

## Sujet Stage M2 / Thèse : Transport directionnel dans le pore nucléaire

**Encadrant :** Fabien Montel ([fabien.montel@ens-lyon.fr](mailto:fabien.montel@ens-lyon.fr))

**Collaborations :** Sergio Ciliberto (ENS Lyon), Cécile Cottin-Bizonne (ILM, Lyon), May Penrad-Mobayed (IJM, Paris), Orestis Faklaris (IJM, Paris)

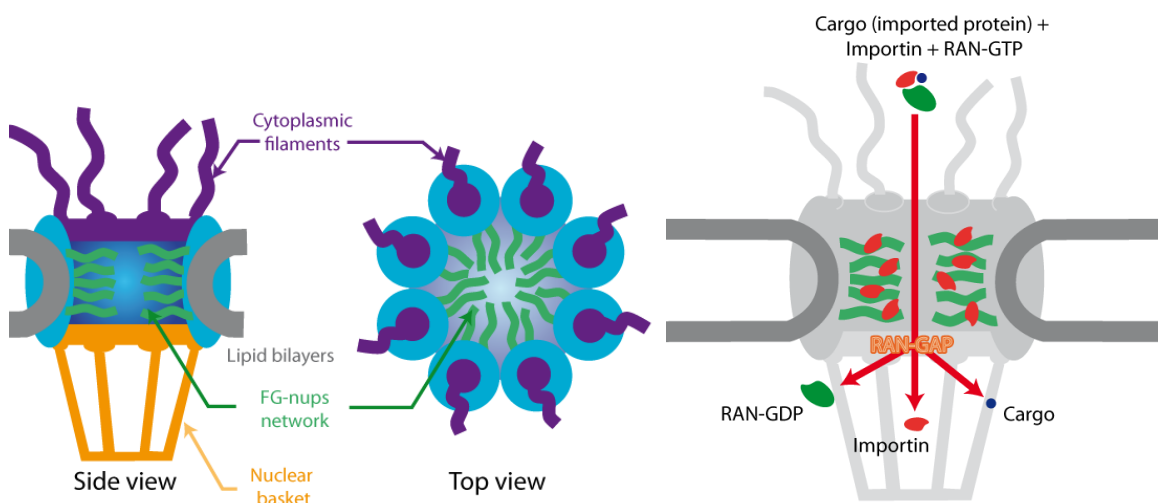
**Institut/Département :** Ecole Normale Supérieure de Lyon / Laboratoire de Physique (UMR 5672)

**Ecole Doctorale :** Ed 52 - PHAST Lyon

Le pore nucléaire est une structure macromoléculaire qui forme l'unique porte entre le noyau cellulaire et le cytoplasme. A tout moment, plus de 300 biomolécules (ARN et protéines) transitent par ce nanopore d'une manière hautement régulée. Les deux caractéristiques principales de ce pore actif sont sa très haute sélectivité et sa directionnalité [1].

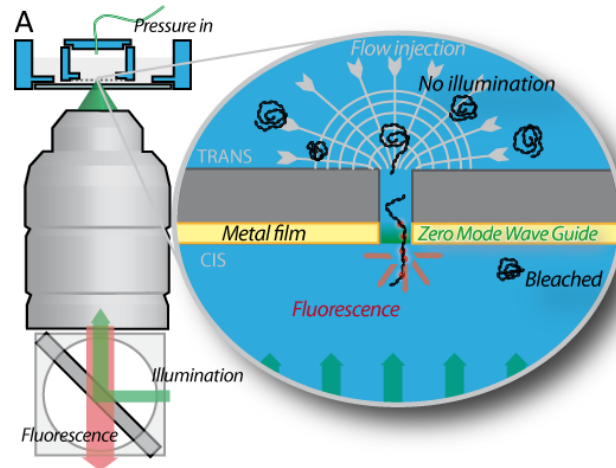
Des protéines non structurées, les FG-Nups, remplissent le canal central du pore nucléaire d'un maillage dense qui fonctionne comme une barrière sélective excluant certaines macromolécules (Figure 1, gauche). La capacité des protéines médiateurs du transport nucléaire (Importine, Exportine) à se lier aux FG-Nups leur permet de surmonter cette barrière. En ce qui concerne la directionnalité, les protéines importées dans le noyau (Cargos) présentent une séquence spécifique (signal de localisation nucléaire) qui leur permet de s'associer spécifiquement à l'Importine et à RAN-GTP (Figure 1, droite). Ce complexe peut, en raison de son hydrophobicité et de sa charge, diffuser à l'intérieur du nanopore. De l'autre côté du pore, une enzyme RAN-GAP hydrolyse le complexe (conversion RanGTP->RanGDP) et empêche sa reformation. Cette dissociation enzymatique tend à biaiser la direction du transport et crée un transport actif vers le noyau (Figure 1, droite). Ce comportement directionnel aujourd'hui fortement débattu peut-être rapproché du Ratchet Brownien dans lequel des fluctuations sont sélectionnées par un système passif asymétrique et permettent de produire un mouvement dirigé.

Dans ce projet, nous proposons de créer et de contrôler un transport actif de biomolécules dans des systèmes mimétiques ou des pores nucléaires extraits pour comprendre les critères nécessaires à l'établissement d'un transport directionnel dans le pore nucléaire.



**Figure 1 : Le pore nucléaire et son mécanisme de transport** (à gauche) Le pore nucléaire est un pore biologique de 70 nm de diamètre et de 100 nm d'épaisseur. Il est constitué d'un canal central rempli d'un réseau dynamique de protéines non structurées (FG-nups, en vert) qui assurent la sélectivité du transport. (à droite) Le mécanisme d'import via le pore nucléaire est basé sur la formation d'un complexe en trois parties (Cargo + Importin + RanGTP) qui peut diffuser dans le canal central du pore en raison de son hydrophobicité et de sa charge. Le complexe est hydrolysé de l'autre côté du pore par RAN-GAP et ne peut pas être reformé. Ceci assure alors la directionnalité du transport.

Dans une première partie, nous créerons un système mimétique reproduisant les composants essentiels du transport directionnel dans le pore nucléaire et en particulier l'effet de Ratchet Brownien. Nous utiliserons l'ADN comme cargo et des polymères polycationiques (PEI) capables de se lier fortement à l'ADN pour biaiser le transport à travers le pore. Nous bénéficierons des expériences de molécules uniques développées au laboratoire comme le Zero-Mode Waveguide pour nanopores ([2] et Figure 2) ou les pinces optiques pour mesurer directement, à l'échelle de molécule unique et du pore unique, la relation force/vitesse ainsi que l'efficacité énergétique de cette nanopompe sélective.



**Figure 2 : Zero-Mode Waveguide pour nanopores.** Un faisceau laser induit un champ proche optique à la sortie d'un nanopore fonctionnalisé par une couche nanométrique de métal. Il conduit à la fluorescence de biomolécules marquées uniquement lorsqu'elles sortent du nanopore. Cette méthode permet de suivre en temps réel le transport de molécules unique et à l'échelle du pore unique. Extrait de [2].

Dans une deuxième partie, nous utiliserons des enveloppes nucléaires issues d'ovocytes de Xenope (figure 1b). Les protocoles développés dans notre groupe permettront d'extraire et de manipuler ces enveloppes. Le complexe RanGTP+Importine+Cargo sera formé en amont du nanopore. L'enzyme RanGAP permettant de biaiser le mouvement diffusif des molécules sera lui placé en aval du nanopore. Le transport directionnel sera suivi avec les outils utilisés dans la partie précédente et les performances de cette nano-pompe seront caractérisés : relation force vitesse, efficacité énergétique. Nous pourrons alors positionner ces paramètres dans l'espace de phase obtenu à partir du système mimétique pour mieux comprendre le rôle des fluctuations dans la production de travaux utilisables à cette échelle.

Dans le cadre d'un stage de M2 l'une ou l'autre des parties du projet pourra être abordée.

### Bibliographie :

- [1] The nuclear pore complex and nuclear transport. Wente SR, Rout MP. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2010 Oct;2(10):a000562.
- [2] 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.