

Spécialité de Master « Optique, Matière, Plasmas »

Stage de recherche (4 mois minimum, à partir de début mars)

Proposition de stage (**ne pas dépasser 1 page**)

Date de la proposition : 29/10/2012

Responsable du stage / internship supervisor:	
Cedric Bouzigues Antigoni Alexandrou Tél : 0169335057 Courriel / mail: cedric.bouzigues@polytechnique.edu	
Fax : 0169335084	
Nom du Laboratoire / laboratory name: Laboratoire Optique et Biosciences	
Code d'identification : UMR7645	Organisme : CNRS
Site Internet / web site: www.lob.polytechnique.fr	
Adresse / address: Ecole Polytechnique	
Lieu du stage / internship place: Palaiseau	

Imagerie d'enzymes de réparation de l'ADN individuelles par microscopie de fluorescence

L'observation de molécules individuelles est devenue une technique essentielle pour répondre à de nombreuses questions biologiques, notamment celles concernant la dynamique ou la stochasticité des réactions impliquant des biomolécules. La mesure « en direct » de l'action d'une protéine implique ainsi la mise en œuvre de méthodes optiques puissantes et innovantes. Nous proposons ainsi d'étudier l'activité de la protéine de réparation de l'ADN NucS, connue depuis peu chez *Pyrococcus abyssi* pour son rôle dans le clivage de fragments simples brins résultant d'une cassure dans l'ADN double brin, ou « flaps » (travail de l'équipe de H. Myllykallio).

Nous avons ainsi développé un système expérimental basé sur la microscopie par onde évanescente permettant de visualiser l'interaction entre une enzyme de réparation et son substrat à l'échelle de la molécule unique. Ceci nous a permis de mesurer récemment avec une précision inédite la cinétique de l'association et de la dissociation du complexe NucS-ADN, en l'absence d'activité de clivage.

Dans le cadre de ce stage, nous proposons d'étudier cette interaction dans des conditions proches de la situation physiologique. Le (la) stagiaire s'intéressera notamment à la processivité de l'enzyme sur le flap, au mécanisme de clivage des flaps par le complexe protéique (NucS-PCNA) permettant leur réparation et à l'effet de différents paramètres sur cette activité (salinité, température, flexibilité du fragment double brin,...). Ceci impliquera le développement d'un système d'illumination multi-couleur permettant le suivi simultanée de plusieurs espèces et la mise en place d'un système de colocalisation nanométrique pour la détection d'interactions protéine/protéine ou protéine/acide nucléique.

Ce stage interdisciplinaire impliquera des activités en microscopie (TIRF, suivi de molécules individuelles,...), en modélisation pour l'interprétation quantitative des données expérimentales, en biologie moléculaire (synthèse de fragments présentant une extrémité simple brin mimant une cassure physiologique, purification-marquage de protéines) et en physico-chimie (traitement de surfaces pour l'accrochage spécifique de fragments d'ADN, fabrication de systèmes microfluidiques pour l'étirement),

Ce stage permettra l'obtention de résultats fondamentaux inédits pour un sujet encore peu exploré et physiologiquement essentiel, ainsi que l'acquisition de techniques variées permettant de poursuivre par une thèse dans de bonnes conditions. Ce stage sera idéalement poursuivi par une thèse, s'intéressant de façon plus générale à l'imagerie de différents complexes protéiques de réparation de l'ADN, *in vitro* et également *in vivo* à l'aide d'outils d'imagerie de molécule unique et à superrésolution (PALM).

Ce stage pourra-t-il se prolonger en thèse ? Possibility of a PhD ? : Oui

Si oui, financement de thèse envisagé/ financial support for the PhD: Ministère – Bourse Monge

Lasers et matière	X	Lumière, Matière : Mesures Extrêmes	
Optique de la science à la technologie	X	Plasmas : de l'espace au laboratoire	