

Axe : Nanobiosciences

Biophysique Moléculaire

<http://www.ijm.fr/en/research/research-groups/biomolecular-nanomanipulation/>

Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure

46 rue d'Ulm

75005 Paris France

Responsable d'équipe :

Terence STRICK

strick@biologie.ens.fr

Membres permanents de l'équipe :

Marc NADAL

marc.nadal@ijm.fr

Florence GARNIER

florence.garnier@uvsq.fr

Helene DEBAT

helene.debat@uvsq.fr

Mathieu LEROUX-COYAU

mathieu.leroux-coyau@ijm.fr

• **Activité scientifiques de l'équipe :**

Notre équipe multidisciplinaire intègre les spécialités de physique, chimie, biochimie, et microbiologie. Nous développons et employons des méthodes dites « molécule-unique » afin d'étudier des processus fondamentaux du métabolisme génétique tels que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Nous nous intéressons plus particulièrement au fonctionnement de moteurs moléculaires issus du vivant tels les ARN polymérases, les ADN topoisomérases, ou encore les hélicases et translocases à ADN. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant leur action, nous pouvons appliquer différentes méthodes expérimentales incluant la nanomanipulation de molécule individuelle, la spectroscopie de force, l'observation en fluorescence de molécule-unique, ainsi que des méthodes corrélatives permettant de combiner nanomanipulation et fluorescence molécule-unique.

- **Recherche(s) et résultat(s) obtenu(s) dans les domaines d’actions des nanosciences :**

Titre du résultat 1 : Mécanismes fondamentaux de la transcription

Identification du mécanisme par lequel l’ARN polymérase échappe à son promoteur, processus baptisé « scrunching » pour souligner la compression d’ADN simple-brin qui a lieu au cours du processus. Il a récemment été confirmé par les équipes de Roger Kornberg et Steve Block que ce processus est conservé chez tous les êtres vivants.

Revyakin *et al. Science* **314** : 1139—1143 (2006).

Titre du résultat 2 : Mécanismes fondamentaux de la réparation d’ADN

Caractérisation des différentes étapes de la réparation dite « transcriptionnellement-couplée » chez la bactérie. Ce processus multi-étapes, multi-composantes est décortiqué en profondeur, nous permettant de reconstituer une voie de réparation d’ADN impliquant cinq protéines agissant de façon successive et coordonnée pour protéger nos génomes des dégâts provoqués par les rayons UV du soleil ou les agents cancérigènes contenus dans la fumée de tabac.

K. Howan, *et al. Nature* **490**: 431—434, (2012).

J. Fan *et al. Nature* (sous presse, 2016).

Titre du résultat 3 : Développement de méthodes corrélatives en expérimentation molécule-unique

Nous avons développé et exploité une nouvelle plateforme pour l’expérimentation molécule unique combinant nanomanipulation moléculaire et imagerie par détection de fluorescence molécule unique. Cette nouvelle approche corrélative, baptisée NanoCOSM (Nanomanipulation and Colocalization of Single Molecules), ouvre de nouvelles perspectives dans la reconstruction et l’étude de grands complexes macromoléculaires.

E.T. Graves *et al. Nature Struct. Mol. Biol.* **22**: 452—457 (2015).

C. Duboc *et al. Methods* doi: 10.1016/j.ymeth.2016.03.028, (2016).

Programme de recherche : Notre programme de recherche est axé sur les interactions protéines-ADN impliquées dans les processus de transcription, réplication et réparation, et la régulation de ces processus. Il s’articule actuellement autour des sujets suivants :

ARN Polymérase et Transcription

L’ARN polymérase (RNAP) st un moteur moléculaire hautement processif mais aussi hautement régulé qui conditionne son départ et son arrêt à des séquences particulières de l’ADN ainsi qu’à la présence ou à l’absence de cofacteurs appropriés tels les facteurs de transcription ou les facteurs de terminaison. Nous étudions les divers mécanismes d’initiation et de terminaison de transcription en

employant la nanomanipulation d'ADN (Howan, 2012). Nous travaillons actuellement à étendre nos mesures du système *E. coli* aux systèmes eucaryotes *C. elegans* et éventuellement *H. Sapiens*.

ADN Topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des protéines capables de modifier le superenroulement de l'ADN, propriété essentielle à son activité biologique. Nous étudions le fonctionnement de topoisomérases de psychrophiles et d'extrémophiles tels *Streptomyces coelicolor* (Szafran, 2014) et *Sulfolobus Solfataricus* (Bizard, 2011) car elles peuvent regrouper en une seule protéine les mêmes fonctions essentielles qui celles retrouvées fragmentées et dispersées dans plusieurs sous-unités chez *H. sapiens*.

Réparation de l'ADN

Nous étudions divers processus de réparation de l'ADN, comprenant la réparation transcriptionnellement-couplée (Howan, 2012) et la réparation couplée à la réplication. Ces processus mettent souvent en jeu de multiples protéines interagissant avec de multiples composantes, ce qui pose de nouveaux défis dans l'analyse molécule-unique. Nous avons donc pour ces études dû développer de nouveaux instruments nous permettant de mesurer simultanément la fluorescence molécule-unique et la réponse d'une molécule à la spectroscopie de force (Graves 2015 ; Duboc, 2016). Ceci nous a permis récemment de suivre en temps réel et de décortiquer les étapes essentielles d'une réaction de réparation d'ADN impliquant six protéines différentes (Fan, 2016). Nous travaillons actuellement à étendre le domaine spectral accessible à ces expériences de fluorescence, d'un côté synthétisant par voie organique de nouveaux fluorophores modifiés et d'un autre en ajoutant des fonctionnalités au système expérimental corrélatif décrit ci-dessus. In fine ceci nous permettra d'augmenter le nombre de fluorophores suivis en même temps et donc la complexité des machineries moléculaires observables.

- **Références :**

J. Fan, M. Leroux-Coyau, N.J. Savery and T.R. Strick
Reconstruction of bacterial transcription coupled-repair at single-molecule resolution.
Nature sous presse, 2016.

C. Duboc, E.T. Graves and T.R. Strick
Simple calibration of TIR field depth using the supercoiling response of DNA.
Methods. S1046-2023(16)30062-7. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.03.028, 2016.

E.T. Graves, C. Duboc, J. Fan, F. Stransky, M. Leroux-Coyau and T.R. Strick
A dynamic DNA-repair complex observed by correlative single-molecule nanomanipulation and fluorescence.
Nature Struct. Mol. Biol. **22**: 452—457, 2015.

K. Howan, A. Smith, L. Westblade, N. Joly, W. Grange, S. Zorman, S. Darst, N. Savery and T.R. Strick
Real-time detection of the initiation of transcription-coupled repair at single-molecule resolution.
Nature **490**: 431—434, 2012.

A. Revyakin, C. Liu, R.H. Ebright and T.R. Strick
Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching.
Science **314**: 1139—1143, 2006.