

Sujet de stage/thèse

Dynaloops

Etude de la dynamique de structures ADN-ARN à l'échelle de la molécule unique par nanopores et pinces optiques

Projet de thèse en co-tutelle entre :

Fabien Montel (fabien.montel@ens-lyon.fr)

Laboratoire de Physique de l'ENS de Lyon,

Vincent Vanoosthuyse (vincent.vanoosthuyse@ens-lyon.fr)

Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la Cellule, ENS de Lyon,).

Plusieurs activités indispensables au fonctionnement de la cellule menacent pour autant l'intégrité du génome des cellules somatiques. La transcription des gènes qui produit l'ARN messager à partir de l'ADN est l'une d'entre elles. En se déplaçant sur l'ADN pour transcrire l'ARN, les ARN polymérases peuvent introduire des distorsions dans la double-hélice d'ADN susceptibles de générer des structures secondaires délétères. En interférant avec des fonctions cellulaires primordiales comme la transcription, la duplication ou la réparation de l'ADN, ces structures secondaires ARN-ADN peuvent compromettre la survie des cellules.

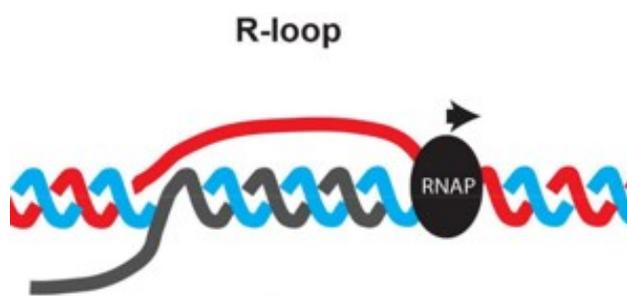


Fig.1: Les R-loops se forment quand l'ARN naissant (en gris) s'hybride avec sa matrice ADN (en bleu). Le brin ADN non transcrit (en rouge) ne peut alors plus s'hybrider avec le brin matriciel (en bleu).

La 'R-loop' est une des structures qui déforment localement la double-hélice et qui a la capacité de compromettre l'intégrité des chromosomes. C'est une structure à trois brins résultant de l'hybridation anormale de l'ARN naissant à sa matrice ADN (Fig. 1). Des données récentes ont montré que seule une petite proportion des R-loops est cytotoxique. Les propriétés intrinsèques de ces R-loops cytotoxiques restent mal comprises. L'objectif de ce projet est d'utiliser une **approche multidisciplinaire biologie/physique** pour mieux caractériser et manipuler les **propriétés physiques des R-loops cytotoxiques**.

Dans une étude précédente les équipes de V. Vanoosthuyse et C. Moskalenko ont montré que les R-loops diffèrent entre elles *in vitro* par leur organisation 3D. En utilisant la microscopie à force atomique (AFM), l'équipe a montré que la synthèse d'une R-loop cytotoxique modèle engendre la formation de structures complexes de plusieurs centaines de nm³ de volume contenant plusieurs centaines de nucléotides, dont les propriétés physiques sont essentiellement déterminées par l'organisation 3D de son ADN simple-brin (en rouge sur la Fig.1) et qui contraignent l'ADN environnant. De façon inattendue, pour un même gène, la formation de R-loops peut générer des structures différentes. De même, le séquençage des R-loops à l'échelle de la molécule unique a montré qu'un même gène pouvait produire des R-loops de tailles différentes. Ces observations ont suggéré que chaque cycle de transcription peut générer une R-loop de nature différente, exposant une quantité spécifique d'ADN simple-brin.

Il apparaît essentiel de déterminer précisément les caractéristiques thermodynamiques et cinétiques de ces structures pour mieux comprendre et prédire leur dynamique et leur stabilité. Pour cela, il faudrait pouvoir déterminer pour chaque structure observée la séquence exacte de l'ADN simple-brin impliqué.

L'équipe de F. Montel utilise et développe des outils basés sur la nanofluidique pour étudier la dynamique des biomolécules. Les nanopores artificiels et naturels ont été utilisés ces dernières années comme de véritables sondes moléculaires. Ils ont permis d'étudier à l'échelle de la molécule unique et dans des conditions physiologiques de nombreux paramètres fondamentaux comme la dynamique de repliement des protéines, la formation de nœuds au sein de molécules d'ADN mais aussi l'association

des protéines avec l'ADN. L'équipe du laboratoire de Physique de l'ENS de Lyon a construit une méthode de détection optique qui permet de suivre en temps réel le transport de molécules individuelles à travers des nanopores individuels (Zero-Mode Waveguide for Nanopores, Fig 2b). Ces outils leur ont permis de mesurer le paysage énergétique de transport pour des molécules d'ADN, d'ARN ou des complexes ARN-protéines. En utilisant des modèles de physique statistique, ces informations ont été utilisées par exemple pour déterminer la cinétique d'ouverture d'ADN présentant des structures secondaires. Par ailleurs l'équipe vient de faire l'acquisition d'un système couplant des pinces optiques multi-pièges et un contrôle microfluidique qui permettra de mesurer les forces nécessaires pour induire la translocation de biomolécules mais aussi la déstabilisation de complexes ARN-ADN. Il nous permettra de quantifier la variabilité des structures obtenues lors de cycles déstabilisation/reformation (Fig 2a).

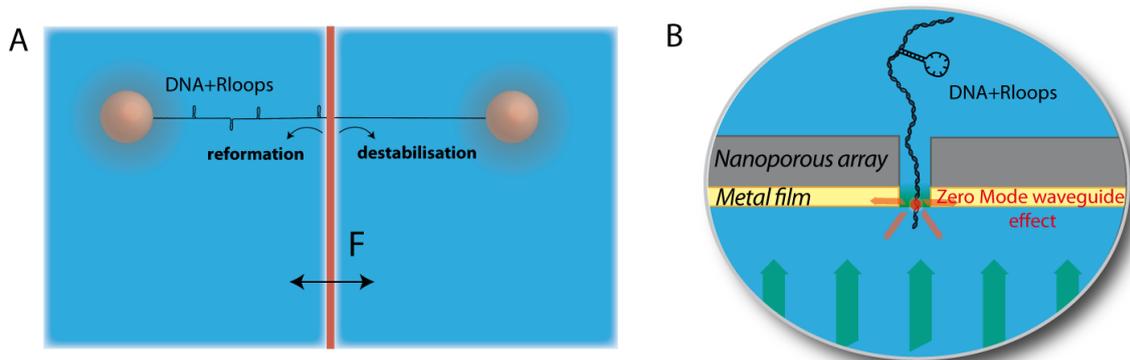


Fig 2 : A) Cycle de déstabilisation/reformation des R-loops réalisé à l'aide des pinces optiques multi-pièges (en gris). Une molécule d'ADN double brin (en noir) présentant une ou plusieurs R-loops est piégée par ses deux extrémités et manipulée pour mesurer le paysage énergétique de déstabilisation. B) Caractérisation de la structure des R-loops par Zero-Mode Waveguide. Le suivi en temps réel et à l'échelle de la molécule unique de la translocation de R-loops à travers une membrane nanoporeuse nous permettra de quantifier leur structure et leur stabilité.

L'objectif du stage et/ou de la thèse est de déterminer simultanément et à l'échelle de la molécule unique la stabilité et la séquence de l'ADN simple-brin impliqué dans les structures R-loops. Cela permettra d'établir une correspondance entre la taille et la séquence des R-loops et leur capacité à former des structures en 3D, et ainsi d'augmenter considérablement notre compréhension de l'organisation interne et des paramètres thermodynamiques associés aux différents types de R-loops. Cette stratégie combinée pourra également être appliquée pour déterminer la cinétique de formation des R-loops lors de la transcription et étudier le rôle de cofacteurs potentiels dans la stabilité et la dynamique de ces structures hybrides. A terme ce travail permettra de déterminer précisément le lien entre propriétés physiques des R-loops et leur toxicité et de mieux prédire les régions génomiques susceptibles de former des R-loop toxiques.

References :

The extruded non-template strand determines the architecture of R-loops. Y. Carrasco-Salas, A. Malapert, S. Sulthana, B. Molcrette, L. Chazot-Franguiadakis, P. Bernard, F. Chédin, C. Faivre-Moskalenko, V. Vanoosthuyse. *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue 13, 26 July 2019, Pages 6783–6795,

Zero-mode waveguide detection of flow-driven DNA translocation through nanopores. Auger T, Mathé J, Viasnoff V, Charron G, Di Meglio JM, Auvray L, Montel F. *Phys Rev Lett*. 2014 Jul 11;113(2):028302.

Zero-Mode Waveguide Detection of DNA Translocation Through FIB-organised Arrays of Engineered Nanopores. Auger T, Bourhis E, Donnez J, Durnez A, Di Meglio J-M, Auvray L, Montel F, Yates J, Gierak J. *Microelectronic Engineering* 187, 90-94 (2018)