature than either *pot1-1* or *stn1-1* single mutants. (**C**) *pot1-1 stn1-1* double mutant has similar telomere length as *pot1-1* or *stn1-1* single mutants. Southern blot was performed using samples collected at 0, 4, 8 and 16 h after temperature shift to 37°C. DNA samples were digested with EcoRI enzyme and the membrane was radiolabeled with telomeric probe. (**D**) Telomere length of *pot1-1 stn1-1* double mutants encompasses the size of *pot1-1* and *stn1-1* single mutants. Densitometry of Wt, *pot1-1, stn1-1* and *pot1-1 stn1-1* double mutants at 25°C ($T = 0$). Dashed lines represent the maxima and minima of telomeres in each strain. (**E**) Spot viability assay revealed a rescue of Pot1 and Stn1 deficiency upon *rif1* deletion. (**F**) Southern blotting shows that *rif1* deletion rescues telomere loss that characterizes Pot1 and Stn1 inactivation. Samples were digested with EcoRI enzyme. All telomere Southern blots were equally loaded (Supplementary Figure S2) before transferred and radiolabeled using a telomeric probe.

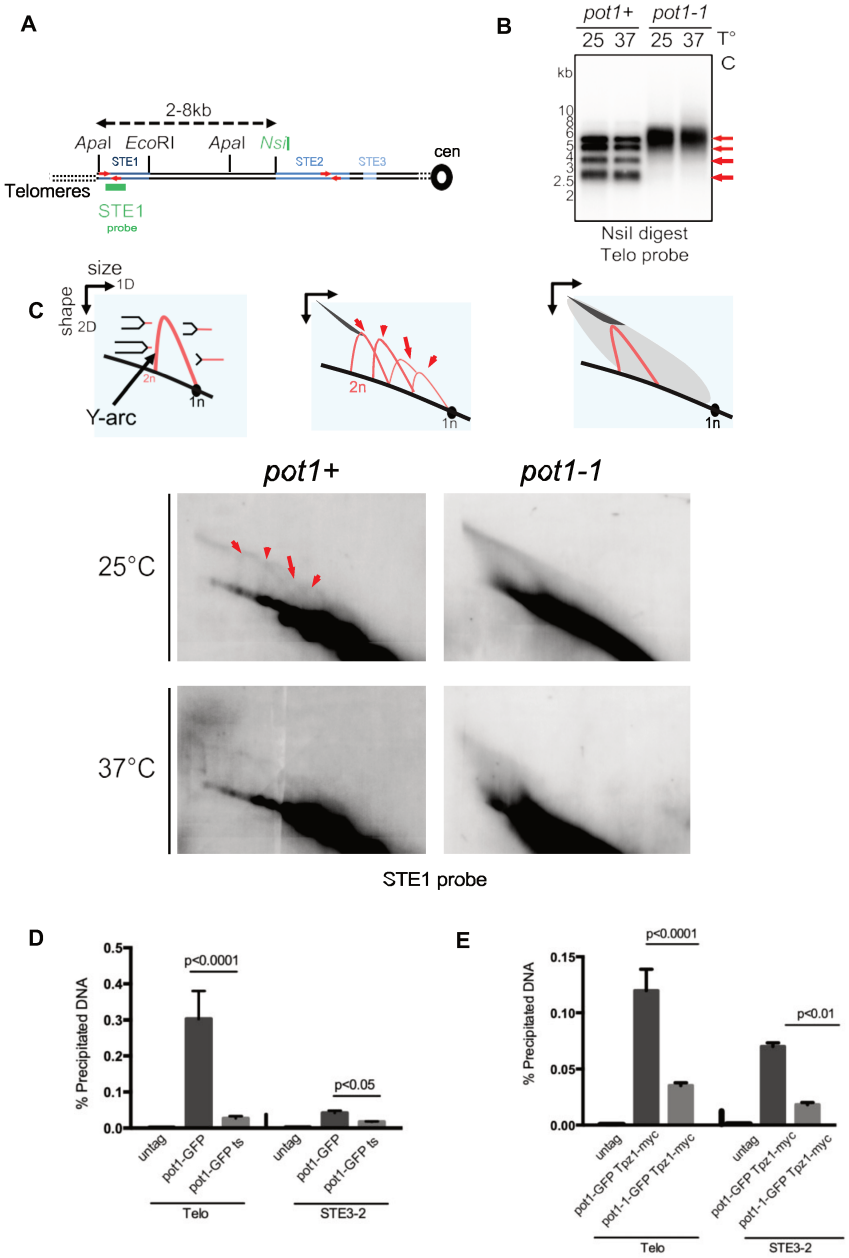



**Figure 3.** Pot1 inactivation induces replication fork stalling and collapse. (**A**) Relative position of the restriction sites in the subtelomeric regions of chromosomes I and II. Position of the STE sequences are indicated. The subtelomeric probe (STE1) that is used for 2D-gel hybridization (see below) is represented. Oligonucleotides used for the ChIP and specific to telomeres and STE3-2 regions are represented by red arrows. Cen, centromere. (**B**) Southern blot analysis of *NsiI* telomeric fragments (first dimension) from the parental WT (*pot1+*) strain and *pot1-1*mutant revealed by STE1 probe. (**C**) 2D-gel analysis of *NsiI* telomeric fragments of WT (*pot1+*) and *pot1-1* strains at 25°C and after 4 hours at 37°C. The Y-arc pattern is generated by unidirectional movement of a replication fork across each telomeric fragment shown in the first dimension. The cone-shaped signal represents four-way DNA junctions (double Y). (**D**) Pot1 is recruited to telomeres and to STE3-2 subtelomeric region at permissive temperature. Pot1-1 recruitment is strongly reduced at both telomeres and subtelomeres. ChIP analysis was used to quantify Pot1-GFP and Pot1-1-GFP recruitment to telomeres and STE3-2. $n \geq 3$; *P*-values are indicated on the graph. They are calculated based on a two-way ANOVA test. Error bars represent standard deviation and dots the mean value. (**E**) Tpz1 is recruited to telomeres and to STE3-2 subtelomeric region at permissive temperature. Tpz1 recruitment is significantly reduced at both sites. ChIP analysis was used to quantify Tpz1-myc recruitment to telomeres and STE3-2. For (C and D), $n \geq 3$; *P*-values are indicated on the graph. They are calculated based on a two-way ANOVA test. Error bars represent standard deviation .

restrictive temperature, the replication intermediates of *pot1- 1* were barely detected, consistent with the disappearance of telomeric DNA in these conditions. Thus, from the 2D-gel analysis, we conclude that Pot1 is actively involved in the replication of telomeric DNA, possibly by facilitating Stn1 recruitment and its role in DNA end replication.

We previously showed that Stn1 is crucial to maintain 'hard-to-replicate' regions located at STE3 and STE2 (named STE3-2), likely by preventing the accumulation of ssDNA through lagging-DNA synthesis (58). We further demonstrated that the recruitment of Stn1 relies on Pot1-Tpz1-Poz1 factors but not Taz1. Thus, Pot1 and Tpz1 like Stn1 are likely recruited to the STE3-2 region. To test this assumption, we assessed the binding of Pot1 and Tpz1 at telomeres and STE3-2 by ChIP in *pot1-GFP* and *pot1-1-GFP* cells (Figure 3D and E). Our results show that both Pot1 and Tpz1 are recruited to telomeres and to the STE3-2 region in WT cells. In contrast, binding of Pot1 and Tpz1 is impaired in *pot1-1* grown at the restrictive temperature. Taken together, our ChIP experiments indicate first that Pot1, Tpz1 and Stn1 are recruited to telomeres and subtelomeres and second that binding of Tpz1 and Stn1 to these regions require a fully functional Pot1 protein.

### Overexpression of *stn1*$^{+}$ rescues *pot1-1* deficiency

Our data indicate that *pot1* and *stn1* are crucial for telomere replication and that Pot1 is important to recruit Stn1 to telomeres. Thus, we hypothesized if overexpression of *stn1*$^{+}$ could restore defects of *pot1-1* mutants. To test this, we replaced the endogenous promoter of *stn1*$^{+}$ by the *nmt* promoter (i.e. *nmt1-stn1*) and incorporated it in *pot1-1* mutants. Strikingly, overexpression of *stn1*$^{+}$ restored the growth defect of *pot1-1* mutants at the restrictive temperature (Figure 4A). This rescue was abolished by Tpz1-K242R, a mutation that prevents the SUMOylation of Tpz1 and impairs the recruitment of Stn1 at telomeres (20,21) (Supplementary Figure S1A), indicating that the rescue of *pot1-1* by overexpression of *stn1*$^{+}$ relies on the SUMOylation of Tpz1. In addition, this growth rescue at 37°C depended on the strength of the *nmt* promoter that controls the level of expression of *stn1*$^{+}$ (Supplementary Figure S1B). Indeed, expression of Stn1 with weaker versions of the *nmt* promoter (*nmt41* and *nmt81)* restored *pot1-1* viability only partially (Figure 4A). Consistent with this, overexpression of *stn1*$^{+}$ also abrogated cell elongation of *pot1-1* at 37°C (Figure 4B). Next, we assessed the impact of the overexpression of *stn1*$^{+}$ on telomere maintenance. We found that higher expression of *stn1*$^{+}$ prevented both the loss of telomeric DNA (Figure 4C and Supplementary Figure S3D) and accumulation of telomeric ssDNA after 8 h at 37°C (Figure 4D and Supplementary Figure S3E). Conclusively, *pot1-1* mutants longer telomeres were also rescued by *stn1*$^{+}$ overexpression (Figure 4C). Taken together, our data indicates that Pot1 regulates telomere length and replication by the recruitment of Stn1 to telomeres.

### Overexpression of Polα partially rescues *pot1-1* deficiency

The (C)ST complex promotes DNA replication through the recruitment of the Polα-primase complex at telomeres and stalled replication forks (52). We previously showed that the overexpression of the catalytic subunit of the DNA poly- merase α (Pol1) partially restores viability and telomere loss of *stn1* mutants (22). In line with this, we tested whether overexpression *pol1*$^{+}$ driven by pREP41-pol1 plasmids could also rescue the defects of *pot1-1* mutants. Indeed, we observed that overexpression of *pol1*$^{+}$ partially restores the growth defects of *pot1-1* mutant at restrictive temperature (Figure 5A), and partially prevents the loss of telomeric sequences (Figure 5B), thus paralleling the positive effects observed on *stn1* mutants (22). Thus, our data suggest that Pot1 facilitates reinitiation of DNA synthesis at stalled or collapsed replication forks through recruitment and/or the stabilization of Stn1-Ten1 complex at telomeres leading to fork restart by the Polα-primase complex.

## Discussion

Pot1 is an essential subunit of the Shelterin telomere binding complex that binds directly the telomeric single-stranded DNA and to TPP1$^{Tpz1}$ (2). A main function of Pot1 is to protect chromosomal ends from an inappropriate DNA damage response, by blocking the accumulation of RPA-coated ss- DNA, thereby inhibiting the recruitment of ATR$^{Rad3}$ (37,53). The (C)ST complex interacts with Tpz1/Pot1 that both promote lagging strand DNA replication (41) and negatively regulate telomerase (39). In this study, we further explored the role of Pot1 in fission yeast using *pot1-1* mutant. Our data demonstrate that Pot1 has a dual role at chromosomes ends. First, in regulating telomere length and, second, by participat- ing in telomere and subtelomere DNA replication (Figure 5C). Both functions rely on the ability of Pot1 to recruit Stn1-Ten1 complex and to promote DNA synthesis by Polα-primase. This mechanistically explains how Pot1 limits the accumulation of ssDNA at telomeres and prevents Rad3$^{ATR}$-dependent DDR. Although Pot1 does not appear to bind directly to Stn1 or Ten1 (51), we propose that Pot1 stabilizes Stn1-Ten1 recruitment through its interaction with Tpz1 (Figure 5C). This idea is supported by the observation that overexpression of *stn1*$^{+}$ can restore growth deficiency, telomere loss and telomere elongation of *pot1-1* mutants at restrictive temperature. Upon *pot1* inhibition, Stn1-Ten1 recruitment to telomeres is impaired causing telomere elongation, replication defects and accumulation of ssDNA (Figure 5C), all reminiscent of phenotypes observed in *stn1-1* and *stn1-226* mutants (22,28).

Taken together, our results suggest that Pot1, Tpz1 and Stn1-Ten1 work together not only in controlling the telom- erase elongation cycle but also in DNA replication of telom- eric and subtelomeric regions, possibly at stalled replication forks. Thus, Pot1, like Stn1-Ten1 and Taz1, is a new com- ponent of the Shelterin involved in the DNA replication of telomeres and subtelomeres. Remarkably, the deletion of *rif1* restores viability and telomere loss of *pot1-1* mutant, mimick- ing the effect observed in *stn1-1* and *stn1-226* mutants. This indicates that the firing of subtelomeric origins can circumvent the replication defects of *pot1-1* by rescuing blocked replica- tion forks.

We established that fission yeast Pot1 is crucial for replication of chromosome ends (Figure 5C). This is achieved by recruiting Stn1-Ten1 and Polα-primase complexes to promote DNA-synthesis upon stalled or blocked replication forks. Unlike mammalian cells, this mechanism appears to be restricted to telomeres and subtelomeres since Stn1-Ten function depends uniquely on its interaction with Tpz1/Pot1. The evolutionary difference may have occurred as result of the loss of the CTC1 homolog in fission yeast. In human and mouse cells, POT1 was proposed to promote the telomere lagging strand

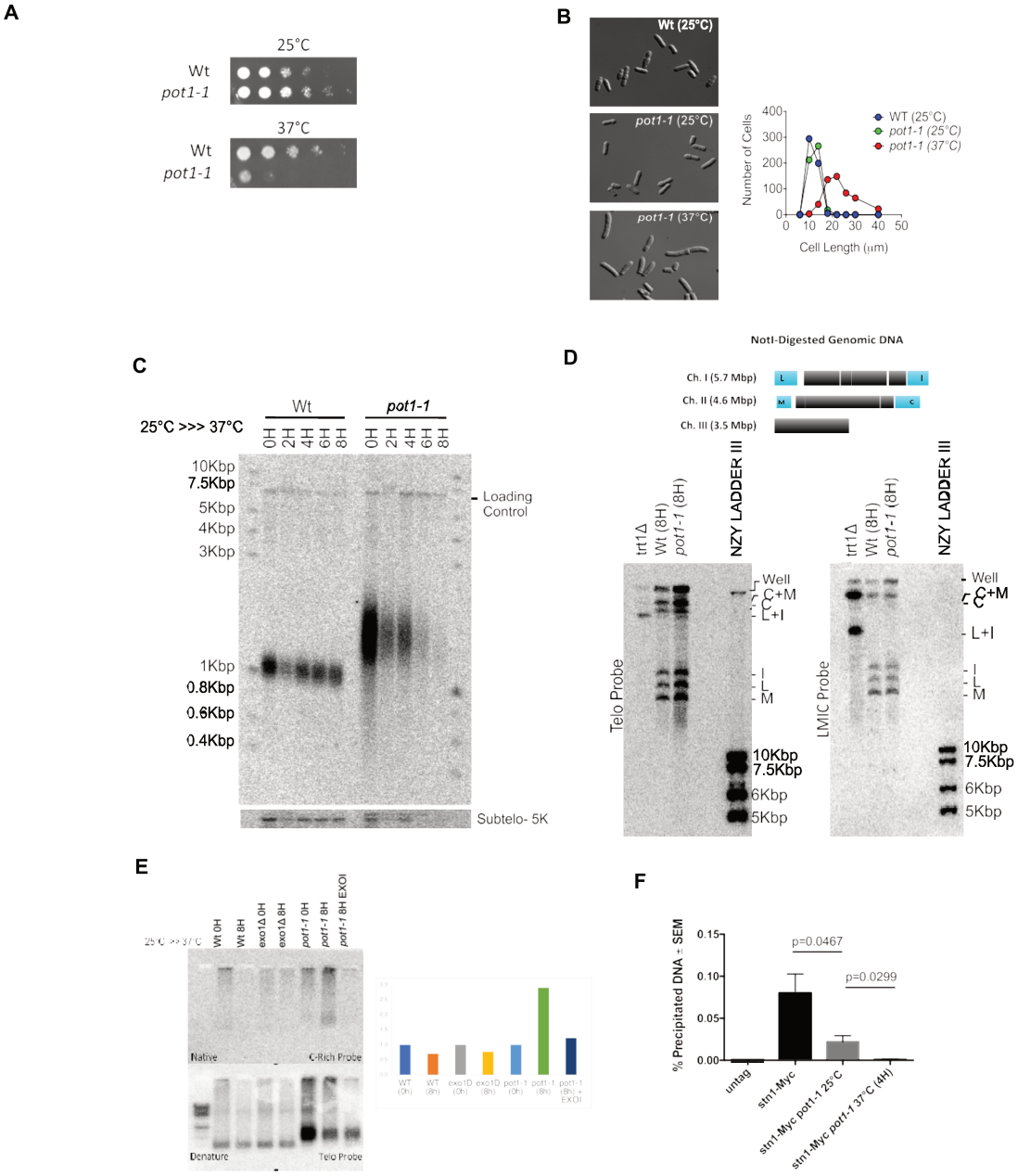



**Figure 1.** Pot1 inactivation reduces Stn1 recruitment to telomeres. (**A**) *pot1-1* inactivation compromises cell viability. Cell viability was assessed through spot dilution assay. (**B**) Cell elongation is triggered upon *pot1-1* inactivation. Delta Vision Core System were used to image the cells and their length were assessed using FIJI software. (**C**) *pot1-1* deficiency leads to rapid telomere loss. Chromosomes loose telomeres upon *pot1-1* inactivation. Cells were collected at 0, 2, 4 and 8 h after temperature shift and DNA samples were digested with *EcoR*I enzyme. (**D**) PFGE shows no chromosome circularization upon 8 h of *pot1-1* inactivation. Samples were digested with *Not*I enzyme and Southern blots were radiolabeled with telomeric and LMIC probes. Mutants for telomerase (*trt1Δ*) controlled for cells containing circular chromosomes. The top band is the well and shows unresolved genomic DNA. (**E**) *pot1-1* cells have longer G-rich overhang when Pot1 is inactive. In-gel hybridization assay was performed to access telomeric ssDNA. Samples were digested with *EcoR*I enzyme and radiolabeled with C-rich probe when native and telomeric probe when denatured. Mutants for fission yeast *exo1Δ* were used as cells deficient for telomere end-resection. *Escherichia coli* exonuclease (EXOI) enzyme was added to digest all the ssDNA of *pot1-1* samples collected at the restricted temperature. (**F**) Stn1 recruitment to *pot1-1* telomere is significantly reduced at permissive temperature and Pot1 inactivation abolishes Stn1-myc binding to telomeres. ChIP analysis was used to quantify Stn1-myc recruitment to telomere. $n \geq 3$; P-values are indicated and calculated based on a two-tailed Student's *t*-test to control sample. Error bars represent standard error of the mean (SEM).

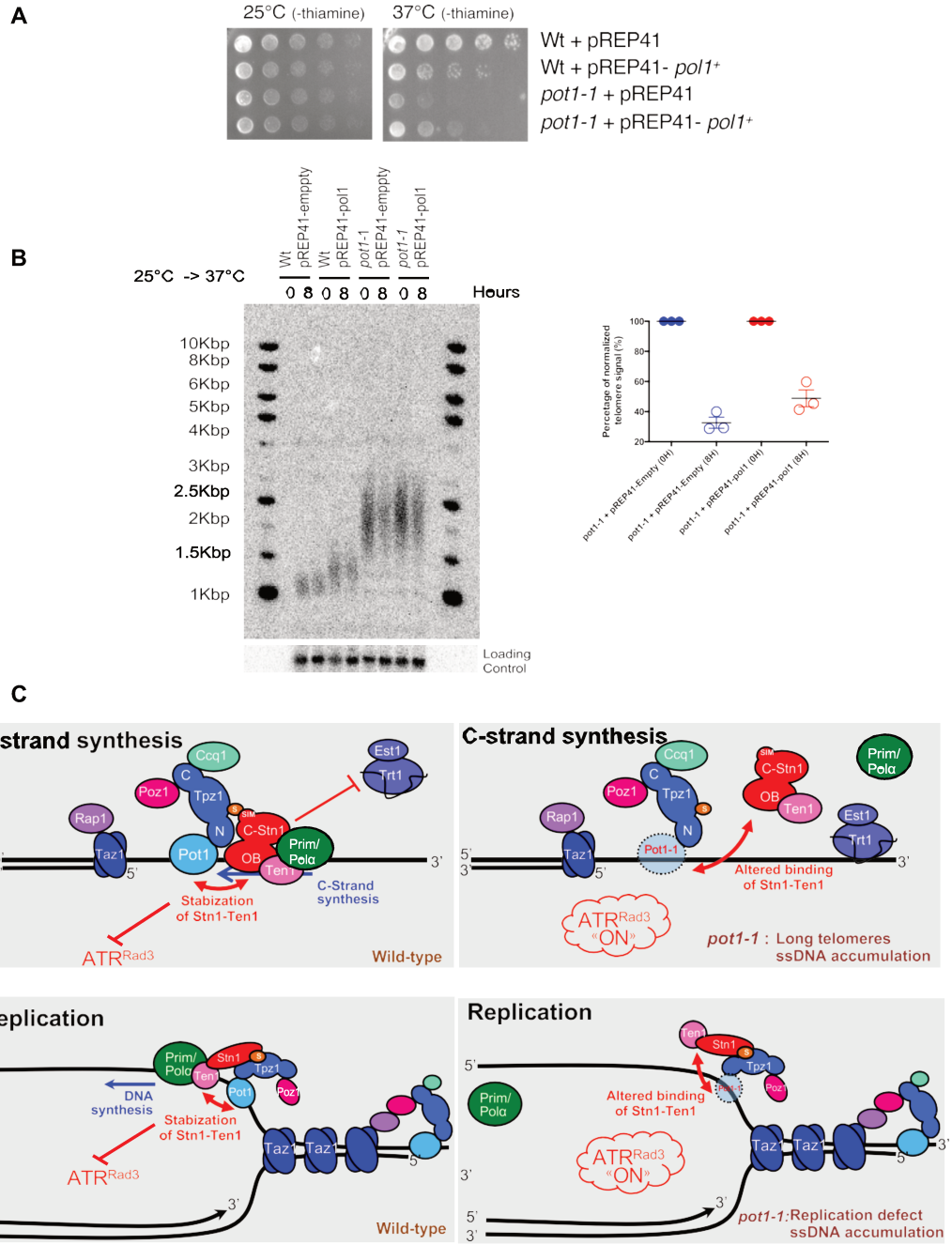



**Figure 5.** Polα overexpression rescues cell viability and telomere loss of *pot1-1* cells. (**A**) Spot viability assay reveals that *pol1*$^{+}$ overexpression partially rescues the viability of *pot1-1* cells at 37°C. (**B**) Quantification of Southern blot shows a modest rescue of *pot1-1* telomere loss 8 h after Pot1 inactivation. DNA samples were digested with *EcoRI* enzyme and equally loaded (Supplementary Figure S2) before transferred and radiolabeled using a telomeric probe. (**C**) Dual function of Pot1 at telomeres *via* the recruitment of Stn1-Ten1. We showed here that Pot1 is crucial to recruit and/or stabilize Stn1-Ten complex at telomeres. Through this function, we propose that Pot1 has a dual function at telomeres, first in regulating telomere length and, second, by participating in telomere DNA replication. Both functions rely on the ability of Pot1 to recruit Stn1-Ten1 complex and to promote DNA synthesis by Polα-primase, explaining how Pot1 limits the accumulation of ssDNA at telomeres and prevents the activation of ATR-dependent DDR. When Pot1 is impaired, Stn1-Ten1 recruitment is reduced and telomerase inhibition is altered leading to the lengthening of telomeres. This also causes the accumulation of ssDNA and DDR activation through ATR$^{Rad3}$. Telomere DNA replication is also hindered by Pot1 inactivation. This also leads to ssDNA accumulation during DNA replication and DDR activation.

synthesis by the recruitment of the CST complex (40,41). Based on our data in fission yeast, we anticipate that hu- man POT1 participates in telomere DNA replication by promoting CST-dependent DNA synthesis at stalled replication forks by preventing the accumulation of RPA-coated ssDNA and repressing ATR activation as suggested in mammalian cells as suggested by the unpublished work of the de Lange's laboratory.

Mammalian CST also fulfils important functions outside of telomeres (52,54). It facilitates the replication of G-rich regions in the genome (32,33,55) and counteracts DNA resection at double strand breaks (DSBs) in cooperation with the Rev7-Shieldin complex (56). The interaction between CST and TPP1-POT1 may not necessary for its function at global genomic G-rich sites or DSBs. However, CST interaction with TPP1-POT1 may be required to promote CST recruitment at the multiple interstitial telomeric sequences (ITS) and facilitate their replication (57). Further research will be necessary to elucidate the role of POT1 in DNA replication of both telomeric and non-telomeric region in mammalian cells.

## Data availability

The data underlying this article are available in the article and in its online supplementary material.

## Supplementary data

Supplementary Data are available at NAR Online.

## Acknowledgements

We thank Dr Cooper, Dr Ishikawa, Dr Bianchi, Dr McIntosh and Dr Fleck for providing fission yeast strain. We are grateful to Rima Kochman for technical assistance, Vincent Géli for reading the manuscript and MGF laboratory for critical comments and discussion. The current grant for Miguel Ferreira in the acknowledgement ANR: ANR-21-CE14-0054.

*Author contributions:* M.G.F. conceived the study and designed the experiments. P.C.C.B. performed most experiments. J.M.E. and C.B. performed ChIP experiments. S.M. performed the DNA 2D-gel experiments. M.G.F. and S.C. wrote the manuscript, M.G.F. supervised the research.

## Funding

Portuguese Fundação Ciência e Tecnologia (FCT) [PTDC/BEX-BCM/5179/14]; Howard Hughes Medical Institute IECS (to M.G.F.); Université Côte d'Azur - Académie 4 (Installation Grant: Action 2 - 2019) (to M.G.F.); Fonda- tion pour la Recherche Médicale (Equipe labélisée FRM) [EQU201903007804]; [SFRH/BD/114401/2016 to M.G.F.]; [PTDC/BEX-BCM/5179/14, PIEF-GA-2013–624759 to J.M.E.]; 'Ligue Nationale Contre le Cancer' (LNCC) (Equipe labélisée) to S.C.; Agence Nationale de la Research (ANR- 16-CE12 TeloMito and ANR-20-CE12 TeloRPA) to S.C. Funding for open access charge: Agence Nationale de la Recherche (ANR).

## Conflict of interest statement

None declared.

## References

1. Lange de,T. (2018) Shelterin-mediated telomere protection. *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 223–247.
2. Palm,W. and Lange de,T. (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.*, **42**, 301–334.
3. Verdun,R.E. and Karlseder,J. (2006) The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell*, **127**, 709–720.
4. Arnoult,N. and Karlseder,J. (2015) Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 859–866.
5. Gilson,E. and Géli,V. (2007) How telomeres are replicated. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 825–838.
6. Lingner,J., Cooper,J. and Cech,T. (1995) Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem?*Science*, **269**, 1533–1534.
7. Lansdorp,P. (2022) Telomere length regulation. *Frontiers Oncol,,* **12**, 943622.
8. Maestroni,L., Matmati,S. and Coulon,S. (2017) Solving the Telomere replication problem. *Genes*, **8**, 55.
9. Higa,M., Fujita,M. and Yoshida,K. (2017) DNA replication origins and fork progression at mammalian telomeres. *Genes*, **4**, 8.
10. Miller,K.M., Rog,O. and Cooper,J.P. (2006) Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature*, **440**, 824–828.
11. Sfeir,A., Kosiyatrakul,S.T., Hockemeyer,D., MacRae,S.L., Karlseder,J., Schildkraut,C.L. and Lange de,T. (2009) Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell*, **138**, 90–103.
12. Miyoshi,T., Kanoh,J., Saito,M. and Ishikawa,F. (2008) Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. *Science*, **320**, 1341–1344.
13. Nakamura,T.M., Moser,B.A., Du,L.-L. and Russell,P. (2005) Cooperative control of Crb2 by ATM family and Cdc2 kinases is essential for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 10721–10730.
14. Dehé,P.-M. and Cooper,J.P. (2010) Fission yeast telomeres forecast the end of the crisis. *FEBS Lett.*, **584**, 3725–3733.
15. Nakamura,T.M., Morin,G.B., Chapman,K.B., Weinrich,S.L., Andrews,W.H., Lingner,J., Harley,C.B. and Cech,T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and Human. *Science*, **277**, 955–959.
16. Webb,C.J. and Zakian,V.A. (2007) Identification and characterization of the schizosaccharomyces pombe TER1 telomerase RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 34–42.
17. Moser,B.A., Chang,Y.-T., Kosti,J. and Nakamura,T.M. (2011) Tel1ATM and Rad3ATR kinases promote Ccq1-Est1 interaction to maintain telomeres in fission yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 1408–1413.
18. Yamazaki,H., Tarumoto,Y. and Ishikawa,F. (2012) Tel1(ATM) and Rad3(ATR) phosphorylate the telomere protein Ccq1 to recruit telomerase and elongate telomeres in fission yeast. *Genes Dev.*, **26**, 241–246.
19. Armstrong,C.A., Pearson,S.R., Amelina,H., Moiseeva,V. and Tomita,K. (2014) Telomerase activation after recruitment in fission yeast. *Curr. Biol.*, **24**, 2006–2011.
20. Miyagawa,K., Low,R.S., Santosa,V., Tsuji,H., Moser,B.A., Fujisawa,S., Harland,J.L., Raguimova,O.N., Go,A., Ueno,M., *et al.* (2014) SUMOylation regulates telomere length by targeting the shelterin subunit Tpz1(Tpp1) to modulate shelterin-Stn1 interaction in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 5950–5955.
21. Garg,M., Gurung,R.L., Mansoubi,S., Ahmed,J.O., Davé,A., Watts,F.Z. and Bianchi,A. (2014) Tpz1TPP1 SUMOylation reveals evolutionary conservation of SUMO-dependent Stn1 telomere association. *EMBO Rep.*, **15**, 871–877.
22. Matmati,S., Vaurs,M., Escandell,J.M., Maestroni,L., Nakamura,T.M., Ferreira,M.G., Géli,V. and Coulon,S. (2018) The fission yeast Stn1-Ten1 complex limits telomerase activity via its

SUMO-interacting motif and promotes telomeres replication. *Sci. Adv.*, **4**, eaar2740.
1. Escandell,J.M., Carvalho,E.S., Gallo-Fernández,M., Reis,C.C., Matmati,S., Luís,I.M., Abreu,I.A., Coulon,S. and Ferreira,M.G. (2019) Ssu72 phosphatase is a conserved telomere replication terminator. *EMBO J.*, **38**, e100476.
2. Luciano,P., Coulon,S., Faure,V., Corda,Y., Bos,J., Brill,S.J., Gilson,E., Simon,M.N. and Géli,V. (2012) RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. *EMBO J.*, **31**, 2034–2046.
3. Audry,J., Maestroni,L., Delagoutte,E., Gauthier,T., Nakamura,T.M., Gachet,Y., Saintomé,C., Géli,V. and Coulon,S. (2015) RPA prevents G-rich structure formation at lagging-strand telomeres to allow maintenance of chromosome ends. *EMBO J.*, **34**, 1942–1958.
4. McDonald,K.R., Sabouri,N., Webb,C.J. and Zakian,V.A. (2014) The Pif1 family helicase Pfh1 facilitates telomere replication and has an RPA-dependent role during telomere lengthening. *DNA Repair (Amst.)*, **24**, 80–86.
5. Matmati,S., Lambert,S.A.E., Géli,V. and Coulon,S. (2020) Telomerase repairs collapsed replication forks at Telomeres. *Cell Rep.*, **30**, 3312–3322.
6. Takikawa,M., Tarumoto,Y. and Ishikawa,F. (2016) Fission yeast Stn1 is crucial for semi-conservative replication at telomeres and subtelomeres. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 1255–1269.
7. Stewart,J.A., Wang,F., Chaiken,M.F., Kasbek,C., Chastain,P.D., Wright,W.E. and Price,C.M. (2012) Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. *EMBO J.*, **31**, 3537–3549.
8. Wang,F., Stewart,J.A., Kasbek,C., Zhao,Y., Wright,W.E. and Price,C.M. (2012) Human CST has independent functions during Telomere duplex replication and C-strand fill-In. *Cell Rep.*, **2**, 1096–1103.
9. Gu,P., Min,J.-N., Wang,Y., Huang,C., Peng,T., Chai,W. and Chang,S. (2012) CTC1 deletion results in defective telomere replication, leading to catastrophic telomere loss and stem cell exhaustion. *EMBO J.*, **31**, 2309–2321.
10. Zhang,M., Wang,B., Li,T., Liu,R., Xiao,Y., Geng,X., Li,G., Liu,Q., Price,C.M., Liu,Y., *et al.* (2019) Mammalian CST averts replication failure by preventing G-quadruplex accumulation. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 5243–5259.
11. Wang,Y., Brady,K.S., Caiello,B.P., Ackerson,S.M. and Stewart,J.A. (2019) Human CST suppresses origin licensing and promotes AND-1/Ctf4 chromatin association. *Life Sci. Allian.*, **2**, e201800270.
12. Feng,X., Hsu,S.-J., Bhattacharjee,A., Wang,Y., Diao,J. and Price,C.M. (2018) CTC1-STN1 terminates telomerase while STN1-TEN1 enables C-strand synthesis during telomere replication in colon cancer cells. *Nat. Commun.*, **9**, 2827.
13. Chen,L.-Y., Redon,S. and Lingner,J. (2012) The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature*, **488**, 540–544.
14. Hockemeyer,D., Sfeir,A.J., Shay,J.W., Wright,W.E. and Lange,T.d. (2005) POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J.*, **24**, 2667–2678.
15. Denchi,E.L. and Lange de,T. (2007) Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, **448**, 1068–1071.
16. Hockemeyer,D., Palm,W., Else,T., Daniels,J.-P., Takai,K.K., Ye,J.Z.-S., Keegan,C.E., Lange,T.d. and Hammer,G.D. (2007) Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 754–761.
17. Loayza,D. and Lange de,T. (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, **423**, 1013–1018.
18. Wu,P., Takai,H. and Lange de,T. (2012) Telomeric 3′ overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-In by POT1b-associated CST. *Cell*, **150**, 39–52.
19. Takai,H., Jenkinson,E., Kabir,S., Babul-Hirji,R., Najm-Tehrani,N., Chitayat,D.A., Crow,Y.J. and Lange de,T. (2016) A POT1 mutation implicates defective telomere end fill-in and telomere truncations in Coats plus. *Gene Dev.*, **30**, 812–826.
20. Pitt,C.W. and Cooper,J.P. (2010) Pot1 inactivation leads to rampant telomere resection and loss in one cell cycle. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6968–6975.
21. Bähler,J., Wu,J.Q., Longtine,M.S., Shah,N.G., McKenzie,A., Steever,A.B., Wach,A., Philippsen,P. and Pringle,J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in schizosaccharomyces pombe. *Yeast*, **14**, 943–951.
22. Noguchi,E., Noguchi,C., Du,L.L. and Russell,P. (2003) Swi1 Prevents replication fork collapse and controls checkpoint kinase Cds1. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 7861–7874.
23. Moser,B.A., Subramanian,L., Chang,Y.-T., Noguchi,C., Noguchi,E. and Nakamura,T.M. (2009) Differential arrival of leading and lagging strand DNA polymerases at fission yeast telomeres. *EMBO J.*, **28**, 810–820.
24. Carneiro,T., Khair,L., Reis,C.C., Borges,V., Moser,B.A., Nakamura,T.M. and Ferreira,M.G. (2010) Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway. *Nature*, **467**, 228–232.
25. D'Urso,G. and Nurse,P. (1995) Checkpoints in the cell cycle of fission yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 12–16.
26. Nakamura,T.M., Cooper,J.P. and Cech,T.R. (1998) Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science*, **282**, 493–496.
27. Baumann,T.R.C.P. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, **292**, 1171–1175.
28. Zou,L. and Elledge,S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, **300**, 1542–1548.
29. Martín,V., Du,L.L., Rozenzhak,S. and Russell,P. (2007) Protection of telomeres by a conserved Stn1 Ten1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 14038–14043.
30. Stewart,J.A., Wang,Y., Ackerson,S.M. and Schuck,P.L. (2018) Emerging roles of CST in maintaining genome stability and human disease. *Front. Biosci.*, **23**, 1564–1586.
31. Flynn,R.L., Centore,R.C., O'sullivan,R.J., Rai,R., Tse,A., Songyang,Z., Chang,S., Karlseder,J. and Zou,L. (2011) TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature*, **471**, 532.
32. Lyu,X., Sang,P.B. and Chai,W. (2021) CST in maintaining genome stability: beyond telomeres. *DNA Repair (Amst.)*, **102**, 103104.
33. Lyu,X., Lei,K.H., Sang,P.B., Shiva,O., Chastain,M., Chi,P. and Chai,W. (2020) Human CST complex protects stalled replication forks by directly blocking MRE11 degradation of nascent-strand DNA. *EMBO J.*, **40**, e103654.
34. Mirman,Z., Lottersberger,F., Takai,H., Kibe,T., Gong,Y., Takai,K., Bianchi,A., Zimmermann,M., Durocher,D. and Lange de,T. (2018) 53BP1-RIF1-shieldin counteracts DSB resection through CST- and Polα-dependent fill-in. *Nature*, **560**, 112–116.
35. Meyne,J., Baker,R.J., Hobart,H.H., Hsu,T.C., Ryder,O.A., Ward,O.G., Wiley,J.E., Wurster-Hill,D.H., Yates,T.L. and Moyzis,R.K. (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, **99**, 3–10.
36. Vaurs,M., Naiman,K., Bouabboune,C., Rai,S., Ptasin´ska,K., Rives,M., Matmati,S., Carr,A.M., Géli,V. and Coulon,S. (2023) Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast. *Cell Rep.*, **42**, 112537.

**Received:** January 20, 2023. **Revised:** October 19, 2023. **Editorial Decision:** October 19, 2023. **Accepted:** October 31, 2023
© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse,

# 3. Article en préparation : Bouabboune et al,

Chez la levure de fission, comme chez l'homme, les télomères sont des régions difficiles à répliquer car elles comportent de nombreux obstacles (R-loop, surenroulement d'ADN, G4...) ainsi que des protéines liées à l'ADN qui entravent la progression de la fourche de réplication (Maestroni et al., 2017; Higa et al., 2017; Bonnell et al., 2021). Pour limiter ce stress réplicatif et empêcher une perte abrupte des télomères, diverses protéines sont recrutées par des facteurs télomériques et non télomériques afin de faciliter le passage des fourches de réplication à travers les séquences télomériques. Parmi ces protéines, TRF1 joue un rôle clé en favorisant une réplication efficace de l'ADN télomérique, ce qui permet d'éviter le blocage des fourches (Sfeir et al., 2009).

De manière similaire, il a été établi que l'absence de Taz1 induit des défauts majeurs dans la réplication des télomères. En effet, Taz1 joue un rôle crucial dans la progression de la fourche de réplication à travers l'ADN terminal, y compris les régions subtélomériques et télomériques (Miller et al., 2006 ; Vaurs et al., 2023). Cependant, la fonction exacte de Taz1 dans la réplication est inconnue. Précédemment, nous avons montré que Taz1 est recruté à la région STE3-2 mais son rôle aux subtelomères reste inconnu et semble indépendant de l'action de Stn1-Ten1 et du complexe Pot1-Tpz1-Poz1 (Vaurs et al., 2023).

Mon projet de thèse a consisté à explorer la fonction de Taz1 dans la réplication des séquences terminales. Nous avons montré que le domaine de dimérisation de Taz1 est phosphorylé de manière dépendante de Rad3(ATR), spécifiquement en phase S tardive du cycle cellulaire. Nous avons découvert que cette phosphorylation module la capacité de Taz1 à se dimériser et à se lier efficacement aux régions télomériques et subtélomériques, notamment au locus STE3-2. Nous avons également démontré que le recrutement de Taz1 est régulé en fonction du cycle cellulaire. Le recrutement de Taz1 aux subtélomères et aux télomères se produit pendant la phase S, et est concomitant au recrutement de Pol α (synthèse brin lagging). De plus, nous avons montré que les mutations mimétiques de la phosphorylation perturbent la réplication du brin retardé. Enfin, notre analyse par spectrométrie de masse des partenaires de Taz1 nous a permis d'identifier Lig1 (Cdc17), une enzyme impliquée dans la maturation des fragments d'Okazaki. Cette interaction doit être confirmée. Nos résultats, suggèrent que la

phosphorylation de Taz1, médiée par Rad3 (ATR), contrôle le recrutement de Taz1 pendant la réplication des séquences terminales.  Taz1 pourrait jouer un rôle au niveau de la synthèse du brin retardé mais cette hypothèse doit être confirmée expérimentalement.

Mes recherches ont été soutenu pendant trois ans par un financement académique d'Aix-Marseille Université et pendant six mois par la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.

# Rad3$^{ATR}$-dependent phosphorylation of Taz1 facilitates lagging strand synthesis

Chaïnez Bouabboune[1], François Laffont [1], Stéphane Audebert[2], Pierre-Marie Dehé[1], Pierre-Henri Gaillard[1], Karel Naiman[1] and Stéphane Coulon[1*]

[1] Marseille Cancer Research Center (CRCM), UMR7258 CNRS, U1068 INSERM, UM105 Aix-Marseille University, Institut Paoli-Calmettes, Team Telomere, Marseille, F-13009, France

[2] Aix-Marseille Université, Inserm, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille Protéomique, Marseille, F-13009, France

* Corresponding author: stephane.coulon@inserm.fr

# Introduction

Telomeres are nucleoprotein structures located at the ends of linear chromosomes which serve to maintain genomic integrity. Telomeric DNA consists of G-rich repetitive sequences, ending in a 3' single-stranded overhang (G-tail). In mammals, the so-called shelterin complex is composed of TRF1 and TRF2 that bind the telomeric double-stranded DNA, RAP1 that associates with TRF2, POT1-TPP1 that bind single-stranded DNA (ssDNA) overhang, and TIN2 that bridges the shelterin subcomplexes (Lange, 2018; Chen, 2019). Importantly, shelterin mediates the protective function of telomeres by suppressing the DNA damage response (DDR), thereby preventing inappropriate fusion, resection and recombination of telomeric DNA(Lange, 2018; Sfeir & Lange, 2012) . In germinal and stem cells, telomeric proteins also maintain telomere length by recruiting the telomerase, a reverse transcriptase that is able to elongate the 3'-overhang by addition of telomeric repeats (REF revue). In addition, telomeres are one of the most difficult regions to replicate because they encompass multiple obstacles for replication fork progression(Maestroni *et al*, 2017; Higa *et al*, 2017; Bonnell *et al*, 2021) . Because of this high replication stress, telomeres are considered as fragile sites(Sfeir *et al*, 2009). To avoid replication fork collapse and abrupt telomere loss, telomeric factors also facilitate telomere replication (Maestroni *et al*, 2017; Higa *et al*, 2017). The most striking example is TRF1 that is known to promote efficient replication of telomeric DNA to avoid fork stalling (Sfeir *et al*, 2009) . Furthermore, POT1 and CTC1-STN1-TEN1 (CST) complex are also known to facilitate normal progression of the replication fork (Pinzaru *et al*, 2016; Stewart *et al*, 2012) . However, the precise mechanisms in which these factors are involved are not established.

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is an attractive model in the telomere field since the discovery of a shelterin-like structure (Miyoshi *et al*, 2008; Cooper *et al*, 1997), underscoring the evolutionary conservation of telomere composition and telomere functions between fission yeast and mammals. Fission yeast contains three chromosomes and six telomeres. Terminal sequences are composed of degenerate telomere repeats ($G_{2\text{-}6}$-TTAC[A]) and are ~300 bp in length. In contrast, subtelomeric regions contain a mosaic of multiple

segments of homologous sequences that span ~50 kb of the telomere-proximal DNA regions of chromosome I and II. These repeat sequences include the subtelomeric elements 1 (STE1), 2 (STE2), and 3 (STE3), which are enriched in poly[dA:dT] tracts, and *tlh* genes that encode putative telomere-linked helicases (Tlhs) of the RecQ family(Wood *et al*, 2002; Kanoh *et al*, 2005; Kanoh, 2018; Oizumi *et al*, 2021) . The shelterin complex consists of Taz1 that specifically binds to duplex telomeric DNA, the G-overhang binding protein Pot1, and the four telomeric proteins Tpz1, Rap1, Poz1, and Ccq1 that link Taz1 and Pot1 through a network of protein-protein interactions(Moser & Nakamura, 2009; Dehé & Cooper, 2010) **(Figure 1A)**. As in mammals, the fission yeast shelterin complex ensure protection of telomeres, facilitate their replication and is crucial to maintain their length through telomerase recruitment. The telomerase complex includes the catalytic subunit Trt1, the regulatory subunit Est1, and the TER1 RNA(Nakamura *et al*, 1997; Beernink *et al*, 2003; Webb & Zakian, 2007). Phosphorylation of Ccq1 protein by both checkpoint $Rad3^{ATR}$ and $Tel1^{ATM}$ kinases, triggers telomerase recruitment(Moser *et al*, 2011; Yamazaki *et al*, 2012), then Tpz1 interaction with Trt1 further engages the telomerase core complex (Trt1-TER1) for the 3'-end extension (Armstrong *et al*, 2014; Hu *et al*, 2016) . Subsequently, SUMOylation of Tpz1 by the SUMO ligase Pli1 promotes recruitment of the Stn1-Ten1 complex to telomeres (Garg *et al*, 2014; Miyagawa *et al*, 2014) . Stn1-Ten1 complex negatively regulates the association of telomerase with telomeres and promotes the recruitment of the Polymerase α-Primase complex for the synthesis of the complementary strand (C-strand) (Escandell *et al*, 2019; Matmati *et al*, 2018) .

In fission yeast as in mammals, telomeres are among the most difficult regions to replicate because of the many obstacles that impede replication fork progression (Maestroni *et al*, 2017; Higa *et al*, 2017; Bonnell *et al*, 2021) . The two-dimensional gel (2D-gel) electrophoresis analysis of replicating DNA has shown that replication forks naturally slow and eventually stall as they approach telomeric chromatin (Miller *et al*, 2006). Telomere replication mostly proceeds unidirectionally from a centromere-proximal origin. For the right arm of the chromosome II (C2-R), the most active origin is located ~25 Kb away from telomeric sequences and in the majority of cells, the outward-moving fork from this origin is responsible for the replication of the entire subtelomeric region of C2-R, the C-rich leading strand being replicated by Polε while the G-rich lagging strand is replicated by Polδ (Vaurs *et al*, 2023) . Consistent with the observation that replication forks slow down and stall when approaching

chromosome ends, we have recently identified a hard-to-replicate region of the C2-R, located within STE3 and STE2 elements (named STE3-2) (Vaurs *et al*, 2023) . Recent studies have demonstrated that telomeric proteins such as Taz1, the Pot1-Tpz1-Poz1 sub-complex and the Stn1-Ten1 complex are also involved in chromosome end replication (Matmati *et al*, 2018; Vaurs *et al*, 2023; Borges *et al*, 2023). Our current model is that when forks are stalled at STE3-2, Pot1-Tpz1-Poz1 recruits Stn1-Ten1 and Polα to initiate lagging strand synthesis which counteracts active resection, thus avoiding accumulation of ssDNA. This anti-recombinogenic process prevents homologous recombination-based restart of replication fork such as Break-Induced Replication (BIR) or Recombination-Dependent Replication (RDR)(Berti *et al*, 2020; Lambert & Carr, 2013) .

Taz1 is the main component of shelterin that binds telomeric DNA duplex as a dimer, each monomer recognizing a telomeric GGTTA sequence (Cooper *et al*, 1997; Deng *et al*, 2015; Spink *et al*, 2000) . Taz1 contains a TRF domain also found in TRF1 and TRF2 (Fairall *et al*, 2001) , a dimerization (Dim) domain(Deng *et al*, 2015), a Rap1 binding domain(Miller *et al*, 2005), a MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)-inhibition (Min) domain (Khayat *et al*, 2021) and the Myb domain that recognizes double-stranded telomere sequence(Cooper *et al*, 1997; Spink *et al*, 2000) **(Figure 1B)**. Dimerization and DNA-binding capacity are essential for Taz1 to function since mutations in the Dim or the Myb domains confer many features of the *taz1*Δ phenotype *in vivo* (Tomita & Cooper, 2007; Deng *et al*, 2015) . Indeed, loss of Taz1 results in several telomere defects including dramatic elongation of the telomeric tracts (Cooper *et al*, 1997) , (Cooper et al., 1997), inappropriate chromosome end-fusions in G1(Ferreira & Cooper, 2001) , and severe meiotic defects(Tomita & Cooper, 2007). Taz1 also plays a prominent role in the efficient replication fork progression through terminal DNA including subtelomeres and telomeres (Miller *et al*, 2006; Vaurs *et al*, 2023) . Stalling of replication in *taz1*Δ cells is thought to lead to several outcomes including rapid telomere loss in the absence of telomerase and a high rate of telomeric homologous recombination (HR) (Miller *et al*, 2006; Rog *et al*, 2010; Dehé *et al*, 2012). Moreover, lethal chromosomal entanglements seen in *taz1*Δ cells at cold temperatures appear to stem from aberrant processing of defective telomeric replication forks (Miller & Cooper, 2003; Rog *et al*, 2010). Despite these numerous studies, the precise role of Taz1 in replication process of telomeric and subtelomeric regions is still unknown and importantly Taz1 seems to act independently of Pot1-Tpz1-Poz1 / Stn1-Ten1/ Polα pathway

to maintain STE elements (Vaurs *et al*, 2023; Matmati *et al*, 2018). Tandem repeats of GGTTA sequence that are potential non-telomeric binding sites for Taz1 (Zofall *et al*, 2016; Toteva *et al*, 2017) are found in STE3 and likely account for the detection of Taz1 binding by ChIP at subtelomeres (Kanoh *et al*, 2005; Vaurs *et al*, 2023) .

To gain insight into replication of terminal DNA, we investigated the function of Taz1 and the importance of its regulation. First, we showed that Taz1 Dim domain is phosphorylated in Rad3$^{ATR}$-dependent manner specifically in late S phase. Second, we found that this phosphorylation controls capacity of Taz1 to dimerize and to efficiently bind to terminal DNA. Third, we demonstrated that of recruitment of Taz1 is cell-cycle controlled, occurs during S phase and is concomitant to the passage of Polα. Our results demonstrated that Taz1 processes lagging-strand synthesis at terminal DNA.

# Results

## Rad3$^{ATR}$-dependent phosphorylation of Taz1 *in vivo*

To determine whether Taz1 protein is regulated and undergoes post-translational modifications through the cell cycle, we synchronized *S. pombe* cells expressing Taz1-HA by using the *cdc25-22* mutant. Cells were released from the G2/M block and harvested at different time points after the shift to permissive temperature. Cell-cycle progression was followed by septum index and Taz1-HA was visualized by Western blot. As previously described(Spink *et al*, 2000), two distinct isoforms of Taz1 protein were distinguished by Western blot **(Figure 1C)**. Remarkably, at 110 min that corresponds to the end of S phase, a distinct mobility shift of Taz1-HA was observed by SDS-PAGE indicating that Taz1 is post-translationally modified. We next wondered if this cell cycle-dependent shift of Taz1 corresponds to phosphorylation. Taz1-HA was immuno-precipitated and samples were subjected to phosphatase treatment prior SDS-PAGE analysis **(Figure 1D)**. Mobility shift of Taz1-HA was again distinctly detectable at 110 min and also at130 min, but not visible after phosphatase treatment demonstrating that Taz1 undergoes cell cycle-dependent phosphorylation. Rad3$^{ATR}$ is the main kinase involved in telomere length control through the phosphorylation of Ccq1. Thus, we assessed the phosphorylation status of Taz1 in *rad3*D cells. Strikingly, phosphorylation shift observed at 110 min was abolished in absence of Rad3$^{ATR}$ **(Figure 1C)**. Taken together, these data demonstrated that Taz1 is phosphorylated in a Rad3$^{ATR}$ -dependent manner in late S phase.

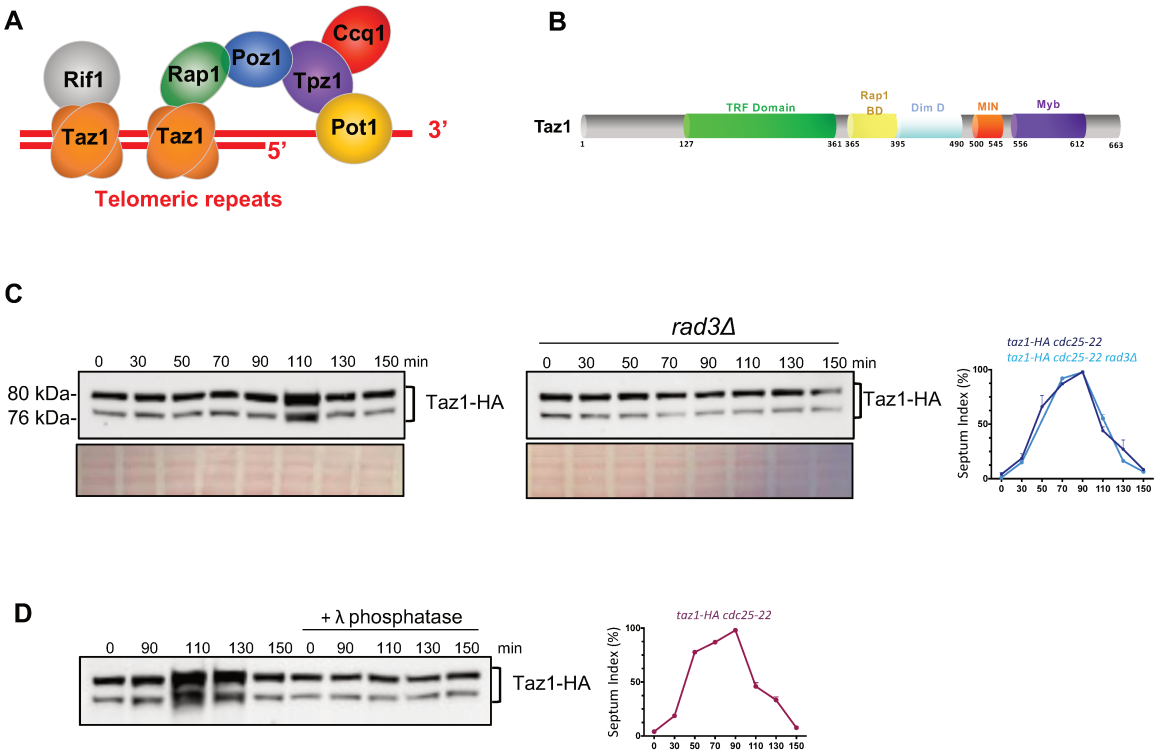



**Figure 1 : Taz1 is phosphorylated by Rad3$^{ATR}$ in late S phase.**

(**A**) Schematic representation of the fission yeast shelterin. (**B**) Schematic representation of Taz1 protein: the TRF (Telomeric Repeat binding Factor) domain, the Rap1 binding domain, the dimerization (Dim) domain, the MRN-inhibition (MIN) domain and the canonical Myb DNA-binding domain are shown. (**C**) Western blot detection of HA-tagged Taz1 in WT and *rad3*D genetic background. Samples from *cdc25-22* cells producing HA-tagged Taz1 blocked at 36 °C for 4 h before release at 25 °C. Total proteins were extracted at each indicated time point of the time course and analyzed by Western blot. Ponceau-S staining of the membrane was used as a loading control. Septation index measured for each strain is shown. (**D**) Western blot detection of immunoprecipitated Taz1-HA from blocked and released *cdc25-22* cells. Cell lysates were treated with l-phosphatase then subjected to Western blot. Ponceau-S staining of the membrane was used as a loading control. Septation index measured is shown.

.

## Rad3 phosphorylates the dimerization domain of Taz1 *in vitro*

Taz1 contains in total eight putative $Rad3^{ATR}$ consensus phosphorylation sites (S80Q, S315Q, S375Q, S455Q, S476Q, S547Q, S574Q, T600Q) **(Figure S1A)**. To determine whether Taz1 is a direct substrate of $Rad3^{ATR}$ we performed *in vitro* kinase assays with recombinant Taz1 fragments and $Rad3^{ATR}$ as previously described **(Figure 2A)**(Giaccherini *et al*, 2022). Recombinant fragments of Taz1 fused to 6His-MBP tag were produced in *E. coli* and affinity purified on $Ni^{++}$ and amylose resins **(Figure S1B)**. Recombinant GFP-$Rad3^{ATR}$ was instead transiently overproduced in yeast cells exposed to bleomycin to induce DNA damage and activate $Rad3^{ATR}$. GFP pull-down was performed with extracts from *chk1*Δ *cds1*Δ *rad3*Δ mutant strain to eliminate the possibility of endogenous checkpoint kinases co-purifying with GFP-$Rad3^{ATR}$. As shown in figure 2B (lane 2 and 3), C-terminal part of Taz1 (Cter-Taz1 and CTer-Taz1- ΔMyb) but not the N-terminal part was phosphorylated by GFP-$Rad3^{ATR}$. To determine which functional domain in the Cter-Taz1 was phosphorylated we produced recombinant Rap1 binding domain (Rap1-BD), dimerization domain (Dim) and the MRN-Inhibition domain (MIN) of Taz1. Figure 2B (lane 6) shows that Taz1-Dim was phosphorylated by GFP-$Rad3^{ATR}$. Taz1-Dim contains two consensus phosphorylation sites S455Q and S476Q **(Figure S1)**. To explore which SQ sites were important for phosphorylation, we tested the impact of mutating serine 455, serine 476 and both into alanine in Taz1-Dim: S455A, S476A and S2A, respectively. Phosphorylation of Taz1-Dim was significantly reduced of about 50% by S455A, S476A mutations but not fully reduced even with the combination of both mutations (S2A) **(Figure 2C)**. S455 and S476 are located in the minimal core of dimerization domain of Taz1 (Deng lei 2015). $S^{455}$ and $S^{476}$ juxtapose to S454 and S475, respectively, two residues know to be contact residues of dimerization surface (Lei et al., 2015). The ability of Taz1-Dim to dimerize was confirmed by yeast two-hybrids (Y2H) **(Figure 2D)**. We further explored the capacity of phospho- and phosphomimetic-mutants of Taz1-Dim to interact by Y2H, Taz1-Dim-S2A and Taz1-Dim-S2D respectively. Figure 2D showed that phosphomimetic-mutations abolished the dimerization capacity of Taz1-Dim while phosphor-mutations did not. Single phosphomimetic-mutation S476D had predominant effect on capacity of Taz1-Dim to dimerize compare to S455D. Our data demonstrate that $Rad3^{ATR}$ phosphorylates Taz1 dimerization domain and that this phosphorylation may modulate the ability of Taz1 to dimerize.

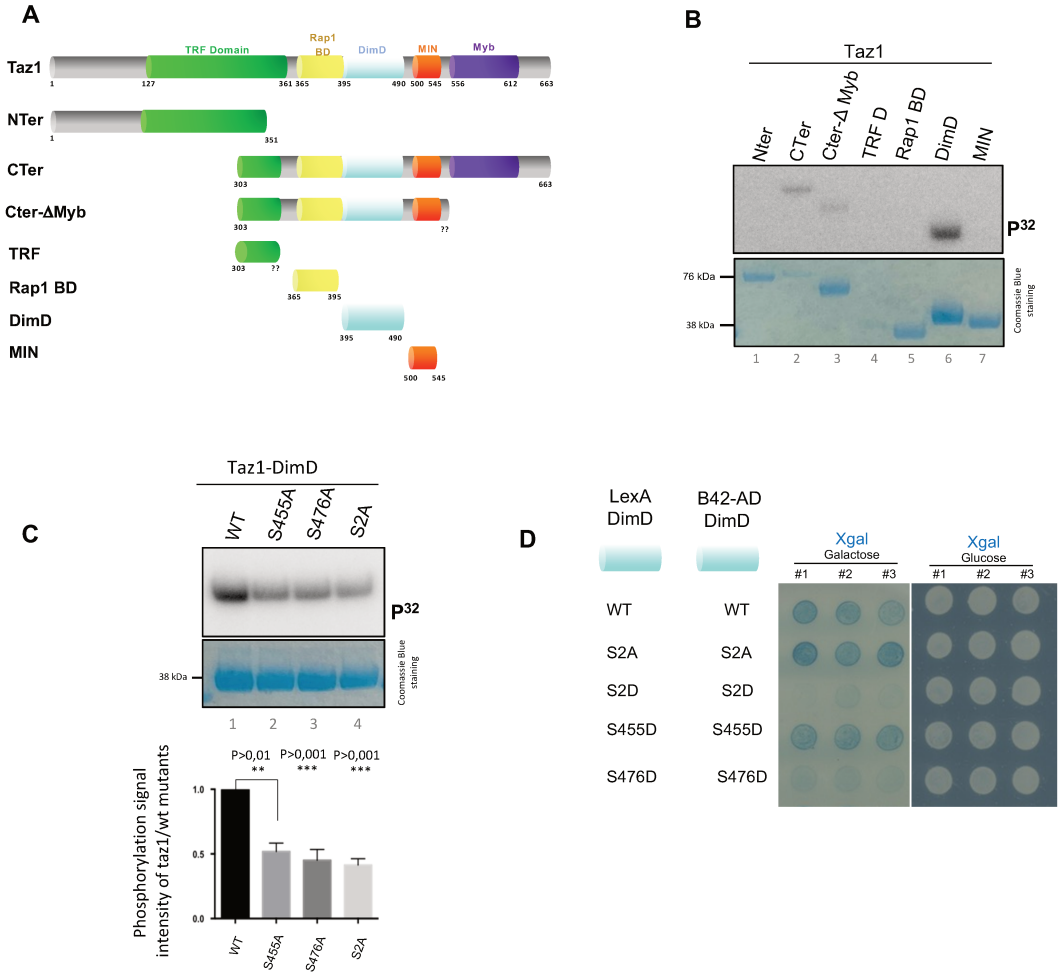



**Figure 2 : Rad3$^{ATR}$ directly phosphorylates the dimerization domain of Taz1.**

(**A**) Schematic representation of Taz1 protein and the truncated recombinant fragments of Taz1 that were produced and purified from bacterial cultures (purification scheme is depicted on **figure S1**). (**B**) Representative autoradiography of $^{32}$P labeled Taz1 fragments. Rad3$^{ATR}$ *in vitro* kinase assays were carried out on Taz1 recombinant fragments. Samples were loaded on a 3–8% Nupage Tris-Acetate polyacrylamide gel. (**C**) Representative autoradiography of $^{32}$P labeled dimerization domain of Taz1 (Taz1-DimD). Rad3$^{ATR}$ *in vitro* kinase assays were carried out on WT, S455A, S476A and the double mutant S2A (S455A, S476A) recombinant fragments. Relative band intensity of phosphorylated dimerization domain of Taz1 (n=3). Statistical significance is measured using a one-way ANOVA. (**D**) Taz1 dimerization analyzed by yeast two-hybrid assay (Y2H). Taz1-DimD containing S455D, S476D mutations and the double mutant S2D and S2A were used as bait to test their capacity to dimerize. Three clones of each combination were grown and spotted on selective medium (-TRP and -HIS) and tested for activation of *Lac*Z reporter. Image is displayed on black and white background to visualize the blue color on galactose medium. Glucose medium complemented with Xgal is used as negative control.

## *In vivo* analysis of phospho- and phosphomimetic-mutants of Taz1

To gain insight into the function of phosphorylation of Taz1 *in vivo*, we introduced phospho- and phosphomimetic-point mutations into chromosomally encoded Taz1. We generated *taz1-S455A, taz1-S476A, taz1-S2A, taz1-S455D, taz1-S476D* and *taz1-S2D* strains. These mutants were spotted on yeast extract base medium (YES) plates at 18, 25, 32, and 36°C **(Figure 3A)**. We did not observe any growth defect of mutants at any temperatures in contrast to *taz1D* strain that displayed cold-sensitivity when grown at 18°C. Next, we investigated the effect of phospho- and phosphomimetic-mutations on telomere length regulation. After several streaks on plate, genomic DNA was extracted and telomere status was assessed by southern blotting **(Figure 3B)**. Phospho-mutants *taz1-S455A, taz1-S476A* and *taz1-S2A* cells displayed a telomere length similar to WT strain while a slight increase was observed in phosphomimetic mutants, particularly visible in *taz1-S476D* and *taz1-S2D* strains. These observations indicate that Rad3$^{ATR}$-dependent phosphorylation has a minor effect on telomere length regulation, in striking contrast with mutations that entirely abolish the dimerization of Taz1 (L431R and L445R) that lead to a strong elongation of telomeres mimicking the phenotype of *taz1D* cells (Matmati *et al*, 2020, 2018) .

Genetic analysis established the necessity of factors such as Stn1-Ten1 complex and Rad51 to sustain cell growth and telomere maintenance in absence of Taz1 (Matmati *et al*, 2020, 2018). Thus, we combined *taz1-S2A* and *taz1-S2D* with the thermosensitive allele of *stn1-226* and the *rad51*D mutant. *taz1-S2A* and *taz1-S2D* mutants did not exacerbated the viability of *stn1-226* at 36°C **(Figure 3C)** nor further modified the length of its telomeres **(Figure 3D)**. *taz1-S2A rad51*D and *taz1-S2D rad51*D double mutant did not exhibit growth defect at any temperature **(Figure 3E)**, however we observed a significant increase in size and heterogeneity of telomeres in *taz1-S2D rad51*D mutant which was not detected in *taz1-S2A rad51*D cells **(Figure 3F)**. This indicate that Rad51 fulfills important functions when Taz1 dissociates to DNA via Rad3$^{ATR}$-dependent phosphorylation. Telomere elongation is likely due to telomerase activity since HR pathway is deficient in these strains, underscoring the complex interplay between Taz1, Rad51 and telomerase to maintain telomere integrity in fission yeast.

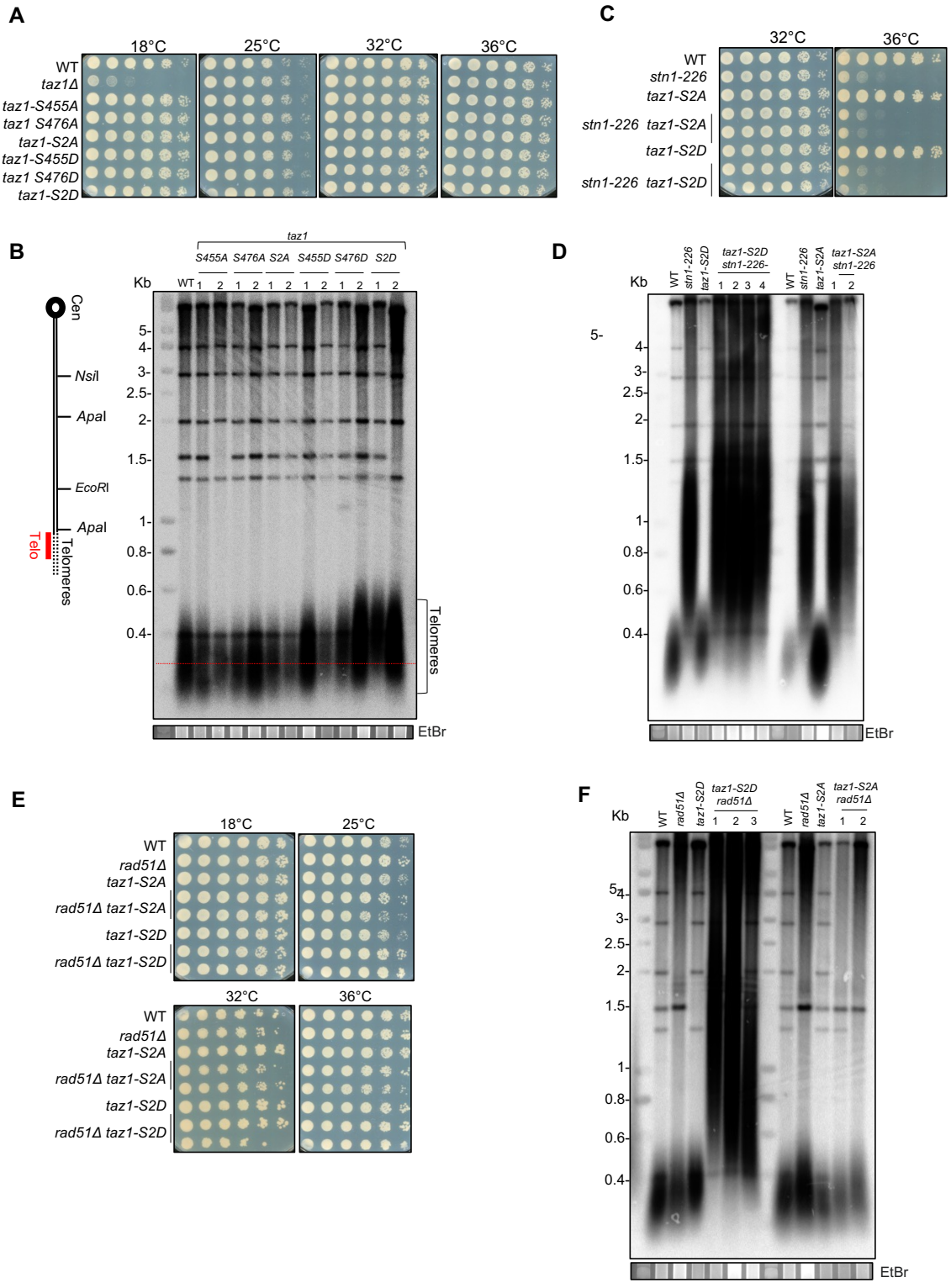



**Figure 3 : *In vivo* analysis of phospho- and phosphomimetic-mutants of Taz1.**

(**A**, **C** & **E**) Analysis of viability of the indicated strains at different temperatures. Cells were grown at 25°C, then serially diluted (fivefold), and plated on YES-rich medium. (**B**, **D** & **F**) Genomic DNA from cells with the indicated genotype was prepared, digested with *Apa*I, and analyzed by Southern blotting with a radiolabeled telomeric DNA probe.

## Phosphomimetic-mutations of Taz1 alter its binding to terminal DNA

We showed that Rad3$^{ATR}$-dependent phosphorylation of Taz1 may modulate the ability of Taz1 to dimerize **(Figure 2D)**. Since dimerization of Taz1 is required for its association to telomeric DNA (Deng *et al*, 2015) , we examined whether Taz1 phosphorylation is also crucial for its association to telomeric (Telo; -0.2 kb) and subtelomeric (STE3-2; -3.7 kb) DNA by chromatin immuno-precipitation (ChIP) assay **(Figure 4A)**. Telomere DNA was precipitated from cell extracts in a GFP-tag-dependent manner followed by quantitative PCR analysis **(Figure 4B)**. ChIP experiments demonstrated that recruitment of Taz1 is strongly impacted in *taz1-S2D-GFP* cells compare to *taz1-GFP* at both telomeric and subtelomeric loci, showing that Rad3$^{ATR}$-dependent phosphorylation of Taz1 controls binding capacity of Taz1 through its dimerization. Recruitment of telomeric proteins to telomeres are known to be controlled in cell cycle-dependent manner (Moser *et al*, 2009; Chang *et al*, 2013) .Therefore, we decided to characterize the cell cycle specific changes of Taz1 and Taz1-S2D recruitment at DNA ends by ChIP. As described above, we used *cdc25-22* block and release to synchronize the cells. We confirmed that Taz1 is constitutively bound to telomeres trough the different phases of the cell cycle and we found that Taz1 is enriched in late S phase (110 min) **(Figure 4C)**. Noteworthy, the peak of Taz1 association to telomeres is concomitant to its phosphorylation **(Figure 1C)**. Taz1-S2D was also found to be enriched at telomeres in late S phase, however the basal level of Taz1 bound to telomeres was reduced throughout the cell cycle **(Figure 4C)**, confirming ChIP data with asynchronized cells. We previously showed that Taz1 was also enriched to the STE3-2 subtelomeric region (Vaurs *et al*, 2023) , therefore we examined the association of Taz1 and Taz1-S2D to STE3-2 in synchronized cells **(Figure 4D)**. We observed that Taz1 was constitutively bound to STE3-2 and was enriched at this locus in S phase (70 min). In contrast, we found that Taz1-S2D was significantly poorly enriched at STE3-2 in S phase and that its basal level was reduced throughout the cell cycle.

Taken together, our ChIP data showed that the recruitment of Taz1 to telomeres and subtelomeres is controlled in a cell cycle-dependent manner, Taz1 being recruited at STE3-2 locus in S phase (70 min) and at telomeres in late S phase (110 min). Our results also indicated that Rad3$^{ATR}$-dependent phosphorylation of Taz1 perturbs dynamic of association of Taz1 at both telomeric and subtelomeric regions, substantially at STE3-2 region in S phase.

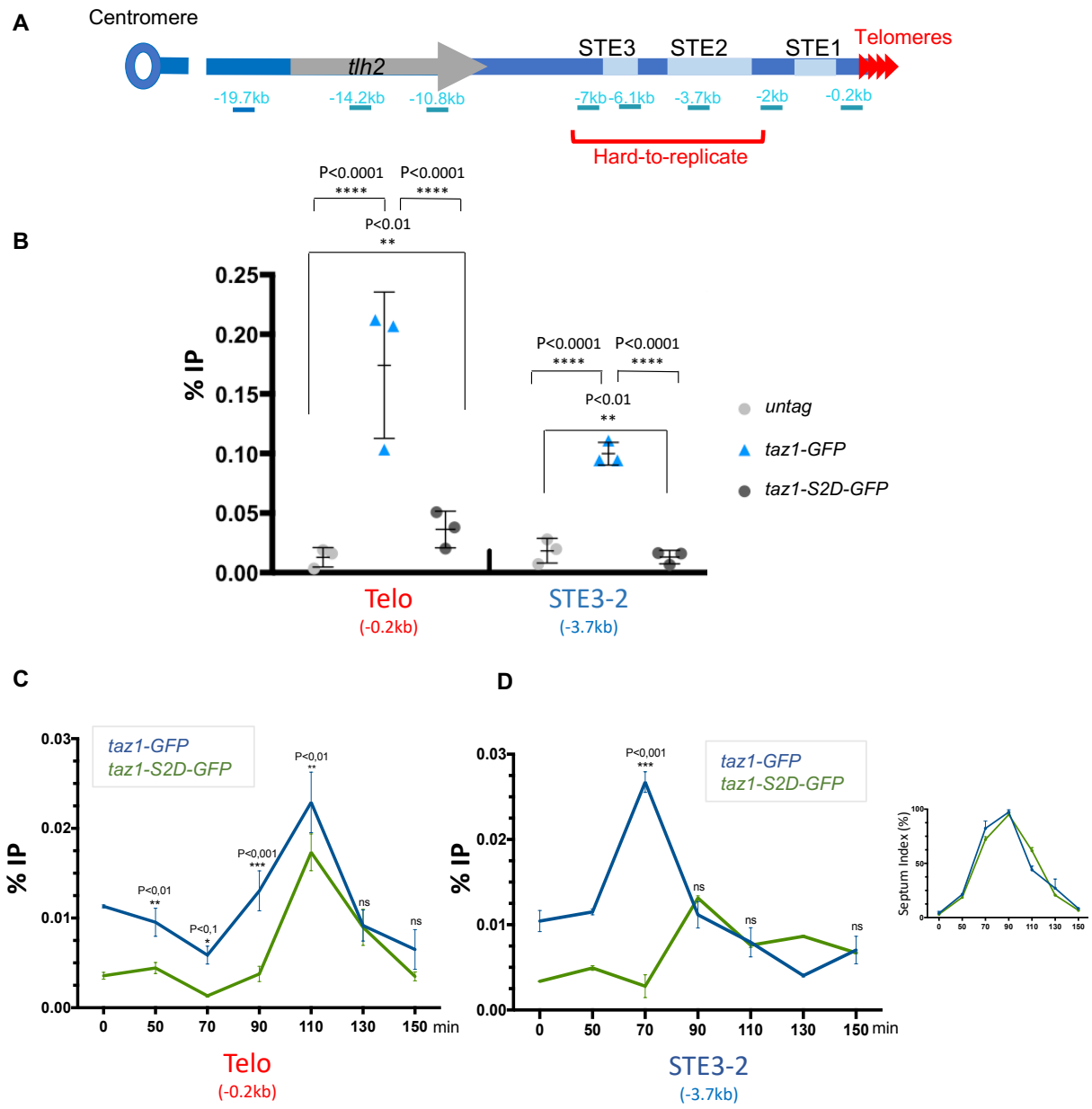



**Figure 4 : Phosphomimetic-mutations of Taz1 alter its binding to terminal DNA**

(**A**) Detailed map of the chromosome 2 right end (C2-R), including *tlh2* and subtelomeric elements (STE). Regions used to monitor the binding of proteins of interest by ChIP/qPCR ar marked. (B) ChIP analysis of Taz1-GFP and Taz1-S2D-GFP at telomeres and STE3-2 region analyzed by qPCR. Error bars show the SEM, n=3.

p values are calculated with the Mann-Whitney test. (C & D) ChIP analysis of Taz1-GFP and Taz1-S2D-GFP at telomeres and STE3-2 region analyzed by qPCR through the cell cycle. Samples from *cdc25-22* cells blocked at 36 °C for 4 h before release at 25 °C were collected at different time point (minutes) as indicated. Error bars show the SEM, n ≥3. p values are calculated with the Mann-Whitney test. Septation index measured is shown.

## Taz1 association to terminal DNA coincides to lagging-strand synthesis

Taz1 is known to be important for replication of chromosome ends (Miller *et al*, 2006), therefore we wondered if Taz1 recruitment at subtelomeres and telomeres coincides with the passage of the replication fork. Using *cdc25-22* block and release to synchronize the cells, we performed ChIP experiments of Pol1-FLAG (Polα) and Pol2-FLAG (Polε) that replicate the lagging and the leading strand respectively, then we mapped by qPCR the associations of both polymerases and Taz1 to terminal DNA, up to ~20 kb from telomeric repeated sequences including STE3-2 region. In most of the cells, replication fork progression is unidirectional with forks moving ~25 kb toward the telomere through *tlh2* gene, the STE regions, and the telomeric repeats (Vaurs *et al*, 2023) . Figure 5 shows the kinetic of association of Polα, Polε and Taz1 along the 20 kb telomere-proximal region as function of time. Polε association was detected quite early (30 min) at -10 kb from telomeres then progressed rapidly through STE3, STE2 and STE1 regions (50-70 min) **(Figure 5A)**. At 90 min, Polε reached the telomeres corroborating our previous observations (Audry et al., 2015). With regard to lagging strand, Polα association to -10 kb position was visible later than Polε at 50 min, then progressed STE3 and STE2 regions (70 min) **(Figure 5B)**. In line with our prior results (Audry *et al*, 2015), Polα was detected in the vicinity of telomeric tracts at 110 min.

First, these data were consistent with the delayed replication of the lagging strand versus leading strand previously observed at telomeres (Moser *et al*, 2009; Audry *et al*, 2015), but they also revealed that initiation of terminal DNA occurs early during the cell cycle. Second, we were unable to detect ChIP signal at *tlh2* locus (-19.7 and -14.2 kb positions) suggesting that replication forks progress efficiently through this region, but approaching STE regions the enrichment of ChIP signal for Polα and Polε indicate that replication forks slowed down and that their progression was hindered. This is in line with our previous observation showing that STE3-2 locus is a hard-to-replicate region (Vaurs *et al*, 2023) . Thus, we concluded that replication along the 10 kb telomere-proximal subtelomeric region is challenging for the cells and provoke the uncoupling of the leading- and lagging-strand polymerases.

Having established the dynamic of replication of subtelomeres, we next analyzed the recruitment of Taz1 along the ~20 kb telomere-proximal region by exploiting ChIP experiments from figure 4B-C, although the 30 min time point was missing. Enrichment of Taz1 was first detected in S phase at 70 min at position -6.1 kb and -3.7 kb positions (STE3-2 regions), then

persisted until the late S phase (110 min) **(Figure 5C)**. A second peak of association was detected at 110 min at telomeres (-0.2 kb position). At 130 min, the association of Taz1 was back to its basal level identical to the 0 min time point that correspond to G2 phase. Strikingly, Taz1 temporal association pattern was nearly superimposed to Polα profile along the 10 kb telomere-proximal region. First, we concluded that Taz1 recruitment is concomitant to the passage of the fork and second that Taz1 participates to the lagging-strand synthesis. Persistence of Taz1 signal at STE3-2 region between 70 to 110 min may suggest that Taz1 processes late events of lagging-strand synthesis.

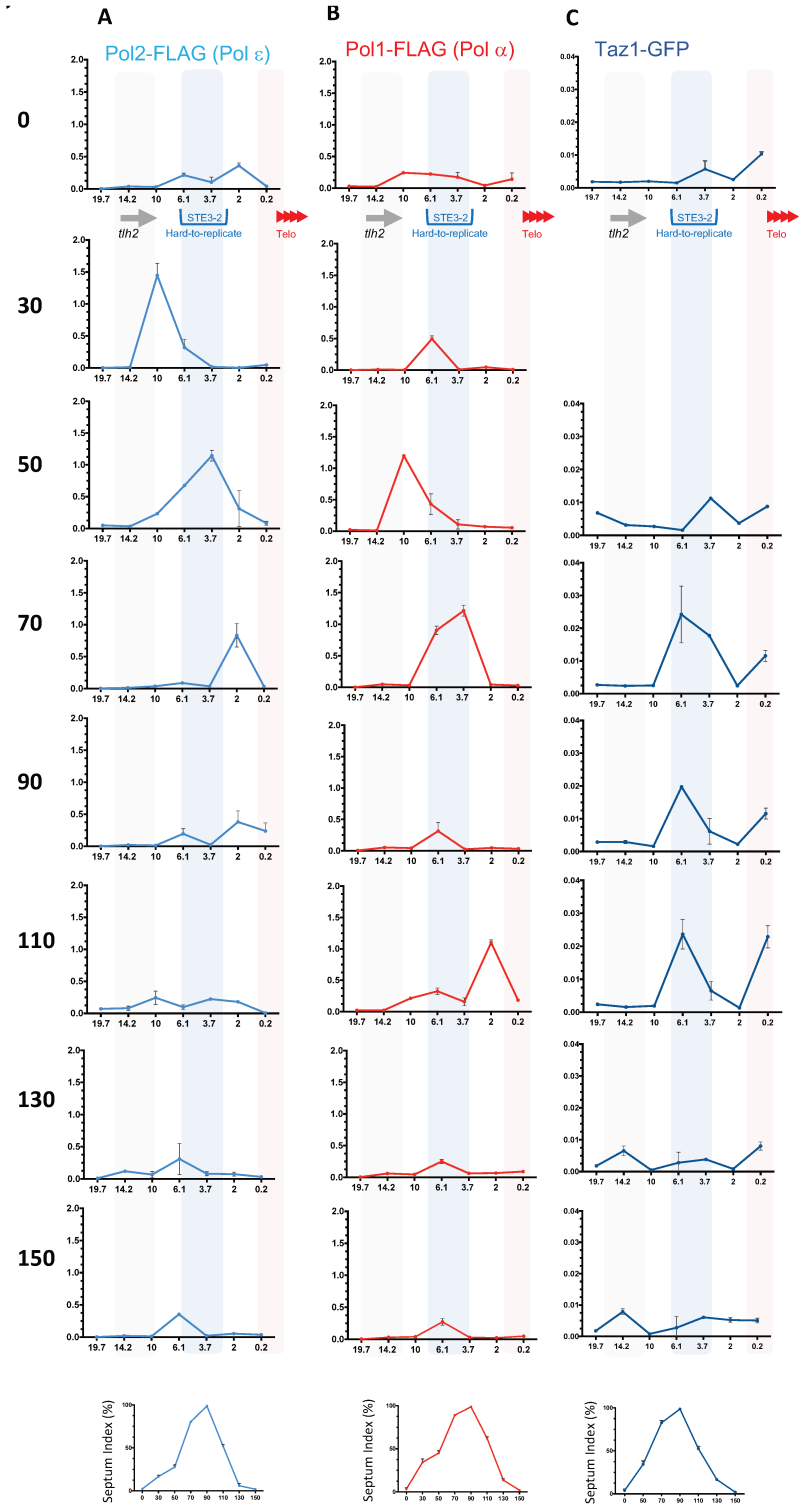



**Figure 5 : Taz1 association to terminal DNA coincides to lagging-strand synthesis**

ChIP of Pol2-FLAG (Polε) (**A**), Pol1-FLAG (Polα) (**B**), and Taz1-GFP (**C**) at the subtelomere C2-R analyzed by qPCR through the cell cycle. Samples from *cdc25-22* cells blocked at 36 °C for 4 h before release at 25 °C were collected at different time point (minutes) as indicated. For (C), ChIP from figure 4 (C & D) were further analyzed at different locations. Error bars show the SEM, n ≥3. Septation index measured is shown at the botom.

## Taz1 participates to the lagging-strand processing

Very few Taz1 partners have been identified, with the exception of Rap1 and Rif1. To gain insight in Taz1 function, we performed a proximity biotin labelling-based mass spectrometry method, TurboID to identify Taz1 associated proteins (Branon et al., 2018). TurboID utilizes a mutant version of the *E. coli* BirA biotin ligase (TbID) that catalyzes biotin intobiotinoyl-5'-AMP, which subsequently covalently attaches to proteins within close proximity (Choi-Rhee et al., 2004). Taz1-BirATbID and WT cells were synchronized in S phase using *cdc25-22* block and release then purification of biotin tagged proteins by streptavidin affinity and mass spectrometry analysis was performed. Proteins that were enriched with statistical significance in comparison to no TurboID tag were identified for 0-, 70- and 110-min time points **(Figure 7)**. As expected, Taz1, Rap1 and Rif1 were identified as hits with a large increase in abundance. A number of additional proteins were also identified as being significantly enriched in the Taz1-BirATbID cells, and thus predicted to be in close proximity to Taz1 protein. Among them, we found Pol3, the catalytic subunit of Polδ, and Cdc17 (Lig1), the ligase that joins the Okazaki fragments, both factors being involved in the lagging-strand processing. These results are in line with the observation that recruitment of Taz1 to terminal DNA coincides with the lagging-strand synthesis.

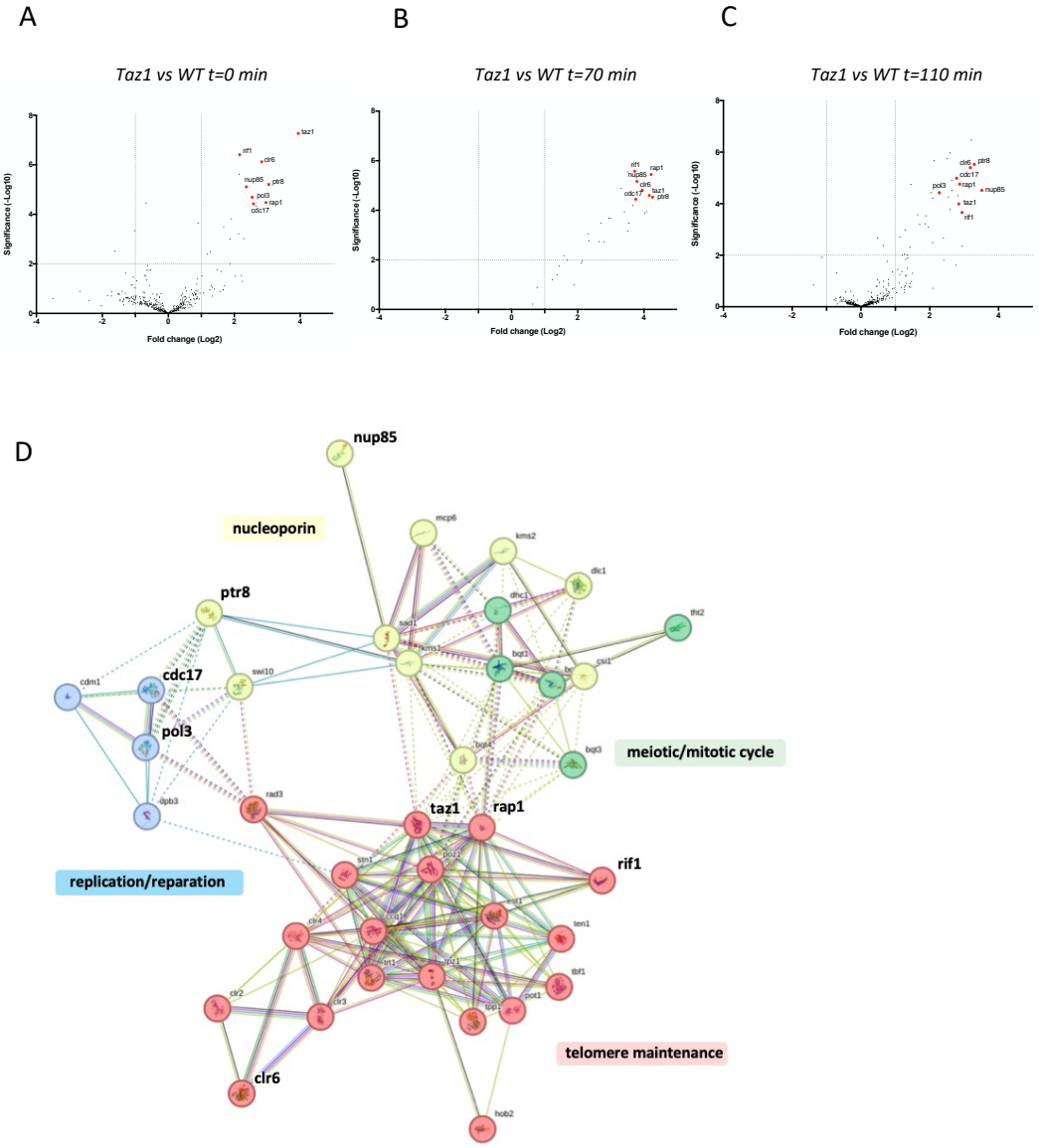



**Figure 6 :** Proximity biotin labelling-based assay and mass spectrometry analysis

(**A**) Volcano plot of TurboID results (n=3) after streptavidin-biotin affinity purification of biotinylated proteins from *taz1-BirATbID cdc25-22* and *taz1+ cdc25-22* cell extracts. Samples from *cdc25-22* cells blocked at 36 °C for 4 h before release at 25 °C were collected at three time points (0, 70 and 110 min). The x-axis represents the logarithm to base 2 of the change in abundance (Log2 fold change), while the y-axis indicates statistical significance expressed as -Log10 (p-value) from Student's t test. Proteins of interest are highlighted. Both axes are presented in logarithmic scale. n=3 independent experiments. (**B**) Taz1 protein interaction network generated by the String tool (https://string-db.org/).

# Material and Methods

## Strains and growth conditions

The *S. pombe* strains used in this study are derivatives of the standard 972h- strain. Unless stated otherwise, the strains were cultured under standard conditions in YES (Yeast Extract with Supplements) at 32°C. *S. pombe* strains used in this work are listed in Table S1. Diploid strains were sporulated or haploid strains were mated and sporulated on ME plates prior to dissection, then the genotype was verified following the genetic markers or by PCR (see Table S2). Point mutants were obtained by genome editing (Rodríguez-López *et al*, 2016). Plasmids used in this work are listed in Table S3.

## Cell Synchronization

Cells carrying the temperature-sensitive *cdc25-22* allele were grown in exponential phase at a permissive temperature of 25°C ($OD_{600}$nm = 0.2), then shifted to a restrictive temperature of 36°C for 4 hours to arrest the cell cycle in G2 phase ($OD_{600}$nm = 0.4). Upon release to the permissive temperature (25°C), the cells synchronously re-entered the cell cycle. Samples were collected and processed every 20 minutes. Progression into S phase was monitored microscopically by counting cells with septa, detected using calcofluor (Sigma Aldrich) staining, which correlates with S phase entry.

## Chromatin immunoprecipitation

Cells were grown in 100 ml cultures (=$2.10^9$ cells) in YES medium at 32°C or collected after synchronization at $OD_{600}$nm = 0.8. They were crosslinked with 1% formaldehyde (Sigma Aldrich) at room temperature for 15 minutes with agitation. Glycine was added to a final concentration of 0.125 M to stop cross-linking. Cells were pelleted, washed twice with cold PBS, and resuspended in low-salt lysis buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 2 mM PMSF, protease inhibitors) and lysed mechanically with glass beads using 4 cycles of 20 seconds at a speed of 6.5 in a bead beater. Whole-cell extracts were sonicated for 10 minutes (30s ON, 30s OFF) with a Bioruptor Pico sonication device (Diagenode). The sonicated lysates were cleared by centrifugation and

standardized. 1.5 µL anti-FLAG (F3165-.1MG, Sigma), or 3 µL anti-GFP (A11122, Invitrogen), were added and incubated overnight at 4°C. Then, 25 µL of protein G magnetic beads (Dynabeads protein G, Invitrogen) were added and incubated for 3 hours at 4°C. The beads were washed twice with ice-cold low-salt lysis buffer, twice with ice-cold high-salt lysis buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate), twice with ice-cold LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA), and once with ice-cold TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). The beads were then eluted in TES buffer (TE with 1% SDS) by incubating for 15 minutes at 65°C. Samples were incubated 12 h at 65°C and then treated with Proteinase K for 4 h at 37°C. DNA was purified using innuPREP PCRpure purification columns (Innuscreen GmbH, iST), and the samples were analyzed by qPCR (see Table S2).

## qPCR-Based Quantification and Statistical Evaluation for ChIP

Input samples were initially diluted 1:40. The reaction mix was prepared by combining 2 µL of template DNA with 5 µL of TB Green Premix Ex Taq II (Takara), and primers were added to achieve a final concentration of 0.4 µM. Each sample was run in triplicate on a 96-well PCR plate using a C1000 Touch Thermal Cycler (CFX96, Bio-Rad). The thermal cycling conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 30 seconds, followed by 55 cycles of 95°C for 10 seconds, a primer-specific annealing temperature for 10 seconds (refer to the appendix table for specific temperatures), and 72°C for 10 seconds. A final extension step at 72°C for 5 minutes concluded the program. The percentage of immunoprecipitation (% IP) was calculated using the formula:

$$(\%\ \mathrm{IP}) = \left(\frac{1}{E^{CT^{IP}} - E^{CT^{IT}} \times DF}\right) \times$$

E represents qPCR efficiency, CT_IP and CT_IT are the mean of triplicate CT values for immunoprecipitated and input samples respectively, and DF is the dilution factor of input samples. Statistical analysis was performed using Prism software, employing unpaired two-tailed t-tests for comparisons. All statistical parameters were reported in the figures and their corresponding legends.

## Protein extraction and immunoblotting

Cells pellets (~$2.10^8$ cells) cells were suspended in 20% TCA and lysed mechanically using glass beads (Sigma). After centrifugation, the TCA pellet was resuspended in SDS-PAGE loading buffer (Invitrogen) supplemented with Tris-base. Protein extracts were immediately resolved on 7.5% acrylamide gels. Samples were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Ponceau-S staining of the membrane was used as a loading control. The membrane was blocked with 5% milk in PBS-Tween 0.1% and incubated with the HA-Tag Monoclonal Antibody (F-7 sc-7392, Santa Cruz). Immunoblots were developed using the enhanced chemiluminescence procedure (ECL kit, Perkin Elmer).

## Immunoprecipitation and phosphatase treatment

Cells pellets (~$1.10^9$ cells) were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH=8; 10% Glycerol; 150 mM NaCl; 50 mM NaF; 0.2% NP40; 1 mM PMSF; 0.1 mM NaV supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche, EDTA-free)). Cell pellets were disrupted using a Ball Mill (Retsch) in the presence of liquid nitrogen. The resulting powder was resuspended in 2 volumes by weight of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 50 mM ß-glycerophosphate (Sigma), 2 mM PMSF, 1 mM DTT, and a protease inhibitor cocktail. Lysates were clarified by centrifugation and incubated with 25 µl of protein G magnetic beads (Dynabeads protein G, Invitrogen) for 2 h at 4°C. The beads were then washed 3 times in lysis buffer, then 3 times in wash buffer (10 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl 0.5 mM EDTA, 0.1% NP40 10% Glycerol) and resuspended 100 µL in of wash buffer. Samples were treated with or without 0.25 µl of lambda phosphatase (New England Biolabs; P0753S), according to the manufacturer's protocol, in the presence of 1 µl of 1X NEB buffer and 1 µl of MnCl2 in a final volume of 10 µl and reactions were stopped by the addition of sample buffer. After incubation for 1 h at 30°C, 50 µl of NuPAGE LDS 4X sample buffer (Thermo Fisher, NP0008) was added and the proteins were denatured for 5 min at 95°C). Samples were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membrane was blocked with 5% milk in PBS-Tween 0.1% and incubated with the HA-Tag Monoclonal Antibody (F-7 sc-7392, Santa Cruz). Immunoblots were developed using the enhanced chemiluminescence procedure (ECL kit, Perkin Elmer).

## Telomere length analysis by Southern blotting

Genomic DNA was extracted from $2\times10^8$ cells and digested with *Apa*I restriction enzymes (New England Biolabs). The digested DNA was separated on 1.2% agarose gel and blotted onto a Hybond-XL membrane (Amersham, cytiva). After transfer, the membrane was UV cross-linked and hybridized with telo probe (Rog *et al*, 2010) . DNA probe was labeled with $32^P$ by random priming using the Klenow fragment exonuclease (New England Biolabs) in the presence of [$\alpha$-$^{32}$P] dCTP (PerkinElmer). Hybridizations were carried out in Church buffer at 60°C. Radioactive signals were visualized using an Amersham Typhoon (cytiva).

## Yeast two-hybrid assay

Yeast strains were derived from EGY48 (*MATα, ura3, his3, trp1, LexA$_{op(x6)}$-LEU2)* containing the pSH18-34 (*LexA$_{op(x8)}$-LacZ, URA3, amp$^r$)* plasmid. The fission yeast cDNA of interest were cloned into the pJG4-5 (*B42-AD, TRP1*, *amp$^r$)* and the pEG202 (*LexA$_{(1-202)}$DNA-BD, HIS3*, *amp$^r$)* and co-transformed into EGY48 + pSH18-34 strain and plated onto -URA-TRP-HIS medium. To monitor protein interaction clones were spotted onto 3% Gal-URA-TRP-HIS-Xgal (80 □g/ml) plates. Plates were incubated at 30°C for 2-4 days.

## Recombinant MBP-taz1-6-His production and purification

Taz1 cDNA was subcloned into the pMBP-parallel plasmid using the In-Fusion (Takara) cloning system. A 6-His tag was inserted in-frame with the Taz1 ORF at the C-terminus of the protein. The plasmids were co-transformed into *Rosetta™ (DE3) pLysS* cells. Expression of MBP-Taz1-6His fragments was induced by growing the cells in auto-inducing media (Formedium) at 37°C. Cells were harvested at 4°C, resuspended in 1X PBS, and stored at -20°C. 2X lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20% glycerol, 0.2% NP-40, 2 mM PMSF, 2 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail (Roche, EDTA-free), 10 mg/mL lysozyme, 20 mM imidazole) was added to the cell pellets, and the mixture was incubated for 20 minutes at 4°C. The lysate was clarified by centrifugation and incubated with Ni2+ agarose beads (Qiagen) for 2 hours at 4°C. The beads were washed with 5 volumes of 1X lysis buffer and then eluted with 1X lysis buffer supplemented with 250 mM imidazole. The eluted complexes were incubated

with amylose beads (New England Biolabs) for 2 hours at 4°C. The beads were washed three times with 1X lysis buffer and twice with kinase buffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl2, 10 mM MnCl2, 2% glycerol, 0.1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 50 mM β-glycerophosphate, 1 mM DTT). The complexes were eluted in kinase buffer supplemented with 10 mM maltose. Proteins were aliquoted, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

## GFP-Rad3$^{ATR}$ production and *in vitro* kinase assay

As previously described (Giaccherini *et al*, 2022) , GFP-Rad3$^{ATR}$ was transiently expressed from the full-length nmt41 promoter in *cds1Δ chk1Δ rad3Δ* cells treated for 2 hours with bleomycin. Cell pellets were disrupted using a Ball Mill (Retsch) in the presence of liquid nitrogen. The resulting powder was resuspended in 2 volumes per weight of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 50 mM ß-glycerophosphate (Sigma), 2 mM PMSF, 1 mM DTT, and protease inhibitor cocktail (Roche, EDTA-free). Lysates were cleared by centrifugation and incubated with GFP-TRAP agarose beads (Chromotek) for 2 hours at 4°C. The beads were washed three times with lysis buffer and twice with kinase buffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl2, 10 mM MnCl2, 2% glycerol, 0.1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 50 mM β-glycerophosphate, 1 mM DTT). GFP-Rad3ATR was kept bound to the beads for the following kinase assays. GFP-TRAP-bound GFP-Rad3$^{ATR}$ was resuspended in kinase buffer supplemented with 100 µM cold ATP, followed by the addition of 10 µCi of γ$^{32}$P-ATP (PerkinElmer) and substrates. After 30 minutes at 30°C, the reactions were stopped by adding 15 µL of 4X SDS sample buffer. Samples were denatured on 4–12% Tris-acetate polyacrylamide NuPAGE gels (Invitrogen) using SDS-PAGE electrophoresis. After Coomassie staining, the gel was dried and exposed overnight to a phosphorimager. The radioactive signals were then visualized using a Typhoon biomolecular imager (Cytiva).

## Affinity Capture of Biotinylated Proteins Using TurboID

Wild-type (untagged) and Taz1-TurboID-3xHA strains were cultured in 500 mL of YES medium. Cells were harvested when the $OD_{600}$ reached 1.0 and immediately flash-frozen in liquid nitrogen. The frozen pellets were mechanically lysed (Retsch Cryomill) with liquid at 30 Hz for 2 minutes over three cycles. Cell powder was resuspended in 5 mL of cold RIPA buffer per gram of cell weight (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% NP-40 (IGEPAL CA-630), 0.4% sodium deoxycholate, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1/1000 MG132, and 1x cOmplete EDTA-free ultra-protease inhibitor cocktail tablet). DNA and RNA were digested by incubating the suspension at 4°C for 75 minutes with 1000 units of Pierce universal nuclease (Thermo Fisher, Ref. 88701) and 10 mM MgCl2.The supernatant was collected and subjected to affinity purification by incubating with 50 µL of Streptavidin-Sepharose beads (GE Healthcare, 17511301), washed and resuspended in RIPA buffer without supplementation, for 3 hours at 4°C. After incubation, the beads were washed once with wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2% SDS) and three times with RIPA buffer containing DTT (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM DTT). Biotinylated proteins were eluted by incubating the beads for 10 minutes at 95°C in 2x volume of NuPAGE LDS sample buffer 4X (Thermo Fisher, NP0008). 10 mM DTT was added to the supernatant. A 1/10th aliquot was analyzed on 4–12% Tris-acetate polyacrylamide NuPAGE gels (Invitrogen), followed by silver staining using the Pierce Silver Staining Kit (24612) and Western blot analysis.

## Mass Spectrometry Analysis

Biotinylated proteins were resolved on a NuPAGE™ gel as a single band, followed by trypsin digestion for mass spectrometry analysis. The analysis was performed using a Q Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) in either data-dependent acquisition mode. Protein identification and quantification were carried out using MaxQuant 1.6.3.4 for DDA, or the DIA-NN 1.8 algorithm (Demichev et al., 2020) and the DIAgui package for DIA (https://github.com/marseille-proteomique/DIAgui) (Gerault camion greanjeau et al., 2024).

## Acknowledgments

We thank the pombe community for sharing strains, in particular Junko Kanoh, Toru Nakamura. We also thank the members of the S.C. team. C.B. is supported by ‘‘Bourse du Ministère de l’Enseignement Supérieur, et de la Recherche (MESR)’’ and by ARC (Association pour la recherche contre le cancer). S.C. is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-22-CE12 TeloSTAB and ANR-20-CE12 TeloRPA). S.C. is a scientist from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and K.N is a scientist fron Institut National de la Recherche Médicale (INSERM). The Marseille Proteomics (MaP; marseille-proteomique.univ-amu.fr) platform is supported by Institut Paoli-Calmettes, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, IBISA (Infrastructures Biologie Santé et Agronomie), the Cancéropôle PACA, FEDER projet Fight Cancer, the Provence-Alpes-Côte d'Azur Région, and Aix-Marseille University.

## Conflict of Interest

No conflict of interest

## References


Armstrong CA, Pearson SR, Amelina H, Moiseeva V & Tomita K (2014) Telomerase activation after recruitment in fission yeast. *Current biology: CB* 24: 2006–2011

Audry J, Maestroni L, Delagoutte E, Gauthier T, Nakamura TM, Gachet Y, Saintomé C, Géli V & Coulon S (2015) RPA prevents G-rich structure formation at lagging-strand telomeres to allow maintenance of chromosome ends. *The EMBO Journal* 34: 1942–1958

Beernink HTH, Miller K, Deshpande A, Bucher P & Cooper JP (2003) Telomere Maintenance in Fission Yeast Requires an Est1 Ortholog. *Curr Biol* 13: 575–580

Berti M, Cortez D & Lopes M (2020) The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 633–651

Bonnell E, Pasquier E & Wellinger RJ (2021) Telomere Replication: Solving Multiple End Replication Problems. *Front Cell Dev Biol* 9: 668171

Borges PCC, Bouabboune C, Escandell JM, Matmati S, Coulon S & Ferreira MG (2023) Pot1 promotes telomere DNA replication via the Stn1-Ten1 complex in fission yeast. *Nucleic Acids Res*: gkad1036

Chang Y-T, Moser BA & Nakamura TM (2013) Fission Yeast Shelterin Regulates DNA Polymerases and Rad3ATR Kinase to Limit Telomere Extension. *PLoS genetics* 9: e1003936

Chen Y (2019) The structural biology of the shelterin complex. *Biological chemistry* 400: 457–466

Cooper JP, Nimmo ER, Allshire RC & Cech TR (1997) Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 385: 744–747

Dehé P-M & Cooper JP (2010) Fission yeast telomeres forecast the end of the crisis. *FEBS letters* 584: 3725–3733

Dehé P-M, Rog O, Ferreira MG, Greenwood J & Cooper JP (2012) Taz1 enforces cell-cycle regulation of telomere synthesis. *Molecular Cell* 46: 797–808

Deng W, Wu J, Wang F, Kanoh J, Dehe P-M, Inoue H, Chen J & Lei M (2015) Fission yeast telomere-binding protein Taz1 is a functional but not a structural counterpart of human TRF1 and TRF2. *Cell Res* 25: 881–884

Escandell JM, Carvalho ES, Gallo-Fernández M, Reis CC, Matmati S, Luís IM, Abreu IA, Coulon S & Ferreira MG (2019) Ssu72 phosphatase is a conserved telomere replication terminator. *The EMBO Journal* 38: e100476

Fairall L, Chapman L, Moss H, Lange T de & Rhodes D (2001) Structure of the TRFH Dimerization Domain of the Human Telomeric Proteins TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 8: 351–361

Ferreira MG & Cooper JP (2001) The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to-end fusions. *Molecular Cell* 7: 55–63

Garg M, Gurung RL, Mansoubi S, Ahmed JO, Davé A, Watts FZ & Bianchi A (2014) Tpz1TPP1 SUMOylation reveals evolutionary conservation of SUMO-dependent Stn1 telomere association. *EMBO reports* 15: 871–877

Giaccherini C, Scaglione S, Coulon S, Dehé P-M & Gaillard P-HL (2022) Regulation of Mus81-Eme1 structure-specific endonuclease by Eme1 SUMO-binding and Rad3ATR kinase is essential in the absence of Rqh1BLM helicase. *PLoS Genet* 18: e1010165

Higa M, Fujita M & Yoshida K (2017) DNA Replication Origins and Fork Progression at Mammalian Telomeres. *Genes* 8

Hu X, Liu J, Jun H-I, Kim J-K & Qiao F (2016) Multi-step coordination of telomerase recruitment in fission yeast through two coupled telomere-telomerase interfaces. *eLife* 5

Kanoh J (2018) Unexpected roles of a shugoshin protein at subtelomeres. *Genes & genetic systems* 92: 127–133

Kanoh J, Sadaie M, Urano T & Ishikawa F (2005) Telomere binding protein Taz1 establishes Swi6 heterochromatin independently of RNAi at telomeres. *Current biology : CB* 15: 1808–1819

Khayat F, Cannavo E, Alshmery M, Foster WR, Chahwan C, Maddalena M, Smith C, Oliver AW, Watson AT, Carr AM, *et al* (2021) Inhibition of MRN activity by a telomere protein motif. *Nat Commun* 12: 3856

Lambert S & Carr AM (2013) Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Curr Opin Genet Dev* 23: 132–139

Lange T de (2018) Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annual review of genetics* 52: 223–247

Maestroni L, Matmati S & Coulon S (2017) Solving the Telomere Replication Problem. *Genes* 8: 55

Matmati S, Lambert SAE, Géli V & Coulon S (2020) Telomerase Repairs Collapsed Replication Forks at Telomeres. *Cell reports* 30: 3312-3322.e3

Matmati S, Vaurs M, Escandell JM, Maestroni L, Nakamura TM, Ferreira MG, Géli V & Coulon S (2018) The fission yeast Stn1-Ten1 complex limits telomerase activity via its SUMO-interacting motif and promotes telomeres replication. *Science advances* 4: eaar2740

Miller KM & Cooper JP (2003) The telomere protein Taz1 is required to prevent and repair genomic DNA breaks. *Molecular Cell* 11: 303–313

Miller KM, Ferreira MG & Cooper JP (2005) Taz1, Rap1 and Rif1 act both interdependently and independently to maintain telomeres. *The EMBO Journal* 24: 3128–3135

Miller KM, Rog O & Cooper JP (2006) Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* 440: 824–828

Miyagawa K, Low RS, Santosa V, Tsuji H, Moser BA, Fujisawa S, Harland JL, Raguimova ON, Go A, Ueno M, *et al* (2014) SUMOylation regulates telomere length by targeting the shelterin subunit Tpz1(Tpp1) to modulate shelterin-Stn1 interaction in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 5950–5955

Miyoshi T, Kanoh J, Saito M & Ishikawa F (2008) Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. *Science (New York, NY)* 320: 1341–1344

Moser BA, Chang Y-T, Kosti J & Nakamura TM (2011) Tel1ATM and Rad3ATR kinases promote Ccq1-Est1 interaction to maintain telomeres in fission yeast. *Nature Structural & Molecular Biology* 18: 1408–1413

Moser BA & Nakamura TM (2009) Protection and replication of telomeres in fission yeast. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 87: 747–758

Moser BA, Subramanian L, Chang Y-T, Noguchi C, Noguchi E & Nakamura TM (2009) Differential arrival of leading and lagging strand DNA polymerases at fission yeast telomeres. *The EMBO Journal* 28: 810–820

Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB & Cech TR (1997) Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human. *Science* 277: 955–959

Oizumi Y, Kaji T, Tashiro S, Takeshita Y, Date Y & Kanoh J (2021) Complete sequences of Schizosaccharomyces pombe subtelomeres reveal multiple patterns of genome variation. *Nature communications* 12: 611–16

Pinzaru AM, Hom RA, Beal A, Phillips AF, Ni E, Cardozo T, Nair N, Choi J, Wuttke DS, Sfeir A, *et al* (2016) Telomere Replication Stress Induced by POT1 Inactivation Accelerates Tumorigenesis. *Cell Rep* 15: 2170–2184

Rodríguez-López M, Cotobal C, Fernández-Sánchez O, Bravo NB, Oktriani R, Abendroth H, Uka D, Hoti M, Wang J, Zaratiegui M, *et al* (2016) A CRISPR/Cas9-based method and primer design tool for seamless genome editing in fission yeast. *Wellcome Open Res* 1: 19

Rog O, Miller KM, Ferreira MG & Cooper JP (2010) Sumoylation of RecQ Helicase Controls the Fate of Dysfunctional Telomeres. *Molecular Cell* 33: 559–569

Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL & Lange T de (2009) Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138: 90–103

Sfeir A & Lange T de (2012) Removal of Shelterin Reveals the Telomere End-Protection Problem. *Science* 336: 593–597

Spink KG, Evans RJ & Chambers A (2000) Sequence-specific binding of Taz1p dimers to fission yeast telomeric DNA. *Nucleic Acids Res* 28: 527–533

Stewart JA, Wang F, Chaiken MF, Kasbek C, Chastain PD, Wright WE & Price CM (2012) Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. *The EMBO Journal* 31: 3537–3549

Tomita K & Cooper JP (2007) The Telomere Bouquet Controls the Meiotic Spindle. *Cell* 130: 113–126

Toteva T, Mason B, Kanoh Y, Brøgger P, Green D, Verhein-Hansen J, Masai H & Thon G (2017) Establishment of expression-state boundaries by Rif1 and Taz1 in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 1093–1098

Vaurs M, Naiman K, Bouabboune C, Rai S, Ptasińska K, Rives M, Matmati S, Carr AM, Géli V & Coulon S (2023) Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast. *Cell Rep* 42: 112537

Webb CJ & Zakian VA (2007) Identification and characterization of the Schizosaccharomyces pombe TER1 telomerase RNA. *Nature Structural & Molecular Biology* 15: 34–42

Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, *et al* (2002) The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe. *Nature* 415: 871–880

Yamazaki H, Tarumoto Y & Ishikawa F (2012) Tel1(ATM) and Rad3(ATR) phosphorylate the telomere protein Ccq1 to recruit telomerase and elongate telomeres in fission yeast. *Genes & development* 26: 241–246

# SUPPLEMENTARY MATERIALS

## Table S1: Strains used in this study

| Figure | Strain n° | Name | Genotype |
|---|---|---|---|
| Fig 1 | 1570 | *taz1-HA cdc25-22* | *taz1:3HA:ura4 cdc25-22* |
| | CB22A | *taz1-HA cdc25-22 rad3Δ* | *taz1:3HA:ura4 rad3 ::kanMx6 cdc25-22* |
| Fig 2 | 388 | *taz1* | *taz1-2::ura4+* |
| | 1529 | *taz1-S455A* | *taz1-S455A* |
| | 1531 | *taz1-S476A* | *taz1-S476A* |
| | 1532 | *taz1-S2A* | taz1-S455A-S476A |
| | 1559 | *taz1-S455D* | taz1-S455D |
| | 1561 | *taz1-S476D* | taz1-S476D |
| | 1563 | *taz1-S2D* | taz1-S455D-S476D |
| Fig 3 | 1409 | *taz1Δ* | taz1-2::ura4+ |
| | CB14A | *stn1-226 taz1-S2A* | *taz1-S455A-S476A stn1-226-13myc:*natMX6 |
| | CB15A | *stn1-226 taz1-S2D* | *taz1-S455D-S476D stn1-226-13myc:*natMX6 |
| | 1174 | *stn1-226 #1* | *stn1-226-13myc:*natMX6 |
| | 838 | *rad51Δ* | rhp51::ura4 |
| | CB16A | *rad51Δ taz1-S2A* | *rhp51::ura4 taz1-S455A-S476A* |
| | CB13A | *rad51Δ taz1-S2D* | *rhp51::ura4 taz1-S455D-S476D* |
| Fig 4 | 1033 | *taz1-GFP* | *taz1-GFP:kanMX6* |
| | FL | *taz1-S2D-GFP* | *taz1-S455D-S476D-GFP:hph* |
| | 1466 | *taz1-GFP cdc25-22* | *taz1-GFP:kanM6 cdc25-22* |
| | 1608 | *taz1-S2D cdc25-22* | *taz1-S455D-S476D-GFP:hph* cdc25-22 |
| Fig 5 | 1033 | *taz1-GFP* | *taz1-GFP:kanMX6* |
| | 622 | *pol2-3FLAG cdc25-22* | pol2-3FLAG:kanMX6 cdc25-22 |
| | 621 | *pol1-3FLAG cdc25-22* | pol1-3FLAG:kanMX6 cdc25-22 |
| Fig 6 | 386 | *cdc25-22* | cdc25-22 |
| | CB4A | *taz1-BirA-3HA cdc25-22* | *taz1-TurboID-3xHA:kanMX6 cdc25-22* |

## Table S2. Primers used in this study

| | Primer n° | Sequence | Temperature |
|---|---|---|---|
| -0.2kb | Fw (119)<br>Rev (120) | TATTTCTTTATTCAACTTACCGCACTTC<br>CAGTAGTGCAGTGTATTATGATAATTAAAATGG | 55°C |
| -2kb | Fw (1063)<br>Rev (1064) | GTGTGGAAGTTGAGTATGTTGG<br>CGCTCAATTCAACCCAACTTC | 54°C |
| -3.7kb | Fw (1000)<br>Rev (1065) | GCCAATGAATGACAAACAGCA<br>CCCGACGACATATCACTCAAC | 56°C |
| -6.1kb | Fw (1089)<br>Rev (1090) | CAAACAACTGCAAGCGGTAG<br>CGACATACAACTGACCGAGC | 54°C |
| -7kb | Fw (1066)<br>Rev (1067) | GTTGAACTCGCCAAGTAATGAG<br>ACATCACATTCTCACCATACAC | 55°C |
| -10.8kb | Fw (1072)<br>Rev (1073) | CAGCCAGGGAATAGCAGTG<br>CAGACGAAGGGAACAAAGTGA | 58°C |
| -14.2kb | Fw (1068)<br>Rev (1069) | TTACGTCGTCCATCAGCG<br>GCTGATGTTACTGCTGCTG | 58°C |
| -19.7kb | Fw (1070)<br>Rev (1071) | CAATAAGCGTTCCCTGACAC<br>TCAGTCTCTCGCTAAGTGTTTAC | 56°C |
| S455A Taz1 | Fw (1258)<br>Rev (1136) | CTGATAATTTATCAGAAACGGTTG<br>CTCATTGCCGAACTTCTAC | 55°C |
| S476D Taz1 | Fw (1264)<br>Rev (1136) | GCAGAGCTAAGTCCCTTGA<br>CTCATTGCCGAACTTCTAC | 55°C |

## Table S3. Plasmids used in this study

| Plasmid n° | Name | Description |
|---|---|---|
| pSC574 | pMBP-parralell | maltose binding protein, amp$^r$ |
| pSC530 | pMBP-Nter-Taz1-6his | MBP-Taz1$_{1-351}$-6his |
| pSC531 | pMBP-Cter-Taz1-6his | MBP-Taz1$_{351-663}$-6his |
| pSC576 | pMBP-Cter-ΔMYB-Taz1-6his | MBP-Taz1$_{303-545}$-6his |
| pSC582 | pMBP-Taz1-TRF-6his | MBP-Taz1$_{303-363}$-6his |
| pSC583 | pMBP-Taz1-Rap1BD-6his | MBP-Taz1$_{364-395}$-6his |
| pSC584 | pMBP-Taz1-DimD-6his | MBP-Taz1$_{395-490}$-6his |
| pSC585 | pMBP-Taz1-Min-6his | MBP-Taz1$_{490-545}$-6his |
| pSC593 | pMBP-Taz1-DimD-S455A-6his | MBP-Taz1$_{395-490}$-S455A-6his |
| pSC594 | pMBP-Taz1-DimD-S476A-6his | MBP-Taz1$_{395-490}$-S476A-6his |
| pSC595 | pMBP-Taz1-DimD-S2A-6his | MBP-Taz1$_{395-490}$-S455A-S476A-6his |
| pSC187 | pSH18-34 | *LexA$_{op(x8)}$-LacZ*, *URA3*, amp$^r$ |
| pSC140 | pJG4-5 | acidic activator B42, *TRP1*, amp$^r$, HA epitope tag |
| pSC141 | pEG202 | *LexA$_{(1-202)}$DNA-BD*, *HIS3*, amp$^r$ |
| pSC614 | pJG45-Taz1-DimD | B42-Taz1$_{395-490}$ |
| pSC618 | pEG202-Taz1-DimD | LexA-Taz1$_{395-490}$ |
| pSC617 | pJG45-Taz1-DimD-S2A | B42-Taz1$_{395-490}$-S455A-S476A |
| pSC625 | pEG202-Taz1-DimD-S2A | LexA-Taz1$_{395-490}$-S455A-S476A |
| pSC625 | pJG45-Taz1-DimD-S2D | B42-Taz1$_{395-490}$-S455D-S476D |
| pSC626 | pEG202-Taz1-DimD-S2D | LexA-Taz1$_{395-490}$-S455D-S476D |
| pSC635 | pJG45-Taz1-DimD-S455D | B42-Taz1$_{395-490}$-S455D |
| pSC637 | pEG202-Taz1-DimD-S455D | LexA-Taz1$_{395-490}$-S455D |
| pSC636 | pJG45-Taz1-DimD-S476D | B42-Taz1$_{395-490}$-S476D |
| pSC638 | pEG202-Taz1-DimD-S476D | LexA-Taz1$_{395-490}$-S476D |

A

Taz1
MISVQSTETIQKVLENEGDQQFDKEVVQNSDSNIETGQISDSLTKAVEERAETESSSNLS
NFTTSESESSKPAYCFNSHSQNMAEGSISIPVISHSMNVENEVSTAEGQDSRTGESENDQ
NAMIVRSIWDIEKASLLVNDCQNIANMAEQKVMMVSAIFSESSKDIVNPESFSERLGKET
VKDLYEFNEQLTTKYGLEFRTIFFSYIRKYDAYWCLFEDLEKPLKSIQFFTGLIDLLDNT
NKHLTLRSIVLDALLSADEEDSFYGDALVLFEELVIRYFGTDSNPSIDASEFILSCLPYT
SLDALNVVCGQVWKSQKICDFLKSTIGNTSNSPLQLRASFPAFVNAVIHFLLEFKNVRRL
ERKDLSVKGMLYDSDSQQILNRLRERVSGSTAQSADEASGHESDASEDTFSERTLGLNSI
DNTEISEVVSLGLVSSALDKITGLLSADNLSETVSQARDFSHTLSKSLKSRAKSLSQKEA
ANRSKLIAKRGDNLRREASLSSEQDDLSEDFPPVRESDEQESRSGGRSSAMRVSIERSAA
RSGTRRSQGNPYEGYRTRRKWTDEEENELYEMISQHGCCWSKIIHIQKLENGPLKTFGPT
QIKDKARLIKARFMKQNRLQELYSKSLNWKNVTVGQAYCELHKIPYIEATPPLLREELVN
YQS

B

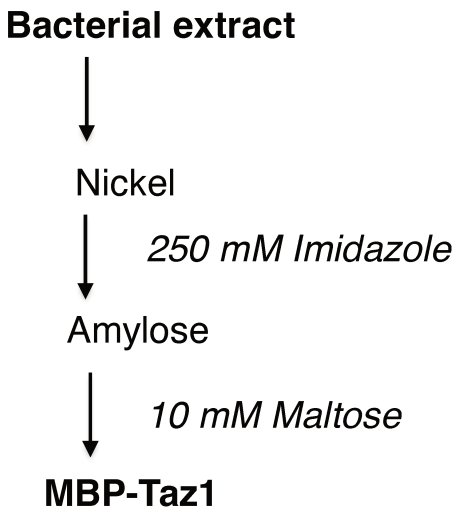



**Figure S1: Taz1 sequence and purification of Taz1 recombinant fragments**

(**A**) Primary Taz1 protein sequence. The eight potential phosphorylated SQ/TQ sites are colored in red and Taz1 dimerization domain is underlined. (**B**) Purification scheme of Taz1 recombinant fragments is depicted.

# III. Discussion/conclusion

L'étude des protéines télomériques effectuée au sein de notre laboratoire a mis en lumière le rôle crucial du complexe Stn1-Ten1 dans le maintien des télomères (Matmati et al., 2018). Ce travail a permis de montrer que ce complexe possède deux fonctions principales : d'une part, il régule négativement l'activité de la télomérase et favorise la synthèse du brin complémentaire, et d'autre part, il participe à la réplication des régions télomériques et subtélomériques en recrutant le complexe Primase-Polα pour initier la synthèse d'ADN sur le brin retardé (Escandell et al., 2019).

Nos travaux ont montré que le recrutement de Stn1 dépend du complexe Pot1-Tpz1-Poz1, mais que sa fonction est indépendante de celle de Taz1 qui est également recruté dans la région STE3-2 et joue un rôle essentiel dans la réplication des régions subtélomériques (Vaurs et al., 2023). Nos travaux, réalisés chez *S. pombe,* suggéraient donc que Pot1 est impliqué dans la réplication des télomères et des subtélomères en recrutant Stn1-Ten1, mais le mécanisme précis par lequel Pot1 régule ce processus restait encore à élucider. En effet, il n'a pas été établi que Pot1 soit recruté aux subtélomères ni que le recrutement du complexe Stn1-Ten1 dépende ou non de la présence de Pot1. Pot1 est une protéine essentielle pour la protection de l'extrémité 3' simple brin mais son rôle dans la réplication des séquences terminales n'a pas encore été clairement établi.

## Pot1 favorise la réplication des extrémités terminales via le complexe Stn1-Ten1

Dans l'article issu de mon travail de thèse, nous avons montré, en utilisant un mutant thermosensible de *pot1 (pot1-1),* que Pot1 joue un rôle crucial dans la réplication des télomères grâce aux gels 2D. Nous avons également démontré que Pot1 est recruté au niveau de la région subtélomérique STE3-2 (une région difficile à répliquer) et que Pot1, probablement par l'intermédiaire de son partenaire Tpz1, participe au recrutement du complexe Stn1-Ten1, initiant ainsi la synthèse d'ADN au niveau du brin retardé **(Figure 22)**. Ces résultats sont en accord avec nos travaux précédents (Vaurs et al., 2023) et corroborent

les résultats de Pinzaru et al. (2020), qui ont suggéré que le complexe POT1-TPP1, chez l'homme, pourrait favoriser la synthèse du brin retardé (lagging strand) des télomères en recrutant le complexe CST, facilitant ainsi le redémarrage des fourches de réplication. Une hypothèse similaire a également été proposée chez la souris (Hockemeyer et al., 2006 ; Wu et al., 2012).

Ces résultats suggèrent que, chez *S. pombe*, le recrutement du complexe ST au niveau des régions subtélomériques est dépendant de la protéine télomérique Pot1. De manière similaire, chez l'homme, POT1 pourrait également jouer un rôle dans le recrutement du complexe CST pour la réplication des télomères.

Chez l'homme, plusieurs éléments suggèrent que le complexe CST pourrait exercer des fonctions sur le génome ailleurs qu'aux télomères. Tout d'abord, il a été démontré que CST se lie à divers substrats d'ADNsb de manière indépendante de la séquence, et seulement 20 % des foyers STN1 sont localisés au niveau des télomères (Miyake et al., 2009).
Deuxièmement, l'épuisement de CTC1 entraîne une augmentation des foyers γH2AX, qui ne colocalisent pas avec les télomères, suggérant un rôle de CST dans la réponse aux dommages de l'ADN en dehors des télomères (Miyake et al., 2009 ; Surovtseva et al., 2009). Enfin, les travaux du groupe de C. Price ont montré que le CST favorise la réplication de l'ADN, en particulier dans des conditions de stress réplicatif ou à proximité de barrières de réplication naturelles.

De plus, CST intervient au niveau des CDB, en coopération avec le complexe Shieldin, ce qui soutient l'hypothèse selon laquelle son action n'est pas site-spécifique (Stewart et al., 2012 ; Mirman et al., 2018). Ces observations soulèvent la question du mode de recrutement du complexe CST en dehors des télomères ? Pot1 recrute-t-il le complexe CST en dehors des télomères ou plus vraisemblablement un mécanisme distinct de recrutement est-il utilisé ? Une approche pertinente consisterait à identifier, à l'échelle du génome, d'autres sites d'enrichissement en Pot1, afin d'explorer son rôle éventuel dans le recrutement du complexe CST dans des contextes non télomériques. Il a été établi aussi que le complexe CST interagit également avec d'autres protéines, notamment RAD51. Il a été proposé que le CST puisse se lier à l'ADNsb riche en guanine et limiter la formation de structures G4, une fonction qui

favoriserait la liaison de RAD51 à l'ADNsb et faciliterait ainsi le redémarrage de la réplication en réponse au stress réplicatif (Chastain et al., 2016).

L'une des principales fonctions de POT1, chez l'homme comme chez S. pombe, est de protéger les extrémités chromosomiques contre une activation inappropriée de la DDR. Il exerce cette protection en remplaçant RPA (switch RPA-POT1) au niveau des télomères, car RPA et POT1 présentent une affinité similaire pour l'ADNsb télomérique, expliquant ainsi qu'ils puissent entrer en compétition pour l'ADNsb lors de la réplication, lorsque RPA est recruté aux télomères (Flynn et al., 2011 ; Flynn, Chang, et Zou., 2012). La présence de POT1 sur l'ADNsb empêche donc l'activation d'ATR. Il est possible qu'une des fonctions de POT1 soit de recruter le complexe CST pour initier la synthèse d'ADN au niveau des fourches de réplication, évitant ainsi l'accumulation d'ADNsb recouvert par RPA et, par conséquent, l'activation d'ATR.

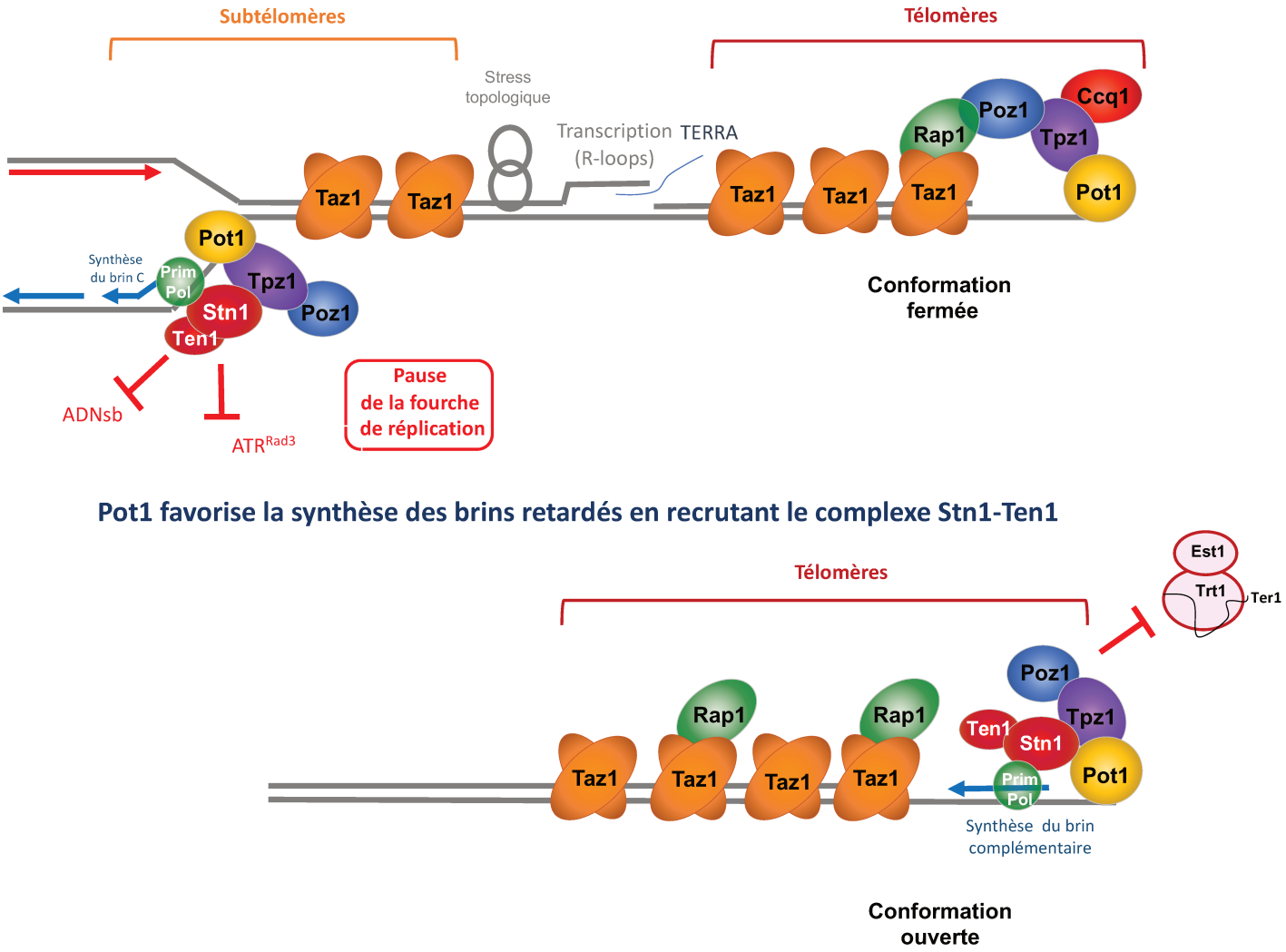



***Figure 22 : Pot1 favorise la réplication de l'ADN télomérique via le complexe Stn1-Ten1***

*Schéma illustrant le rôle de Pot1 dans la réplication de l'ADN télomérique. Pot1 recrute et/ou stabilise le complexe Stn1-Ten1 ainsi que Polα-primase aux télomères via Tpz1, facilitant ainsi la synthèse du brin retardé au niveau des fourches de réplication bloquées. Ce mécanisme permet à Pot1 de remplir une double fonction : (1) réguler la longueur des télomères et (2) promouvoir la réplication de l'ADN télomérique, limitant ainsi l'accumulation d'ADNsb et empêchant l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN.*

## Taz1 est phosphorylé par la kinase Rad3 (ATR) au cours de la phase S

Précédemment, nous avons montré que Taz1 est recruté à la région STE3-2 mais son rôle aux subtelomères reste inconnu et semble indépendant de l'action de Stn1-Ten1 et du complexe Pot1-Tpz1-Poz1 (Vaurs et al., 2023). Nous savons que Taz1 joue un rôle dans la progression de la fourche de réplication à travers l'ADN terminal, y compris les régions subtélomériques et télomériques (Miller et al., 2006 ; Vaurs et al., 2023). Toutefois, sa fonction exacte dans le processus de réplication demeure inconnue à ce jour.

Durant mon doctorat, nous avons montré que Taz1 est phosphorylé par la kinase Rad3 (ATR) au niveau de son domaine de dimérisation (résidus S455 et S476), spécifiquement au cours de la phase S. Cette modification post-traductionnelle influence la capacité de Taz1 à se dimériser et à interagir efficacement avec les régions télomériques et subtélomériques, notamment au locus *STE3-2*. En d'autres termes, la phosphorylation par Rad3 pourrait réguler négativement l'association de Taz1 aux télomères en modulant sa capacité à dimériser.

ATR est un élément principal de la DDR, jouant le rôle de transducteur du signal en se liant à RPA (Zhou et al., 2003). Son rôle dans le maintien des télomères est moins connu. Il a été décrit qu'il est important pour le maintien des télomères (Pennarun et al., 2010) et pourrait à la fois contrôler l'activité de la télomérase positivement (Tong et al., 2015) et négativement aux cassures (Kinzig et al., 2024). Le rôle de Rad3 chez *S. pombe* dans le contrôle de la télomérase est bien décrit, puisqu'il phosphoryle ccq1 (Yamazaki et al., 2012 ; Moser et al., 2011). Nos résultats suggèrent que Rad3 pourrait réguler négativement l'association de Taz1 aux télomères en modifiant sa capacité à se dimériser, ce qui pourrait être une étape importante pour la réplication des séquences terminales. Le contrôle de l'association de TRF1 à l'ADN chez l'homme par ATR/ATM a été aussi mis en évidence. En effet, il a été montré que la phosphorylation à proximité du domaine Myb de TRF1 par les kinases ATR/ATM (résidu S367) entraîne sa dissociation de la chromatine, et favorise probablement le recrutement de la télomérase en phase S (Tong et al., 2015). De manière similaire à nos résultats, cette étude a montré que le mutant phospho-mimétique S367D, régule négativement l'association de TRF1 en phase S et G1 aux télomères. Par ailleurs, une étude a mis en évidence la complexité des mécanismes en révélant l'existence d'un mode de régulation supplémentaire impliquant

la phosphorylation. Il a été montré que la phosphorylation de TRF1 par les kinases de type Polo (Plk1) favorise l'association de TRF1 aux télomères, contrairement aux études précédentes qui suggéraient que la phosphorylation entraînait sa dissociation. Ces observations suggèrent que la phosphorylation du domaine MYB de TRF1 pourrait constituer un mécanisme clé dans la régulation de son interaction avec l'ADN.

Ainsi, ces observations et nos résultats suggèrent que le contrôle de l'association à l'ADN de TRF1 et de Taz1 par la phosphorylation pourrait être conservé entre *S. pombe* et l'homme. Il est envisageable que l'association de TRF1 soit régulée par la phosphorylation du domaine MYB, tandis que celle de Taz1 serait régulé par la phosphorylation de son domaine de dimérisation. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que, chez l'homme, le domaine de dimérisation de TRF1 se situe dans le domaine TRFH (TRF Homology Domain), à l'extrémité N-terminale de la protéine, tandis que, dans le cas de Taz1, ce domaine se trouve dans la région C-terminale. Cette différence de localisation pourrait effectivement influencer le mécanisme de régulation de plusieurs manières. Tout d'abord, la position différente du domaine de dimérisation pourrait moduler son accessibilité aux kinases régulatrices, affectant ainsi l'efficacité de la phosphorylation et la régulation de la protéine. De plus, la phosphorylation du domaine N-terminal de TRF1 ou du domaine C-terminal de Taz1 pourrait induire des changements conformationnels distincts, ce qui influencerait la capacité de ces protéines à interagir avec les kinases de manière spécifique. Enfin, la localisation divergente du domaine de dimérisation pourrait altérer les interactions avec d'autres protéines régulatrices, influençant ainsi indirectement la capacité de la protéine à interagir avec l'ADN télomérique ou avec les kinases régulatrices. Ces mécanismes pourraient expliquer comment la différence de localisation des domaines de dimérisation entre TRF1 et Taz1 peut conduire à des régulations distinctes de la liaison à l'ADN, tout en maintenant des principes généraux de contrôle par phosphorylation. Bien qu'il ne s'agisse que d'hypothèses, celles-ci soulignent la complexité des mécanismes régulateurs impliqués dans la dynamique des protéines télomériques et mettent en évidence les subtilités des interactions entre ces protéines, les kinases régulatrices et l'ADN télomérique. Les différences structurelles entre TRF1 et Taz1 pourraient jouer un rôle clé dans la régulation spécifique des télomères, et ces variations peuvent contribuer à l'adaptation des mécanismes de contrôle selon les contextes biologiques.

## Le recrutement de Taz1 aux télomères est contrôlé de manière dépendante du cycle cellulaire

Il a été montré que Taz1 joue un rôle crucial dans la progression de la fourche de réplication à travers les séquences terminales de l'ADN, y compris les régions subtélomériques et télomériques (Miller et al., 2006). Cependant, la fonction exacte de Taz1 dans la réplication reste inconnue. Précédemment, nous avons montré que Taz1 est recruté à la région STE3-2 mais, son rôle aux subtelomères est inconnu (Vaurs et al., 2023).

Afin de mieux comprendre le rôle exact de Taz1 dans le processus de réplication, nous avons analysé la cinétique de recrutement de Taz1 au cours du cycle cellulaire et avons démontré que Taz1 est recruté en phase S. Par conséquent, nous nous sommes demandés si le recrutement de Taz1 aux subtélomères et aux télomères coïncidait avec le passage de la fourche de réplication. Nous avons réalisé des expériences de ChIP en utilisant les polymérases α (Polα) et ε (Polε), qui répliquent respectivement le brin retardé et le brin avancé, pour visualiser la progression de la fourche de réplication. Nous avons ensuite cartographié la cinétique de recrutement des deux polymérases et de Taz1 à l'ADN terminal, jusqu'à environ 20 kb en amont des séquences télomériques, y compris la région STE3-2. Nous avons observé que la dynamique d'association de Taz1 était presque superposée à celle de Polα le long de la région subtélomérique située à environ 10 kb en amont des télomères. De cette observation, nous avons d'abord conclu que le recrutement de Taz1 coïncide avec la réplication et particulièrement la synthèse du brin retardé.

Ces observations soulèvent deux questions importantes : comment Taz1 se lie-t-il à l'ADN néosynthétisé du brin retardé ? Et quelle est la fonction précise de Taz1 dans la synthèse du brin retardé ?

## Les modes de liaison possibles de Taz1 aux régions subtélomériques lors de la synthèse du brin retardé :

Le pic d'association de Taz1 aux subtélomères coïncide avec celui de la polymérase α, mais pas avec celui de la polymérase ε. Cela suggère que Taz1 pourrait se lier au duplex d'ADN une fois celui-ci synthétisé par Polα. Les travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence la présence de trois sites potentiels de fixation pour Taz1, doublets de la séquence GGTTA situés à −7,3, −7 et −6,3 kb des répétitions télomériques (Vaurs et al., 2023). De plus, nous avons noté la présence de séquences GGTTA (singulet) dispersées dans les régions subtélomériques STE. Il a aussi été établi que la dimérisation de Taz1 est essentielle à son association avec l'ADN télomérique (Deng et al., 2015) et que la capacité de son domaine MYB à interagir avec l'ADN dépend de la capacité de Taz1 à dimériser (Wei Deng et al., 2015). Comment imaginer la fixation de Taz1 dans la région STE3-2 alors qu'il y a très peu de sites potentiels de liaison de Taz1 ?

On peut imaginer qu'en plus du mode dimérique conventionnel, Taz1 pourrait se lier selon un mode de liaison monomérique. Il est également envisageable que chaque monomère de Taz1 se fixe sur chaque chromatide sœur, avec un site de liaison unique sur le brin continu et le brin discontinu. Ce mode de liaison ne serait possible qu'après l'achèvement de la synthèse du brin retardé par Polα. De plus, il est plausible que ce mode de liaison contribue à maintenir la cohésion des chromatides sœurs.

Une autre possibilité serait celle de liaisons de dimère de Taz1 sur des singulets éloignés. Cela aurait pour conséquence que la fixation de Taz1 rapprocherait ainsi des sites distants en formant une boucle. Ce mécanisme pourrait induire des torsions ou la formation de structures spécifiques de l'ADN **(Figure 23)**.

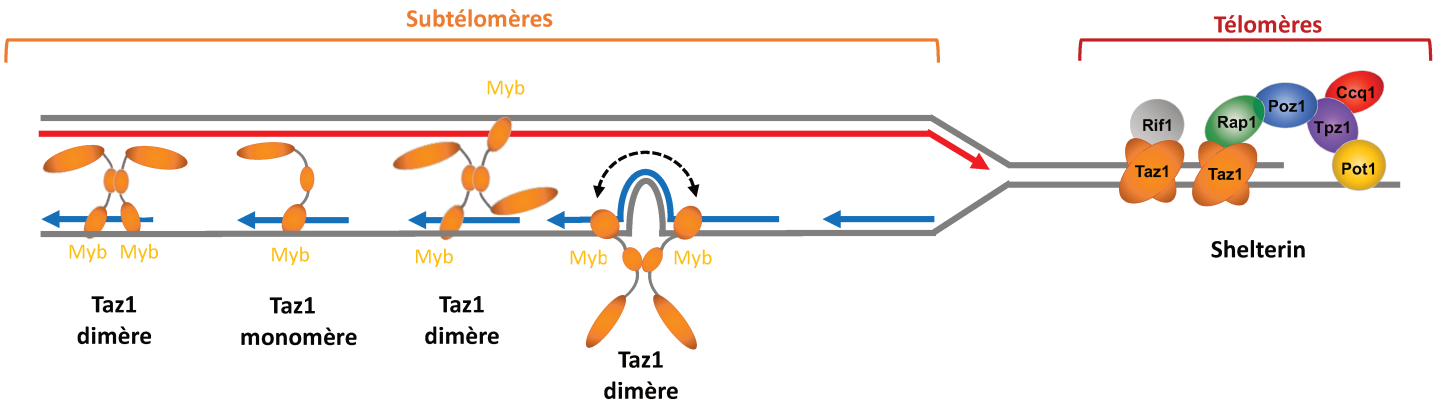



***Figure 23 : Modèle illustrant les modes de liaison de Taz1 aux régions subtélomériques lors de la synthèse du brin retardé***

Pour mieux comprendre les modes de liaison de Taz1 à l'ADN, on peut envisager de réaliser des tests de mobilité électrophorétique (EMSA) *in vitro*. J'ai produit des fragments recombinants de Taz1 (CterTaz1) qui pourraient être utilisés pour répondre à cette question. Stefano Mattarocci est actuellement en train de mettre au point des tests EMSA avec le Cter_Taz1. On peut envisager d'utiliser différents substrats d'ADN, incluant un ou deux sites GGTTA avec des espacements différents. Ainsi, nous pourrions évaluer la capacité de Taz1 à interagir avec des séquences spécifiques en fonction du substrat utilisé.

## Le rôle de Taz1 dans la synthèse du brin retardé (lagging-strand) :

La réplication tardive des télomères a été observée par le laboratoire de T. Nakamura, qui a montré que les télomères sont répliqués en fin de phase S (Moser et al., 2009). De plus, il a été démontré que Polε est recrutée aux séquences répétées avant Polα/δ indiquant un découplage entre la synthèse du brin avancé et retardé (Moser et al., 2009 ; Audry et al., 2015). La réplication des séquences télomériques est donc caractérisée par un découplage entre les activités des polymérases réplicatives. Nos résultats sont en accord avec ces observations, puisque nous avons mis en évidence une association plus tardive de Polα à la position -10 kb par rapport à Polε. De plus, nous avons observé que le recrutement de Taz1 est concomitant au passage de Polα, suggérant une implication de cette protéine dans la synthèse du brin retardé. Étant donné le découplage existant pour la réplication des régions subtélomériques, il est envisageable qu'un mode différent de la synthèse du brin retardé soit mis en place, distinct du modèle canonique des fragments d'Okazaki. Ce mécanisme non conventionnel, spécifique aux séquences terminales, pourrait nécessiter l'intervention du complexe ST-PTP ainsi que de Taz1, dont la fonction exacte reste à déterminer **(Figure 24)**.

Notre analyse par spectrométrie de masse des partenaires de Taz1 a permis d'identifier Pol3, la sous-unité catalytique de Polδ, ainsi que Cdc17 (Lig1), la ligase responsable de la ligature des fragments d'Okazaki, deux acteurs clés de la synthèse du brin retardé. Ces résultats corroborent l'observation selon laquelle le recrutement de Taz1 coïncide avec Polα. De manière inattendue, ces protéines étaient enrichies significativement en phase S mais aussi en G2, suggérant ainsi qu'elles pourraient être constitutivement associées à Taz1.

Ensemble, ces résultats indiquent que Taz1 participerait à synthèse du brin retardé, où il pourrait se lier préférentiellement aux fragments d'Okazaki nouvellement synthétisés et probablement intervenir dans leur maturation. Il est envisageable qu'un mode de synthèse non conventionnel du brin retardé soit mis en place chez *S. pombe*, dans un contexte de réplication dans lequel la progression de la fourche de réplication est lente et de découplage entre la synthèse du brin avancé et retardé. Dans ce contexte, Taz1 pourrait faciliter le recrutement de Cdc17 en reconnaissant les fragments d'Okazaki comme substrat.

Parallèlement, le complexe Stn1-Ten1 (CST) (Vaurs et al*.,* 2023), initie la synthèse du brin retardé après le passage de la fourche de réplication. Cdc17 assurerait ensuite la ligation des fragments d'Okazaki générés durant ce processus (Vaurs et al., 2023) **(Figure 24)**. Ce modèle non conventionnel de maturation des fragments d'Okazaki impliquerait plusieurs protéines télomériques, dont le complexe Stn1-Ten1, le complexe Pot1-Tpz1-Poz1 et Taz1, afin de faciliter la réplication. Le fait que le signal Taz1 dans la région STE3-2 persiste entre 70 et 110 minutes soutient l'hypothèse selon laquelle Taz1 pourrait jouer un rôle crucial dans le traitement des événements tardifs (par exemple la ligation des fragments d'Okazaki) de la synthèse du brin retardé. Il est important de noter que ce modèle nécessiterait une validation expérimentale. L'interaction directe entre Taz1 et Cdc17 devra être confirmée par des techniques telles que le double hybride ou la co-immunoprécipitation (Co-IP).

La formation des fragments d'Okazaki étant transitoire, l'interaction potentielle avec Taz1 devrait être étudiée dans le contexte spécifique des régions télomériques et subtélomériques. Dans cette optique, nous pourrions envisager d'analyser la cinétique de recrutement de Cdc17 dans un contexte de phosphomimétique mutant de Taz1 par ChIP au cours du cycle cellulaire. Ces approches expérimentales seront essentielles pour valider ou infirmer l'hypothèse d'une interaction entre Taz1 et le complexe de maturation des fragments d'Okazaki dans le contexte spécifique des régions télomériques et subtélomériques. De plus, nous avons montré que Rad51 joue un rôle crucial en combinaison avec le mutant phosphomimetique de Taz1. L'élongation des télomères observée est très probablement due à l'activité de la télomérase en l'absence d'une voie de recombinaison homologue fonctionnelle. Pour confirmer cette hypothèse, une ChIP d'une sous-unité de la télomérase dans un mutant phospho-mimétique de Taz1 (S2D) pourrait être réalisée.

Ensemble, nos travaux sur Taz1 ont révélé deux aspects intéressants : Taz1 est régulé par des modifications post-traductionnelles : la phosphorylation par Rad3 pourrait réguler négativement l'association de Taz1 aux télomères en modulant sa capacité à dimériser. Deuxièmement, Taz1 est crucial pour la réplication du brin retardé. Cependant, nous n'avons pas encore établi le lien entre la phosphorylation de Taz1 et la réplication. Autrement dit, la régulation de Taz1 perturbe-t-elle la dynamique de réplication des régions terminales ?

Plusieurs approches sont actuellement en cours au laboratoire pour tester cette hypothèse. Tout d'abord, nous prévoyons d'analyser la dynamique de réplication par électrophorèse sur gel 2D dans un mutant phosphomimétique de Taz1 au cours de la phase S, c'est-à-dire lorsque les télomères sont répliqués. Cette analyse nous permettra d'observer en détail la progression de la réplication et, si notre hypothèse est correcte, de mettre en évidence des pauses/blocages lors de la progression de la fourche de réplication, indiquant que dans ces mutants, la réplication est bien affectée.

Deuxièmement, nous étudierons la cinétique du recrutement des polymérases Polα et Polε par ChIP dans le mutant S2D phosphomimétique de Taz1 au cours du cycle cellulaire. Nous nous attendons à observer une altération de la cinétique de recrutement, en particulier pour Polα, responsable de la synthèse du brin retardé. Cette observation suggérerait que la régulation de Taz1 perturbe la dynamique de réplication des régions terminales.

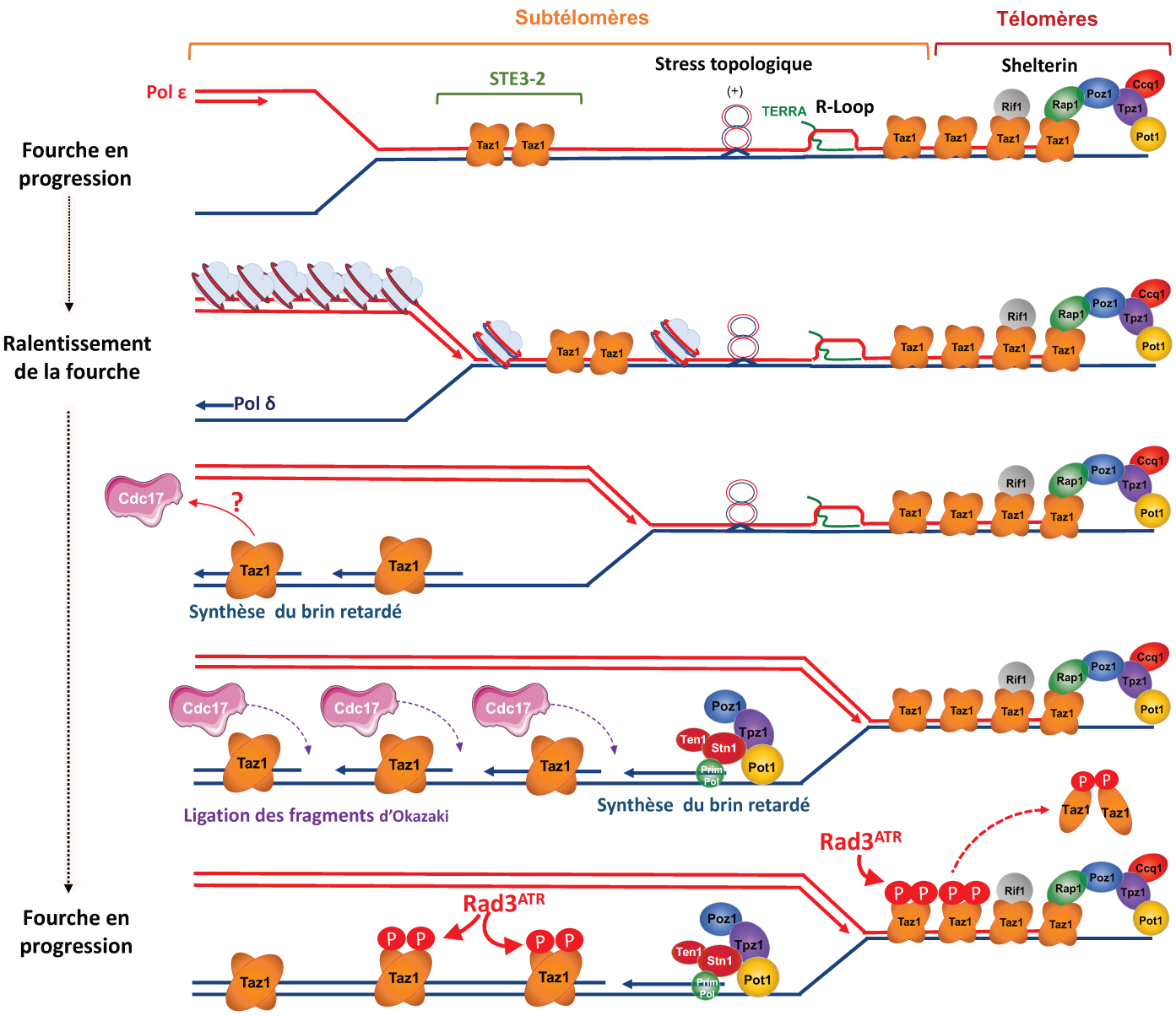



***Figure 24 : Modèle de la maturation non conventionnelle des fragments d'Okazaki impliquant Taz1, Stn1-Ten1 et le complexe Pot1-Tpz1-Poz1.***

*Lors de la progression de la fourche de réplication, divers obstacles tels que les R-loops, le stress topologique et la nature variable des nucléosomes peuvent ralentir ou bloquer son avancée. Taz1, présent en région subtélomérique jouerait un rôle clé dans la synthèse du brin retardé en facilitant le recrutement de Cdc17, probablement en reconnaissant les fragments d'Okazaki comme substrats. En parallèle, le complexe Stn1-Ten1 initierait la synthèse du brin retardé après le passage de la fourche de réplication. Enfin, Cdc17 assurerait la ligation des fragments d'Okazaki générés au cours de ce processus, permettant la maturation et la complétion de la réplication des extrémités chromosomiques.*

# Synthèse globale et projection future

Ainsi, les résultats de notre étude ont confirmé le découplage observé entre Polε et Polα/δ lors de la réplication, Polε précédant l'arrivée de Polα/δ (Moser et al., 2009 ; Audry et al., 2015). D'autre part, nos résultats ont révélé que la réplication des régions terminales se produit tôt au cours du cycle cellulaire et les séquences télomériques tardivement comme cela avait été observé par le groupe de T. Nakamura. De plus, nous n'avons pas pu détecter de signal pour les polymérases au niveau du locus *tlh2* (-19,7 et -14,2 kb), ce qui suggère que les fourches de réplication progressent efficacement et rapidement à travers cette région. Cependant, à l'approche des régions STE, les fourches de réplication ralentissent et leur progression est entravée. Cela concorde avec notre observation précédente montrant que le locus STE3-2 est une région difficile à répliquer (Vaurs et al., 2023). Ainsi, nous avons conclu que la réplication le long de la région subtélomérique proximale des télomères (de 10 kb) est complexe et représente un défi pour les cellules, provoquant le découplage des polymérases décrit précédemment (Moser et al., 2009 ; Audry et al., 2015). Toutefois, une question subsiste : Comment expliquer la difficulté de réplication de cette région ? Quels sont les obstacles limitant la progression des fourches de réplication ?

D'après la littérature, nous savons que cette région représente un défi majeur pour la cellule en raison de plusieurs facteurs inhérents à sa composition. Parmi ceux-ci, le niveau de compaction de la chromatine varie considérablement, présentant une occupation nucléosomique moins dense. De plus, la transcription de TERRA, ainsi que la formation de R-loops et de hybrides ARN:ADN, génèrent diverses sources de blocages endogènes qui entravent la progression des fourches de réplication à travers ces régions. Il est également envisageable que Taz1 joue un rôle antagoniste dans ce processus, en facilitant à la fois la réplication des télomères et en constituant une barrière à la progression des fourches de réplication, comme l'ont suggéré les travaux in vitro sur TRF1 et TRF2 (Ohki et al., 2004). Cette dualité d'action pourrait ainsi entraver la progression des fourches de réplication.

Ainsi, nos résultats soulèvent une question fondamentale : l'implication de Taz1 dans la réplication du brin retardé est-elle conservée chez l'homme ? Une hypothèse de réponse est fournie par les travaux de Zimmermann et al. (2014), qui ont montré que TRF1 peut recruter l'hélicase BLM pour dérouler les G4 afin de faciliter la réplication du brin retardé. Bien que les régions subtélomériques chez S. pombe, riches en AT, ne forment à priori pas de structures G4, cette observation peut paraître cohérente avec nos résultats, qui suggèrent que TRF1 et Taz1 jouent un rôle dans la synthèse du brin retardé. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes précis de ces processus.

# Bibliographie


Anderson BH, Kasher PR, Mayer J, Szynkiewicz M, Jenkinson EM, Bhaskar SS, Urquhart et JE, Daly SB, Dickerson JE, O'Sullivan J, et al. « Mutatons in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus ». *Nature genetics*, 2012.

Armstrong, Christine Anne, Siân Rosanna Pearson, Hanna Amelina, Vera Moiseeva, et Kazunori Tomita. « Telomerase Activation after Recruitment in Fission Yeast ». *Current Biology* 24, nº 17 (septembre 2014): 2006-11.

Arnoult, Nausica, et Jan Karlseder. « Complex Interactions between the DNA-Damage Response and Mammalian Telomeres ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22, nº 11 (novembre 2015): 859-66.

Arnoult, Nausica, Amandine Van Beneden, et Anabelle Decottignies. « Telomere Length Regulates TERRA Levels through Increased Trimethylation of Telomeric H3K9 and HP1α ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19, nº 9 (septembre 2012): 948-56.

Audry, Julien, Laetitia Maestroni, Emmanuelle Delagoutte, Tiphaine Gauthier, Toru M Nakamura, Yannick Gachet, Carole Saintomé, Vincent Géli, et Stéphane Coulon. « RPA Prevents G-rich Structure Formation at Lagging-strand Telomeres to Allow Maintenance of Chromosome Ends ». *The EMBO Journal* 34, nº 14 (14 juillet 2015): 1942-58.

Audry, Julien, Haitao Zhang, Carly Kerr, Kathleen L Berkner, et Kurt W Runge. « Ccq1 Restrains Mre11-Mediated Degradation to Distinguish Short Telomeres from Double-Strand Breaks ». *Nucleic Acids Research* 52, nº 7 (24 avril 2024): 3722-39.

Autexier, Chantal, et Neal F. Lue. « The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase ». *Annual Review of Biochemistry* 75, nº 1 (1 juin 2006): 493-517.

Bah, Amadou, Harry Wischnewski, Vadim Shchepachev, et Claus M. Azzalin. « The Telomeric Transcriptome of Schizosaccharomyces Pombe ». *Nucleic Acids Research* 40, nº 7 (avril 2012): 2995-3005.

Bähler Jürg, Alexander B. Steever, Sally Wheatley, Yu-li Wang, John R. Pringle, Kathleen L. Gould, Dannel McCollum. « Role of Polo Kinase and Mid1p in Determining the Site of Cell Division in Fission Yeast ». *J Cell Biol (1998) 143 (6): 1603–1616*, 1998.

Baumann, Peter, et Thomas R. Cech. « Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans ». *Science* 292, nº 5519 (11 mai 2001): 1171-75.

Baumann, Peter, et Thomas R. Cech. « Protection of Telomeres by the Ku Protein in Fission Yeast ». Édité par Alan P. Wolffe. *Molecular Biology of the Cell* 11, nº 10 (octobre 2000): 3265-75.

Beernink, Hans T.H., Kyle Miller, Atul Deshpande, Philipp Bucher, et Julia Promisel Cooper. « Telomere Maintenance in Fission Yeast Requires an Est1 Ortholog ». *Current Biology* 13, nº 7 (avril 2003): 575-80.

Brian D., Jan Benada, Philip Yuk Kwong Yung, Ryan A. V. Bell, George Pappas, Vaclav Urban, Johanna K. Ahlskog, et al. « Cancer Cells Use Self-Inflicted DNA Breaks to Evade Growth Limits Imposed by Genotoxic Stress ». *Science* 376, nº 6592 (29 avril 2022): 476-83.

Bian, Lei, Yiling Meng, Meichao Zhang, et Dong Li. « MRE11-RAD50-NBS1 Complex Alterations and DNA Damage Response: Implications for Cancer Treatment ». *Molecular Cancer* 18, nº 1 (décembre 2019): 169.

Bianchi, Alessandro, et David Shore. « Early Replication of Short Telomeres in Budding Yeast ». *Cell* 128, nº 6 (mars 2007): 1051-62.

Bianchi, Alessandro, et David Shore. « Increased Association of Telomerase with Short Telomeres in Yeast ». *Genes & Development* 21, nº 14 (15 juillet 2007): 1726-30.

Blackburn, Elizabeth H, et Joseph G Gall. « A Tandemly Repeated Sequence at the Termini of the Extrachromosomal Ribosomal RNA Genes in Tetruhymena », J. Mol. Biol. 120, 33-53 1978.

Blackburn, Elizabeth H., Elissa S. Epel, et Jue Lin. 2015. « Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection », Science 350 (6265): 1193-98.

Bleichert, Franziska, Michael R. Botchan, et James M. Berger. « Mechanisms for Initiating Cellular DNA Replication ». *Science* 355, nº 6327 (24 février 2017): eaah6317.

Boddy, Michael N., Pierre-Henri L. Gaillard, W.Hayes McDonald, Paul Shanahan, John R. Yates, et Paul Russell. « Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase ». *Cell* 107, nº 4 (novembre 2001): 537-48

Bonnell, Erin, Emeline Pasquier, et Raymund J. Wellinger. « Telomere Replication: Solving Multiple End Replication Problems ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (1 avril 2021): 668171.

Bombarde, Oriane, Céline Boby, Dennis Gomez, Philippe Frit, Marie-Josèphe Giraud-Panis, Eric Gilson, Bernard Salles, et Patrick Calsou. « TRF2/RAP1 and DNA–PK Mediate a Double Protection against Joining at Telomeric Ends ». *The EMBO Journal* 29, nº 9 (5 mai 2010): 1573-84.

Carvalho Borges, Pâmela C, Chaïnez Bouabboune, Jose Miguel Escandell, Samah Matmati, Stéphane Coulon, et Miguel Godinho Ferreira. « Pot1 Promotes Telomere DNA Replication via the Stn1-Ten1 Complex in Fission Yeast ». *Nucleic Acids Research* 51, nº 22 (11 décembre 2023): 12325-36.

Bryan, Tracy M. « G-Quadruplexes at Telomeres: Friend or Foe? » *Molecules* 25, nº 16 (13 août 2020): 3686.

Bryan, Harman, Ashley, Tracy « Telomere Maintenance and the DNA Damage Response: A Paradoxical Alliance ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 12 (17 octobre 2024): 1472906.

Budden, Alice M, Murat Eravci, Adam T Watson, Eduard Campillo-Funollet, Antony W Oliver, Karel Naiman, et Antony M Carr. « Schizosaccharomyces Pombe Rtf2 Is Important for Replication Fork Barrier Activity of RTS1 via Splicing of Rtf1 ». *eLife* 12 (24 août 2023): e78554.

Carneiro, Tiago, Lyne Khair, Clara C. Reis, Vanessa Borges, Bettina A. Moser, Toru M. Nakamura, et Miguel Godinho Ferreira. « Telomeres Avoid End Detection by Severing the Checkpoint Signal Transduction Pathway ». *Nature* 467, nº 7312 (septembre 2010): 228-32.

Carvalho Borges, Pâmela C, Chaïnez Bouabboune, Jose Miguel Escandell, Samah Matmati, Stéphane Coulon, et Miguel Godinho Ferreira. « Pot1 Promotes Telomere DNA Replication via the Stn1-Ten1 Complex in Fission Yeast ». *Nucleic Acids Research* 51, nº 22 (11 décembre 2023): 12325-36.

Cai, Sarah W., Hiroyuki Takai, Arthur J. Zaug, Teague C. Dilgen, Thomas R. Cech, Thomas Walz, et Titia De Lange. « POT1 Recruits and Regulates CST-Polα/Primase at Human Telomeres ». *Cell* 187, nº 14 (juillet 2024): 3638-3651.e18.

Chagin, V. O., J. H. Stear, et M. C. Cardoso. « Organization of DNA Replication ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, nº 4 (1 avril 2010): a000737-a000737.

Chang, Michael, Milica Arneric, et Joachim Lingner. « Telomerase Repeat Addition Processivity Is Increased at Critically Short Telomeres in a Tel1-Dependent Manner in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Genes & Development* 21, nº 19 (1 octobre 2007): 2485-94.

Chikashige, Yuji, et Yasushi Hiraoka. « Telomere Binding of the Rap1 Protein Is Required for Meiosis in Fission Yeast ». *Current Biology* 11, nº 20 (octobre 2001): 1618-23.

Chang, Ya-Ting, Bettina A. Moser, et Toru M. Nakamura. « Fission Yeast Shelterin Regulates DNA Polymerases and Rad3ATR Kinase to Limit Telomere Extension ». Édité par Joachim Lingner. *PLoS Genetics* 9, nº 11 (7 novembre 2013): e1003936.

Chapman, J. Ross, Patricia Barral, Jean-Baptiste Vannier, Valérie Borel, Martin Steger, Antonia Tomas-Loba, Alessandro A. Sartori, Ian R. Adams, Facundo D. Batista, et Simon J. Boulton. « RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection ». *Molecular Cell* 49, nº 5 (mars 2013): 858-71.

Chastain, Megan, Qing Zhou, Olga Shiva, Maria Fadri-Moskwik, Leanne Whitmore, Pingping Jia, Xueyu Dai, Chenhui Huang, Ping Ye, et Weihang Chai. « Human CST Facilitates Genome-Wide RAD51 Recruitment to GC-Rich Repetitive Sequences in Response to Replication Stress ». *Cell Reports* 16, nº 5 (août 2016): 1300-1314.

Chen, Liuh-Yow, Sophie Redon, et Joachim Lingner. « The Human CST Complex Is a Terminator of Telomerase Activity ». *Nature* 488, nº 7412 (août 2012): 540-44.

Chen Hu, Hongmiao, Helen Linwen Yan, et Thi Hoang Duong Nguyen. « Structural Biology of Shelterin and Telomeric Chromatin: The Pieces and an Unfinished Puzzle ». *Biochemical Society Transactions* 52, nº 4 (28 août 2024): 1551-64.

Churikov, Dmitri, et Carolyn M Price. « Pot1 and Cell Cycle Progression Cooperate in Telomere Length Regulation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15, nº 1 (janvier 2008): 79-84.

Collopy, Laura C., Tracy L. Ware, Tomas Goncalves, Sunnvør Í Kongsstovu, Qian Yang, Hanna Amelina, Corinne Pinder, et al. « LARP7 Family Proteins Have Conserved Function in Telomerase Assembly ». *Nature Communications* 9, nº 1 (8 février 2018): 557.

Cohen, Adiel, Martin Kupiec, et Ronit Weisman. « Gad8 Protein Is Found in the Nucleus Where It Interacts with the MluI Cell Cycle Box-Binding Factor (MBF) Transcriptional Complex to Regulate the Response to DNA Replication Stress ». *Journal of Biological Chemistry* 291, nº 17 (avril 2016): 9371-81.

Coluzzi, Elisa, Stefano Leone, et Antonella Sgura. « Oxidative Stress Induces Telomere Dysfunction and Senescence by Replication Fork Arrest ». *Cells* 8, nº 1 (3 janvier 2019): 19.

Cooper, Julia Promisel, Elaine R. Nimmo, Robin C. Allshire, et Thomas R. Cech. « Regulation of Telomere Length and Function by a Myb-Domain Protein in Fission Yeast ». *Nature* 385, nº 6618 (février 1997): 744-47.

Cooper, J.P., Watanabe, Y., and Nurse, « Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination». *Nature* 392. (1998), 828–831

Daigaku, Yasukazu, Andrea Keszthelyi, Carolin A Müller, Izumi Miyabe, Tony Brooks, Renata Retkute, Mike Hubank, Conrad A Nieduszynski, et Antony M Carr. « A Global Profile of Replicative Polymerase Usage ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22, nº 3 (mars 2015): 192-98.

Davé, Anoushka, Carol Cooley, Mansi Garg, et Alessandro Bianchi. « Protein Phosphatase 1 Recruitment by Rif1 Regulates DNA Replication Origin Firing by Counteracting DDK Activity ». *Cell Reports* 7, nº 1 (avril 2014): 53-61.

Dehé, Pierre-Marie, et Julia Promisel Cooper. « Fission Yeast Telomeres Forecast the End of the Crisis ». *FEBS Letters* 584, nº 17 (10 septembre 2010): 3725-33.

Dehé, Pierre-Marie, Stéphane Coulon, Sarah Scaglione, Paul Shanahan, Arato Takedachi, James A Wohlschlegel, John R Yates, Bertrand Llorente, Paul Russell, et Pierre-Henri L Gaillard. « Regulation of Mus81–Eme1 Holliday Junction Resolvase in Response to DNA Damage ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20, nº 5 (mai 2013): 598-603.

De Lange, Titia. « Shelterin-Mediated Telomere Protection ». *Annual Review of Genetics* 52, nº 1 (23 novembre 2018): 223-47.

Demichev, Vadim, Christoph B. Messner, Spyros I. Vernardis, Kathryn S. Lilley, et Markus Ralser. « DIA-NN: Neural Networks and Interference Correction Enable Deep Proteome Coverage in High Throughput ». *Nature Methods* 17, nº 1 (janvier 2020): 41-44.

Denchi, Eros Lazzerini, et Titia De Lange. « Protection of Telomeres through Independent Control of ATM and ATR by TRF2 and POT1 ». *Nature* 448, nº 7157 (août 2007): 1068-71.

Deng, Wei, Jian Wu, Feng Wang, Junko Kanoh, Pierre-Marie Dehe, Haruna Inoue, Juan Chen, et Ming Lei. « Fission Yeast Telomere-Binding Protein Taz1 Is a Functional but Not a Structural Counterpart of Human TRF1 and TRF2 ». *Cell Research* 25, nº 7 (juillet 2015): 881-84.

Dickey, Thayne H., et Deborah S. Wuttke. « The Telomeric Protein Pot1 from Schizosaccharomyces Pombe Binds ssDNA in Two Modes with Differing 3' End Availability ». *Nucleic Acids Research* 42, nº 15 (2 septembre 2014): 9656-65.

Doksani, Ylli, John Y. Wu, Titia de Lange, et Xiaowei Zhuang. « Super-Resolution Fluorescence Imaging of Telomeres Reveals TRF2-Dependent T-Loop Formation ». *Cell* 155, nº 2 (octobre 2013): 345-56.

Drosopoulos, William C., Settapong T. Kosiyatrakul, et Carl L. Schildkraut. « BLM Helicase Facilitates Telomere Replication during Leading Strand Synthesis of Telomeres ». *Journal of Cell Biology* 210, nº 2 (20 juillet 2015): 191-208.

Drosopoulos, William C., Settapong T. Kosiyatrakul, Zi Yan, Simone G. Calderano, et Carl L. Schildkraut. « Human Telomeres Replicate Using Chromosome-Specific, Rather than Universal, Replication Programs ». *Journal of Cell Biology* 197, nº 2 (16 avril 2012): 253-66.

Elias, Guoli Ma, Segolene Demolin, Cornelia Brönner, Manuel Zocco, Alexandre Cirilo, Nives Ivic, et Mario Halic. « Disordered Region of H3K9 Methyltransferase Clr4 Binds the Nucleosome and Contributes to Its Activity ». *Nucleic Acids Research* 47, nº 13 (26 juillet 2019): 6726-36.

Van Emden, Thomas S, Marta Forn, Ignasi Forné, Zsuzsa Sarkadi, Matías Capella, Lucía Martín Caballero, Sabine Fischer-Burkart, et al. « Shelterin and Subtelomeric DNA Sequences Control Nucleosome Maintenance and Genome Stability ». *EMBO Reports* 20, nº 1 (janvier 2019): e47181.

Escandell, Jose Miguel, Edison Sm Carvalho, Maria Gallo-Fernandez, Clara C Reis, Samah Matmati, Inês Matias Luís, Isabel A Abreu, Stéphane Coulon, et Miguel Godinho Ferreira. « Ssu72 Phosphatase Is a Conserved Telomere Replication Terminator ». *The EMBO Journal* 38, nº 7 (avril 2019): e100476.

Escribano-Díaz, Cristina, Alexandre Orthwein, Amélie Fradet-Turcotte, Mengtan Xing, Jordan T.F. Young, Ján Tkáč, Michael A. Cook, et al. « A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice ». *Molecular Cell* 49, nº 5 (mars 2013): 872-83.

Fantes, Peter A, et Charles S Hoffman. « A Brief History of *Schizosaccharomyces Pombe* Research: A Perspective Over the Past 70 Years ». *Genetics* 203, nº 2 (1 juin 2016): 621-29.

Fairall, Louise, Lynda Chapman, Heidi Moss, Titia De Lange, et Daniela Rhodes. « Structure of the TRFH Dimerization Domain of the Human Telomeric Proteins TRF1 and TRF2 ». *Molecular Cell* 8, nº 2 (août 2001): 351-61.

Feng, Xuyang, Shih-Jui Hsu, Anukana Bhattacharjee, Yongyao Wang, Jiajie Diao, et Carolyn M. Price. « CTC1-STN1 Terminates Telomerase While STN1-TEN1 Enables C-Strand Synthesis during Telomere Replication in Colon Cancer Cells ». *Nature Communications* 9, nº 1 (19 juillet 2018): 2827.

Feng, Junli, Walter D. Funk, Sy-Shi Wang, Scott L. Weinrich, Ariel A. Avilion, Choy-Pik Chiu, Robert R. Adams, et al. « The RNA Component of Human Telomerase ». *Science* 269, nº 5228 (septembre 1995): 1236-41.

Ferreira, Miguel Godinho, et Julia Promisel Cooper. « The Fission Yeast Taz1 Protein Protects Chromosomes from Ku-Dependent End-to-End Fusions ». *Molecular Cell* 7, nº 1 (janvier 2001): 55-63.

Ferreira, Miguel Godinho, et Julia Promisel Cooper. « Two Modes of DNA Double-Strand Break Repair Are Reciprocally Regulated through the Fission Yeast Cell Cycle ». *Genes & Development* 18, nº 18 (15 septembre 2004): 2249-54.

Flynn, Rachel Litman, Richard C. Centore, Roderick J. O'Sullivan, Rekha Rai, Alice Tse, Zhou Songyang, Sandy Chang, Jan Karlseder, et Lee Zou. « TERRA and hnRNPA1 Orchestrate an RPA-to-POT1 Switch on Telomeric Single-Stranded DNA ». *Nature* 471, nº 7339 (mars 2011): 532-36.

Flynn Litman, Rachel, Sandy Chang, et Lee Zou. « RPA and POT1: Friends or Foes at Telomeres? » *Cell Cycle* 11, nº 4 (15 février 2012): 652-57.

Flynn, Rachel Litman, et Lee Zou. « Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding Fold Proteins: A Growing Family of Genome Guardians ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45, nº 4 (août 2010): 266-75.

Fragkos M, Ganier O, Coulombe P & Méchali M (2015) DNA replica□on origin activation in space and □me. Nature reviews Molecular cell biology 16: 360–374

Forsburg, Susan L, et Nicholas Rhind. « Basic Methods for Fission Yeast ». *Yeast* 23, nº 3 (février 2006): 173-83.

Gachotte, D., J. Eckstein, R. Barbuch, T. Hughes, C. Roberts, et M. Bard. « A Novel Gene Conserved from Yeast to Humans Is Involved in Sterol Biosynthesis ». *Journal of Lipid Research* 42, nº 1 (janvier 2001): 150-54.

Garg, Mansi, Resham L Gurung, Sahar Mansoubi, Jubed O Ahmed, Anoushka Davé, Felicity Z Watts, et Alessandro Bianchi. « Tpz1 $^{TPP\ 1}$ SUMO Ylation Reveals Evolutionary Conservation of SUMO -dependent Stn1 Telomere Association ». *EMBO Reports* 15, nº 8 (août 2014): 871-77.

Gerace, Erica L., Mario Halic, et Danesh Moazed. « The Methyltransferase Activity of Clr4Suv39h Triggers RNAi Independently of Histone H3K9 Methylation ». *Molecular Cell* 39, nº 3 (août 2010): 360-72.

Gilson, Eric, et Vincent Géli. « How Telomeres Are Replicated ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, nº 10 (octobre 2007): 825-38.

Giaccherini, Cédric, Sarah Scaglione, Stéphane Coulon, Pierre-Marie Dehé, et Pierre-Henri L. Gaillard. « Regulation of Mus81-Eme1 Structure-Specific Endonuclease by Eme1 SUMO-Binding and Rad3ATR Kinase Is Essential in the Absence of Rqh1BLM Helicase ». Édité par Gregory P. Copenhaver. *PLOS Genetics* 18, nº 4 (22 avril 2022): e1010165.

Glousker, Galina, Fabien Touzot, Patrick Revy, Yehuda Tzfati, et Sharon A. Savage. « Unraveling the Pathogenesis of Hoyeraal–Hreidarsson Syndrome, a Complex Telomere Biology Disorder ». *British Journal of Haematology* 170, nº 4 (août 2015): 457-71.

Glousker, Galina, et Joachim Lingner. « Challenging Endings: How Telomeres Prevent Fragility ». *BioEssays* 43, nº 10 (octobre 2021): 2100157.

Gomes, Fátima C.O, Carla Pataro, Juliana B Guerra, Maria J Neves, Soraya R Corrêa, Elizabeth S.A Moreira, et Carlos A Rosa. « Physiological Diversity and Trehalose Accumulation in *Schizosaccharomyces Pombe* Strains Isolated from Spontaneous Fermentations during the Production of the Artisanal Brazilian *Cachaça* ». *Canadian Journal of Microbiology* 48, nº 5 (1 mai 2002): 399-406.

Gomes, Nuno M.V., Jerry W. Shay, et Woodring E. Wright. « Telomere Biology in Metazoa ». *FEBS Letters* 584, nº 17 (10 septembre 2010): 3741-51.

Greider, C. W., et E. H. Blackburn. 1985. « Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts ». Cell 43 (2 Pt 1): 405-13.

Griffith, Jack D, Laurey Comeau, Soraya Rosenfield, Rachel M Stansel, Alessandro Bianchi, Heidi Moss, et Titia De Lange. « Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop ». *Cell* 97, nº 4 (mai 1999): 503-14.

Gu, Peili, Jin-Na Min, Yang Wang, Chenhui Huang, Tao Peng, Weihang Chai, et Sandy Chang. « CTC1 Deletion Results in Defective Telomere Replication, Leading to Catastrophic Telomere Loss and Stem Cell Exhaustion: CTC1 Deletion Results in Defective Telomere Replication ». *The EMBO Journal* 31, nº 10 (16 mai 2012): 2309-21.

Gu, Peili, Shuting Jia, Taylor Takasugi, Valerie M. Tesmer, Jayakrishnan Nandakumar, Yong Chen, et Sandy Chang. « Distinct Functions of POT1 Proteins Contribute to the Regulation of Telomerase Recruitment to Telomeres ». *Nature Communications* 12, nº 1 (17 septembre 2021): 5514.

Hardy CF, Sussel L & Shore D « A RAP1-interacting protein involved in transcrip onal silencing and telomere length regulation». *Genes & development* 6: (1992) 801–814

Hanaoka, Shingo, Aritaka Nagadoi, Shoko Yoshimura, Saburo Aimoto, Bibo Li, Titia De Lange, et Yoshifumi Nishimura. « NMR Structure of the Hrap1 Myb Motif Reveals a Canonical Three-Helix Bundle Lacking the Positive Surface Charge Typical of Myb DNA-Binding Domains ». *Journal of Molecular Biology* 312, nº 1 (septembre 2001): 167-75.

Harman, Ashley, et Tracy M. Bryan. « Telomere Maintenance and the DNA Damage Response: A Paradoxical Alliance ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 12 (17 octobre 2024): 1472906.

Hartsuiker, Edgar, Matthew J. Neale, et Antony M. Carr. « Distinct Requirements for the Rad32Mre11 Nuclease and Ctp1CtIP in the Removal of Covalently Bound Topoisomerase I and II from DNA ». *Molecular Cell* 33, nº 1 (janvier 2009): 117-23.

Hayano, Motoshi, Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Claire Renard-Guillet, Katsuhiko Shirahige, et Hisao Masai. « Rif1 Is a Global Regulator of Timing of Replication Origin Firing in Fission Yeast ». *Genes & Development* 26, nº 2 (15 janvier 2012): 137-50.

Hayflick, L. 1965. « The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains ». Experimental Cell Research 37 (mars):614-36.

Hayflick, L., et P. S. Moorhead. 1961. « The Serial Cul va on of Human Diploid Cell Strains ». Experimental Cell Research 25 (décembre):585-621.

Hayles J, Nurse P. Introduc on to Fission Yeast as a Model System. Cold Spring Harb Protoc. 2018 May 1;2018(5). doi: 10.1101/pdb.top079749. PMID: 28733415.

Higa, Mitsunori, Masatoshi Fujita, et Kazumasa Yoshida. « DNA Replication Origins and Fork Progression at Mammalian Telomeres ». *Genes* 8, nº 4 (28 mars 2017): 112.

Higa, Mitsunori, Tatsunori Kushiyama, Seiichiro Kurashige, Daisuke Kohmon, Kouki Enokitani, Satoko Iwahori, Nozomi Sugimoto, Kazumasa Yoshida, et Masatoshi Fujita. « TRF2 Recruits ORC through TRFH Domain Dimerization ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, nº 1 (janvier 2017): 191-201.

Hiraga, Shin-ichiro, Gina M. Alvino, FuJung Chang, Hui-yong Lian, Akila Sridhar, Takashi Kubota, Bonita J. Brewer, Michael Weinreich, M.K. Raghuraman, et Anne D. Donaldson. « Rif1 Controls DNA Replication by Directing Protein Phosphatase 1 to Reverse Cdc7-Mediated Phosphorylation of the MCM Complex ». *Genes & Development* 28, nº 4 (15 février 2014): 372-83.

Hiraga, Shin-ichiro, Tony Ly, Javier Garzón, Zuzana Hořejší, Yoshi-nobu Ohkubo, Akinori Endo, Chikashi Obuse, Simon J Boulton, Angus I Lamond, et Anne D Donaldson. « Human RIF 1 and Protein Phosphatase 1 Stimulate DNA Replication Origin Licensing but Suppress Origin Activation ».

Hiraga, Shin-ichiro, Chandre Monerawela, Yuki Katou, Sophie Shaw, Kate Rm Clark, Katsuhiko Shirahige, et Anne D Donaldson. « Budding Yeast Rif1 Binds to Replication Origins and Protects DNA at Blocked Replication Forks ». *EMBO Reports* 19, nº 9 (septembre 2018): e46222.

Hiyama, E, et K Hiyama. « Telomere and Telomerase in Stem Cells ». *British Journal of Cancer* 96, nº 7 (avril 2007): 1020-24.

Hockemeyer, Dirk, Agnel J Sfeir, Jerry W Shay, Woodring E Wright, et Titia De Lange. « POT1 Protects Telomeres from a Transient DNA Damage Response and Determines How Human

Hoffman, Charles S, Valerie Wood, et Peter A Fantes. « An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces Pombe* Model System ». *Genetics* 201, nº 2 (1 octobre 2015): 403-23.

Hu, Xichan, Jinqiang Liu, Hyun-IK Jun, Jin-Kwang Kim, et Feng Qiao. « Multi-Step Coordination of Telomerase Recruitment in Fission Yeast through Two Coupled Telomere-Telomerase Interfaces ». *eLife* 5 (2 juin 2016): e15470.

Hyrien, Olivier. « Peaks Cloaked in the Mist: The Landscape of Mammalian Replication Origins ».

Ivanova, Tsvetomira, Michael Maier, Alsu Missarova, Céline Ziegler-Birling, Monica Dam, Mercè Gomar-Alba, Lucas B. Carey, et Manuel Mendoza. « Budding Yeast Complete DNA Synthesis after Chromosome Segregation Begins ». *Nature Communications* 11, nº 1 (8 mai 2020): 2267.

Jezek, Meagan, et Erin Green. « Histone Modifications and the Maintenance of Telomere Integrity ». *Cells* 8, nº 2 (25 février 2019): 199.

Jun, Hyun-Ik, Jinqiang Liu, Heetae Jeong, Jin-Kwang Kim, et Feng Qiao. « Tpz1 Controls a Telomerase-Nonextendible Telomeric State and Coordinates Switching to an Extendible State via Ccq1 ». *Genes & Development* 27, nº 17 (1 septembre 2013): 1917-31.

Jackson, A. P., R. A. Laskey, et N. Coleman. « Replication Proteins and Human Disease ». *Cold*

Nandakumar, Jayakrishnan, et Thomas R. Cech. « DNA-Induced Dimerization of the Single-Stranded DNA Binding Telomeric Protein Pot1 from Schizosaccharomyces Pombe ». *Nucleic Acids Research* 40, nº 1 (janvier 2012): 235-44. *Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, nº 1 (1 janvier 2014): a013060-a013060.

Kanoh, Junko. « Unexpected Roles of a Shugoshin Protein at Subtelomeres ». *Genes & Genetic Systems* 92, nº 3 (2017): 127-33.

Kanoh, Junko, et Fuyuki Ishikawa. « spRap1 and spRif1, Recruited to Telomeres by Taz1, Are Essential for Telomere Function in Fission Yeast ». *Current Biology* 11, nº 20 (octobre 2001): 1624-30.

Kanoh, Junko, Mahito Sadaie, Takeshi Urano, et Fuyuki Ishikawa. « Telomere Binding Protein Taz1 Establishes Swi6 Heterochromatin Independently of RNAi at Telomeres ». *Current Biology* 15, nº 20 (octobre 2005): 1808-19.

Kanoh, Yutaka, Seiji Matsumoto, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Nobuaki Kono, Claire Renard-Guillet, Koji Masuda, et al. « Rif1 Binds to G Quadruplexes and Suppresses Replication over Long Distances ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22, nº 11 (novembre 2015): 889-97.

Kanoh Y, Ueno M, Hayano M, Kudo S, Masai H. Aberrant association of chromatin with nuclear periphery induced by Rif1 leads to mito□c defect. Life Sci Alliance. (feb 2023) 7;6(4):e202201603.

Kannan, Ram, Rachel M. Helston, Richard O. Dannebaum, et Peter Baumann. « Diverse Mechanisms for Spliceosome-Mediated 3' End Processing of Telomerase RNA ». *Nature Communications* 6, nº 1 (19 janvier 2015): 6104.

Keszthelyi, Andrea, Yasukazu Daigaku, Katie Ptasińska, Izumi Miyabe, et Antony M Carr. « Mapping Ribonucleotides in Genomic DNA and Exploring Replication Dynamics by Polymerase Usage Sequencing (Pu-Seq) ». *Nature Protocols* 10, nº 11 (novembre 2015): 1786-1801.

Khayat, Freddy, Elda Cannavo, Majedh Alshmery, William R. Foster, Charly Chahwan, Martino Maddalena, Christopher Smith, et al. « Inhibition of MRN Activity by a Telomere Protein Motif ». *Nature Communications* 12, nº 1 (22 juin 2021): 3856.

Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, Jeffery L, Baek ST, Lee H, Shim YS, Lee M, Kim L, Heo KS, Noh EJ, Lee AR, Jang YJ, Chung KS, Choi SJ, Park JY, Park Y, Kim HM, Park SK, Park HJ, Kang EJ, Kim HB, Kang HS, Park HM, Kim K, Song K, Song KB, Nurse P, Hoe KL. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Nat Biotechnol*. 2010 Jun;28(6):617-623.

Kinzig, Charles G., George Zakusilo, Kaori K. Takai, Logan R. Myler, et Titia De Lange. « ATR Blocks Telomerase from Converting DNA Breaks into Telomeres ». *Science* 383, nº 6684 (16 février 2024): 763-70.

Lambert, Sarah, Adam Watson, Daniel M. Sheedy, Ben Martin, et Antony M. Carr. « Gross Chromosomal Rearrangements and Elevated Recombination at an Inducible Site-Specific Replication Fork Barrier ». *Cell* 121, nº 5 (juin 2005): 689-702.

Lamarche, Brandon J., Nicole I. Orazio, et Matthew D. Weitzman. « The MRN Complex in Double-strand Break Repair and Telomere Maintenance ». *FEBS Letters* 584, nº 17 (10 septembre 2010): 3682-95.

Lammens, Katja, Derk J. Bemeleit, Carolin Möckel, Emanuel Clausing, Alexandra Schele, Sophia Hartung, Christian B. Schiller, et al. « The Mre11:Rad50 Structure Shows an ATP-Dependent Molecular Clamp in DNA Double-Strand Break Repair ». *Cell* 145, nº 1 (avril 2011): 54-66.

Lansdorp, Peter. « Telomere Length Regulation ». *Frontiers in Oncology* 12 (4 juillet 2022): 943622.

Leonardi, Jessica, Jessica A Box, Jeremy T Bunch, et Peter Baumann. « TER1, the RNA Subunit of Fission Yeast Telomerase ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15, nº 1 (janvier 2008): 26-33.

Lei, Ming, Elaine R Podell, et Thomas R Cech. « Structure of Human POT1 Bound to Telomeric Single-Stranded DNA Provides a Model for Chromosome End-Protection ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11, nº 12 (décembre 2004): 1223-29.

Li, Tingfang, Miaomiao Zhang, Yanjing Li, Xinyu Han, Lu Tang, Tengfei Ma, Xiaotong Zhao, et al. « Cooperative Interaction of CST and RECQ4 Resolves G-quadruplexes and Maintains Telomere Stability ». *EMBO Reports* 24, nº 9 (6 septembre 2023): e55494.

Lingner, Joachim, Julia Promisel Cooper, et Thomas R. Cech. « Telomerase and DNA End Replication: No Longer a Lagging Strand Problem? » *Science* 269, nº 5230 (15 septembre 1995): 1533-34.

Limbo, Oliver, Charly Chahwan, Yoshiki Yamada, Robertus A.M. De Bruin, Curt Wittenberg, et Paul Russell. « Ctp1 Is a Cell-Cycle-Regulated Protein That Functions with Mre11 Complex to Control Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination ». *Molecular Cell* 28, nº 1 (octobre 2007): 134-46.

Limbo, Oliver, Yoshiki Yamada, et Paul Russell. « Mre11-Rad50–Dependent Activity of ATM/Tel1 at DNA Breaks and Telomeres in the Absence of Nbs1 ». Édité par Orna Cohen-Fix. *Molecular Biology of the Cell* 29, nº 11 (juin 2018): 1389-99.

Lim, Ci Ji, et Thomas R. Cech. « Shaping Human Telomeres: From Shelterin and CST Complexes to Telomeric Chromatin Organization ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22, nº 4 (avril 2021): 283-98.

Liu, Liping, et Anna Malkova. « Break-Induced Replication: Unraveling Each Step ». *Trends in Genetics* 38, nº 7 (juillet 2022): 752-65.

Loayza, Diego, et Titia De Lange. « POT1 as a Terminal Transducer of TRF1 Telomere Length Control ». *Nature* 423, nº 6943 (juin 2003): 1013-18.

Lototska, Liudmyla, Jia-Xing Yue, Jing Li, Marie-Josèphe Giraud-Panis, Zhou Songyang, Nicola J Royle, Gianni Liti, Jing Ye, Eric Gilson, et Aaron Mendez-Bermudez. « Human RAP 1 Specifically Protects Telomeres of Senescent Cells from DNA Damage ». *EMBO Reports* 21, nº 4 (3 avril 2020): e49076.

Luciano, Pierre, Stéphane Coulon, Virginie Faure, Yves Corda, Julia Bos, Steven J Brill, Eric Gilson, Marie-Noelle Simon, et Vincent Géli. « RPA Facilitates Telomerase Activity at Chromosome Ends in Budding and Fission Yeasts: RPA Interacts with Telomerase at Telomeres ». *The EMBO Journal* 31, nº 8 (18 avril 2012): 2034-46.

Lyu, Xinxing, Kai-Hang Lei, Pau Biak Sang, Olga Shiva, Megan Chastain, Peter Chi, et Weihang Chai. « Human CST Complex Protects Stalled Replication Forks by Directly Blocking MRE11 Degradation of Nascent-strand DNA ». *The EMBO Journal* 40, nº 2 (15 janvier 2021): e103654.

Maestroni, Laetitia, Julien Audry, Pierre Luciano, Stéphane Coulon, Vincent Géli, et Yves Corda. « RPA and Pif1 Cooperate to Remove G-Rich Structures at Both Leading and Lagging Strand ». *Cell Stress* 4, nº 3 (9 mars 2020): 48-63.

Maestroni, Laetitia, Samah Matmati, et Stéphane Coulon. « Solving the Telomere Replication Problem ». *Genes* 8, nº 2 (31 janvier 2017): 55.

Makoto Kawamukai, « Regulation of Sexual Differentiation Initiation in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 88, nº 5 (22 avril 2024): 475-92.

Martın, Victoria, Li-Lin Du, Sophie Rozenzhak, et Paul Russell. « Protection of Telomeres by a Conserved Stn1–Ten1 Complex », Proc. Natl. Acad. Sci. 2007; 104:14038–14043.

Marcand, Stéphane, Vanessa Brevet, Carl Mann, et Eric Gilson. « Cell Cycle Restriction of Telomere Elongation ». *Current Biology* 10, nº 8 (avril 2000): 487-90.

Maresca, C., A. Dello Stritto, C. D'Angelo, E. Petti, A. Rizzo, E. Vertecchi, F. Berardinelli, et al. « PARP1 Allows Proper Telomere Replication through TRF1 Poly (ADP-Ribosyl) Ation and Helicase Recruitment ». *Communications Biology* 6, nº 1 (2 mars 2023): 234.

Matmati, Samah, Sarah Lambert, Vincent Géli, et Stéphane Coulon. « Telomerase Repairs Collapsed Replication Forks at Telomeres ». *Cell Reports* 30, nº 10 (mars 2020): 3312-3322.e3.

Matmati, Samah, Mélina Vaurs, José M. Escandell, Laetitia Maestroni, Toru M. Nakamura, Miguel G. Ferreira, Vincent Géli, et Stéphane Coulon. « The Fission Yeast Stn1-Ten1 Complex Limits Telomerase Activity via Its SUMO-Interacting Motif and Promotes Telomeres Replication ». *Science Advances* 4, nº 5 (4 mai 2018): eaar2740.

Matsuda, Atsushi, Yuji Chikashige, Da-Qiao Ding, Chizuru Ohtsuki, Chie Mori, Haruhiko Asakawa, Hiroshi Kimura, Tokuko Haraguchi, et Yasushi Hiraoka. « Highly Condensed Chromatins Are Formed Adjacent to Subtelomeric and Decondensed Silent Chromatin in Fission Yeast ». *Nature Communications* 6, nº 1 (24 juillet 2015): 7753.

Matsura Atsushi, Naito T, Ishikawa F. « Genetic control of telomere integrity in Schizosaccharomyces pombe: rad3(+) and tel1(+) are parts of two regulatory networks independent of the downstream protein kinases chk1(+) and cds1(+)». *Genetics.* 1999 Aug;152(4):1501-12.

Mattarocci, Stefano, Maksym Shyian, Laure Lemmens, Pascal Damay, Dogus Murat Altintas, Tianlai Shi, Clinton R. Bartholomew, Nicolas H. Thomä, Christopher F.J. Hardy, et David Shore. « Rif1 Controls DNA Replication Timing in Yeast through the PP1 Phosphatase Glc7 ». *Cell Reports* 7, nº 1 (avril 2014): 62-69.

McDonald, Karin R., Nasim Sabouri, Christopher J. Webb, et Virginia A. Zakian. « The Pif1 Family Helicase Pfh1 Facilitates Telomere Replication and Has an RPA-Dependent Role during Telomere Lengthening ». *DNA Repair* 24 (décembre 2014): 80-86.

Mennie, Amanda K., Bettina A. Moser, et Toru M. Nakamura. « LARP7-like Protein Pof8 Regulates Telomerase Assembly and Poly(A)+TERRA Expression in Fission Yeast ». *Nature Communications* 9, nº 1 (8 février 2018): 586.

Mennie, Amanda K., Bettina A. Moser, Alice Hoyle, Ross S. Low, Katsunori Tanaka, et Toru M. Nakamura. « Tpz1TPP1 Prevents Telomerase Activation and Protects Telomeres by Modulating the Stn1-Ten1 Complex in Fission Yeast ». *Communications Biology* 2, nº 1 (7 août 2019): 297.

Miller, Kyle M, et Julia Promisel Cooper. « The Telomere Protein Taz1 Is Required to Prevent and Repair Genomic DNA Breaks ». *Molecular Cell* 11, nº 2 (février 2003): 303-13.

Miller, Kyle M, Miguel Godinho Ferreira, et Julia Promisel Cooper. « Taz1, Rap1 and Rif1 Act Both Interdependently and Independently to Maintain Telomeres ». *The EMBO Journal* 24, nº 17 (7 septembre 2005): 3128-35.

Miller, Kyle M., Ofer Rog, et Julia Promisel Cooper. « Semi-Conservative DNA Replication through Telomeres Requires Taz1 ». *Nature* 440, nº 7085 (avril 2006): 824-28.

Myler, Logan R., Beatrice Toia, Cara K. Vaughan, Kaori Takai, Andreea M. Matei, Peng Wu, Tanya T. Paull, Titia De Lange, et Francisca Lottersberger. « DNA-PK and the TRF2 iDDR Inhibit MRN-Initiated Resection at Leading-End Telomeres ». *Nature Structural & Molecular Biology* 30, nº 9 (septembre 2023): 1346-56.

Mirman, Zachary, Francisca Lottersberger, Hiroyuki Takai, Tatsuya Kibe, Yi Gong, Kaori Takai, Alessandro Bianchi, Michal Zimmermann, Daniel Durocher, et Titia De Lange. « 53BP1–RIF1–Shieldin Counteracts DSB Resection through CST- and Polα-Dependent Fill-In ». *Nature* 560, nº 7716 (août 2018): 112-16.

Miyabe, Izumi, Ken'Ichi Mizuno, Andrea Keszthelyi, Yasukazu Daigaku, Meliti Skouteri, Saed Mohebi, Thomas A Kunkel, Johanne M Murray, et Antony M Carr. « Polymerase δ Replicates Both Strands after Homologous Recombination–Dependent Fork Restart ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22, nº 11 (novembre 2015): 932-38.

Miyake, Yasuyuki, Mirai Nakamura, Akira Nabetani, Shintaro Shimamura, Miki Tamura, Shin Yonehara, Motoki Saito, et Fuyuki Ishikawa. « RPA-like Mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 Complex Binds to Single-Stranded DNA and Protects Telomeres Independently of the Pot1 Pathway ». *Molecular Cell* 36, nº 2 (octobre 2009): 193-206.

Miyagawa, Keisuke, Ross S. Low, Venny Santosa, Hiroki Tsuji, Bettina A. Moser, Shiho Fujisawa, Jennifer L. Harland, et al. « SUMOylation Regulates Telomere Length by Targeting the Shelterin Subunit Tpz1$^{Tpp1}$ to Modulate Shelterin–Stn1 Interaction in Fission Yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, nº 16 (22 avril 2014): 5950-55.

Miyoshi, Tomoichiro, Junko Kanoh, Motoki Saito, and Fuyuki Ishikawa « Fission Yeast Pot1-Tpp1 Protects Telomeres and Regulates Telomere Length ». *Science* 320: 2008. 1341–44.

Miyoshi, Tomoichiro, Mahito Sadaie, Junko Kanoh, et Fuyuki Ishikawa. « Telomeric DNA Ends Are Essential for the Localization of Ku at Telomeres in Fission Yeast ». *Journal of Biological Chemistry* 278, nº 3 (janvier 2003): 1924-31.

Moser, Bettina A., et Toru M. Nakamura. « Protection and Replication of Telomeres in Fission yeastThis Paper Is One of a Selection of Papers Published in This Special Issue, Entitled 30th Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and Has Undergone the Journal's Usual Peer Review Process. » *Biochemistry and Cell Biology* 87, nº 5 (octobre 2009): 747-58.

Moser, Bettina A, Lakxmi Subramanian, Ya-Ting Chang, Chiaki Noguchi, Eishi Noguchi, et Toru M Nakamura. « Differential Arrival of Leading and Lagging Strand DNA Polymerases at Fission Yeast Telomeres ». *The EMBO Journal* 28, nº 7 (8 avril 2009): 810-20.

Moser, Bettina A, Ya-Ting Chang, Jorgena Kosti, et Toru M Nakamura. « Tel1ATM and Rad3ATR Kinases Promote Ccq1-Est1 Interaction to Maintain Telomeres in Fission Yeast ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18, nº 12 (décembre 2011): 1408-13.

Myler, Logan R., Beatrice Toia, Cara K. Vaughan, Kaori Takai, Andreea M. Matei, Peng Wu, Tanya T. Paull, Titia De Lange, et Francisca Lottersberger. « DNA-PK and the TRF2 iDDR Inhibit MRN-Initiated Resection at Leading-End Telomeres ». *Nature Structural & Molecular Biology* 30, nº 9 (septembre 2023): 1346-56.

Nageshan, Rishi Kumar, Raquel Ortega, Nevan Krogan, et Julia Promisel Cooper. « Fate of Telomere Entanglements Is Dictated by the Timing of Anaphase Midregion Nuclear Envelope Breakdown ». *Nature Communications* 15, nº 1 (3 juin 2024): 4707.

Naiman, Karel, Eduard Campillo-Funollet, Adam T. Watson, Alice Budden, Izumi Miyabe, et Antony M. Carr. « Replication Dynamics of Recombination-Dependent Replication Forks ». *Nature Communications* 12, nº 1 (10 février 2021): 923.

Nakamura, Toru M., Bettina A. Moser, Li-Lin Du, et Paul Russell. « Cooperative Control of Crb2 by ATM Family and Cdc2 Kinases Is Essential for the DNA Damage Checkpoint in Fission Yeast ». *Molecular and Cellular Biology* 25, nº 24 (1 décembre 2005): 10721-30.

Nakamura, Toru M., Julia Promisel Cooper, et Thomas R. Cech. « Two Modes of Survival of Fission Yeast Without Telomerase ». *Science* 282, nº 5388 (16 octobre 1998): 493-96.

Nishibuchi, Gohei, et Jérôme Déjardin. « The Molecular Basis of the Organization of Repetitive DNA-Containing Constitutive Heterochromatin in Mammals ». *Chromosome Research* 25, nº 1 (mars 2017): 77-87.

Noguchi, Eishi, Chiaki Noguchi, Li-Lin Du, et Paul Russell. « Swi1 Prevents Replication Fork Collapse and Controls Checkpoint Kinase Cds1 ». *Molecular and Cellular Biology* 23, nº 21 (1 novembre 2003): 7861-74.

Oganesian, Liana, et Jan Karlseder. « Telomeric Armor: The Layers of End Protection ». *Journal of Cell Science* 122, nº 22 (15 novembre 2009): 4013-25.

Ogawa, Shiho, Sayuri Kido, Tetsuya Handa, Hidesato Ogawa, Haruhiko Asakawa, Tatsuro S Takahashi, Takuro Nakagawa, Yasushi Hiraoka, et Hisao Masukata. « Shelterin Promotes Tethering of Late Replication Origins to Telomeres for Replication-timing Control ». *The EMBO Journal* 37, nº 15 (août 2018): e98997.

Ohno, Yuko, Yuki Ogiyama, Yoshino Kubota, Takuya Kubo, et Kojiro Ishii. « Acentric Chromosome Ends Are Prone to Fusion with Functional Chromosome Ends through a Homology-Directed Rearrangement ». *Nucleic Acids Research* 44, nº 1 (8 janvier 2016): 232-44.

Oizumi, Yusuke, Takuto Kaji, Sanki Tashiro, Yumiko Takeshita, Yuko Date, et Junko Kanoh. « Complete Sequences of Schizosaccharomyces Pombe Subtelomeres Reveal Multiple Patterns of Genome Variation ». *Nature Communications* 12, nº 1 (27 janvier 2021): 611.

Okamoto, Keiji, Cristina Bartocci, Iliana Ouzounov, Jolene K. Diedrich, John R. Yates Iii, et Eros Lazzerini Denchi. « A Two-Step Mechanism for TRF2-Mediated Chromosome-End Protection ». *Nature* 494, nº 7438 (février 2013): 502-5.

Ohki, R. « Telomere-Bound TRF1 and TRF2 Stall the Replication Fork at Telomeric Repeats ». *Nucleic Acids Research* 32, nº 5 (8 mars 2004): 1627-37.

Olovnikov, A M. « A Theory of Marginotomy The Incomplete Copying of Template Margin in Enzymic Synthesis of Polym&otides and Biological Significance of the Phenomenon? », *Journal of Theoretical Biology 41* (1): 181-90

Olson, Conner L., et Deborah S. Wuttke. « Guardians of the Genome: How the Single-Stranded DNA-Binding Proteins RPA and CST Facilitate Telomere Replication ». *Biomolecules* 14, nº 3 (22 février 2024): 263.

Pan, Lili, Duncan Tormey, Nadine Bobon, et Peter Baumann. « Rap1 Prevents Fusions between Long Telomeres in Fission Yeast ». *The EMBO Journal* 41, nº 20 (17 octobre 2022): e110458.

Palm, Wilhelm, et Titia De Lange. « How Shelterin Protects Mammalian Telomeres ». *Annual Review of Genetics* 42, nº 1 (1 décembre 2008): 301-34.

Páez-Moscoso, Diego J., Lili Pan, Rutendo F. Sigauke, Morgan R. Schroeder, Wen Tang, et Peter Baumann. « Pof8 Is a La-Related Protein and a Constitutive Component of Telomerase in Fission Yeast ». *Nature Communications* 9, nº 1 (8 février 2018): 587.

Baumann, Peter, et Thomas R. Cech. « Protection of Telomeres by the Ku Protein in Fission Yeast ». Édité par Alan P. Wolffe. *Molecular Biology of the Cell* 11, nº 10 (octobre 2000): 3265-75.

Piazza, Aurèle, Michael Adrian, Frédéric Samazan, Brahim Heddi, Florian Hamon, Alexandre Serero, Judith Lopes, Marie-Paule Teulade-Fichou, Anh Tuân Phan, et Alain Nicolas. « Short Loop Length and High Thermal Stability Determine Genomic Instability Induced by G-quadruplex-forming Minisatellites ». *The EMBO Journal* 34, nº 12 (12 juin 2015): 1718-34.

Piazza, Aurèle, Alexandre Serero, Jean-Baptiste Boulé, Patricia Legoix-Né, Judith Lopes, et Alain Nicolas. « Stimulation of Gross Chromosomal Rearrangements by the Human CEB1 and CEB25 Minisatellites in Saccharomyces Cerevisiae Depends on G-Quadruplexes or Cdc13 ». Édité par Nancy Maizels. *PLoS Genetics* 8, nº 11 (1 novembre 2012): e1003033.

Pinzaru, Alexandra M., Robert A. Hom, Angela Beal, Aaron F. Phillips, Eric Ni, Timothy Cardozo, Nidhi Nair, et al. « Telomere Replication Stress Induced by POT1 Inactivation Accelerates Tumorigenesis ». *Cell Reports* 15, nº 10 (juin 2016): 2170-84.

Pinzaru, Alexandra M., Mike Kareh, Noa Lamm, Eros Lazzerini-Denchi, Anthony J. Cesare, et Agnel Sfeir. « Replication Stress Conferred by POT1 Dysfunction Promotes Telomere Relocalization to the Nuclear Pore ». *Genes & Development* 34, nº 23-24 (1 décembre 2020): 1619-36.

Pitt, Christopher W., et Julia Promisel Cooper. « Pot1 Inactivation Leads to Rampant Telomere Resection and Loss in One Cell Cycle ». *Nucleic Acids Research* 38, nº 20 (novembre 2010): 6968-75.

Prioleau M-N (2017) G-Quadruplexes and DNA Replication Origins. (2017) Adv Exp Med Biol 1042: 273–286

Rai, Rekha, Hong Zheng, Hua He, Ying Luo, Asha Multani, Phillip B Carpenter, et Sandy Chang. « The Function of Classical and Alternative Non-Homologous End-Joining Pathways in the Fusion of Dysfunctional Telomeres ». *The EMBO Journal* 29, nº 15 (4 août 2010): 2598-2610.

Ramsay, Andrew J, Víctor Quesada, Miguel Foronda, Laura Conde, Alejandra Martínez-Trillos, Neus Villamor, David Rodríguez, et al. « POT1 Mutations Cause Telomere Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Nature Genetics* 45, nº 5 (mai 2013): 526-30.

Reddel, Roger R. « Alternative Lengthening of Telomeres, Telomerase, and Cancer ». *Cancer Letters* 194, nº 2 (mai 2003): 155-62.

Rodríguez-López M, Cotobal C, Fernández-Sánchez O, Bravo NB, Oktriani R, Abendroth H, Uka D, Hoti M, Wang J, Zaratiegui M, et al (2016) « A CRISPR/Cas9-based method and primer design tool for seamless genome editing in fission yeast ».*Wellcome Open* Res 1: 19

Rog, Ofer, Kyle M. Miller, Miguel Godinho Ferreira, et Julia Promisel Cooper. « Sumoylation of RecQ Helicase Controls the Fate of Dysfunctional Telomeres ». *Molecular Cell* 33, nº 5 (mars 2009): 559-69.

Roake, Caitlin M., et Steven E. Artandi. « Regulation of Human Telomerase in Homeostasis and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, nº 7 (juillet 2020): 384-97.

Saab, Christopher, Joseph Stephan, et Elias Akoury. « Structural Insights into the Binding Mechanism of Clr4 Methyltransferase to H3K9 Methylated Nucleosome ». *Scientific Reports* 14, nº 1 (5 mars 2024): 5438.

Sabouri, Nasim, John A Capra, et Virginia A Zakian. « The Essential Schizosaccharomyces Pombe Pfh1 DNA Helicase Promotes Fork Movement Past G-Quadruplex Motifs to Prevent DNA Damage ». *BMC Biology* 12, nº 1 (décembre 2014): 101.

Saada Ait, Anissia, Ana Teixeira-Silva, Ismail Iraqui, Audrey Costes, Julien Hardy, Giulia Paoletti, Karine Fréon, et Sarah A.E. Lambert. « Unprotected Replication Forks Are Converted into Mitotic Sister Chromatid Bridges ». *Molecular Cell* 66, nº 3 (mai 2017): 398-410.e4.

Saab, Christopher, Joseph Stephan, et Elias Akoury. « Structural Insights into the Binding Mechanism of Clr4 Methyltransferase to H3K9 Methylated Nucleosome ». *Scientific Reports* 14, nº 1 (5 mars 2024): 5438.

Sarek, Grzegorz, Panagiotis Kotsantis, Phil Ruis, David Van Ly, Pol Margalef, Valerie Borel, Xiao-Feng Zheng, et al. « CDK Phosphorylation of TRF2 Controls T-Loop Dynamics during the Cell Cycle ». *Nature* 575, nº 7783 (21 novembre 2019): 523-27.

Sarthy, Jay, Nancy S Bae, Jonathan Scrafford, et Peter Baumann. « Human RAP1 Inhibits Non-Homologous End Joining at Telomeres ». *The EMBO Journal* 28, nº 21 (4 novembre 2009): 3390-99.

Saxena, Sneha, et Lee Zou. « Hallmarks of DNA Replication Stress ». *Molecular Cell* 82, nº 12 (juin 2022): 2298-2314.

Shampay, Janis, Jack W. Szostak, et Elizabeth H. Blackburn. « DNA Sequences of Telomeres Maintained in Yeast ». *Nature* 310, nº 5973 (juillet 1984): 154-57.

Shen, J. « Unwinding the Molecular Basis of the Werner Syndrome ». *Mechanisms of Ageing and Development* 122, nº 9 (15 juillet 2001): 921-44.

Segurado, Mónica, Alberto De Luis, et Francisco Antequera. « Genome-wide Distribution of DNA Replication Origins at A+T-rich Islands in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *EMBO Reports* 4, nº 11 (novembre 2003): 1048-53.

Sfeir, Agnel, Settapong T. Kosiyatrakul, Dirk Hockemeyer, Sheila L. MacRae, Jan Karlseder, Carl L. Schildkraut, et Titia De Lange. « Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication ». *Cell* 138, nº 1 (juillet 2009): 90-103.

Sfeir, Agnel, et Titia De Lange. « Removal of Shelterin Reveals the Telomere End-Protection Problem ». *Science* 336, nº 6081 (4 mai 2012): 593-97.

Shi, Shaohua, Yuanze Zhou, Yanjia Lu, Hong Sun, Jing Xue, Zhenfang Wu, et Ming Lei. « Ccq1–Raf2 Interaction Mediates CLRC Recruitment to Establish Heterochromatin at Telomeres ». *Life Science Alliance* 4, nº 11 (novembre 2021): e202101106.

Simon, Amos J., Atar Lev, Yong Zhang, Batia Weiss, Anna Rylova, Eran Eyal, Nitzan Kol, et al. « Mutations in *STN1* Cause Coats plus Syndrome and Are Associated with Genomic and Telomere Defects ». *Journal of Experimental Medicine* 213, nº 8 (25 juillet 2016): 1429-40.

Spink, K. G. « Sequence-Specific Binding of Taz1p Dimers to Fission Yeast Telomeric DNA ». *Nucleic Acids Research* 28, nº 2 (15 janvier 2000): 527-33.

Smith, Emmanuel W., Simon Lattmann, Zhehui Barry Liu, Bilal Ahsan, et Daniela Rhodes. « Insights into POT1 Structural Dynamics Revealed by Cryo-EM ». Édité par Arthur J. Lustig. *PLOS ONE* 17, nº 2 (17 février 2022): e0264073.

Subramanian, Lakxmi, et Toru M. Nakamura. « A Kinase-Independent Role for the Rad3ATR-Rad26ATRIP Complex in Recruitment of Tel1ATM to Telomeres in Fission Yeast ». Édité par Gregory P. Copenhaver. *PLoS Genetics* 6, nº 2 (5 février 2010): e1000839.

Surovtseva, Yulia V., Dmitri Churikov, Kara A. Boltz, Xiangyu Song, Jonathan C. Lamb, Ross Warrington, Katherine Leehy, Michelle Heacock, Carolyn M. Price, et Dorothy E. Shippen. « Conserved Telomere Maintenance Component 1 Interacts with STN1 and Maintains Chromosome Ends in Higher Eukaryotes ». *Molecular Cell* 36, nº 2 (octobre 2009): 207-18.

Shampay, Janis, Jack W. Szostak, et Elizabeth H. Blackburn. « DNA Sequences of Telomeres Maintained in Yeast ». *Nature* 310, nº 5973 (juillet 1984): 154-57.

Stewart, Jason A. « Emerging Roles of CST in Maintaining Genome Stability and Human Disease ». *Frontiers in Bioscience* 23, nº 8 (2018): 1564-86.

Storchova, Radka, Matous Palek, Natalie Palkova, Pavel Veverka, Tomas Brom, Ctirad Hofr, et Libor Macurek. « Phosphorylation of TRF2 Promotes Its Interaction with TIN2 and Regulates DNA Damage Response at Telomeres ». *Nucleic Acids Research* 51, nº 3 (22 février 2023): 1154-72.

Takai, Hiroyuki, Emma Jenkinson, Shaheen Kabir, Riyana Babul-Hirji, Nasrin Najm-Tehrani, David A. Chitayat, Yanick J. Crow, et Titia De Lange. « A POT1 Mutation Implicates Defective Telomere End Fill-in and Telomere Truncations in Coats Plus ». *Genes & Development* 30, nº 7 (1 avril 2016): 812-26.

Takai, Hiroyuki, Valentina Aria, Pamela Borges, Joseph T. P. Yeeles, et Titia De Lange. « CST–Polymerase α-Primase Solves a Second Telomere End-Replication Problem ». *Nature* 627, nº 8004 (21 mars 2024): 664-70.

Takasugi, Taylor, Peili Gu, Fengshan Liang, Isabelle Staco, et Sandy Chang. « *Pot1b* −/− Tumors Activate G-Quadruplex-Induced DNA Damage to Promote Telomere Hyper-Elongation ». *Nucleic Acids Research* 51, nº 17 (22 septembre 2023): 9227-47.

Tashiro, Sanki, Tetsuya Handa, Atsushi Matsuda, Takuto Ban, Toru Takigawa, Kazumi Miyasato, Kojiro Ishii, et al. « Shugoshin Forms a Specialized Chromatin Domain at Subtelomeres That Regulates Transcription and Replication Timing ». *Nature Communications* 7, nº 1 (25 janvier 2016): 10393.

Tazumi, Atsutoshi, Masayoshi Fukuura, Ryuichiro Nakato, Ami Kishimoto, Tomokazu Takenaka, Shiho Ogawa, Ji-hoon Song, et al. « Telomere-Binding Protein Taz1 Controls Global Replication Timing through Its Localization near Late Replication Origins in Fission Yeast ». *Genes & Development* 26, nº 18 (15 septembre 2012): 2050-62.

Teixeira, M.T., Arneric, M., Sperisen, P., and Lingner, J. « Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states ». *Cell* 117, (2004) 323–335.

Tong, Adrian S., J. Lewis Stern, Agnel Sfeir, Melissa Kartawinata, Titia de Lange, Xu-Dong Zhu, et Tracy M. Bryan. « ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres ». *Cell Reports* 13, nº 8 (novembre 2015): 1633-46.

Tomita, Kazunori, et Julia Promisel Cooper. « The Telomere Bouquet Controls the Meiotic Spindle ». *Cell* 130, nº 1 (juillet 2007): 113-26.

Tomita, Kazunori, et Julia Promisel Cooper. « Fission Yeast Ccq1 Is Telomerase Recruiter and Local Checkpoint Controller ». *Genes & Development* 22, nº 24 (15 décembre 2008): 3461-74.

Tomita, Kazunori, Akira Matsuura, Thomas Caspari, Antony M. Carr, Yufuko Akamatsu, Hiroshi Iwasaki, Ken-ichi Mizuno, et al. « Competition between the Rad50 Complex and the Ku Heterodimer Reveals a Role for Exo1 in Processing Double-Strand Breaks but Not Telomeres ». *Molecular and Cellular Biology* 23, nº 15 (1 août 2003): 5186-97.

Toteva, Tea, Bethany Mason, Yutaka Kanoh, Peter Brøgger, Daniel Green, Janne Verhein-Hansen, Hisao Masai, et Geneviève Thon. « Establishment of Expression-State Boundaries by Rif1 and Taz1 in Fission Yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, nº 5 (31 janvier 2017): 1093-98.

Tusso, Sergio, Bart P S Nieuwenhuis, Fritz J Sedlazeck, John W Davey, Daniel C Jeffares, et Jochen B W Wolf. « Ancestral Admixture Is the Main Determinant of Global Biodiversity in Fission Yeast ». Édité par Rasmus Nielsen. *Molecular Biology and Evolution* 36, nº 9 (1 septembre 2019): 1975-89.

Urban, John M., Michael S. Foulk, Cinzia Casella, et Susan A. Gerbi. « The Hunt for Origins of DNA Replication in Multicellular Eukaryotes ». *F1000Prime Reports* 7 (3 mars 2015).

Vaurs, Mélina, Karel Naiman, Chaïnez Bouabboune, Sudhir Rai, Katarzyna Ptasińska, Marion Rives, Samah Matmati, Antony M. Carr, Vincent Géli, et Stéphane Coulon. « Stn1-Ten1 and Taz1 Independently Promote Replication of Subtelomeric Fragile Sequences in Fission Yeast ». *Cell Reports* 42, nº 6 (juin 2023): 112537.

Verdun, Ramiro E., et Jan Karlseder. « The DNA Damage Machinery and Homologous Recombination Pathway Act Consecutively to Protect Human Telomeres ». *Cell* 127, nº 4 (novembre 2006): 709-20.

Vyas, Aditi, Anna V. Freitas, Zachary A. Ralston, et Zhaohua Tang. « Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* : A Unicellular “Micromammal” Model Organism ». *Current Protocols* 1, nº 6 (juin 2021): e151.

Wang, Feng, Jason A. Stewart, Christopher Kasbek, Yong Zhao, Woodring E. Wright, et Carolyn M. Price. « Human CST Has Independent Functions during Telomere Duplex Replication and C-Strand Fill-In ». *Cell Reports* 2, nº 5 (novembre 2012): 1096-1103.

Wang, Xiaorong, et Peter Baumann. « Chromosome Fusions Following Telomere Loss Are Mediated by Single-Strand Annealing ». *Molecular Cell* 31, nº 4 (août 2008): 463-73.

Wang, Yilin, Kathryn S Brady, Benjamin P Caiello, Stephanie M Ackerson, et Jason A Stewart. « Human CST Suppresses Origin Licensing and Promotes AND-1/Ctf4 Chromatin Association ». *Life Science Alliance* 2, nº 2 (avril 2019): e201800270.

Wang, Yun-Long, Wan-Wen Zhao, Shao-Mei Bai, Li-Li Feng, Shu-Ying Bie, Li Gong, Fang Wang, et al. « MRNIP Condensates Promote DNA Double-Strand Break Sensing and End Resection ». *Nature Communications* 13, nº 1 (12 mai 2022): 2638.

Webb, Christopher J, et Virginia A Zakian. « Identification and Characterization of the Schizosaccharomyces Pombe TER1 Telomerase RNA ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15, nº 1 (janvier 2008): 34-42.

Webb, Christopher J., et Virginia A. Zakian. « *Schizosaccharomyces Pombe* Ccq1 and TER1 Bind the 14-3-3-like Domain of Est1, Which Promotes and Stabilizes Telomerase–Telomere Association ». *Genes & Development* 26, nº 1 (1 janvier 2012): 82-91.

Welfer, Griffin A, et Bret D Freudenthal. « Recent Advancements in the Structural Biology of Human Telomerase and Their Implications for Improved Design of Cancer Therapeutics ». *NAR Cancer* 5, nº 1 (11 janvier 2023): zcad010.

Wright, Woodring E., Valerie M. Tesmer, Kenneth E. Huffman, Stephen D. Levene, et Jerry W. Shay. « Normal Human Chromosomes Have Long G-Rich Telomeric Overhangs at One End ». *Genes & Development* 11, nº 21 (1 novembre 1997): 2801-9.

Williams, R. Scott, Gerald E. Dodson, Oliver Limbo, Yoshiki Yamada, Jessica S. Williams, Grant Guenther, Scott Classen, et al. « Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair ». *Cell* 139, nº 1 (octobre 2009): 87-99.

Wood, V., R. Gwilliam, M.-A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, et al. « The Genome Sequence of Schizosaccharomyces Pombe ». *Nature* 415, nº 6874 (21 février 2002): 871-80.

Wu, Peng, Hiroyuki Takai, et Titia de Lange. « Telomeric 3' Overhangs Derive from Resection by Exo1 and Apollo and Fill-In by POT1b-Associated CST ». *Cell* 150, nº 1 (juillet 2012): 39-52.

Xue, Jing, Hongwen Chen, Jian Wu, Miho Takeuchi, Haruna Inoue, Yanmei Liu, Hong Sun, Yong Chen, Junko Kanoh, et Ming Lei. « Structure of the Fission Yeast S. Pombe Telomeric Tpz1-Poz1-Rap1 Complex ». *Cell Research* 27, nº 12 (décembre 2017): 1503-20.

Yadav, Rajesh K., Atsushi Matsuda, Brandon R. Lowe, Yasushi Hiraoka, et Janet F. Partridge. « Subtelomeric Chromatin in the Fission Yeast S. Pombe ». *Microorganisms* 9, nº 9 (17 septembre 2021): 1977.

Yamamoto, Io, Hidenori Nakaoka, Masahiro Takikawa, Sanki Tashiro, Junko Kanoh, Tomoichiro Miyoshi, et Fuyuki Ishikawa. « Fission Yeast Stn1 Maintains Stability of Repetitive DNA at Subtelomere and Ribosomal DNA Regions ». *Nucleic Acids Research* 49, nº 18 (11 octobre 2021): 10465-76.

Yamazaki, Harutake, Yusuke Tarumoto, et Fuyuki Ishikawa. « Tel1$^{ATM}$ and Rad3$^{ATR}$ Phosphorylate the Telomere Protein Ccq1 to Recruit Telomerase and Elongate Telomeres in Fission Yeast ». *Genes & Development* 26, nº 3 (1 février 2012): 241-46.

Young, Eleanor, Heba Z. Abid, Pui-Yan Kwok, Harold Riethman, et Ming Xiao. « Comprehensive Analysis of Human Subtelomeres by Whole Genome Mapping ». Édité par Nancy Maizels. *PLOS Genetics* 16, nº 1 (27 janvier 2020): e1008347.

Yu-Tian Tao, Fang Suo, Sergio Tusso, Yan-Kai Wang, Song Huang, Jochen B W Wolf, et Li-Lin Du. « Intraspecific Diversity of Fission Yeast Mitochondrial Genomes ». Édité par Kenneth Wolfe. *Genome Biology and Evolution* 11, nº 8 (1 août 2019): 2312-29.

Zhu, Zhu, Woo-Hyun Chung, Eun Yong Shim, Sang Eun Lee, et Grzegorz Ira. « Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends ». *Cell* 134, nº 6 (septembre 2008): 981-94.

Zhang, Miaomiao, Bing Wang, Tingfang Li, Rui Liu, Yingnan Xiao, Xin Geng, Guang Li, et al. « Mammalian CST Averts Replication Failure by Preventing G-Quadruplex Accumulation ». *Nucleic Acids Research* 47, nº 10 (4 juin 2019): 5243-59.

Zhao, Fei, Wootae Kim, Jake A. Kloeber, et Zhenkun Lou. « DNA End Resection and Its Role in DNA Replication and DSB Repair Choice in Mammalian Cells ». *Experimental & Molecular Medicine* 52, nº 10 (octobre 2020): 1705-14.

Zimmermann, Michal, Tatsuya Kibe, Shaheen Kabir, et Titia De Lange. « TRF1 Negotiates TTAGGG Repeat-Associated Replication Problems by Recruiting the BLM Helicase and the TPP1/POT1 Repressor of ATR Signaling ». *Genes & Development* 28, nº 22 (15 novembre 2014): 2477-91.

Zofall, Martin, Deborah R. Smith, Takeshi Mizuguchi, Jothy Dhakshnamoorthy, et Shiv I.S. Grewal. « Taz1-Shelterin Promotes Facultative Heterochromatin Assembly at Chromosome-Internal Sites Containing Late Replication Origins ». *Molecular Cell* 62, n° 6 (juin 2016): 862-74.

Zou, Lee, et Stephen J. Elledge. « Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes ». *Science* 300, n° 5625 (6 juin 2003): 1542-48.

Zou, Lee, Dou Liu, et Stephen J. Elledge. « Replication Protein A-Mediated Recruitment and Activation of Rad17 Complexes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, n° 24 (25 novembre 2003): 13827-32.

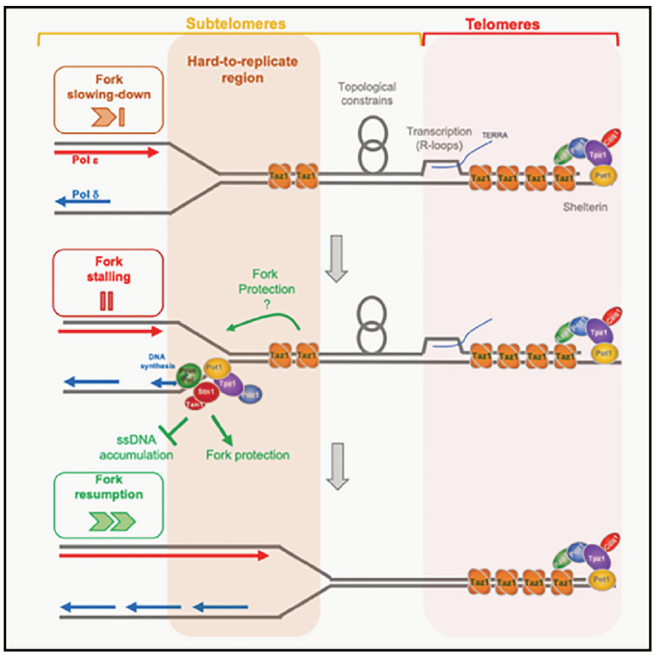
# ANNEXES

Article

Cell Reports

## Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast

### Graphical abstract




### Highlights

- Stn1-Ten1 is crucial for replication of a hard-to-replicate subtelomeric region
- Taz1 and Stn1-Ten1 bind to this hard-to-replicate subtelomeric region
- Stn1-Ten1 function relies on its association with Pot1-Tpz1-Poz1 but not Taz1
- An HR-based fork restart mechanism occurs when Stn1 is dysfunctional

### Authors

Me´lina Vaurs, Karel Naiman, Chaı¨nez Bouabboune, ..., Antony M. Carr, Vincent Ge´li, Ste´phane Coulon

### Correspondence

vincent.geli@inserm.fr (V.G.), stephane.coulon@inserm.fr (S.C.)

### In brief

Vaurs et al. show that the Stn1-Ten1 complex is crucial for efficient replication of the subtelomeric STE3-2 region. While both Taz1 and Stn1-Ten1 bind STE3-2, Stn1-Ten1 function is independent of Taz1 but relies on Pot1-Tpz1-Poz1. With dysfunctional Stn1, an HR-based fork restart mechanism becomes necessary for STE3-2 replication.

Vaurs et al., 2023, Cell Reports 42, 112537
June 27, 2023 a 2023 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112537

CellPress

Cell Reports

CellPress
OPEN ACCESS

Article

# Stn1-Ten1 and Taz1 independently promote replication of subtelomeric fragile sequences in fission yeast

Me´lina Vaurs,[1,3] Karel Naiman,[1,2,3] Cha¨ınez Bouabboune,[1] Sudhir Rai,[1] Katarzyna Ptasińska,[2] Marion Rives,[1] Samah Matmati,[1] Antony M. Carr,[2] Vincent Ge´li,[1,*] and Ste´phane Coulon[1,4,*]

[1]CNRS, INSERM, Aix Marseille Univ, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Ligue Nationale Contre le Cancer (e´quipe labellise´e), Marseille, France
[2]Genome Damage and Stability Centre, School of Life Sciences, University of Sussex, Falmer BN1 9RQ, UK
[3]These authors contributed equally
[4]Lead contact
*Correspondence: vincent.geli@inserm.fr (V.G.), stephane.coulon@inserm.fr (S.C.)
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112537

## SUMMARY

Efficient replication of terminal DNA is crucial to maintain telomere stability. In fission yeast, Taz1 and the Stn1-Ten1 (ST) complex play prominent roles in DNA-ends replication. However, their function remains elusive. Here, we have analyzed genome-wide replication and show that ST does not affect genome-wide replication but is crucial for the efficient replication of a subtelomeric region called STE3-2. We further show that, when ST function is compromised, a homologous recombination (HR)-based fork restart mecha- nism becomes necessary for STE3-2 stability. While both Taz1 and Stn1 bind to STE3-2, we find that the STE3-2 replication function of ST is independent of Taz1 but relies on its association with the shelterin pro- teins Pot1-Tpz1-Poz1. Finally, we demonstrate that the firing of an origin normally inhibited by Rif1 can circumvent the replication defect of subtelomeres when ST function is compromised. Our results help illuminate why fission yeast telomeres are terminal fragile sites.

## INTRODUCTION

During each cell cycle, accurate replication of the genome ensures its integrity. In eukaryotes, DNA replication is stochastically initiated at replication origins that constitute binding sites for the origin recognition complex (ORC) that subsequently load the mini-chromosome maintenance protein complex (MCM) (reviewed in Hyrien,[1] Urban et al.,[2] and Fragkos et al.[3]). Replication initiates bidirectionally, and individual forks continue along a chromosome until they meet a fork initiated by an adjacent origin. At the end of the chromosome, replication is unidirectional because initiation mostly originates within subtelomeric regions, with the replication fork moving toward the telomeric repeats.[4–6] However, if such terminal forks arrest, replication can eventually initiate within the telomeric repeats to complete replication.[5–7]

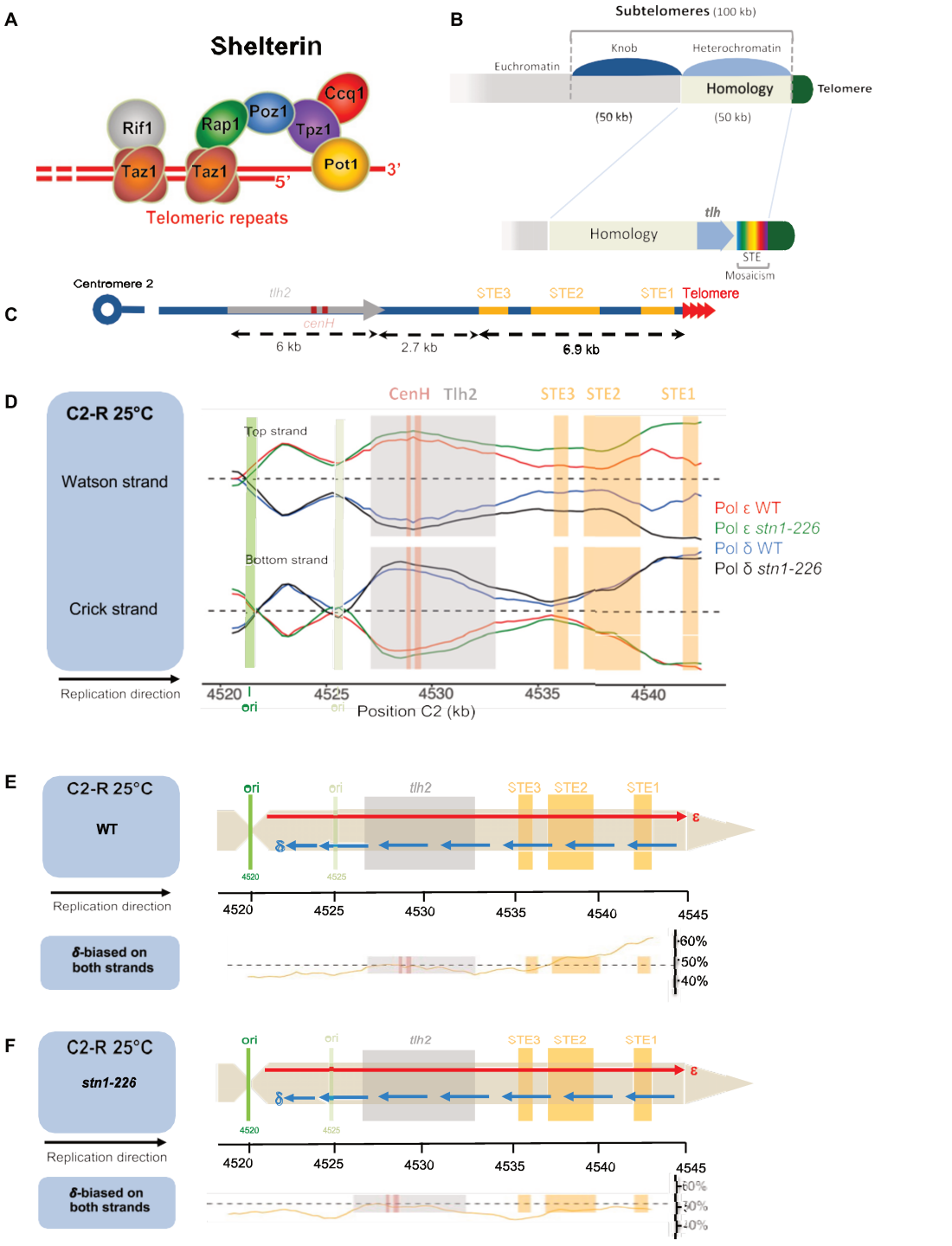
Telomeric sequences themselves are fragile sites that are hard to replicate, and replication forks frequently stall when entering telomeric tracks.[5,8] Indeed, these G-rich regions are prone to forming secondary structures, such as G-quadruplex (G4), T-loop super-structures, and R-loops or other RNA:DNA hybrids associated with telomere repeat-containing RNA (TERRA) transcription. These are potential sources of endogenous replication blocks that can impede the progression of a fork replicating telomeric repeat sequences.[9,10]

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* contains three chromosomes and six telomeres. Terminal sequences are composed of degenerate telomere repeats ($G_{2\text{-}6}$TTAC[A]) and are ~300 bp in length. The Taz1 protein specifically binds to duplex telomeric repeat DNA, and Pot1 recognizes the telomeric $3^0$-overhang, or G-tail. Four additional telomeric proteins, Tpz1, Rap1, Poz1, and Ccq1, bridge Taz1 to Pot1 through a network of protein-protein interactions[11,12] (Figure 1A). In contrast, subtelomeric regions contain a mosaic of multiple segments of homologous sequences that span ~50 kb of the telomere-proximal DNA regions of chromosome I and II. These repeat sequences include the subtelomeric elements 1 (STE1), 2 (STE2), and 3 (STE3), which are enriched in poly[dA:dT] tracts, and centromere-homologous sequences (*cenH*), which are embedded in *tlh* genes that encode putative telomere-linked helicases (Tlhs) of the RecQ family[13–16] (Figure 1B). Chromosome III subtelomeric regions generally contain rDNA repeats, although in some strains, the telomere-proximal left arm of chromosome III mirrors the structure of chromosomes I and II.[16] Adjacent to these subtelomeric regions, an additional ~50 kb region forms a highly condensed subtelomeric chromatin body (Knob) that separates euchromatin from subtelomeres.[17,18]

In fission yeast,[8] as in mammalian cells, replication forks slow down when in the proximity of telomeric repeats, and telomere maintenance requires efficient replication.[19,20] Fission yeast Taz1 plays a prominent role in telomere replication, although its precise function is not yet established.[8] In addition to Taz1, further components including the RPA heterotrimer, the Pfh1




This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).




*(legend on next page)*

helicase, and telomerase itself contribute to promoting efficient replication of telomeres.[21–24] Recently, we and others have shown that the Stn1-Ten1 complex fulfills an important function during telomere replication.[25,26] *stn1* and *ten1* are both essential genes, deletion mutants of which eventually survive by circularizing their chromosomes. This suggests that both proteins fulfill crucial functions during telomere maintenance.[27] Stn1-Ten1 (ST) is known to negatively regulate telomerase through interaction with the SUMOylated form of Tpz1 and to promote C-strand synthesis through Primase-Pola recruitment.[25,28–30] The *stn1-226* allele, which results in amino acid changes in the SIM (SUMO-interacting motif) of Stn1 confers a thermo-sensitive (*ts*) phenotype.[25] Intriguingly, deletion of *rif1*$^+$ rescues the inviability and the telomere loss associated with the *stn1-226* mutant at the restrictive temperature.[25,26] Rif1 is a highly conserved and multifaceted protein that was initially identified as a negative regulator of telomere length in budding and fission yeasts.[31–33] In addition, Rif1 controls the timing of replication by regulating the firing of late origins.[34–37]

In humans, the Stn1 and Ten1 homologs STN1 and TEN1 are components of the CST (CTC1-ST) complex.[38,39] As in yeast, the human CST complex acts as an inhibitor of telomerase by promoting the synthesis of the complementary strand through Primase-Pola recruitment.[40] Independently of this C-strand fill- in reaction, CST has been shown to be essential for the replica- tion of duplex telomeric DNA[41–43] and also helps to resolve replication problems throughout the genome, likely at GC-rich repetitive sequences[44] or when replication is challenged.[45,46] These activities may also function via promoting Pola chromatin association. In addition, it has been reported that CST can suppress origin licensing by preventing MCM helicase loading.[47] Thus, the CST complex has crucial functions at telomeres and during genome maintenance that explain why mutations in either CTC1 and STN1 can cause the Coats plus syndrome, a se- vere genetic disease.[48,49] Human RIF1 also plays key roles in replication initiation and the regulation of replication timing by counteracting DDK-dependent phosphorylation through PP1 activity.[50,51] RIF1 also functions in double-strand break (DSB) repair, acting with 53BP1 to promote non-homologous end joining by antagonizing resection.[52,53] More recently, RIF1 and 53BP1, in association with Shieldin, have been shown to promote fill-in synthesis by promoting the association of a CST-Pola complex at DNA breaks and at dysfunctional telomeres.[54] Thus, in several respects, the CST complex and RIF1 operate in common pathways.

To gain insight into the fission yeast ST complex function and its connection with Rif1, we investigated genome-wide replication dynamics in *stn1-226* cells. For this purpose, we used the polymerase usage sequencing (PuSeq) approach that relies on mutant replicative polymerases that insert an increased frequency of ribonucleotides during DNA synthesis.[55,56] By mapping the strand-specific location of ribonucleotides across the genome by high-throughput sequencing, PuSeq allows the tracking of polymerase usage across the genome. This permits the examination of replication timing and the assignment of origin efficiencies. We show that the ST complex does not affect genome-wide replication but is crucial for the replication of a subtelomeric region called STE3-2. Strikingly, the ST complex is recruited to the STE3-2 region in a manner that requires the shelterin components Pot1-Tpz1-Poz1 but that does not require Taz1. Replication forks stall at STE3-2 when ST function is compromised. These stalled forks can either be restarted by homologous recombination (HR) or rescued by the firing of an origin downstream of STE3-2. Furthermore, we show that while Taz1 is also crucial for the STE3-2 replication, it acts independently of the ST complex. Our results reveal a specific role for shelterin factors and the ST complex in promoting replication of a difficult to replicate region that has characteristics reminiscent of fragile sites.

## RESULTS

### Genome-wide replication dynamics in *stn1-226*

To investigate ST functions during replication, we monitored replication dynamics by tracking polymerase usage in the *stn1-226* mutant grown at either the permissive temperature of 25°C or for three population doublings (9 h) at the semi-permissive temperature of 34°C. *stn1-226* cells grown at 34°C exhibit a mild *ts* phenotype but sustain sufficient growth to perform PuSeq. Indeed, 9 h following the temperature shift, telomeric and subtelomeric DNA is still maintained in *stn1-226* cells (Figure S1), contrasting with its loss at 36°C.[25] From the polymerase usage data we first calculated, as described previously,[55,56] T-rep (the time at which 50% of the locus of interest is replicated) to examine the relative replication timing across all three chromosomes of *S. pombe*. The global profile of replication dynamics did not change in *stn1-226* when compared with wild type (WT) at either 25°C or 34°C (Figure S2A). Because of the known genetic interaction between *stn1-226* and *rif1*D, we next focused our analysis on the 35 high-affinity Rif1-binding sites that have been identified on the fission yeast chromosomes.[57] At these sites, we specifically monitored the average origin activity, reflecting the relative probability of each locus to be used as an origin (see Katarzyna Ptasin´ska's PhD).[58] Around these Rif1-binding sites, the origin activity in *stn1-226* and WT was similar at both temperatures (Figure S2B).

Because human CST has been shown to resolve replication problems both at telomeres and also throughout the genome,

Figure 1. Replication dynamics of subtelomeres analyzed by PuSeq at the permissive temperature of 25°C

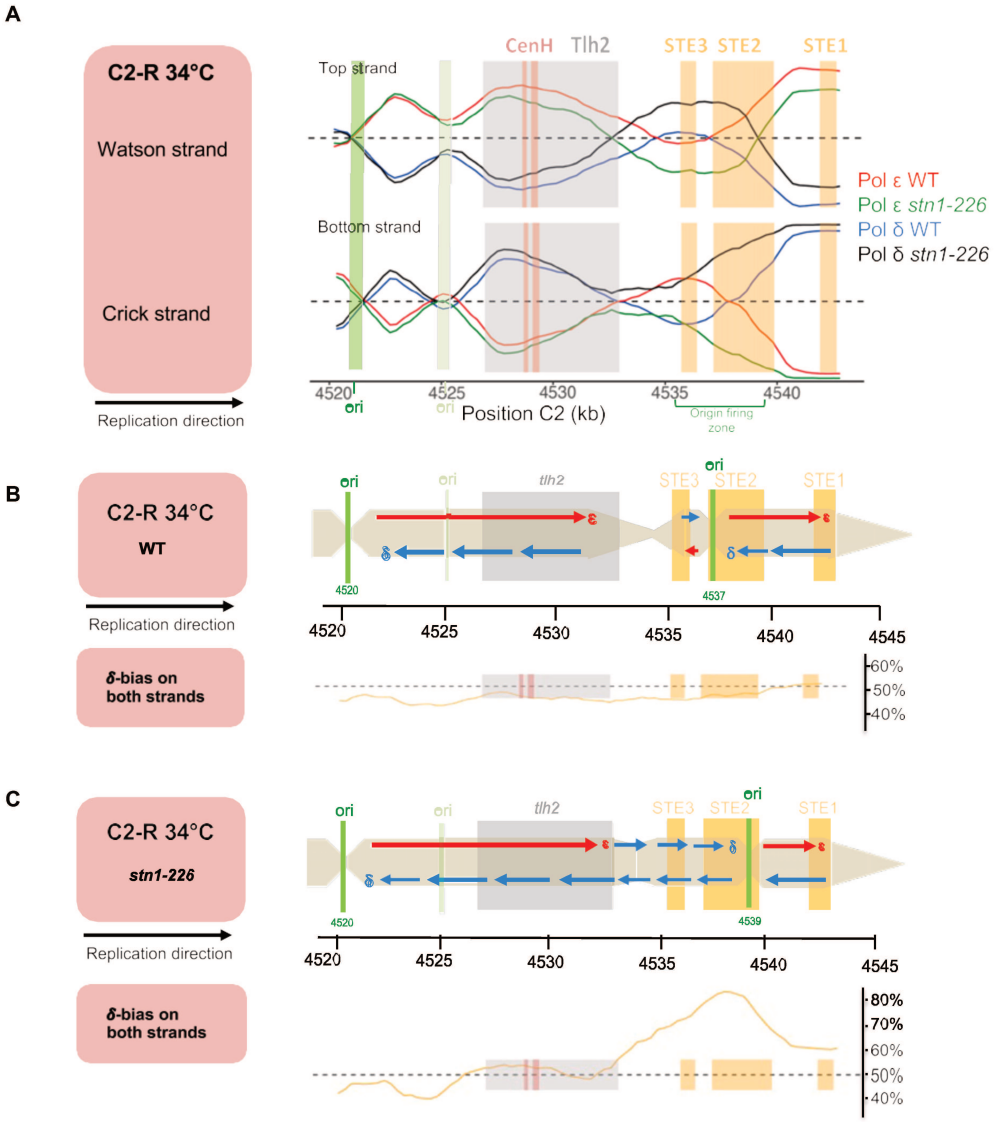
(A) Schematic representation of the fission yeast shelterin.

(B) Schematic illustration of the structures of subtelomeres (~100 kb) of chromosomes 1 and 2 in strain 972.

(C) Detailed map of *tlh2* and STE regions of the right arm of chromosome 2 (C2-R).

(D) Top panel: PuSeq traces for the Watson and Crick strands of C2-R at 25°C: in wild type (WT), the usage of Pol d (blue) and Pol ϵ (red), and in the *stn1-226* strain, the usage of Pol d (black) and Pol ϵ (green). Positions of *CenH*, *tlh2*, and STE1-3 are indicated.

(E and F) Schematic representation of the dynamic of replication at C2-R in WT and the *stn1-226* mutant at 25°C. Pol d-bias represents the total contribution of Pol d to the synthesis of both DNA strands at each individual locus.




(legend on next page)

likely at GC-rich repetitive sequences that are prone to form G4s, we next examined the influence of *stn1-226* on replication dynamics at 446 GC-rich sequences[59] that are predicted to fold into G4s (named here as G4 sites). Around these G4 sites, the Stn1 SIM mutation did not significantly modify the origin activity when compared with WT at either 25°C or 34°C (Figure S2C). To further analyze the role of ST at GC-rich sequences, we moni- tored the stability of the minisatellite CEB (CEB25-L1T) in the *stn1-226* mutant (Figure S3A). CEB25-L1T was previously intro- duced into the genome of *S. pombe* at the *leu1* locus[60] and con- tains 14 repeats of a 44 nt sequence (0.62 kb) that can form sta- ble G4s.[61,62] In striking contrast to what has been observed for an RPA mutant (*rpa1-D223Y*),[22] no increased instability of CEB was detected in the *stn1-226* mutant at either 25°C or at 36°C when compared with WT (Figures S3B–S3D).

We concluded that the *stn1-226* mutant does not influence origin activity at either Rif1-binding sites or G4 sites and does not impact the maintenance of GC-rich sequences in the fission yeast genome. However, it is notable that we have previously shown *stn1-226* cells to be sensitive to genotoxic agents at semi-permissive temperatures.[25] This may suggest a role for the ST complex when replication is challenged by the addition of drugs, similar to the activity of CST in human cells.[45,46,63]

## Replication dynamics at subtelomeres

ST has been shown to be important for the replication of subtelomeric regions. We therefore specifically assessed the replication profile of a telomere-proximal ~20 kb on the right arm of chromosome II (C2-R). We extended the sequence available in the database[13] up to the STE1 regions by flanking the subtelomeric region with the sequence from telomeric plasmid pNSU70 (Figure 1C). In WT at 25°C, two origins were evident: the first and most active maps to approximately 4,520 kb (ori- 4520), while the second is less active and maps to approximately 4,525 (ori-4525). In the majority of cells, rightward-moving forks from these two origins are responsible for the replication of the entire subtelomeric region of C2-R: Pol ϵ usage (leading strand synthesis) is >50% on the Watson strand and does not change dramatically, and this is mirrored by Pol d (lagging strand synthesis) on the Crick strand (Figure 1D). In the graph, the contribution of each polymerase to the synthesis of both the Watson and Crick strands is plotted. The dashed line represents a 50% contribution to strand synthesis. A schematic representation of the replication dynamic of C2-R in WT based on the PuSeq data is shown in Figure 1E. We have added a plot of the cumu- lative ratio of Pol d usage on both strands (d-bias). d-bias above 50% (dotted line) reflects usage of Pol d on both strands, while 50% corresponds to the equal division of labor between the two polymerases. It should be noted that we observed a slight increase above 50% in the d-bias close to the telomeric sequences at STE1. However, this elevated d-bias was not observed in *stn1-226* (cf. Figure 1F) or at 34°C in the WT (cf. Figure 2B).

In *stn1-226* at the permissive temperature of 25°C, the overall replication profile was equivalent to WT, and the division of labor between Pol ϵ and Pol d was maintained throughout the C2-R (Figure 1F): ori-4520 was fired with an efficiency similar to that seen in WT, and the less-active ori-4525 was also evident. Thus, we have confirmed that, at the permissive temperature of 25°C, the ST complex mutation does not influence C2-R replication. Next, we monitored replication at 34°C (Figure 2). In WT, in addition to ori-4520 and ori-4525, an origin was active within the STE2 element (ori-4537). Despite this, the replication of the Watson (top) and Crick (bottom) strands across C2-R was again mainly performed by Pol ϵ and Pol d, respectively (Figures 2A and 2B). This suggests that ori-4537 was fired late, likely in response to replication forks slowing down or stalling. In the *stn1-226* mutant, the same origins were active: ori-4520, ori-4525, and ori-4539 located within STE2 element (Figures 2A and 2C). Strikingly, although the ori-4539 was active, Pol d synthetized a significant proportion of both the Watson and Crick strands over the STE3 and STE2 regions, represented by a high d-bias (Fig- ure 2C). This elevated Pol d-bias likely reflects the occurrence of HR-mediated replication fork restart between *tlh2* and the STE3-2 region.[64–66] This observation is consistent with genetic analysis that demonstrated Rad51 is crucial to maintain cellular growth of *stn1-226* cells.[25] Taken together, these data show that STE3 and STE2 likely represent "hard-to-replicate" regions, which require an HR-based replication fork restart mechanism in the absence of a functional ST complex. This, in turn, indicates that ST is an important accessory factor for replication of the STE3-2 region.

## The absence of subtelomeric regions restores the viability of *stn1-226* cells

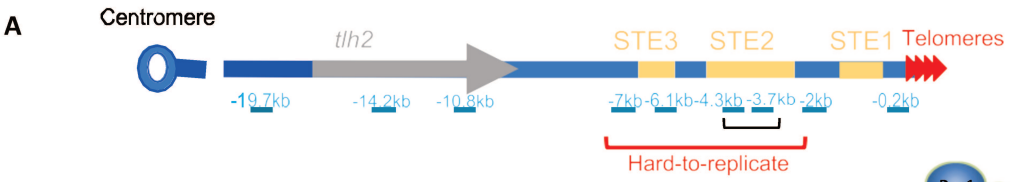
Since the main defect identified by PuSeq in *stn1-226* cells is the replication of the subtelomeric STE3-2 region, we hypothesized that the removal of subtelomeric regions would suppress the growth defect of *stn1-226* cells at 36°C. We took advantage of the *SD5* strain (subtelomere deletion), constructed by Junko Kanoh's group, in which the subtelomeric sequences (including the whole STE1-3 region) of all five chromosome ends have been removed.[16] We introduced the *stn1-226* allele in the *SD5* strain and monitored its growth. Removing the five subtelomeric sequences partially suppressed the growth defect of *stn1-226* cells at 36°C (Figure 2D). Consistent with this result, when we introduced the *stn1-226* allele into *trt1*D cells (in which the three chromosomes are circular and lack telomeres and subtelomeres[67]), the viability of *stn1-226* cells was completely restored (Figure 2E). This is consistent with the fact that *stn1*D and *ten1*D cells survive

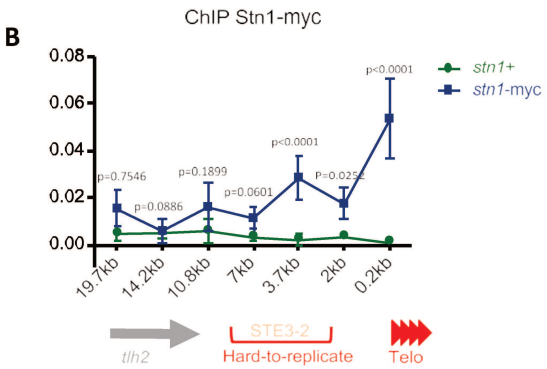
Figure 2. Replication of the STE3-2 region is impaired in *stn1-226* at the restrictive temperature of 34°C

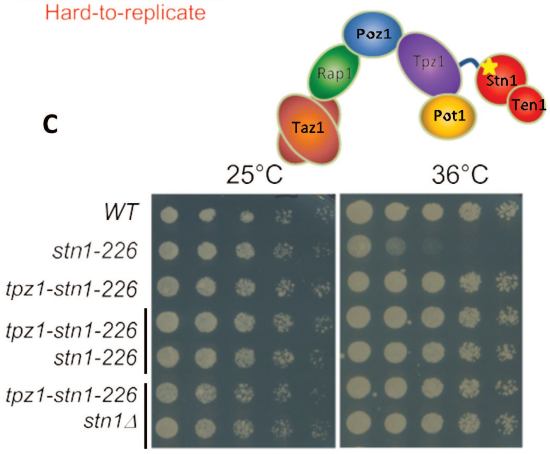
(A) Top panel: PuSeq traces for the Watson and Crick strands of C2-R at 34°C: in WT, the usage of Pol d (blue) and Pol ϵ (red), and in the *stn1-226* strain, the usage of Pol d (black) and Pol ϵ (green). Positions of *CenH*, *tlh2*, and STE1-3 are indicated. Pol d-bias represents the total contribution of Pol d to the synthesis of both DNA strands at each individual locus.

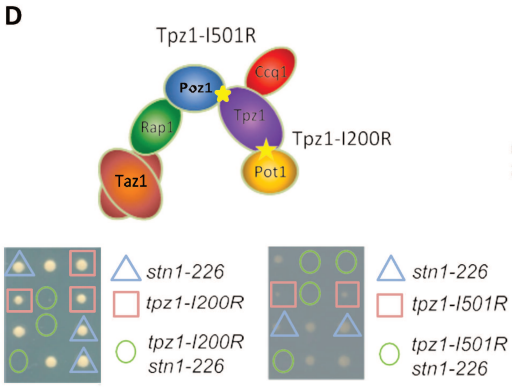
(B and C) Schematic representation of the dynamic of replication at C2-R in WT and *stn1-226* mutant at 34°C.

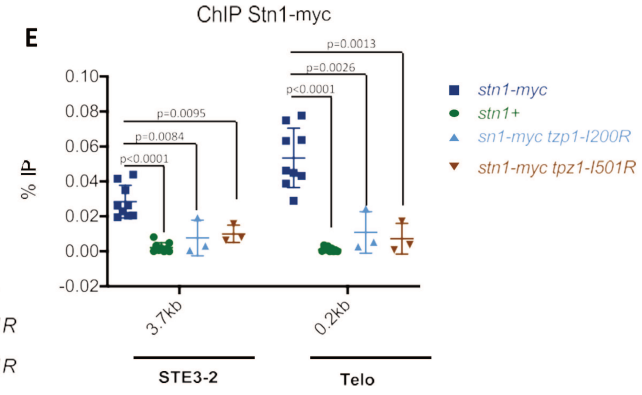
(D and E) 5-fold serial dilution spot assay with the subtelomeric deleted strain (*SD5*) and *trt1*D strain with circular chromosomes combined with the *stn1-226* allele at 25°C and 36°C on YES plates grown for 2 days at 36°C and 3 days at 25°C.

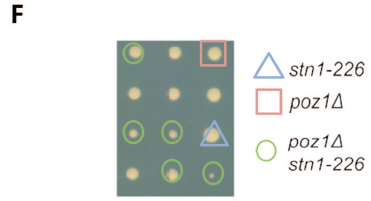

A
Centromere
tlh2
STE3
STE2
STE1
Telomeres
-19.7kb
-14.2kb
-10.8kb
-7kb
-6.1kb
-4.3kb
-3.7kb
-2kb
-0.2kb
Hard-to-replicate

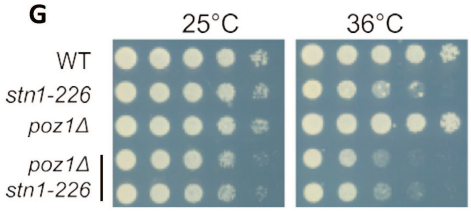

B
ChIP Stn1-myc
stn1+
stn1-myc
p=0.7546
p=0.0886
p=0.1899
p=0.0601
p<0.0001
p<0.0001
19.7kb
14.2kb
10.8kb
7kb
3.7kb
2kb
0.2kb
tlh2
STE3-2
Hard-to-replicate
Telo


C
Poz1
Rap1
Tpz1
Stn1
Ten1
Taz1
Pot1
25°C
36°C
WT
stn1-226
tpz1-stn1-226
tpz1-stn1-226
stn1-226
tpz1-stn1-226
stn1Δ


D
Tpz1-I501R
Poz1
Ccq1
Rap1
Tpz1
Tpz1-I200R
Taz1
Pot1
stn1-226
tpz1-I200R
tpz1-I200R
stn1-226
stn1-226
tpz1-I501R
tpz1-I501R
stn1-226


E
ChIP Stn1-myc
% IP
p=0.0095
p=0.0084
p<0.0001
p=0.0013
p=0.0026
p<0.0001
stn1-myc
stn1+
sn1-myc tzp1-I200R
stn1-myc tpz1-I501R
3.7kb
0.2kb
STE3-2
Telo


F
stn1-226
poz1Δ
poz1Δ
stn1-226


G
25°C
36°C
WT
stn1-226
poz1Δ
poz1Δ
stn1-226

by circularizing their chromosomes.[27] These results show that the ST complex becomes dispensable when hard-to-replicate telomeres and subtelomeres are removed.

## Stn1 binds to subtelomeric regions and promotes their replication

The ST complex ensures conventional replication of the STE3-2 region, suggesting that ST is recruited to this specific locus. We therefore assayed for the presence of ST at subtelomeres by chromatin immunoprecipitation (ChIP) using a myc-tagged Stn1. We designed primer sets that spread across ~20 kb from the telomere tip to the *tlh2* region (Figure 3A). As previously described,[25] we observed that Stn1 was enriched at telomeres. We also observed Stn1 to be associated with the STE regions (STE1–STE3) and that association decreased toward the *tlh2* region (Figure 3B). Interestingly, we observed a maximum of Stn1 binding to non-telomeric repeat sequences with the —3.7 kb primer set, which corresponds to the STE2 region.

In fission yeast, Stn1 recruitment to telomeres relies on the interaction of its SIM domain with sumoylated Tpz1.[28,29] To assess if an equivalent Tpz1-Stn1 interaction was also necessary to ensure the replication of subtelomeres and sustain the viability of *stn1-226* cells at the restrictive temperature, we expressed a Tpz1-Stn1-226 fusion protein (adapted from Mennie et al.[68]) in either *stn1-226* or *stn1*D cells. The Tpz1-Stn1-226 fusion restored the growth defect of both *stn1-226* at 36°C and of *stn1*D. This indicates that the replicative function of ST at subtelomeres is dependent on its interaction with Tpz1. In support of this, when we combined the *stn1-226* allele with mutants of Tpz1 that do not interact with either Poz1 or Pot1 (*tpz1-I501R* and *tpz1-I200R,* respectively),[69] we observed a synthetic lethal interaction in both cases (Figure 3D). This supports the suggestion that ST function requires a functional shelterin.

We next analyzed Stn1 recruitment at both the telomere (0.2 kb: cf. Figure 3A) or STE3-2 by ChIP. Stn1 recruitment was impaired in the *tpz1-I501R* and *tpz1-I200R* mutants when compared with *tpz1*$^{+}$ cells (Figure 3E), indicating that Stn1 recruitment relies on Pot1-Tpz1-Poz1. We further combined the *stn1-226* allele with *poz1*D (Figure 3F) and observed that *stn1-226 poz1*D double mutants were viable but exhibit a syn- thetic sickness at 36°C (Figure 3G). This further indicates that Poz1 function is important when Stn1 is dysfunctional. This syn- thetic sickness contrasts with the fitness of the *stn1-226 rap1*D mutant, where the deletion of *rap1*+ partially restored the growth defect of *stn1-226*.[25] Taken together, these observations indi- cate that the interactions between Pot1, Tpz1, and Poz1 participate in Stn1 recruitment to STE3-2, which in turn promotes the efficient replication of subtelomeric regions. Importantly, these results are corroborated by the recent observation showing that Pot1 is crucial for Stn1 recruitment in fission yeast and promotes telomere replication.[70] Thus, we conclude that Pot1-Tpz1-Poz1 are essential proteins and function in the recruitment of the ST complex to ensure the replication of chromosomes ends.

## Taz1 binds to subtelomeric regions and promotes their replication

Because Taz1 is involved in telomere replication, we assayed the presence of GFP-tagged Taz1 at subtelomeres by ChIP. We observed that Taz1 was significantly recruited at subtelomeres (Figure 4A), confirming previous observations.[14] The ChIP signal for Taz1 was stronger at the STE3-2 region and was reduced as primer sets approached *tlh2*, mimicking the Stn1 ChIP profile. Tandem repeats of the telomere consensus sequence GGTTAC have been shown to be binding sites for Taz1 on chro- mosome arms and to be responsible for heterochromatin estab- lishment and influence replication timing.[71–73] Consistent with this, we identified three Taz1-binding sites (Taz1 BSs) in the vi- cinity of the STE3 region, located —7.3, —7, and —6.3 kb from te- lomeric repeats (Figure S4). Taken together, these results demonstrated that, as with the ST complex, Taz1 is recruited at subtelomeres specifically at the hard-to-replicate STE3-2 region.

Next, we attempted to assess replication dynamics of the C2-R region in *taz1*D cells. While the PuSeq analysis confirmed the division of labor between Pol ϵ and Pol d through the genome in WT and in *taz1*D cells at 30°C (Figure S5), we were unable to establish a distinct polymerase usage pattern for the C2-R region in *taz1*D cells. This is reminiscent of previous observations from J. Cooper's laboratory showing that *taz1*D cells displayed instability of STE regions and that Taz1 is essential for replication of telomeres.[8]

Then, we asked whether the recruitment of Stn1 at subtelomeres relies on Taz1 by performing ChIP analysis of Stn1 recruitment in *taz1*D cells. Strikingly, Stn1 recruitment was not reduced neither at the STE3-2 region, nor at telomeres, in the absence of Taz1 (Figure 4B). This shows that Taz1 promotes the replication of the STE3-2 region independently of Stn1. Thus, Taz1 functions in subtelomeric replication independently of ST recruitment.

Because both Stn1 and Taz1 are recruited to STE3-2, we wondered if they could bind to an ectopic subtelomeric region. We therefore inserted the STE3-2 region into a strain with circular

Figure 3. Stn1 is recruited to subtelomeres

(A) Detailed map of *tlh2* and STE regions of the chromosome 2 right end (C2-R) with regions used to monitor the binding of Stn1-myc, Taz1-GFP, Rad51, and Rpa1-myc by ChIP/qPCR marked.

(B) ChIP of Stn1-myc at the C2-R subtelomere analyzed by qPCR. Error bars show the standard error of the mean (SEM), n R 3. p values are calculated with Mann-Whitney for 0.2 and 3.7 kb, with an unpaired two-tailed t test for 2, 7, 10.8, 14.2, and 19.7 kb.

(C) 5-fold serial dilution spot assay of indicated strains expressing the *tpz1-stn1-226* fusion on YES plates grown for 2 days at 36°C or 3 days at 25°C.

(D) Tetrad analysis of a mating between *stn1-226* and *tpz1-I200R* or *tpz1-I501R* mutants on YES plates at 25°C. Double mutants are synthetically lethal. Unmarked colonies are WT strains.

(E) ChIP analysis of Stn1-myc at telomeres and the STE3-2 region analyzed by qPCR in *tpz1-I200R* and *tpz1-I501R* mutants. Error bars show the SEM, n R 3. p values are calculated with the Mann-Whitney test.

(F) Tetrad analysis of a mating between *stn1-226* and *poz1*D mutants on YES plates at 25°C. Unmarked colonies are WT strains.

(G) 5-fold serial dilution spot assay of the *stn1-226* allele combined with *poz1*D on YES plates grown at 36°C for 3 days.

CellPress
OPEN ACCESS

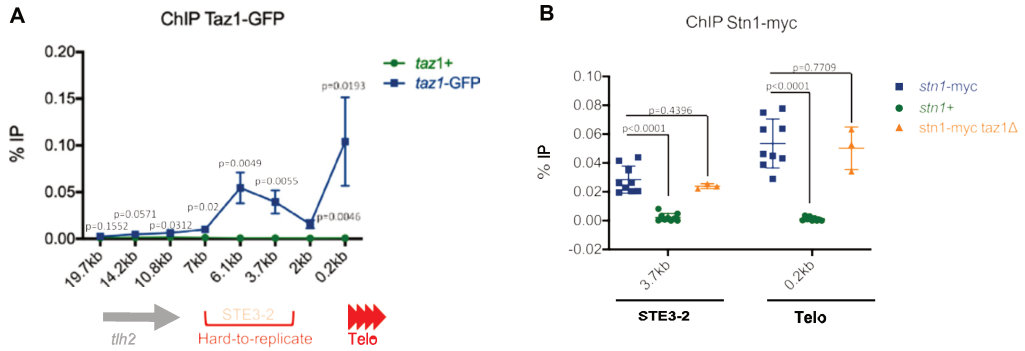



Figure 4. Taz1 is recruited to subtelomeres

(A) ChIP of Taz1-GFP at the subtelomere C2-R analyzed by qPCR. Error bars show the SEM, n = 3. p value are calculated with an unpaired two-tailed t test.

(B) ChIP of Stn1-myc at telomeres and STE3-2 region analyzed by qPCR in a taz1D strain. Error bars show the SEM, n R 3. p values are calculated with Mann-Whitney between *stn1+* and *stn1-myc* and an unpaired two-tailed t test between *stn1-myc* and *stn1-myc taz1*D.

chromosomes (*trt1*D strain) lacking the subtelomeric and telomeric regions[74] (Figure S6A). Recruitment of Taz1-GFP and Stn1-myc to this internal STE3-2 region (intSTE3-2 circ) was analyzed by ChIP (Figures S6B and S6C). In this genetic context, we could not detect binding of Taz1 or Stn1 to the internal STE3-2 (intSTE3-2) region. We concluded that the recruitment of Taz1 and Stn1 to STE3-2 requires the presence of a telomere that could modify for example the chromatin structure and/or the low abundance of nucleosomes at the STE3-2 region.[75]

## HR-dependent fork restart occurs in *stn1-226* allele

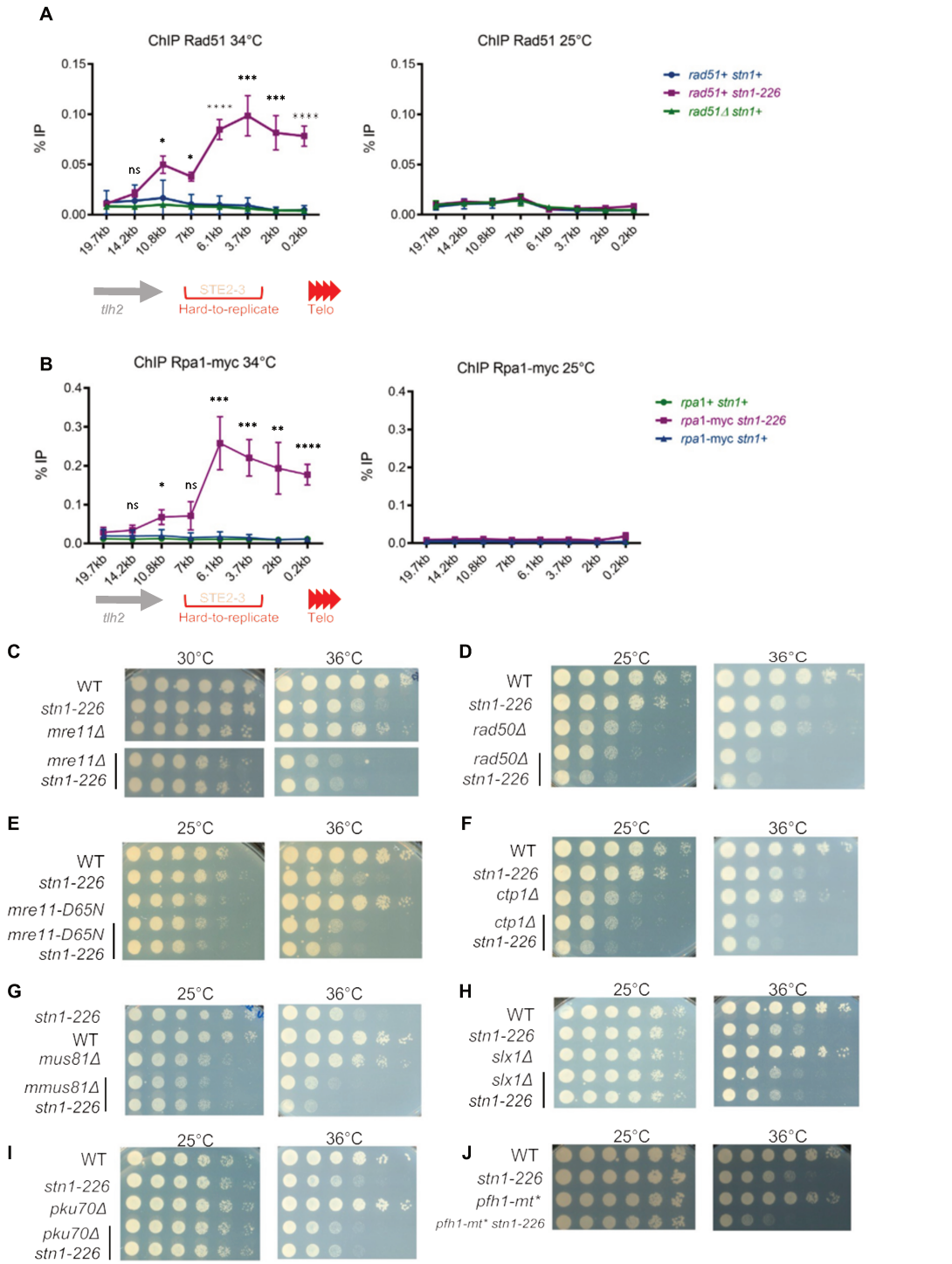
Our PuSeq analysis suggests that HR-dependent fork restart may occur within subtelomeric regions when ST function is impaired. Thus, we assessed the recruitment of the HR factors Rad51 and RPA by ChIP in *stn1+* and *stn1-226* backgrounds at both the permissive and semi-restrictive temperatures. No Rad51 binding was detected in *stn1+* cells at either temperature or in *stn1-226* cells at 25°C. However, a strong enrichment of Rad51 was detected at telomeres and subtelomeres in the *stn1-226* mutant cells at 34°C (Figure 5A). This is consistent with previous results obtained using the *stn1-1* allele.[26] Rad51 binding was consistently high at ~6/7 kb, encompassing the telomeres and STE1-3, and decreased near and within *tlh2.* A similar binding profile was observed for RPA: recruitment was evident in the *stn1-226* mutant at 34°C, but not at 25°C, and was not seen in *stn1+* cells at either temperature (Figure 5B). We conclude that the HR pathway is required when Stn1 function is compromised, likely to restart collapsed or broken forks that occur within the STE3-2 region.

To further characterize the mechanism of HR-based fork restart at the STE3-2 region, we combined *stn1-226* with mutants of the HR pathway.[76–81] Inactivation of Mre11-Rad50- Nbs1 (MRN) complex components Mre11 or Rad50 exacerbated the growth defect of *stn1-226* at 36°C, indicating that the MRN complex is required when ST function is impaired (Figures 5C and 5D). When *stn1-226* was combined with *mre11-D65N*, whose product is deficient in nuclease activity,[82] the growth defect was also enhanced. This suggests that the nuclease activity of the MRN complex is required to sustain *stn1-226* viability at restrictive temperatures (Figure 5E). In line with this result, the absence of the MRN cofactor Ctp1 was also deleterious when combined with the *stn1-226* mutant at 36°C (Figure 5F).

We also observed that the Mus81 structure-specific endonuclease was required when Stn1 functions were altered but that another structure-specific nuclease, Slx1, was not (Figures 5G and 5H). Of note, we observed no genetic interaction at the restrictive temperature when *stn1-226* was combined with *pku70*D (Figure 5I). Pfh1 is a helicase that has previously been shown to facilitate telomere replication.[23] When we combined *stn1-226* with a mutant of Pfh1 (*pfh1-mt**), we observed a synergistic effect on growth at 36°C (Figure 5J). This indicates that Pfh1 is important to sustain viability when Stn1 is deficient. Collectively, these results indicate that MRN-Ctp1 and Mus81 play a major function when the ST complex is deficient, likely to process DNA replication intermediates that arise upstream or downstream of HR-based fork restart. Pfh1 likely promotes the efficient replication of telomeres,[23] thus we suggest that both Pfh1 and the ST complex act in distinct pathways to facili- tate replication of chromosome ends.

## rDNA replication dynamics are impaired in *stn1-226* mutant

The rDNA loci contain well-characterized tandem repeats of replication/transcription units in which replication forks are stalled at a defied replication fork barriers (RFBs) to promote unidirectional replication of these units (Figure S7A).[83,84] It was recently reported by the group of F. Ishikawa that Stn1 is important to maintain rDNA stability.[85] Thus, we assessed the dynamic of rDNA replication in the *stn1-226* mutant by PuSeq. We observed a strong bias toward Pol d in *stn1-226* at both 25°C and 34°C (Figures S6B and S7C), indicating that Stn1 is required to promote efficient replication of rDNA repeats (Figure S7D). This suggests that an HR-based fork restart mechanism may occur at RFB sites in the absence of ST function. Consistent with these observations, we identified multiple potential Taz1 BSs within the rDNA, located between the RFB and the rDNA replication origin (Figure S8). However, we could not show by ChIP that Taz1 was recruited to these sites (data not shown). It




(legend on next page)

is therefore possible that Taz1 and Stn1 contribute to maintain the rDNA by regulating fork restart, although we have previously not observed a clear replication fork arrest defect at the RFB site by two-dimensional gel electrophoresis in *stn1-226* cells.[25]

### Global replication dynamics in *stn1-226 rif1*D double mutant

Because the deletion of *rif1*$^+$ was reported to fully rescue the *ts* phenotype of the *stn1-226* mutant at the restrictive temperature,[25] we used PuSeq to analyze replication dynamics in *rif1*D single and *stn1-226 rif1*D double mutants at 25°C and at 34°C. In agreement with previous work,[34–37] the loss of Rif1 resulted in deregulation of T-rep (Figure S9A). We observed that the *stn1-226* mutation did not modify the T-rep of *rif1*D, either at the permissive or restrictive temperatures (Figure S9B). As previously discussed, origin activity was upregulated around Rif1 BSs in *rif1*D cells. However, the Stn1 SIM mutation did not significantly impact the behavior of the *rif1*D mutant (Figures S2B and S2C). We hence conclude that deletion of *rif1*+ does not affect the global replication dynamic of *stn1-226* and, recipro- cally, that the Stn1 SIM mutation does not affect the global repli- cation dynamics of *rif1*D.

### Deletion of *rif1* abrogates d/d configuration observed in *stn1-226* cells

We next monitored the replication profile of the C2-R subtelomeric region in *rif1*D single and *rif1*D *stn1-226* double mutants. In the absence of Rif1 at 25°C, three origins were active (ori-4520, ori-4525, and ori-4537) in both *stn1*+ and *stn1-226* backgrounds (Figure 6A). These observations confirm previous studies showing that Rif1 inhibits the firing of late origins at subtelomeres.[71,86] Interestingly, ori-4537, which showed increased activity at 34°C in WT cells and even more pronounced activity in *stn1-226* at this semi-restrictive temperature (Figure 2A), was significantly active in all *rif1*D backgrounds at both 25°C and 34°C (Figure 6B). Indeed, the increased firing of ori-4537 al- lowed the progression of a leftward (centromeric moving) fork up to *tlh2* gene (4,530 kb), where a termination zone was detected. Consequently, the increased activity of an origin between STE3 and STE2 regions in the absence of Rif1 modifies the replication profile.

Importantly, for both *rif1*D and the *rif1*D *stn1-226* double mutant at 34°C, the replication pattern was similar to that seen at 25°C (Figure 6B), and the d-bias observed in the *stn1-226* mutant at 34°C (cf. Figure 2B; interpreted as HR-restarted forks with a d/d configuration) was lost. This shows that the increased activity of ori-4537 reestablished a conventional replication profile across the STE3-2 region, indicating that a converging fork likely overcomes the replication constraints imposed by dysfunctional ST and facilitates the maintenance of terminal sequences. Thus, the firing of an origin usually repressed by Rif1 within subtelomeres allows the efficient replication of the STE3-2 region and so restores the viability to *stn1-226* cells at the restrictive temperature.

## DISCUSSION

In humans, the CST complex is involved in the synthesis of the complementary strand at telomeres,[40] in the replication of GC-rich sequences at chromosome ends and arms,[43] and in the suppression of origin licensing.[47] We explored the genome-wide function of the ST complex in fission yeast, taking advantage of the *ts* allele *stn1-226*. We did not identify any major genome-wide changes in replication dynamics or timing, and no replication changes were evident at either Rif1 BSs or G4 sequences. However, our study did reveal that the ST complex is required to efficiently replicate a specific subtelomeric region (STE3-2) (Figure 7A).

In WT cells, replication fork progression is largely unidirectional through the STE3-2 region, with forks moving ~25 kb toward the telomere through *tlh2*, the STE regions, and the telomeric repeats. However, when the ST complex function was compromised, the STE3-2 region was frequently replicated via an HR-based fork restart mechanism (Figure 7B). This suggests that STE3-2 exhibits features of a ''hard-to-replicate'' region (see below), requiring the activity of accessory factors, such as the ST complex, for its replication. Consistent with this, eliminating the subtelomeric regions from the *S. pombe* genome partially restored viability to *stn1-226* cells at the restrictive temperature. In line with ST participating directly in subtelomeric replication, we demonstrated that Stn1 binds to the CR-2 subtelomere and is highly enriched at the STE3-2 region when compared with the telomere distal *tlh2* locus. Strikingly, Stn1 recruitment is impaired when the interaction between Tpz1 and Pot1 or Tpz1 and Poz1 is affected or when Pot1 is deficient.[70] Consistent with this, *stn1* mutants (*stn1*D and *stn1-226*) became perfectly viable when a Tpz1-Stn1-226 chimeric protein was expressed. This clearly indicates that Stn1 recruitment at STE3-2 depends on the presence of, and the proper assembly of, the shelterin fac- tors Pot1-Tpz1-Poz1 (Figure 7A). We also demonstrated that Taz1 is enriched at the STE3-2 region, likely through Taz1 BSs that are present nearby and within STE3. Taz1 is also required for efficient replication of subtelomeric regions but acts independently of the ST complex (Figure 7A).

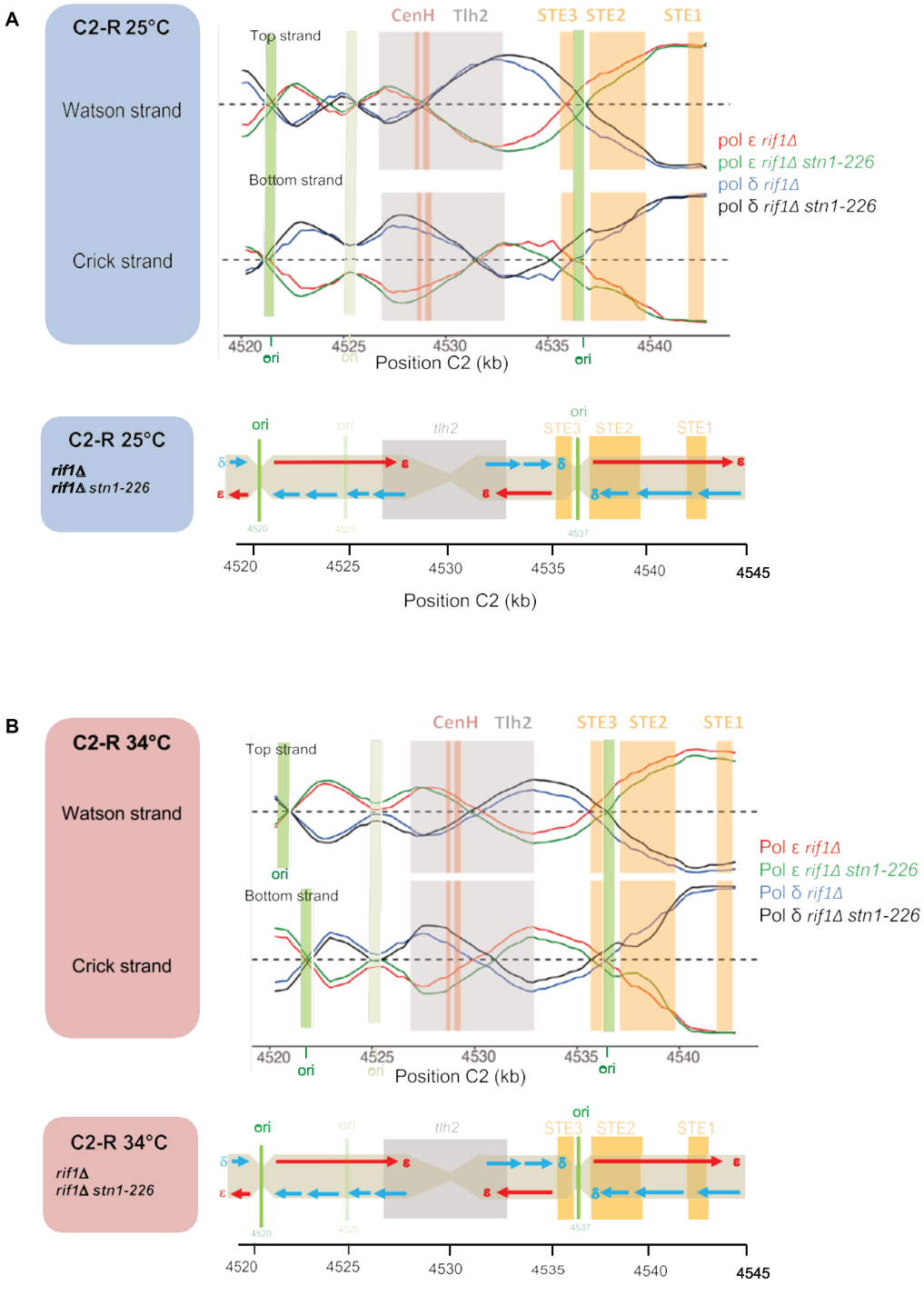
We conclude that a function of the telomeric proteins Pot1-Tpz1-Poz1 is to recruit the ST complex at hard-to-replicate regions, likely to protect stalled forks that could be subjected to extensive resection. ST could promote fill-in reactions that prevent the accumulation of single-stranded DNA (ssDNA), thus avoiding the initiation of inappropriate recombination. We further suggest that Taz1 ensures the replication of telomeres and subtelomeres independently of ST complex, likely through the recruitment of additional accessory factors. Consistent with this, we previously showed that the *taz1*D *stn1-226* double mutant undergoes

Figure 5. Rad51 and Rpa1 are recruited to subtelomeres in *stn1-226* cells at the restrictive temperature

(A and B) ChIP of Rad51 and Rpa1-myc at the subtelomere C2-R analyzed by qPCR in the indicated strains. p value are calculated with an unpaired two-tailedt test. Error bars show the SEM, n = 3.

(C–J) 5-fold serial dilution spotting assay of *stn1-226* allele combined with *mre11*D, *rad50*D, *mre11-D65N*, *ctp1*D, *mus81*D, *slx1*D, *pku70*D, and *pfh1-mt** strains, as indicated, on YES plates grown at indicated temperatures for 3 to 4 days.

CellPress
OPEN ACCESS




(legend on next page)

severe chromosome rearrangements to allow cells to survive.[25] Our study reveals unanticipated mechanisms involving different shelterin proteins during subtelomere replication.

The ST complex has been shown to be recruited to telomeres, consequent on Tpz1 sumoylation, to promote C-strand synthesis through Primase-Pola recruitment.[25,28–30] The results from this study lead us to propose that ST is also recruited at stalled or collapsed forks at specific regions, where its function is to recruit Primase-Pola to counteract extensive Exo1-dependent resection (Figure 7A). This is supported by the previous demonstration that overexpression of the catalytic subunit of Pola (Pol1) was able to restore, at least partially, the viability and telomere loss of the *stn1-226* mutant at the restrictive temperature and that *exo1*$^{+}$ deletion restores the growth defect of *stn1-226* cells at the restrictive temperature.[25] It is also possible that the ST complex protects stalled forks that reverse by blocking Mre11-dependent degradation, as has been proposed for human cells.[39] However, we have no such evidence in *S. pombe.* Indeed, the *mre11*D *stn1-226* double mutant exhibits synthetic sickness, which is likely due to the involvement of the MRN complex in processing recombination intermediates during fork restart (Figure 7B).

With the exception of the rDNA, we did not find any other genomic sites (other than the STE3-2 region) that require the ST complex for efficient replication. Nevertheless, it is likely that the ST complex is required when replication is impaired, as *stn1-226* cells show sensitivity to several DNA-damaging agents.[25] Taken together, we propose that the ST complex pro- tects replication forks from resection (and from HR-based restart) to facilitate the resumption of the replication.

Our observations suggest that STE3-2 exhibits specific, but undetermined, features of a hard-to-replicate region. It was recently demonstrated that the subtelomeric region (from *tlh2* to the telomeric repeats of C2-R) comprises a unique chromatin structure displaying very low nucleosome occu- pancy.[75] Interestingly, low nucleosome occupancy strongly correlates with the presence of exclusive poly [dA:dT] tracts. Factors such as shelterin components and the ORC complex (see below) may bind to these nucleosome-depleted DNA re- gions. At *tlh2* and telomere-distal regions, poly [dA:dT] tracts are absent, and nucleosome levels are high.[75] This may explain why Taz1 binding is not observed at these regions. To summarize, the STE3-2 region is located at the boundary between a high- and a low-density nucleosome region that is prone to binding other factors (Figure 7). When a replication fork progresses unidirectionally from subtelomere toward the telomeric repeats, it is likely that it slows down and/or pauses when approaching the STE3-2 region. We hypothesize that the distinct features of STE3-2 thus require the association of accessory factors with STE3-2, such as the ST complex, to it be efficiently replicated.

Deletion of *rif1*$^{+}$ restores the viability and telomere loss of the *stn1-226* mutant at the restrictive temperature.[25,26] PuSeq analysis allowed us to determine that, in the *rif1*D background, the increased activity of a telomere-proximal origin within the STE region compensates for the replication defect observed in *stn1-226* cells at 34°C, thereby bypassing the need for HR-based replication restart when ST is deficient (Figure 7C). In a *rif1*D strain, the replication of the subtelomeric regions at chromosome ends is no longer unidirectional, and a fork that moves from the STE3-2 region toward *tlh2* appears to overcome constraints that normally block the unidirectional incoming fork. This shows that cryptic origins can be fired within subtelomeres, likely at AT-rich regions.[87] Our results are in agreement with the observation that Rif1 suppresses the T-rep by regulating origin the firing.[34–37]

Our analysis of replication dynamics also indicated that Taz1 and Stn1 contribute to maintaining the rDNA repeats by regulating fork restart, corroborating the observation made by the group of F. Ishikawa that Stn1 is important to maintain rDNA stability.[85] The group of F. Ishikawa also reported a direct interaction between Taz1 and Reb1, a DNA-binding factor that participates in replication fork pausing at RFB.[85] It was proposed that Reb1 localizes to subtelomeres in a Taz1-dependent manner, but our data may also suggest that Taz1 and Reb1 may physically interact at the rDNA locus rather than at telomeres. More extensive work will be necessary understand how Stn1 and Taz1 act at rDNA.

In conclusion, our study unveiled unanticipated replication dynamics of a subtelomeric region in fission yeast and the involvement of telomeric proteins in this process. The presence of this hard-to-replicate region helps to explain why fission yeast telomeres are fragile sites and potential sources of genome instability. Indeed, cells can use an HR-based fork restart mechanism to circumvent the absence of converging fork at terminal DNA. However, the firing of cryptic origins within subtelomeres can rescue stalled forks and relieve the resulting replication stress. Although the role of fission yeast shelterin and ST complexes at the telomeric repeats (~300 bp in length) is well characterized, we show here that shelterin and ST functions extend to subtelomeres over approximately 10 kb. ORC proteins likely coexist within this low-nucleosome-abundance region. The features of terminal sequences in fission yeast are reminiscent of mammalian chromosomes extremities, in which nucleosomes, shelterin, and ORC proteins are also present at telomeres.[88] Thus, further exploration of replication dynamics in yeast may reveal conserved mechanisms in mammals.

## Limitations of the study

Even though we have covered some limitations of our study in the results and discussion, we acknowledge some caveats

Figure 6. Deletion of *rif1* restores a normal distribution of Pol d and ϵ labor in the *stn1-226* mutant

(A) Top panel: PuSeq traces for the Watson and Crick strands for C2-R at 25°C: in *rif1*D, the usage of Pol d (blue) and Pol ϵ (red), and in the *rif1*D *stn1-226* strain, the usage of Pol d (black) and Pol ϵ (green). Positions of *CenH*, *tlh2*, and STE1-3 are indicated. Bottom panel, schematic representation of the dynamics of replication at C2-R in *rif1*D and *rif1*D *stn1-226* strains.

(B) Top panel: PuSeq traces for the Watson and Crick strands of C2-R at 34°C: in *rif1*D, the usage of Pol d (blue) and Pol ϵ (red), and in the *rif1*D *stn1-226* strain, the usage of Pol d (black) and Pol ϵ (green). Positions of *CenH*, *tlh2*, and STE1-3 are indicated. Bottom panel, schematic representation of the dynamics of replication at C2-R in *rif1*D and *rif1*D *stn1-226* strains.

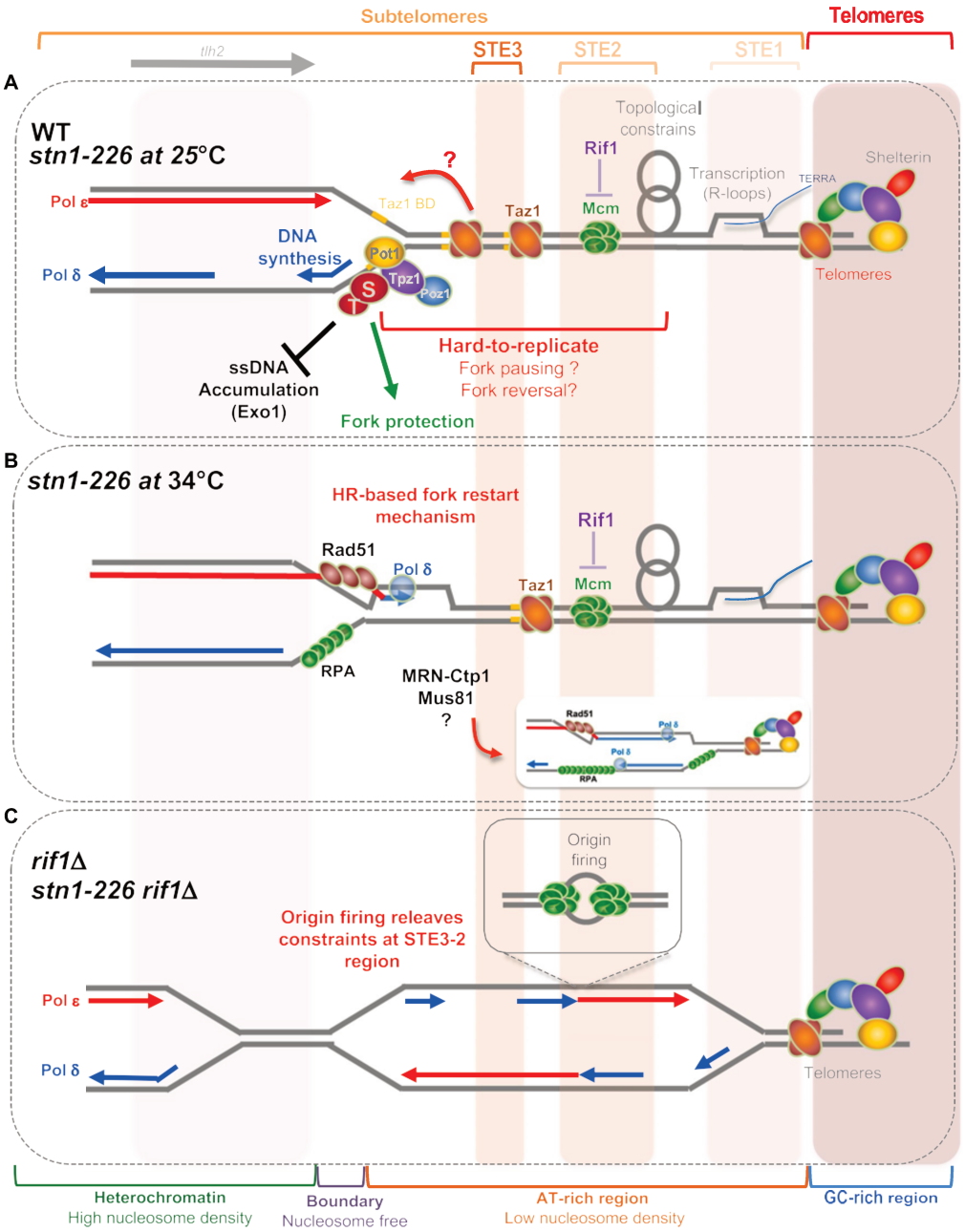



Figure 7. Replication dynamic of subtelomeric regions in fission yeast

that still remain. We show here that ST complex is crucial for the efficient replication of a subtelomeric region, called STE3-2, on C2-R of the fission yeast. One limitation is that we could not investigate the replication dynamic at the other subtelomeric regions by PuSeq. We also identified the STE3-2 of the C2-R as a hard-to-replicate region, but we still have to determine which features of this region are at the origin of the replication stress observed at this specific site. Further investigation will be needed for a better understanding of the mechanisms involved in these processes.

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- d KEY RESOURCES TABLE
- d RESOURCE AVAILABILITY
  - B Lead contact
  - B Materials availability
  - B Data and code availability
- d EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS
  - B Strains and growth conditions
- d METHOD DETAILS
  - B Polymerase usage sequencing (PuSeq)
  - B Chromatin immunoprecipitation
- d QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
  - B qPCR and statistical analysis for ChIP

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112537.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the pombe community for sharing strains, in particular Junko Kanoh, Toru Nakamura, Feng Qiao, Paul Russell, Pascal Bernard, and Julie Cooper. We also thank the members of the V.G. team, especially Christelle Cayrou, for helpful discussions and Nagham Ghaddar for advice on ChIP experiments. K.N., K.P., and A.M.C. are supported by the Wellcome Trust, grant number 110047/Z/15/Z, and Marie Sk1odowska-Curie Fellowship 749631-Rep_Fork Restart. The V.G. laboratory is supported by the ''Ligue Nationale Contre le Cancer'' (LNCC) (Equipe labe´ lise´ e). M.V. and C.B. are supported by ''Bourse du Ministe` re de l'Enseignement Supe´ rieur, et de la Recherche (MESR)'' and by LNCC. S.C. is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE12 TeloMito and ANR-20-CE12 TeloRPA).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.V. and K.N. performed most of experiments presented in this study. C.B. performed the experiments presented in Figures 3C, 3E, and 4C and S.R. and M.R. the experiments of Figures S3 and 5C–5I, respectively. K.P. performed the experiment of Figures 4B and S5. S.M. generated several fission yeast strains used in this study. M.V., K.N., V.G., and S.C. designed experiments and analyzed the data. M.V., V.G., and S.C. wrote the paper with input from K.N. and A.M.C.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: September 15, 2022
Revised: March 1, 2023
Accepted: May 3, 2023
Published: May 25, 2023

## REFERENCES

1. Hyrien, O. (2015). Peaks cloaked in the mist: the landscape of mammalian replication origins. J. Cell Biol. *208*, 147–160. https://doi.org/10.1083/jcb.201407004.

Urban, J.M., Foulk, M.S., Casella, C., and Gerbi, S.A. (2015). The hunt for origins of DNA replication in multicellular eukaryotes. F1000Prime Rep. *7*, 30. https://doi.org/10.12703/p7-30.

2. Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and Me´ chali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *16*, 360–374. https://doi.org/10.1038/nrm4002.

3. Oganesian, L., and Karlseder, J. (2009). Telomeric armor: the layers of end protection. J. Cell Sci. *122*, 4013–4025. https://doi.org/10.1242/jcs.050567.

4. Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. Cell *138*, 90–103. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.021.

5. Drosopoulos, W.C., Kosiyatrakul, S.T., Yan, Z., Calderano, S.G., and Schildkraut, C.L. (2012). Human telomeres replicate using chromosome-specific, rather than universal, replication programs. J. Cell Biol. *197*, 253–266. https://doi.org/10.1083/jcb.201112083.

6. Drosopoulos, W.C., Kosiyatrakul, S.T., and Schildkraut, C.L. (2015). BLM helicase facilitates telomere replication during leading strand synthesis of telomeres. J. Cell Biol. *210*, 191–208. https://doi.org/10.1083/jcb.201410061.

7. Miller, K.M., Rog, O., and Cooper, J.P. (2006). Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. Nature *440*, 824–828. https://doi.org/10.1038/nature04638.

8. Maestroni, L., Matmati, S., and Coulon, S. (2017). Solving the telomere replication problem. Genes *8*, 55. https://doi.org/10.3390/genes8020055.

9. Higa, M., Fujita, M., and Yoshida, K. (2017). DNA replication origins and fork progression at mammalian telomeres. Genes *8*, 112. https://doi.org/10.3390/genes8040112.

10. Moser, B.A., and Nakamura, T.M. (2009). Protection and replication of telomeres in fission yeast. Biochem. Cell Biol. *87*, 747–758. https://doi.org/10.1139/o09-037.

11. Dehe´ , P.M., and Cooper, J.P. (2010). Fission yeast telomeres forecast the end of the crisis. FEBS Lett. *584*, 3725–3733. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.045.

12. Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature *415*, 871–880. https://doi.org/10.1038/nature724.

13. Kanoh, J., Sadaie, M., Urano, T., and Ishikawa, F. (2005). Telomere binding protein Taz1 establishes Swi6 heterochromatin independently of RNAi at telomeres. Curr. Biol. *15*, 1808–1819. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.041.

14. Kanoh, J. (2018). Unexpected roles of a shugoshin protein at subtelomeres. Genes Genet. Syst. *92*, 127–133. https://doi.org/10.1266/ggs.17-00016.

15. Oizumi, Y., Kaji, T., Tashiro, S., Takeshita, Y., Date, Y., and Kanoh, J. (2021). Complete sequences of Schizosaccharomyces pombe subtelomeres reveal multiple patterns of genome variation. Nat. Commun. *12*, 611–616. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20595-1.

16. Matsuda, A., Chikashige, Y., Ding, D.-Q., Ohtsuki, C., Mori, C., Asakawa, H., Kimura, H., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2015). Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. Nat. Commun. *6*, 7753. https://doi.org/10.1038/ncomms8753.

17. Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., et al. (2016). Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. Nat. Commun. *7*, 10393. https://doi.org/10.1038/ncomms10393.

18. Moser, B.A., Subramanian, L., Chang, Y.-T., Noguchi, C., Noguchi, E., and Nakamura, T.M. (2009). Differential arrival of leading and lagging strand

DNA polymerases at fission yeast telomeres. EMBO J. *28*, 810–820. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.31.

1. Chang, Y.-T., Moser, B.A., and Nakamura, T.M. (2013). Fission yeast shelterin regulates DNA polymerases and Rad3ATR kinase to limit telomere extension. PLoS Genet. *9*, e1003936. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003936.s026.
2. Luciano, P., Coulon, S., Faure, V., Corda, Y., Bos, J., Brill, S.J., Gilson, E., Simon, M.N., and Ge´ li, V. (2012). RPA facilitates telomerase activity at chromosome ends in budding and fission yeasts. EMBO J. *31*, 2034–2046. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.40.
3. Audry, J., Maestroni, L., Delagoutte, E., Gauthier, T., Nakamura, T.M., Gachet, Y., Saintome´ , C., Ge´ li, V., and Coulon, S. (2015). RPA prevents G-rich structure formation at lagging-strand telomeres to allow maintenance of chromosome ends. EMBO J. *34*, 1942–1958. https://doi.org/10.15252/embj.201490773.
4. McDonald, K.R., Sabouri, N., Webb, C.J., and Zakian, V.A. (2014). The Pif1 family helicase Pfh1 facilitates telomere replication and has an RPA-dependent role during telomere lengthening. DNA Repair *24*, 80–86. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.09.008.
5. Matmati, S., Lambert, S., Ge´ li, V., and Coulon, S. (2020). Telomerase repairs collapsed replication forks at telomeres. Cell Rep. *30*, 3312–3322.e3. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.065.
6. Matmati, S., Vaurs, M., Escandell, J.M., Maestroni, L., Nakamura, T.M., Ferreira, M.G., Ge´ li, V., and Coulon, S. (2018). The fission yeast Stn1-Ten1 complex limits telomerase activity via its SUMO-interacting motif and promotes telomeres replication. Sci. Adv. *4*, eaar2740. https://doi.org/10.1126/sciadv.aar2740.
7. Takikawa, M., Tarumoto, Y., and Ishikawa, F. (2017). Fission yeast Stn1 is crucial for semi-conservative replication at telomeres and subtelomeres. Nucleic Acids Res. *45*, 1255–1269. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1176.
8. Martı´n, V., Du, L.L., Rozenzhak, S., and Russell, P. (2007). Protection of telomeres by a conserved Stn1 Ten1 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *104*, 14038–14043. https://doi.org/10.1073/pnas.0705497104.
9. Miyagawa, K., Low, R.S., Santosa, V., Tsuji, H., Moser, B.A., Fujisawa, S., Harland, J.L., Raguimova, O.N., Go, A., Ueno, M., et al. (2014). SUMOylation regulates telomere length by targeting the shelterin subunit Tpz1(Tpp1) to modulate shelterin-Stn1 interaction in fission yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *111*, 5950–5955. https://doi.org/10.1073/pnas.1401359111.
10. Garg, M., Gurung, R.L., Mansoubi, S., Ahmed, J.O., Dave´ , A., Watts, F.Z., and Bianchi, A. (2014). Tpz1TPP1 SUMOylation reveals evolutionary conservation of SUMO-dependent Stn1 telomere association. EMBO Rep. *15*, 871–877. https://doi.org/10.15252/embr.201438919.
11. Escandell, J.M., Carvalho, E.S., Gallo-Ferna´ ndez, M., Reis, C.C., Matmati, S., Luı´s, I.M., Abreu, I.A., Coulon, S., and Ferreira, M.G. (2019). Ssu72 phosphatase is a conserved telomere replication terminator. EMBO J. *38*, e100476. https://doi.org/10.15252/embj.2018100476.
12. Hardy, C.F., Sussel, L., and Shore, D. (1992). A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. Genes Dev. *6*, 801–814. https://doi.org/10.1101/gad.6.5.801.
13. Kanoh, J., and Ishikawa, F. (2001). spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. Curr. Biol. *11*, 1624–1630.
14. Miller, K.M., Ferreira, M.G., and Cooper, J.P. (2005). Taz1, Rap1 and Rif1 act both interdependently and independently to maintain telomeres. EMBO J. *24*, 3128–3135. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600779.
15. Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Renard-Guillet, C., Shirahige, K., and Masai, H. (2012). Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. Genes Dev. *26*, 137–150. https://doi.org/10.1101/gad.178491.111.
16. Dave´ , A., Cooley, C., Garg, M., and Bianchi, A. (2014). Protein phosphatase 1 recruitment by Rif1 regulates DNA replication origin firing by counteracting DDK activity. Cell Rep. *7*, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.019.
17. Mattarocci, S., Shyian, M., Lemmens, L., Damay, P., Altintas, D.M., Shi, T., Bartholomew, C.R., Thoma¨ , N.H., Hardy, C.F.J., and Shore, D. (2014). Rif1 controls DNA replication timing in yeast through the PP1 phosphatase Glc7. Cell Rep. *7*, 62–69. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.010.
18. Hiraga, S.I., Monerawela, C., Katou, Y., Shaw, S., Clark, K.R., Shirahige, K., and Donaldson, A.D. (2018). Budding yeast Rif1 binds to replication origins and protects DNA at blocked replication forks. EMBO Rep. *19*, 1–14. https://doi.org/10.15252/embr.201846222.
19. Stewart, J.A., Wang, Y., Ackerson, S.M., and Schuck, P.L. (2018). Emerging roles of CST in maintaining genome stability and human disease. Front. Biosci. *23*, 1564–1586.
20. Lyu, X., Sang, P.B., and Chai, W. (2021). CST in maintaining genome stability: beyond telomeres. DNA Repair *102*, 103104. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103104.
21. Chen, L.-Y., Redon, S., and Lingner, J. (2012). The human CST complex is a terminator of telomerase activity. Nature *488*, 540–544. https://doi.org/10.1038/nature11269.
22. Gu, P., Min, J.-N., Wang, Y., Huang, C., Peng, T., Chai, W., and Chang, S. (2012). CTC1 deletion results in defective telomere replication, leading to catastrophic telomere loss and stem cell exhaustion. EMBO J. *31*, 2309–2321. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.96.
23. Stewart, J.A., Wang, F., Chaiken, M.F., Kasbek, C., Chastain, P.D., Wright, W.E., and Price, C.M. (2012). Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. EMBO J. *31*, 3537–3549. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.215.
24. Wang, F., Stewart, J.A., Kasbek, C., Zhao, Y., Wright, W.E., and Price, C.M. (2012). Human CST has independent functions during telomere duplex replication and C-strand fill-in. Cell Rep. *2*, 1096–1103. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.007.
25. Zhang, M., Wang, B., Li, T., Liu, R., Xiao, Y., Geng, X., Li, G., Liu, Q., Price, C.M., Liu, Y., and Wang, F. (2019). Mammalian CST averts replication failure by preventing G-quadruplex accumulation. Nucleic Acids Res. *47*, 5243–5259. https://doi.org/10.1093/nar/gkz264.
26. Chastain, M., Zhou, Q., Shiva, O., Fadri-Moskwik, M., Whitmore, L., Jia, P., Dai, X., Huang, C., Ye, P., and Chai, W. (2016). Human CST facilitates genome-wide RAD51 recruitment to GC-rich repetitive sequences in response to replication stress. Cell Rep. *16*, 1300–1314. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.077.
27. Lyu, X., Lei, K.H., Biak Sang, P., Shiva, O., Chastain, M., Chi, P., and Chai, W. (2021). Human CST complex protects stalled replication forks by directly blocking MRE11 degradation of nascent-strand DNA. EMBO J. *40*, e103654. https://doi.org/10.15252/embj.2019103654.
28. Wang, Y., Brady, K.S., Caiello, B.P., Ackerson, S.M., and Stewart, J.A. (2019). Human CST suppresses origin licensing and promotes AND-1/Ctf4 chromatin association. Life Sci. Alliance *2*, e201800270. https://doi.org/10.26508/lsa.201800270.
29. Anderson, B.H., Kasher, P.R., Mayer, J., Szynkiewicz, M., Jenkinson, E.M., Bhaskar, S.S., Urquhart, J.E., Daly, S.B., Dickerson, J.E., O'Sullivan, J., et al. (2012). Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. Nat. Genet. *44*, 338–342. https://doi.org/10.1038/ng.1084.
30. Simon, A.J., Lev, A., Zhang, Y., Weiss, B., Rylova, A., Eyal, E., Kol, N., Barel, O., Cesarkas, K., Soudack, M., et al. (2016). Mutations in STN1 cause Coats plus syndrome and are associated with genomic and telomere defects. J. Exp. Med. *213*, 1429–1440. https://doi.org/10.1084/jem.20151618.
31. Hiraga, S.I., Ly, T., Garzo´ n, J., Ho˘rej˘sı´, Z., Ohkubo, Y.N., Endo, A., Obuse, C., Boulton, S.J., Lamond, A.I., and Donaldson, A.D. (2017). Human RIF1 and protein phosphatase 1 stimulate DNA replication origin licensing but suppress origin activation. EMBO Rep. *18*, 403–419. https://doi.org/10.15252/embr.201641983.

CellPress
OPEN ACCESS

1.

2.

3. Hiraga, S.I., Alvino, G.M., Chang, F., Lian, H.-Y., Sridhar, A., Kubota, T., Brewer, B.J., Weinreich, M., Raghuraman, M.K., and Donaldson, A.D. (2014). Rif1 controls DNA replication by directing Protein Phosphatase 1 to reverse Cdc7-mediated phosphorylation of the MCM complex. Genes Dev. *28*, 372–383. https://doi.org/10.1101/gad.231258.113.

4. Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013). RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. Mol. Cell *49*, 858–871. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002.

5. Escribano-Dı´az, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T.F., Tka´ c˘, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., et al. (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. Mol. Cell *49*, 872–883. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001.

6. Mirman, Z., Lottersberger, F., Takai, H., Kibe, T., Gong, Y., Takai, K., Bianchi, A., Zimmermann, M., Durocher, D., and de Lange, T. (2018). 53BP1-RIF1-shieldin counteracts DSB resection through CST- and Pola--dependent fill-in. Nature *560*, 112–116. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0324-7.

7. Daigaku, Y., Keszthelyi, A., Mu€ller, C.A., Miyabe, I., Brooks, T., Retkute, R., Hubank, M., Nieduszynski, C.A., and Carr, A.M. (2015). A global profile of replicative polymerase usage. Nat. Struct. Mol. Biol. *22*, 192–198. https://doi.org/10.1038/nsmb.2962.

8. Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Ptasin´ska, K., Miyabe, I., and Carr, A.M. (2015). Mapping ribonucleotides in genomic DNA and exploring replication dynamics by polymerase usage sequencing (Pu-seq). Nat. Protoc. *10*, 1786–1801. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.116.

9. Kanoh, Y., Matsumoto, S., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kono, N., Renard-Guillet, C., Masuda, K., Iida, K., Nagasawa, K., Shirahige, K., and Masai, H. (2015). Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. Nat. Struct. Mol. Biol. *22*, 889–897. https://doi.org/10.1038/nsmb.3102.

10. Ptasin´ska, and Katarzyna. (2018). Studying DNA replication dynamics in Schizosaccharomyces pombe using next generation sequencing.

11. Sabouri, N., Capra, J.A., and Zakian, V.A. (2014). The essential Schizosaccharomyces pombe Pfh1 DNA helicase promotes fork movement past G-quadruplex motifs to prevent DNA damage. BMC Biol. *12*, 101. https://doi.org/10.1186/s12915-014-0101-5.

12. Maestroni, L., Audry, J., Luciano, P., Coulon, S., Ge´ li, V., and Corda, Y. (2020). RPA and Pif1 cooperate to remove G-rich structures at both leading and lagging strand. Cell stress *4*, 48–63. https://doi.org/10.15698/cst2020.03.214.

13. Piazza, A., Serero, A., Boule´ , J.B., Legoix-Ne´ , P., Lopes, J., and Nicolas, A. (2012). Stimulation of gross chromosomal rearrangements by the human CEB1 and CEB25 minisatellites in Saccharomyces cerevisiae depends on G-quadruplexes or Cdc13. PLoS Genet. *8*, e1003033. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003033.

14. Piazza, A., Adrian, M., Samazan, F., Heddi, B., Hamon, F., Serero, A., Lopes, J., Teulade-Fichou, M.-P., Phan, A.T., and Nicolas, A. (2015). Short loop length and high thermal stability determine genomic instability induced by G-quadruplex-forming minisatellites. EMBO J. *34*, 1718–1734. https://doi.org/10.15252/embj.201490702.

15. Wang, F., Stewart, J., and Price, C.M. (2014). Human CST abundance determines recovery from diverse forms of DNA damage and replication stress. Cell Cycle *13*, 3488–3498. https://doi.org/10.4161/15384101.2014.964100.

16. Miyabe, I., Mizuno, K., Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Skouteri, M., Mohebi, S., Kunkel, T.A., Murray, J.M., and Carr, A.M. (2015). Polymerase d replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart. Nat. Struct. Mol. Biol. *22*, 932–938. https://doi.org/10.1038/nsmb.3100.

17. Naiman, K., Campillo-Funollet, E., Watson, A.T., Budden, A., Miyabe, I., and Carr, A.M. (2021). Replication dynamics of recombination-dependent replication forks. Nat. Commun. *12*, 923–1011. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21198-0.

18. Lambert, S., and Carr, A.M. (2013). Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. Curr. Opin. Genet. Dev. *23*, 132–139. https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.009.

19. Wang, X., and Baumann, P. (2008). Chromosome fusions following telomere loss are mediated by single-strand annealing. Mol. Cell *31*, 463–473. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.028.

20. Mennie, A.K., Moser, B.A., Hoyle, A., Low, R.S., Tanaka, K., and Nakamura, T.M. (2019). Tpz1TPP1 prevents telomerase activation and protects telomeres by modulating the Stn1-Ten1 complex in fission yeast. Commun. Biol. *2*, 297–315. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0546-8.

21. Jun, H.-I., Liu, J., Jeong, H., Kim, J.-K., and Qiao, F. (2013). Tpz1 controls a telomerase-nonextendible telomeric state and coordinates switching to an extendible state via Ccq1. Genes Dev. *27*, 1917–1931. https://doi.org/10.1101/gad.219485.113.

22. Borges, P.C.C., Escandell, J.M., Matmati, S., Coulon, S., and Ferreira, M.G. (2023). Pot1 promotes telomere DNA replication via the Stn1-Ten1 complex in fission yeast. bioRxiv, . Preprint at. https://doi.org/10.1101/2023.01.23.525167.

23. Tazumi, A., Fukuura, M., Nakato, R., Kishimoto, A., Takenaka, T., Ogawa, S., Song, J.H., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Shirahige, K., and Masukata, H. (2012). Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast. Gene Dev. *26*, 2050–2062. https://doi.org/10.1101/gad.194282.112.

24. Toteva, T., Mason, B., Kanoh, Y., Brøgger, P., Green, D., Verhein-Hansen, J., Masai, H., and Thon, G. (2017). Establishment of expression-state boundaries by Rif1 and Taz1 in fission yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *114*, 1093–1098. https://doi.org/10.1073/pnas.1614837114.

25. Zofall, M., Smith, D.R., Mizuguchi, T., Dhakshnamoorthy, J., and Grewal, S.I.S. (2016). Taz1-Shelterin promotes facultative heterochromatin assembly at chromosome-internal sites containing late replication origins. Mol. Cell *62*, 862–874. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.034.

26. Nakamura, T.M., Cooper, J.P., and Cech, T.R. (1998). Two modes of survival of fission yeast without telomerase. Science *282*, 493–496. https://doi.org/10.1126/science.282.5388.493.

27. van Emden, T.S., Forn, M., Forne´ , I., Sarkadi, Z., Capella, M., Martı´n Caballero, L., Fischer-Burkart, S., Bro¨ nner, C., Simonetta, M., Toczyski, D., et al. (2019). Shelterin and subtelomeric DNA sequences control nucleosome maintenance and genome stability. EMBO Rep. *20*, e47181. https://doi.org/10.15252/embr.201847181.

28. Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A.M., Wittenberg, C., and Russell, P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. Mol. Cell *28*, 134–146. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.009.

29. Boddy, M.N., Gaillard, P.-H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., and Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. Cell *107*, 537–548.

30. Williams, R.S., Dodson, G.E., Limbo, O., Yamada, Y., Williams, J.S., Guenther, G., Classen, S., Glover, J.N.M., Iwasaki, H., Russell, P., and Tainer, J.A. (2009). Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11- Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. Cell *139*, 87–99. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.033.

31. Dehe´ , P.M., Coulon, S., Scaglione, S., Shanahan, P., Takedachi, A., Wohlschlegel, J.A., Yates, J.R., Llorente, B., Russell, P., and Gaillard, P.-H.L. (2013). Regulation of Mus81–Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. Nat. Struct. Mol. Biol. *20*, 598–603. https://doi.org/10.1038/nsmb.2550.

32. Coulon, S., Gaillard, P.H.L., Chahwan, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, and Russell, P. (2004). Slx1-Slx4 are subunits of a structure-specific endonuclease that maintains ribosomal DNA in fission yeast. Mol. Biol. Cell *15*, 71–80. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-08-0586.

1.
2. Teixeira-Silva, A., Ait Saada, A., Hardy, J., Iraqui, I., Nocente, M.C., Fre´ on, K., and Lambert, S.A.E. (2017). The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. Nat. Commun. *8*, 1982. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02144-5.
3. Hartsuiker, E., Neale, M.J., and Carr, A.M. (2009). Distinct requirements for the Rad32(Mre11) nuclease and Ctp1(CtIP) in the removal of covalently bound topoisomerase I and II from DNA. Mol. Cell *33*, 117–123. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.021.
4. Brewer, B.J., Lockshon, D., and Fangman, W.L. (1992). The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. Cell *71*, 267–276. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90355-g.
5. Sanchez, J.A., Kim, S.M., and Huberman, J.A. (1998). Ribosomal DNA replication in the fission yeast, Schizosaccharomyces pombe. Exp. Cell Res. *238*, 220–230. https://doi.org/10.1006/excr.1997.3835.
6. Yamamoto, I., Nakaoka, H., Takikawa, M., Tashiro, S., Kanoh, J., Miyoshi, T., and Ishikawa, F. (2021). Fission yeast Stn1 maintains stability of repetitive DNA at subtelomere and ribosomal DNA regions. Nucleic Acids Res. *49*, 10465–10476. https://doi.org/10.1093/nar/gkab767.
7. Ogawa, S., Kido, S., Handa, T., Ogawa, H., Asakawa, H., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Hiraoka, Y., and Masukata, H. (2018). Shelterin promotes tethering of late replication origins to telomeres for replica- tion-timing control. EMBO J. *37*, e98997. https://doi.org/10.15252/embj.201898997.
8. Segurado, M., de Luis, A., and Antequera, F. (2003). Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in Schizosaccharomyces pombe. EMBO Rep. *4*, 1048–1053. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400008.
9. Nishibuchi, G., and De´ jardin, J. (2017). The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. Chromosome Res. *25*, 77–87. https://doi.org/10.1007/s10577-016-9547-3.
10. Harris, M.A., Rutherford, K.M., Hayles, J., Lock, A., Ba¨ hler, J., Oliver, S.G., Mata, J., and Wood, V. (2022). Fission stories: using PomBase to understand Schizosaccharomyces pombe biology. Genetics *220*, iyab222. https://doi.org/10.1093/genetics/iyab222.

## STAR+METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

| REAGENT or RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|---|---|---|
| **Antibodies** | | |
| Anti-Rad51 | abcam | Cat# ab63799, RRID:AB_1142602 |
| Anti-GFP | Invitrogen | Cat# A-11122, RRID:AB_221569 |
| Anti-Myc (c-Myc antibody; 9E10) | Santa cruz | Cat# sc-40; RRID: AB_2892598 |
| **Chemicals, peptides, and recombinant proteins** | | |
| Proteinase K | Euromedex | EU0090 |
| RNase A DNase-free | Roche | 11119915001 |
| Dynabeads protein G | Invitrogen | 10003D |
| CutSmart buffer | New England Biolabs | B7204S |
| *Apa*I, recombinant | New England Biolabs | R0114S |
| Nourseothricin | Jena Bioscience | AB102L |
| Geneticin | Gibco | 10131–026 |
| Hygromycin | Invitrogen | 10687010 |
| Hybond-XL membrane | Dutsher | RPN2035 |
| Deoxycytidine $5^0$-triphosphate (a-32P) | Perkin Elmer | BLU013Z250UC |
| Formaldehyde | Sigma | F-8775 |
| Glycerol | Euromedex | EU3550 |
| MOPS | Euromedex | EU0034 |
| Potassium acetate | Sigma-Aldrich | P1190 |
| EDTA | Euromedex | EU0007 |
| SDS | Euromedex | EU0360-A |
| Buffer G2 | Qiagen | 1014636 |
| Buffer QC | Qiagen | 19055 |
| Buffer QBT | Qiagen | 19054 |
| Buffer QF | Qiagen | 19056 |
| N-lauroyl sarcosine | Sigma-Aldrich | 61747 |
| RnaseH2 | New England Biolabs | M0288 |
| USER | New England Biolabs | M550 |
| T4 polymerase | New England Biolabs | M0203 |
| Ampure XP beads | Beckman Coulter | A63880 |
| NEB Next Ultra II DNA library Prep kit | New England Biolabs | E7645 |
| Zymolyase | Amsbio | 120493–1 |
| **Critical commercial assays** | | |
| TB Green premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) | TAKARA | RR820W |
| InnuPrep PCR pure Kit | AnalytikJena | 845-KS-5010250 |
| 2% agarose gel casette | Sage Science | BEF2010 |
| Genomic tips G-100 | Quiagen | 10223 |
| High Sensitivity DNA Chips | Agilent Technology | 5067–4626 |
| **Deposited data** | | |
| NCBI GEO repository (GSE207082) | NCBI | N/A |
| **Experimental models: Organisms/strains** | | |
| See Table S1 for a list of yeast strains used in this study | N/A | N/A |
| **Oligonucleotides** | | |
| See Table S2 for a list of primers used in this study | N/A | N/A |

(*Continued on next page*)

CellPress
OPEN ACCESS

*Continued*

| REAGENT or RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|---|---|---|
| Software and algorithms | | |
| Quantity One 1-D analysis software | Biorad | N/A |
| Bowtie 2 | Johns Hopkins University | N/A |
| GitHub repository (https://doi.org/10.5281/zenodo.7890318) | GitHub | N/A |
| Samtools | MIT | N/A |
| R studio | GNU | N/A |
| Prism 6 | GraphPad | N/A |
| Papers 3 | Digital Science Research & Solutions Inc. | N/A |

## RESOURCE AVAILABILITY

### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Ste´ phane Coulon (stephane.coulon@inserm.fr).

### Materials availability

Strains generated for this manuscript are listed in Table S1 and the key resources table. Please request strains by contacting the lead contact.

### Data and code availability

- The datasets generated during the current study are available in the NCBI GEO repository under accession number GSE207082.
- The used script is available at: https://github.com/KarelNaiman/shelterin-dependent-recruitment-of-Stn1-Ten1.git (https://doi.org/10.5281/zenodo.7890318)
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

## EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

### Strains and growth conditions

*S. pombe* strains used in this work are listed in Table S1. Stn1-226-Myc PCR fragment was amplified from plasmid pTopo-Stn1-226-myc:KanMx with primers $^{381}$FwStn1 and $^{294}$RvStn1 (see Table S2) and integrated to the genome of *S. pombe* strains by one-step homologous insertion. Diploid strains were sporulated or haploid strains were mated and sporulated on ME plates prior to dissection, then the genotype was verified following the genetic markers or by PCR (see Table S2). Cells are grown in YES media at indicated temperatures.

## METHOD DETAILS

### Polymerase usage sequencing (PuSeq)

Cells were grown at 25°C or collected 9 h after the shift at 34°C. This incubation time at the restrictive temperature corresponds to three population doublings and is necessary for cells to incorporate ribonucleotides into ~80% of the DNA during the restrictive temperature. The published protocol was used with minor modifications: size selection was performed using a Blue Pippin (Sage Science).[56] We calculated the relative replication timing (T-rep as determined in ref. [55,56]) to examine replication dynamics across all three chromosomes of *S. pombe*. Briefly, T-rep was determined as a time when the population-averaged fraction of the genome replicated was equal to 50%. The telomeric plasmid pNSU70 was aligned to the right end of chromosome 2 using the current version of the *S. pombe* genome available on PomBase.[13,89] Nucleotides 4137 to 7223 of pNSU70 were added to chromosome 2 right end to create the C2-R extended version available under the accession number GSE196149.

### Chromatin immunoprecipitation

Cells were grown at 25°C or collected 6 h after the shift at 34°C. 100mL of culture at $OD_{600nm}$ = 0.8 was crosslinked with 1% of Formaldehyde (Sigma Aldrich) at room temperature for 15min. Crosslinking was quenched with 125mM Glycine for 5 min at room temperature and cells were washed twice with ice-cold TBS. Cell pellets were then resuspended in Lysis Buffer Low Sodium (50mM Hepes-KOH pH7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate, 2mM of PMSF, protease inhibitors) and mechanically lysed with glass beads using 4 cycles of 20 s at a speed of 6.5 in a fast-prep machine. Whole cell extracts were

sonicated for 10 min (30s ON, 30s OFF) using the Diagenode Bioruptor. Sonicated lysates were cleared by centrifugation and standardized. 3mL of anti-Rhp51 (Abcam, ab63799) mouse monoclonal antibodies, 3mL of anti-myc (9E10 sc-40, Santa Cruz) or 3mL of anti-GFP (A11122, Invitrogen), were added to solubilized chromatin and incubated overnight at 4°C. 25mL of Protein G Dynabeads (Thermofisher) were added for 3 h at 4°C. Beads were then washed twice with ice-cold Lysis Buffer Low Sodium, twice with ice-cold Lysis Buffer High Sodium (50mM Hepes-KOH pH7.5, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate), twice with ice-cold Sodium Deoxycolate buffer (10mM Tri-HCl pH 8, 250mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate, 1mM EDTA) and once with ice-cold TE buffer (10mM Tri-HCl pH 8, 1mM EDTA). Beads were then eluted in TES (TE with 1% of SDS) by incubation for 15 min at 65°C. Samples were incubated 12 h at 65°C and then treated with Proteinase K for 4 h at 37°C. DNA was purified using innuPREP PCRpure purification column (Analytikjena) and samples were analyzed by qPCR.

## QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

### qPCR and statistical analysis for ChIP

Input samples were diluted to 1/40. 2mL of template DNA was added to 5mL of TB Green Premix Ex Taq II (Takara), and primers were added to a final concentration of 0.4mM. Each sample was run in triplicate on the same 96-well PCR plate in a C1000 Touch Thermal Cycler (CFX96 Biorad). The PCR program was as follows: 95°C for 30 s followed by 55 cycles at 95°C for 10 s, 54°C for 6.1kb, 56°C for 0.2kb, 2kb, 3.7kb, 10.8kb and 14.2kb, 58°C for 7kb and 19.7kb for 10 s, 72°C for 10 s and a final extension step at 72°C for 5min.

Primers used for qPCR are listed in Table S2.% IP was calculated as followed: $\%IP = \frac{1}{E^{CT^{IP}-CT^{IT}} xDF} x100$ with E the efficiency of qPCR, $CT^{IP}$ and $CT^{IT}$ the mean of triplicate for IP and Input (IT) respectively, DF the dilution factor. Statistical comparisons were performed using an unpaired two-tail t test.

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

*A côté de la difficulté est, certes, une facilité…*