

THÈSE DE DOCTORAT DE PHYSIQUE

présentée par

Thomas AUGER

Translocation de biopolymères à travers des pores naturels ou artificiels

Dirigée par Loïc AUVRAY et Fabien MONTEL

Soutenue à Paris le 31 octobre 2016

Devant le jury composé de :

Atef ASNACIOS	Président du jury
Jan BEHREND	Rapporteur
Françoise BROCHARD-WYART	Examinatrice
Cécile COTTIN-BIZONNE	Examinatrice
Jean-Marc DI MEGLIO	Invité
Fabien MONTEL	Directeur de thèse
Mathias WINTERHALTER	Rapporteur

Remerciements

Au cours de ma thèse j'ai eu la chance et le plaisir d'interagir avec un grand nombre de personnes qui ont, par leur conseils, leur travail, le temps qu'ils ont consacré à m'apprendre, ou simplement à travers de nombreuses conversations, contribué à l'accomplissement du travail présenté dans ce manuscrit et à rendre les trois années passées au laboratoire agréables et pleines d'enseignements. J'aimerais ici leur exprimer ma gratitude et mon estime.

En premier lieu je voudrais remercier mes rapporteurs, Jan Behrends et Mathias Winterhalter, pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon manuscrit ainsi que pour leur retours éclairés et leur conseils. Je remercie également les membres de mon jury de thèse Atef Asnacios, Françoise Brochard et Cécile Cottin-Bizonne pour leur temps, leur présence et l'échange constructif qui a suivi la soutenance.

Je tiens à remercier tout particulièrement Fabien (Montel), qui m'a encadré et accompagné depuis plus de trois ans et demi maintenant. Toujours enthousiaste, toujours une idée ou une blague enfile sous la barbe, toujours de bon conseil, Fabien a aussi eu à cœur que le travail soit, tout au long de la thèse, original et intéressant. Ses qualités tant humaines que scientifiques, la bonne humeur ainsi que l'honnêteté et la confiance avec laquelle nous interagissions ont fait que c'était un véritable plaisir de travailler et d'apprendre à ses côtés.

Je remercie également chaleureusement Jean-Marc (Di Meglio) qui m'a suivi avec bienveillance depuis le début de ma thèse et qui a beaucoup contribué à mon travail par ses remarques, suggestions, corrections toujours pertinentes et son attention au détail. Derrière le bourreau de travail à l'air occupé se cache une grande gentillesse et une vaste curiosité qui se laisse titiller à l'heure du déjeuner ou à l'occasion de l'un des vingt cafés de la journée.

Bien sûr je remercie Loïc (Auvray), qui m'a fait confiance pour continuer le travail commencé en stage par une thèse. Loïc rayonnait toujours d'enthousiasme et de passion, même lorsqu'il était gravement pris par la maladie, et c'était un plaisir pour moi d'aller le voir avec un nouveau résultat, car j'étais inmanquablement accueilli avec un réel intérêt et un grand sourire. Sa simplicité, son authenticité, son amour des bonnes choses et de la « bonne » science sont ce que j'ai retenu de lui, avec ce goût qu'il avait d'aider les autres à accomplir ce qui leur tenait à cœur.

En un mot, j'ai eu beaucoup de chance d'avoir été encadré par ce trio qui ont fait de ma thèse une belle aventure et pour qui je garderai toujours une grande tendresse.

Merci au Capitaine Alain Richert, invétéré boute-en-train, fin pratiquant de l'humour grivois, peintre émérite et grand littéraire. Responsable à lui seul de la bonne humeur au sixième étage et quelque peu au-delà, il a également largement contribué au plaisir que je prenais à venir chaque jour au laboratoire.

Sans son aide précieuse j'aurais (comme bien d'autres thésards) perdu un temps infini en recherche continue d'objets divers; merci d'avoir toujours été disponible et prêt à retourner le laboratoire en quête de ce dont j'avais besoin.

Je remercie May Penrad-Mobayed qui m'a formé avec beaucoup de patience à l'extraction et la manipulation des ovocytes de xénope et m'a prêté le matériel nécessaire, et sans qui le travail avec les ovocytes n'aurait pas été possible. Merci également à Caroline Perrin qui a opéré chaque semaine une xénope pour me fournir des ovocytes frais.

Un grand merci à Cendrine Moskalenko avec qui j'ai passé une excellente semaine à apprendre à faire de l'AFM à l'ENS de Lyon et à qui je cherche encore les limites de la gentillesse et de la générosité.

Merci à Gaëlle Charron avec qui j'ai appris, dans la bonne humeur, à greffer correctement des polymères sur de l'or la tête enfoncée dans un *glove bag*; et aussi merci parce qu'on a bien rigolé ensemble.

Merci à Jérôme Mathé qui a grandement aidé à monter le dispositif expérimental et qui suivait avec intérêt les avancées de mes travaux. Merci aussi pour sa recette de fabrication d'électrode en chlorure d'argent passée d'encadrant à thésard depuis des temps immémoriaux.

Merci à Nathalie Lucianni pour m'avoir montré comment bien manipuler de l'ARN et comment filtrer des protéines, mais aussi et surtout pour la grande gentillesse avec laquelle elle l'a fait.

Merci à Laurent Réa qui a fabriqué bon nombre des pièces que j'ai utilisé dans mon expérience, et pour ses bons conseils en vélo.

Merci à Stéphan Suffit du laboratoire MPQ qui m'a formé au dépôt d'or par évaporation en salle blanche.

Merci aux secrétaires du laboratoire, Carole Barrache, Nadine Beyer, Maëva Sehmoun, Lucie Bouchue et Marlène Hanoomie qui m'ont assisté dans toutes les tâches administratives avec beaucoup de gentillesse et d'efficacité.

Je remercie aussi Mordjane Boukhet, Charisios Zandes, Mélina Durande et Cyndélia Guillaume qui ont effectué un stage avec nous. Ils m'ont permis d'apprendre à former et à encadrer et j'ai eu beaucoup de plaisir à partager la salle de manip et de nombreuses discussions avec eux.

Un très grand merci aux thésards du laboratoire en particulier Gwenn, Jeanne, Fanny, François, David, Simon, Etienne, Tanguy, Mourtaza, Agniese, Iris, Mathieu et Kevin, avec lesquels j'ai passé de très bons moments à discuter tant de science que de tout et n'importe quoi, que ce soit au laboratoire, dans un bar, sur les quais, au centre de la France ou en Baie de Somme. Nous avons entre nous une réelle cohésion et une vraie solidarité – bien nécessaire en temps de rédaction! – et je considère beaucoup d'entre eux comme mes amis. La perspective de ne plus les retrouver chaque jour donne à cette fin de thèse un léger goût amer.

Merci au labex *Who am I?* qui a financé ma thèse ainsi qu'à Catherine Dargemont qui a porté le projet avec Loïc Auvray.

Enfin, et même si ces quelques mots ne suffiront pas, je remercie du fond du cœur mes parents, qui m'ont toujours soutenu (moralement et financièrement), ont toujours été là pour moi, et qui m'ont permis d'aller jusqu'à ce doctorat en ayant toujours confiance en mes choix. C'est une grande joie que de voir ses parents aussi fiers et heureux.

Table des matières

I	Introduction à l'étude des polymères en milieu confiné	9
1	Transport de polymères à travers des nanopores artificiels ou biologiques	13
1.1	Modèles de chaîne isolée au repos	13
1.1.1	La chaîne idéale	13
1.1.2	Worm Like Chain	14
1.1.3	Chaîne à volume exclu en bon solvant	15
1.2	Polymères confinés dans un pore cylindrique	15
1.2.1	Blobs de de Gennes et régime de Odijk	16
1.2.2	Confinement de polymères entraînés par un flux	18
1.2.3	Confinement par forçage osmotique	24
1.3	Entraînement et détection électrique	25
1.3.1	Transport et détection électrique de biopolymères à travers un nanopore	26
1.3.2	Quelques exemples d'applications	31
1.3.3	Détection optique associée à une actuation électrique	33
1.3.4	Pores naturels et fabrication de pores artificiels	34
1.4	En résumé	36
2	Le pore nucléaire : structure et transport	39
2.1	Structure du pore nucléaire	39
2.1.1	Organisation et composition protéique	39
2.1.2	Barrière sélective	42

2.2	Transport sélectif et directionnel	43
2.2.1	Machinerie de transport et cycles d'import et d'export	43
2.2.2	Translocation à travers la barrière de FG-Nups	45
2.3	En résumé	48
	Projet de thèse	49
	II Méthodes	53
	3 Préparation et caractérisation des membranes poreuses	55
3.1	Fabrication et caractéristiques	55
3.2	Métallisation et caractérisation	57
3.2.1	Méthode d'évaporation	57
3.2.2	Caractérisation du dépôt métallique	58
3.3	Réseaux de nanopores en SiN/SiC	59
	4 Microscopie à effet <i>Zero-Mode Waveguide</i>	61
4.1	L'effet <i>Zero-Mode Waveguide</i>	61
4.2	Dispositif expérimental	64
4.2.1	Principe	64
4.2.2	Montage et matériel	64
4.3	Préparation des échantillons et marquage des polymères	67
4.3.1	Manipulation et marquage des ADNs	67
4.3.2	Manipulation et marquage des ARNs	68
	5 Acquisition des données et analyse	71
5.1	Acquisition des données	71
5.1.1	Mesures en molécule unique	71
5.1.2	Mesures en volume	73

5.2	Analyse des données	73
5.2.1	Détection des évènements en molécule unique	73
5.2.2	Analyse des mesures en volume	76
6	Extraction et manipulation des enveloppes nucléaires d'ovocytes de xénope	79
6.1	Élevage de <i>Xenopus laevis</i> et extraction des ovocytes	79
6.2	L'ovocyte de xénope	79
6.3	Extraction de l'enveloppe nucléaire et déposition sur une membrane dorée	80
6.4	Molécules utilisées pour l'étude de la diffusion à travers le pore nucléaire	82
6.5	Mesure de la densité de pore nucléaire	83
III	Résultats	85
7	Translocation d'acide nucléique entraîné par un flux ou un champ électrique	87
7.1	Translocation d'ADN- λ	87
7.1.1	Protocole	88
7.1.2	Expériences et résultats	89
7.1.3	Fonctionnalisation des pores avec des polymères neutres	99
7.2	Translocation de fragments d'ADN- λ , d'ADN de phage T4 et d'ARN	103
7.2.1	Translocation de fragments d'ADN- λ <i>Hind III</i>	103
7.2.2	Translocation d'ADN de phage T4	103
7.2.3	Translocation d'ARN- $\phi 6$	105
7.3	Translocation d'ADN simple brin	107
7.3.1	Résultats	108
7.3.2	Modèle de succion pour l'ADN simple-brin	108
7.4	Translocation d'ADN- λ par un champ électrique	113
7.4.1	Protocole	113
7.4.2	Résultats	114

7.5	Conclusions et perspectives	118
8	Évolution de la structure du réseau de FG-Nups avec la concentration en impβ1	121
8.1	Diffusion à travers l'enveloppe nucléaire d'ovocytes de xénope	121
8.1.1	Modèle diffusif	122
8.1.2	Protocole expérimental	124
8.1.3	Pertinence du modèle	126
8.2	Résultats	127
8.2.1	Validation du protocole expérimental	127
8.2.2	Effet de la RNase sur le rayon du canal central	130
8.2.3	Évolution du rayon du canal central avec la concentration en importin β 1	131
8.2.4	Conclusions et perspectives	139
A	Protocole de manipulation de l'ARN	141
B	Solutions tampon	143

Première partie

Introduction à l'étude des polymères en milieu confiné

Le confinement d'un (bio)polymère dans des pores ou des canaux de taille nanométrique intervient dans de nombreux processus de transport qu'ils soient biologiques ou technologiques. En biologie on rencontre ce confinement dans le cas du transport extra-nucléaire de l'ARN messager [33], de la sécrétion de protéines au travers des membranes lipidiques [106], ou encore de l'injection du matériel génétique de certains virus dans une cellule hôte [17]. Pour les processus technologiques, on peut citer l'extraction pétrolière en milieu poreux par injection à haute pression de solutions de polymères – qui a motivé les premiers travaux théoriques sur le confinement de polymères dans des tubes par de Gennes et Daoud –, les techniques de chromatographie par exclusion stérique et l'électrophorèse capillaire, ou plus récemment les tentatives de séquençage ultrarapide d'ADN [84, 165].

Une autre forme de confinement est celle subie par des polymères greffés sur une surface et/ou formant un réseau connecté. Le confinement est imposé par la géométrie de la surface dans le cas des polymères greffés, et par l'encombrement engendré par la présence d'autres chaînes. Ces brosses de (bio)polymères sont utilisées pour la fonctionnalisation (ou traitement) de surface dans d'innombrables applications comme les traitements médicaux intelligents – où des nanoparticules métalliques sont recouvertes de (bio)polymères augmentant leur biocompatibilité et leur capacité de ciblage – [93] ; ou la fonctionnalisation de membranes poreuses pour de la filtration sélective par ajout d'un groupe chargé ou présentant une affinité spécifique.

On rencontre également de nombreux exemples en biologie, comme dans le pore nucléaire, structure responsable du transport intra et extra-nucléaire dans les cellules eucaryotes, sur la paroi duquel sont greffées des protéines non-structurées formant un réseau complexe [191] ; la compaction de l'ADN viral dans leur capsid [57] ou encore les réseaux d'actine dans les cellules [99].

Dans la suite de ce manuscrit nous nous focaliserons sur deux problèmes : le transport de biopolymères au travers de nanopores artificiels ou biologiques par application d'un flux ou d'un champ électrique, et sur les mécanismes de transport et de sélectivité dans le pore nucléaire. Nous présenterons dans un premier chapitre, les méthodes d'observation de la translocation de biopolymères existantes, les modèles développés ainsi que les résultats obtenus dans la littérature.

Le pore nucléaire fera l'objet d'un deuxième chapitre dans lequel nous décrirons ce qui a été établi sur sa structure, les mécanismes et molécules à l'œuvre dans le transport nucléaire et les modèles d'organisation du réseau de protéines au sein du pore. Nous détaillerons également les techniques d'observation du transport nucléaire existantes.

Enfin nous introduirons les objectifs de ma thèse et justifierons leur pertinence vis-à-vis de la littérature.

Chapitre 1

Transport de polymères à travers des nanopores artificiels ou biologiques

Nous pouvons distinguer deux courants d'étude de la translocation de (bio)polymères au travers de nanopores. Le premier a été instigué par les travaux de Pierre-Gilles de Gennes sur les polymères confinés [40] qui fait appel à un entraînement des polymères par un flux ou par une pression osmotique ; le transport y est quantifié indirectement par des mesures de concentration. Ce courant s'intéresse à la physique du polymère en confinement et à ses interactions avec le flux ou avec d'autres polymères en utilisant des lois d'échelles.

L'autre courant suit les expériences pionnières de John Kasianowicz [75] ainsi que Georges Church et Richard Baldarelli [12] de détection électrique du passage d'ADN et d'ARN simple brin au travers de canaux protéiques suspendus dans une bicouche lipidique. Ce courant s'intéresse plus à la structure et aux propriétés physico-chimiques des biopolymères (séquence des acides nucléiques, conditions de dénaturation des protéines) qui modulent leur signature en détection électrique qu'à leur confinement, l'utilisation d'un champ électrique et la taille des pores utilisés imposant un mode de translocation en « file indienne » (*single-file*).

Nous nous proposons de détailler, dans ce chapitre, les méthodes mises au point et les résultats obtenus dans le cadre de ces deux courants d'étude. Mais avant cela nous allons introduire quelques notions de physique des polymères (non-confinés) en bon solvant, nécessaires à notre propos.

1.1 Modèles de chaîne isolée au repos

1.1.1 La chaîne idéale

Un polymère est un assemblage linéaire d'un nombre N de monomères attachés par des liaisons covalentes. Le modèle de polymère le plus simple est celui d'une chaîne idéale de N_s segments rigides de taille b n'interagissant pas entre eux et dont l'orientation est indépendante de celle des autres segments. Le polymère est alors assimilable à une marche aléatoire de N_s pas de longueur b . On

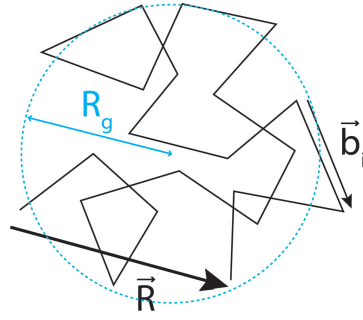


FIGURE 1.1 – Représentation schématique d'une chaîne idéale

définit la longueur de contour du polymère L_c comme la longueur où tous les segments sont alignés, $L_c = N_s b$. La longueur de contour ne représente qu'une des configurations possibles de la chaîne. Pour déterminer l'extension moyenne de la chaîne sur toutes les configurations possibles, nous introduisons le vecteur bout-à-bout $\vec{R} = \sum_{i=1}^{N_s} \vec{b}_i$ où \vec{b}_i repère le segment i . Dans le cas d'une marche aléatoire l'extension moyenne est donnée par la moyenne de la norme carrée $\langle \vec{R}^2 \rangle = N_s b^2$. La chaîne adopte une conformation moyenne de pelote caractérisée par la distance

$$R_0 = \sqrt{\langle \vec{R}^2 \rangle} = \sqrt{N_s} b \quad (1.1)$$

On définit le rayon de giration R_g comme

$$R_g^2 = \frac{1}{2N^2} \sum_{i,j} (\vec{b}_i - \vec{b}_j)^2 \quad (1.2)$$

tel que la chaîne est assimilable à une sphère de rayon R_g . On peut montrer que

$$R_g = \frac{R_0}{\sqrt{6}} = b \sqrt{\frac{N_s}{6}} \quad (1.3)$$

En réalité il existe une orientation préférentielle entre deux monomères successifs d'un polymère réel qui lui confère une rigidité. Pour un polymère dit flexible cette rigidité est négligeable et $N_s = N$, $b = a$ la taille d'un monomère et $R_0 = a\sqrt{N}$.

Dans le cas contraire, le polymère est dit semi-flexible (comme l'ADN), on introduit alors la longueur de persistance l_p qui représente la longueur moyenne de corrélation angulaire entre les monomères. On définit la longueur de Kuhn $b_K = 2l_p$ telle que $N_s = L_c/b_K$. Nous représentons le polymère par une chaîne idéale de segments ayant pour longueur la longueur de Kuhn. On a alors :

$$R_0 = b_K \sqrt{N_s} = b_K \sqrt{\frac{N a}{b_K}} \quad (1.4)$$

et

$$R_g = b_K \sqrt{\frac{N_s}{6}} \quad (1.5)$$

1.1.2 Worm Like Chain

Le modèle de Worm Like Chain (WLC) considère le polymère comme un matériau continu homogène et élastique là où le modèle de chaîne idéale considère des bâtonnets rigides libres en rotation les uns par rapport aux autres. Le modèle de WLC décrit bien les biopolymères comme l'ADN et l'ARN [1].

Pour un polymère de longueur L_c , on écrit le vecteur bout-à-bout comme

$$\vec{R} = \int_0^{L_c} \vec{t}(s) ds \quad (1.6)$$

où s est la coordonnée le long du polymère et $\vec{t}(s)$ est la tangente au polymère en s . En introduisant la longueur de persistance l_p définie comme précédemment, on peut montrer que dans le cas du WLC la fonction de corrélation de l'orientation varie comme

$$\langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(0) \rangle = \langle \cos \theta(s) \rangle = e^{-s/l_p} \quad (1.7)$$

On peut alors calculer la distance bout-à-bout carrée moyenne et on obtient

$$\langle \vec{R}^2 \rangle = 2l_p L_c \left[1 - \frac{l_p}{L_c} \left(1 - e^{-L_c/l_p} \right) \right] \quad (1.8)$$

Dans le cas où $L_c \gg l_p$ on retrouve le résultat de la chaîne idéale avec $b_K = 2l_p$.

1.1.3 Chaîne à volume exclu en bon solvant

Jusqu'à présent nous avons ignoré les interactions des monomères entre eux, des monomères avec le solvant et du solvant avec le solvant. Un monomère ne peut coïncider spatialement avec un autre, c'est l'effet de volume exclu introduit par Flory qui impose une condition de non-recouvrement à la chaîne. En bon solvant, les monomères privilégient le contact avec le solvant plutôt qu'avec les autres monomères. Celui-ci va alors envahir l'intérieur de la chaîne et entourer les monomères. La présence du solvant augmente le volume occupé par la chaîne, elle est dite « gonflée ».

En équilibrant la compétition entre le gonflement de la chaîne qui cherche à augmenter les contacts entre les monomères et le solvant et la perte d'entropie résultante – des positions deviennent interdites aux monomères, soit parce qu'elles sont déjà occupées par un autre monomère soit par le solvant –, Flory a montré que le polymère adopte une configuration de taille moyenne $R_F = N^\nu a$ (pour un polymère flexible) avec l'exposant de Flory $\nu = 3/5$ dans un espace tri-dimensionnel.

Le rayon de giration varie alors en fonction de N comme

$$R_g \propto N^{3/5} \quad (1.9)$$

Ainsi pour une chaîne longue, ces effets sont non-négligeables.

1.2 Polymères confinés dans un pore cylindrique

Nous allons nous intéresser au confinement d'un polymère semi-flexible dans un pore cylindrique solide de diamètre D . Dans un premier temps nous allons considérer le cas statique d'un polymère placé dans un tel confinement puis le cas dynamique de pénétration de ce polymère dans un pore cylindrique. Nous raisonnerons principalement en lois d'échelle, certains facteurs numériques sans dimension (comme π) seront ignorés.

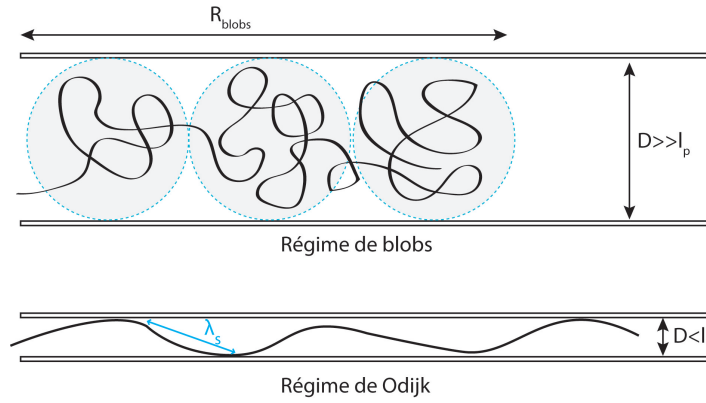


FIGURE 1.2 – Représentation de la configuration d'un polymère en régime de blobs ($D \gg l_p$) (haut) et en régime d'Odijk ($D < l_p$) (bas).

1.2.1 Blobs de de Gennes et régime de Odijk

On distingue deux régimes de confinement selon le rapport entre le diamètre du pore D et la longueur de persistance l_p du polymère. Dans le cas où $D > l_p$ la chaîne se trouve dans le régime de blobs de de Gennes ; dans le cas où $D < l_p$ la chaîne suit le régime d'Odijk.

Il existe en réalité deux régimes intermédiaires dont nous ne discuterons pas ici : le régime de de Gennes étendu et un régime de transition vers celui de Odijk. Pour une revue complète de ces régimes, voir celle réalisée par Austin et *coll.* [146].

Régime de blobs

De Gennes a proposé dans les années 70 [38, 40] un modèle de chaîne confinée s'organisant en une série de *blobs* qui ont la conformation d'une chaîne à volume exclu de rayon $R_b = R_F = D$ (Figure 1.2). L'argument est le suivant : il existe un nombre de segments N_b en-dessous duquel la chaîne ne sent pas la paroi et se comporte comme si elle était libre en volume, et au-delà duquel la chaîne est contrainte par le confinement. N_b est donc défini comme le nombre de segments de taille l_p tel que la chaîne constituée de ces N_b segments ait un diamètre D . Défini ainsi N_b vaut :

$$N_b = \left(\frac{D}{l_p} \right)^{5/3} \quad (1.10)$$

Les blobs interagissent comme des sphères dures entre eux, par conséquent la masse de la chaîne est uniformément répartie le long du pore et l'extension de la chaîne dans l'axe du pore correspond au nombre de blobs multiplié par la taille moyenne d'un blob d'où

$$R_{\text{blobs}} = \frac{N_s}{N_b} D \quad (1.11)$$

Calculons maintenant l'énergie libre de confinement d'une chaîne dans le régime de blobs. Pour ce faire, nous allons d'abord calculer cette énergie dans le cas de la chaîne idéale. L'effet du confinement est exclusivement entropique, la variation d'énergie libre ΔF induite par le confinement correspond

donc à la variation d'entropie ΔS entre l'état libre et l'état confiné, ce qui se traduit par

$$\Delta F = -k_B T \Delta S \quad (1.12)$$

De Gennes a proposé le raisonnement suivant pour le calcul de la variation d'entropie [40]. L'entropie est proportionnelle au nombre de conformations accessibles de la chaîne par conséquent :

- les monomères étant statistiquement indépendants, ΔS doit dépendre linéairement de N_s ;
- ΔS est proportionnelle à k_B et dépend uniquement du rapport R_0/D .

Ce qui donne $\Delta F \simeq k_B T (R_0/D)^m$. La linéarité de ΔS avec N_s impose $m = 2$ d'où

$$\Delta F \simeq k_B T \left(\frac{R_0}{D} \right)^2 \quad (1.13)$$

À noter que l'on peut calculer rigoureusement l'expression de ΔF en résolvant l'équation de diffusion dans le pore, ce qui donne accès aux propriétés statistiques de la chaîne, en particulier à ΔS .

Dans le cas d'une chaîne à volume exclu, le raisonnement précédent reste valable et la variation d'entropie s'écrit alors

$$\Delta F_{\text{blobs}} \simeq k_B T \left(\frac{R_F}{D} \right)^m \simeq k_B T \left(\frac{l_p N_s^{3/5}}{D} \right)^m \quad (1.14)$$

Ici $m = 5/3$ et finalement

$$\Delta F_{\text{blobs}} \simeq k_B T \frac{N_s}{N_b} \quad (1.15)$$

l'énergie libre de confinement est donc de l'ordre de $k_B T$ fois le nombre de blobs.

Régime de Odijk

Lorsque le diamètre D du pore est inférieur à la longueur de persistance du polymère semi-flexible, l'énergie élastique domine et le polymère ne peut plus former de boucles, le modèle de blobs n'est donc plus applicable. Le polymère s'organise alors comme un ressort que l'on aurait confiné radialement en rétrécissant progressivement le diamètre du pore (Figure 1.2). Le polymère serpente à l'intérieur du pore en subissant des déviations successives le long de la paroi. La distance moyenne entre chacune de ces déviations λ_s est appelée longueur de déviation de Odijk et définit un segment de Odijk. Ce dernier a montré que cette longueur dépend de l_p et D comme [122, 123] :

$$\lambda_s = (l_p D^2)^{1/3} \quad (1.16)$$

L'extension de la chaîne le long du pore R_{Odijk} est donnée par le nombre de segments de taille λ_s , L_c/λ_s , multiplié par la projection moyenne d'un segment sur l'axe du pore. En supposant que l'angle de déviation θ entre le polymère et la paroi est faible $\theta \approx D/\lambda_s$ [145] et

$$R_{\text{Odijk}} = L_c \cos \theta = L_c \left[1 - A \left(\frac{D}{l_p} \right)^{2/3} \right] \quad (1.17)$$

avec A un facteur géométrique. Yang et *coll.* ont montré à l'aide de simulations que $A \approx 0,17$ pour un pore cylindrique [194].

L'énergie libre de confinement varie comme $k_B T$ fois le nombre de segments d'Odijk L_c/λ_s de sorte que

$$\Delta F_{\text{Odijk}} \simeq k_B T \frac{L_c}{\lambda_s} \simeq k_B T \frac{L_c}{(l_p D^2)^{1/3}} \quad (1.18)$$

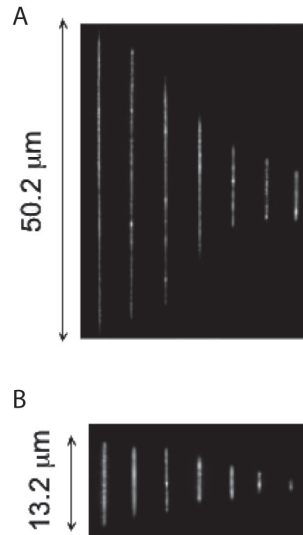


FIGURE 1.3 – Intensité moyenne d’ADN T2 (A) et λ (B) dans des canaux de 30×40 nm, 60×80 nm, 80×80 nm, 140×130 nm, 230×150 nm, 300×440 nm et 440×440 nm. Extrait de [145].

Observations expérimentales

La méthode d’étude privilégiée du confinement statique de polymères semi-flexibles consiste à faire pénétrer un brin d’ADN marqué en fluorescence dans un canal rectangulaire de dimensions nanométriques transparent par électrophorèse. On mesure alors optiquement l’extension du brin d’ADN et ses fluctuations (Figure 1.3). Tegenfeld et *coll.* [172] ont montré la validité du modèle de blobs de de Gennes en mesurant l’extension de fragments d’ADN- λ marqué au TOTO-1 dans des nanocanaux de 100 nm par 200 nm (le confinement est imposé par la dimension la plus petite).

Reisner et *coll.* [145] ont étudié la transition du régime de blobs de Gennes vers le régime d’Odijk en observant le confinement d’ADN- λ marqué au TOTO-1 dans des nanocanaux de 30 à 400 nm de large. Ils ont démontré l’existence des deux régimes avec une transition autour d’une dimension de canal de l’ordre de deux fois la longueur de persistance, dimension à partir de laquelle la rigidité du polymère se fait sentir. Cependant Reisner et *coll.* mesurent une dépendance de l’extension de la chaîne à la dimension du canal qui diffère légèrement des prédictions de de Gennes sans pouvoir l’expliquer.

D’autres travaux expérimentaux [144, 175, 180] et des simulations numériques [31, 32, 184] ont confirmé ses premières observations.

1.2.2 Confinement de polymères entraînés par un flux

En mesurant la diffusion de polymères de polystyrène au travers de membranes poreuses en polycarbonate dont les pores ont un rayon égal ou inférieur au rayon de giration des polymères, Guillot et *coll.* [63] ont montré que ces polymères ne diffusent qu’aux temps très longs ($> 10\,000$ heures) au travers des membranes. Ces observations sont en accord avec l’hypothèse qu’il est entropiquement trop défavorable pour un polymère de se confiner intégralement dans un pore. Il est donc nécessaire d’exercer une force sur celui-ci pour l’y faire pénétrer. Nous nous intéresserons au cas de l’entraînement par un flux dans

un pore cylindrique.

Modèle de déformation affine

Daoudi, Brochard et de Gennes [39, 21, 22] ont été les premiers à proposer un modèle de forçage de polymères par un flux de solvant, le modèle de déformation affine, dont nous allons reprendre les éléments.

Dans un premier temps il convient de décrire l'action d'un flux sur une chaîne de polymère. Pour cela il faut tenir compte de trois éléments :

- i.* la friction hydrodynamique exercée par le flux sur les monomères ;
- ii.* les interactions hydrodynamiques entre monomères : la présence d'un monomère modifie l'écoulement autour de lui, ce qui modifie le flux ressenti par les monomères proches ;
- iii.* les fluctuations thermiques (ou forces de Langevin).

Les modèles tenant compte des éléments (i) et (iii) sont appelés modèles de Rouse. Ceux tenant compte des interactions hydrodynamiques entre monomères sont appelés modèles de Zimm. Ces interactions génèrent des modifications du champ de vitesse du solvant à longue distance et favorisent les mouvements coopératifs des monomères. On ne distingue plus alors le solvant à l'intérieur de la pelote formée par le polymère de la pelote elle-même. Dans le modèle de Zimm, la pelote est donc considérée comme une sphère dure de rayon R_h , le rayon hydrodynamique, telle que son coefficient de diffusion D_{diff} s'écrit :

$$D_{\text{diff}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (1.19)$$

avec η la viscosité du solvant et k_B la constante de Boltzmann.

Le temps de relaxation caractéristique τ de la pelote est donné par

$$\tau = \frac{R_h^2}{D_{\text{diff}}} = \frac{6\pi\eta R_h^3}{k_B T} \quad (1.20)$$

Le rayon hydrodynamique est proportionnel au rayon de giration et varie donc comme $N^{3/5}$ pour la chaîne à volume exclu.

Plaçons nous maintenant à l'entrée d'un pore cylindrique de diamètre D et de longueur L . Le flux J est imposé par l'écoulement dans le pore. Bocquet et coll. [19] ont montré que les équations classiques de mécanique des fluides (Navier-Stokes) sont applicables dans des canaux nanométriques de diamètre supérieur à 1 nm. Nous sommes à bas nombre de Reynolds ($Re \ll 1$) et nous supposons qu'il n'y a pas de glissement du fluide sur les parois du pore, par conséquent l'écoulement dans le pore est un écoulement de Poiseuille et J s'écrit alors :

$$J = \frac{\Delta P}{R_H} = \frac{\pi D^4}{128\eta L} \Delta P \quad (1.21)$$

avec ΔP la différence de pression de part et d'autre du pore et R_H la résistance hydraulique du pore. Si on impose une différence de pression constante alors le flux J est constant.

A un rayon $r \gg D$ de l'entrée du pore, le flux au travers de la demi-sphère de rayon r s'écrit

$$J = 2\pi r^2 v \quad (1.22)$$

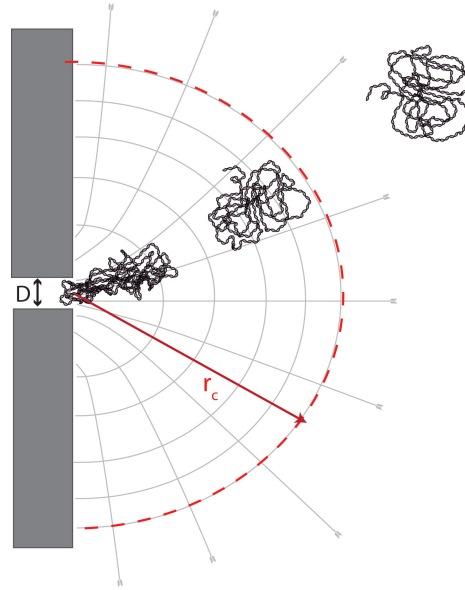


FIGURE 1.4 – Représentation de l'entraînement du polymère par le flux. La ligne pointillée rouge définit la distance au pore à partir de laquelle le polymère est déformé par le flux.

avec v la vitesse du fluide. Le flux étant constant, l'équation précédente montre que le champ de vitesse du solvant est radial et convergent vers le pore.

Le flux exerce un cisaillement de taux s sur le polymère. s correspond au gradient du champ de vitesse d'où

$$s = -\frac{dv(r)}{dr} = \frac{J}{\pi r^3} \quad (1.23)$$

Il existe une distance au pore critique r_c à partir de laquelle la pelote est déformée plus vite qu'elle ne relaxe, c'est-à-dire que $s\tau \geq 1$, le polymère est alors étiré par le flux (Figure 1.4). Daoudi et Brochard supposent qu'alors, pour $r \leq r_c$, le polymère se comporte comme un élément de fluide et suit la déformation du flux; une telle déformation est dite affine.

On peut alors montrer que pour $r < r_c$ le polymère a un rayon transverse $R_{\perp} = R_F(r/r_c)$. La chaîne sera en mesure d'entrer dans le pore si $R_{\perp}(r = D/2) \leq D/2$ ce qui impose $r_c \geq R_F$.

Il existe donc un flux critique minimum J_c à partir duquel le polymère entre dans le pore défini par la condition $s(r = R_F) = \tau^{-1}$ avec τ le temps de relaxation de Zimm, ce qui donne :

$$J_c \simeq \frac{k_B T}{\eta} \quad (1.24)$$

Le flux critique ne dépend donc ni du diamètre du pore, ni de la taille du polymère, ce qui est assez contre-intuitif à priori. Dans les faits, la géométrie de notre problème est telle que la condition de passage du polymère se ramène à une compétition entre la capacité de déformation du flux qui dépend de la force exercée par celui-ci sur la chaîne, donc de η , et la vitesse de relaxation du polymère qui dépend de l'énergie thermique disponible ($k_B T$). Il est alors cohérent que le flux critique dépende du rapport entre ces deux grandeurs.

Le modèle de déformation affine prédit donc une transition abrupte entre un régime non-passant pour $J < J_c$ et un régime passant pour $J > J_c$. Long et Anderson [94] ont été les premiers à observer le

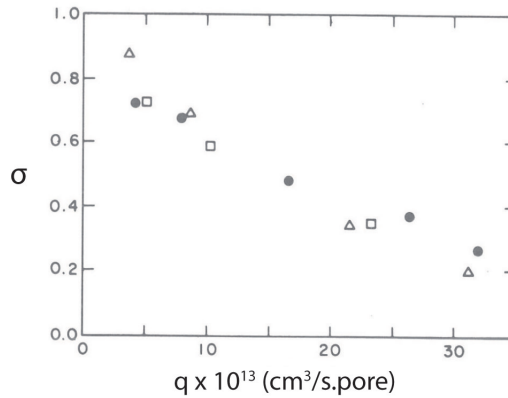


FIGURE 1.5 – Coefficient de réjection en fonction du flux pour trois valeurs du rapport $\lambda = R_h/R_{\text{pore}}$: 0,9 (cercles), 1,9 (triangles) et 3,5 (carrés) ; où R_h est le rayon hydrodynamique du polymère et R_{pore} le rayon du pore. Adapté de [94].

régime $J > J_c$ en mesurant le coefficient de réjection d'une membrane poreuse à différents flux pour des polymères de polystyrène de masse molaire allant de $1,8 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^7$ g.mol⁻¹ (Figure 1.5). Le coefficient de réjection σ est défini dans le cadre où deux compartiments sont séparés par une membrane poreuse (Figure 1.6) comme

$$\sigma = 1 - \frac{C_a}{C_r} \quad (1.25)$$

où C_r est la concentration en polymère dans le compartiment de rétention et C_a celle dans le compartiment accepteur. C_r est imposée et connue, C_a est mesurée par exemple par spectrophotométrie.

Les résultats de Long et Anderson confirment les prédictions d'indépendance du passage des polymères vis-à-vis de la taille du pore et de la taille du polymère, en revanche ils mesurent une décroissance continue du coefficient de réjection et non une transition abrupte comme le prédit le modèle de déformation affine. Long et Anderson définissent un flux critique de transition q^* tel que $\sigma = 0,5$ et mesurent $q^* = 0,27 k_B T / \eta$ en accord avec l'équation (1.24).

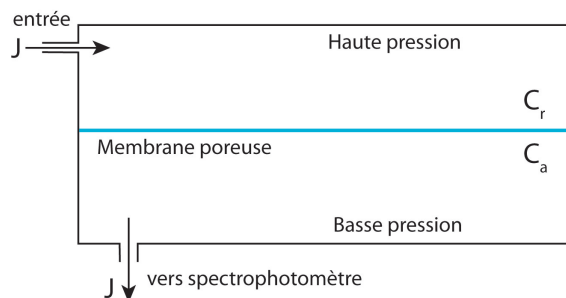


FIGURE 1.6 – Schéma d'une expérience de mesure du coefficient de réjection.

Dans le même temps Guillot et *coll.* [64] ont également mesuré une transition douce entre un régime de rétention par la membrane et un régime passant en fonction du flux appliqué. Ces observations expérimentales ont motivé une nouvelle approche théorique développée par Brochard et de Gennes, le modèle de suction.

Modèle de succion

À cause des fluctuations thermiques, le polymère a en réalité une probabilité non-nulle d'entrer dans le pore même pour un flux inférieur au flux critique. De Gennes et Brochard [23, 16] ont alors proposé de modéliser l'entrée d'un polymère dans un pore en considérant l'équilibre entre le travail fourni par le flux qui entraîne le polymère dans le pore et l'énergie libre de confinement qui s'y oppose.

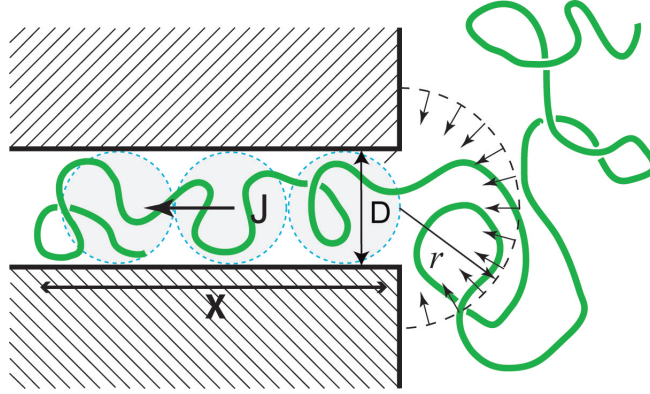


FIGURE 1.7 – Schéma représentant l'organisation en blocs d'un polymère pénétrant dans un pore sur une longueur X .

Considérons une portion de longueur X d'un polymère de longueur de persistance l_p à l'intérieur d'un pore cylindrique de diamètre $D > l_p$. La chaîne à l'intérieur du pore s'organise en X/D blocs de diamètre D (Figure 1.7). La variation d'énergie libre provoquée par la pénétration du polymère sur la longueur X s'écrit alors :

$$\Delta F(X) = k_B T \frac{X}{D} - W \quad (1.26)$$

Le premier terme correspond à l'énergie libre de confinement de X/D blocs (voir 1.2.1) et W le travail exercé par le flux sur les blocs. Si nous supposons un modèle hydrodynamique de type Zimm alors chaque blob subit une force de friction $f = 6\pi\eta Dv$ sur la longueur X et W s'écrit donc :

$$W = 6\pi\eta Dv.X. \left(\frac{X}{D} \right) \quad (1.27)$$

L'expression de v , la vitesse du solvant, est la même que dans le cas de la déformation affine $v = 2J/\pi D^2$. En ignorant les facteurs numériques, la variation d'énergie libre devient :

$$\Delta F(X) = k_B T \frac{X}{D} - \eta J \left(\frac{X}{D} \right)^2 \quad (1.28)$$

ΔF possède un maximum qui s'écrit :

$$\Delta F^* = k_B T \frac{J_c}{J} \quad (1.29)$$

avec $J_c \simeq k_B T/\eta$, le flux critique d'entrée. On retrouve la condition de passage par entraînement du modèle de déformation affine puisque $\Delta F^* < k_B T$ pour $J > J_c$, le polymère peut donc entrer sans opposition. Le modèle de succion introduit de plus une probabilité de passage P pour $J < J_c$ en considérant l'entrée du pore comme une barrière énergétique de hauteur ΔF^* que le polymère doit

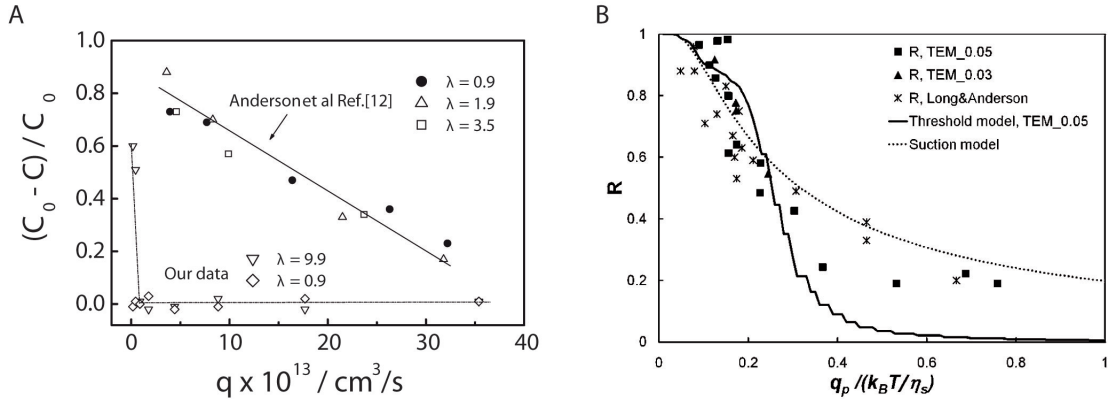


FIGURE 1.8 – Coefficient de réjection en fonction du flux appliqué, extrait de Wu et *coll.* (A) et de Béguin et *coll.* (B).

franchir. En supposant que ce processus suit une statistique de Boltzmann, la probabilité de passage P_p est donnée par

$$P_p = \exp\left(-\frac{\Delta F^*}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{J_c}{J}\right) \quad (1.30)$$

Plus de vingt ans après les expériences de Long et Anderson, deux autres études sur le transport de polymères par un flux au travers de membrane poreuse ont été publiées. Celles de Wu et *coll.* [70] et quelques années plus tard de Béguin et *coll.* [16] où est publié, pour la première fois, le modèle de suction. Ces deux études quantifient le passage de polymères au travers d'une membrane poreuse par mesure du coefficient de réjection par la même méthode que celle de Long et Anderson.

Wu et *coll.* ont mesuré le passage de polymères de polystyrène de $3,5 \cdot 10^4$ et $6,9 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ au travers de deux membranes poreuses en série aux pores de diamètre de 200 nm et 20 nm. Leur résultats sont présentés en Figure 1.8 (A). Leurs données montrent une transition abrupte entre rétention et passage des polymères au travers de la membrane. Béguin et *coll.* ont calculé le flux critique correspondant aux données de Wu et ont obtenu $J_c = 0,006 k_B T / \eta$.

Les résultats obtenus par Béguin et *coll.* sur le passage d'oxide de polyéthylène de $1,1 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ au travers de membrane poreuse aux pores de diamètre 50 nm et 30 nm sont donnés en Figure 1.8 (B). La courbe représente l'évolution du coefficient de réjection corrigé. La correction consiste à prendre en compte l'accumulation des polymères près de la surface de la membrane qui impacte la mesure de réjection. La correction a également été appliquée aux données de Long et Anderson qui sont incluses dans la figure. L'évolution observée est celle prédite par le modèle de suction d'une décroissance continue du coefficient de réjection à mesure que le flux augmente. L'expression du coefficient de réjection issue du modèle de suction ajuste les mesures et permet une estimation du flux critique $J_c = 0,22 k_B T / \eta$ (moyenne du flux critique estimé pour les mesures de Béguin et Long).

Béguin et *coll.* attribuent l'observation d'un seuil de passage par Wu et *coll.* au fait qu'ils n'agissent pas la chambre de rétention. Les polymères les plus longs bloqués à l'entrée des pores empêcheraient alors le passage des polymères plus courts normalement en mesure d'entrer. Par ailleurs Béguin et *coll.* argumentent que le système de double-membranes utilisé par Wu et *coll.* peut être ramené à une membrane aux pores coniques. On peut montrer que pour un pore conique de faible angle $J_c \simeq \epsilon k_B T / \eta$ avec ϵ

l'angle du cône. Ceci justifierait l'écart entre les flux critiques mesurés par l'un et l'autre groupe.

Si les techniques utilisées dans ces travaux ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux critique et son indépendance vis-à-vis de la taille des pores et des polymères, celles-ci possèdent des limitations significatives. La première est que le passage des polymères n'est pas directement observé mais mesuré à posteriori via le coefficient de réjection. Cette mesure est statique et ne donne pas d'informations sur la dynamique de passage. La seconde limitation est une conséquence directe de la première. La nécessité de mesurer la concentration par spectrophotométrie impose des concentrations injectées suffisamment importantes pour générer une polarisation de la membrane – les molécules s'accumulent d'un côté de la membrane – comme cela est mis en évidence par Béguin et *coll.* Cette polarisation modifie le flux au travers des membranes poreuses et peut impacter de manière importante le passage des polymères comme cela est suggéré pour les travaux de Wu et *coll.* Nous proposerons, à la fin de cette première partie, une méthode expérimentale qui pallie à ses limitations.

1.2.3 Confinement par forçage osmotique

En augmentant la concentration d'une solution de polymère en volume, on augmente l'intensité des interactions de volume exclu qui vont comprimer les chaînes et les forcer à s'enchevêtrer, on atteint alors le régime semi-dilué. La transition du régime dilué vers semi-dilué a lieu lorsque la concentration de monomères en solution c excède la concentration moyenne à l'intérieur d'une pelote isolée, appelée concentration de recouvrement c^* . Par définition :

$$c^* \simeq \frac{N}{R_g^3} \simeq \frac{1}{a^3 N^{4/5}} \quad (1.31)$$

La longueur de corrélation ξ des interactions de volume exclu correspond à la distance moyenne entre points d'enchevêtrement des chaînes (schématisé Figure 1.9). On peut montrer que $\xi = a(ca^3)^{-3/4}$ [40] ce qui donne $\xi = R_g$ pour $c = c^*$. Une solution semi-diluée de polymères est donc un empilement compact de blobs de taille ξ . Une chaîne en solution semi-diluée sera alors en mesure d'entrer dans un pore de taille D si $\xi \leq D$, les interactions entre polymères imposant un confinement plus important que celui du pore.

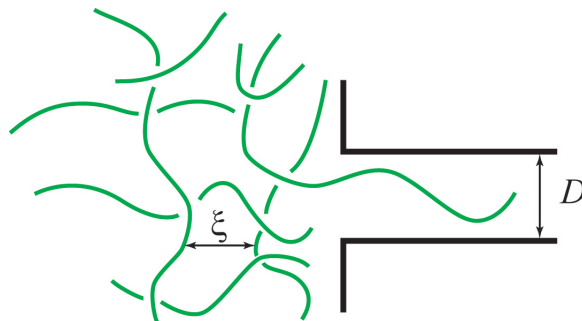


FIGURE 1.9 – Schéma d'une solution semi-diluée de polymère de longueur de corrélation ξ à l'entrée d'un pore.

On peut également trouver cette condition en calculant la pression osmotique Π dans la solution et dans le pore. Π est proportionnelle à l'énergie libre par unité de volume. L'énergie libre d'un blob

est de $k_B T$, en solution le volume d'un blob est $\simeq \xi^3$ et $\simeq D^3$ dans le pore. La pression osmotique en solution est donc donnée par $\Pi_s \simeq k_B T / \xi^3$ et dans le pore $\Pi_p = k_B T / D^3$. Le polymère entre dans le pore si $\Pi_s \leq \Pi_p$ ce qui équivaut à $\xi \leq D$. Ces effets de seuil ont été observés par Guillot et *coll.* [63] ainsi que par Oukhaled et *coll.* [126].

1.3 Entraînement et détection électrique

En 1996, Kasianowicz et *coll.* [75] ont réalisé les premières mesures du passage de molécules d'ADN et d'ARN simple brin à travers un pore d' α -hémolysine inséré dans une bicouche lipidique par une méthode de détection électrique. Cette méthode consiste à appliquer une différence de potentiel d'une centaine de millivolts de part et d'autre de la membrane ; le champ électrique ainsi généré entraîne le polymère chargé au travers du pore. En passant, la chaîne bloque le flux d'électrolyte et induit alors une chute du courant électrique dont les caractéristiques vont dépendre de la nature chimique de la chaîne, de sa longueur, de la largeur du pore et de la force ionique de la solution. Il est possible de mesurer cette variation de courant par une technique d'électrophysiologie si la durée de l'évènement de blocage dépasse la dizaine de microsecondes (Figure 1.10).

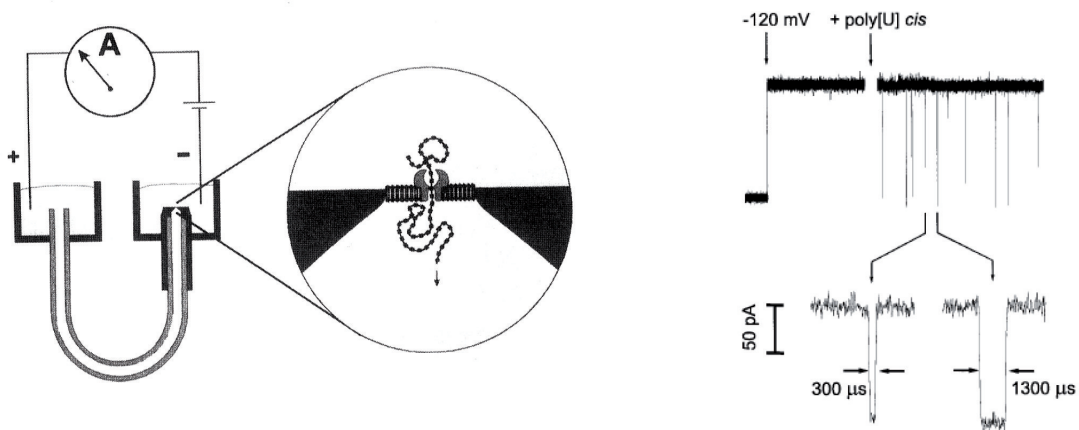


FIGURE 1.10 – À gauche, illustration d'un montage de détection électrique du passage au travers d'un pore. À droite, trace électrique du passage de poly-uracil à travers un pore d' α -hémolysine. Extrait de [75].

Cette technique de détection est identique à la méthode macroscopique utilisée dans le compteur *Coulter*. Elle est aussi comparable à la technique de *patch-clamp* utilisée pour l'étude des canaux ioniques en biologie [152, 66].

Les domaines de recherche et les applications ouverts par la détection électrique sont trop nombreux pour que nous nous attachions à en faire une revue exhaustive. Nous nous concentrerons donc uniquement sur les aspects et applications qui apportent des éléments de comparaison avec la méthode que nous avons mise au point pour l'observation et la quantification du passage de biopolymères au travers de nanopores.

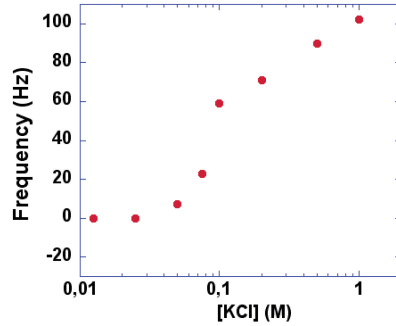


FIGURE 1.11 – Fréquence de passage de dextran sulfate de 8500 g.mol^{-1} à travers un pore d' α -hémolysine soumis à une différence de potentiel de 100 mV en fonction de la concentration en chlorure de potassium ; extrait de données non-publiées de l'équipe de L.Auvray

1.3.1 Transport et détection électrique de biopolymères à travers un nanopore

La passage d'un polyélectrolyte à travers un nanopore peut être décomposé en deux processus : la capture du polyélectrolyte par le pore et la translocation du polyélectrolyte au travers du pore. Le passage du polyélectrolyte n'est possible que si les charges surfaciques du pore sont écrantées, autrement dit si la longueur de Debye imposée par la force ionique est inférieure au rayon du pore. Dans le cas contraire, la chaîne est repoussée par les charges de polarisation et la nécessité de devoir comprimer le nuage de contre-ions autour de la chaîne assurant sa neutralité électrique. Ce phénomène a été mis en avant par la mesure de la fréquence de passage de courtes chaînes de dextran à travers un pore d' α -hémolysine en fonction de la force ionique en solution (Figure 1.11). La courbe met en évidence une concentration seuil de 0,1 M KCl qui correspond à une longueur de Debye de 1 nm égale au rayon du pore d' α -hémolysine. La dépendance de ce seuil avec la différence de potentiel appliquée n'a pas été étudiée.

Taux de capture

Les travaux de Henrickson et *coll.* [65], Meller et *coll.* [109] et Wanunu et *coll.* [186] ont montré que la fréquence à laquelle un polymère est capté par le pore, appelée taux de capture que nous noterons K_c , dépend linéairement de la concentration en polyélectrolytes c mais de manière non-triviale de la taille de la chaîne N et de la différence de potentiel appliquée ΔV . Nous allons reprendre ici la discussion proposée par M. Muthukumar [118] permettant de déterminer une expression du taux de capture en fonction de N , ΔV et c .

La Figure 1.12 (a) illustre les étapes de la translocation d'un polyélectrolyte :

- i.* diffusion : le polymère subit un mélange de dérive (*drift*) due au champ électrique et de diffusion brownienne ;
- ii.* capture : nous définissons un rayon de capture r_c à partir duquel la dérive domine sur la diffusion libre et les effets des forces électro-osmotiques, de différence de constante diélectrique entre le pore et la solution, et de gradients de forces ioniques se font sentir. Selon les conditions, r_c peut aller

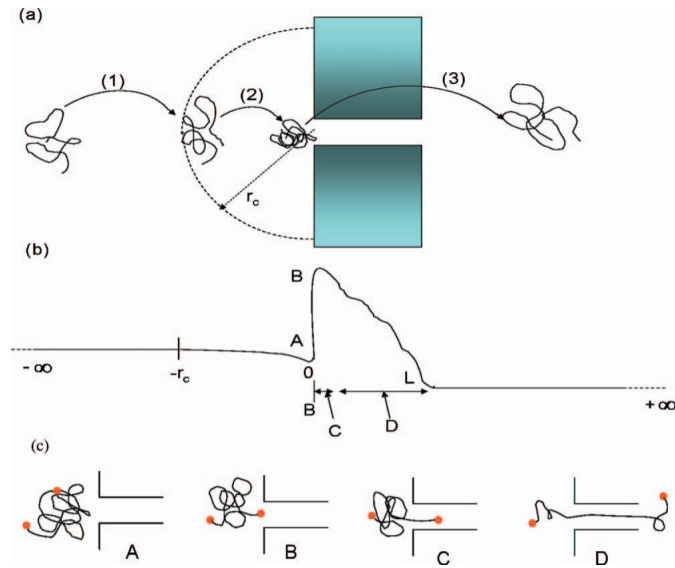


FIGURE 1.12 – (a) Les trois étapes du processus de translocation d'un polyélectrolyte. (b) Profil de l'énergie libre. (c) Détails des stades du passage du polyélectrolyte au travers du pore. Adapté de [118].

du micromètre à moins d'un nanomètre. Proche du pore ($r < r_c$), le polymère est entraîné vers l'entrée par le champ électrique, ceci constitue l'étape de capture ;

iii. entrée et passage dans le pore : le polyélectrolyte atteint l'entrée du pore sous forme de pelote sans corrélation initiale entre un des bouts de la chaîne et l'entrée. Le passage du polymère suit les étapes suivantes, illustrées Figure 1.12 (b) et (c) :

- un bout de la chaîne doit s'aligner avec l'entrée ce qui requiert de surmonter une barrière entropique (A vers B).
- un nombre minimum de monomères doivent entrer dans le pore pour que le reste de la chaîne passe intégralement dû au coup entropique du confinement (B vers C).
- la chaîne migre au travers du pore entraînée par le champ électrique (C vers D).

Si l'on omet les effets complexes comme l'électro-osmose ou les effets de constante diélectrique qui apparaissent lorsque l'on applique un champ électrique dans un pore, cette description est qualitativement la même que dans le cas du passage de polymères entraînés par un flux. L'on s'attend alors à voir deux régimes : un où le confinement domine devant la dérive exercée par la différence de potentiel ΔV (similaire au cas où $J < J_c$ du modèle de succion), et le cas inverse.

Wanunu et coll. [186] ont évalué l'influence de N et de ΔV sur le taux de capture K_c en le mesurant pour des ADN double-brin de 400 à 48 000 paires de base à travers un pore cylindrique de 3,5 nm de diamètre et 25 nm de long. Leur résultats montrent l'existence de deux régimes pour K_c en fonction de la taille de l'ADN. Un régime où K_c croît exponentiellement avec N et un régime de saturation où K_c est indépendant de N (Figure 1.13 (A)). Ils montrent également que pour les chaînes courtes, K_c croît exponentiellement avec ΔV alors que cette croissance est linéaire pour une chaîne longue (Figure 1.13 (B)). Kasianowicz et coll. [65] et Meller et coll. [109] ont également mesuré une variation exponentielle du taux de capture avec ΔV pour des chaînes courtes d'ADN simple brin à travers un pore d' α -hémolysine (α HL).

Il a été montré que la mobilité électrophorétique μ de l'ADN devient indépendante de la taille de

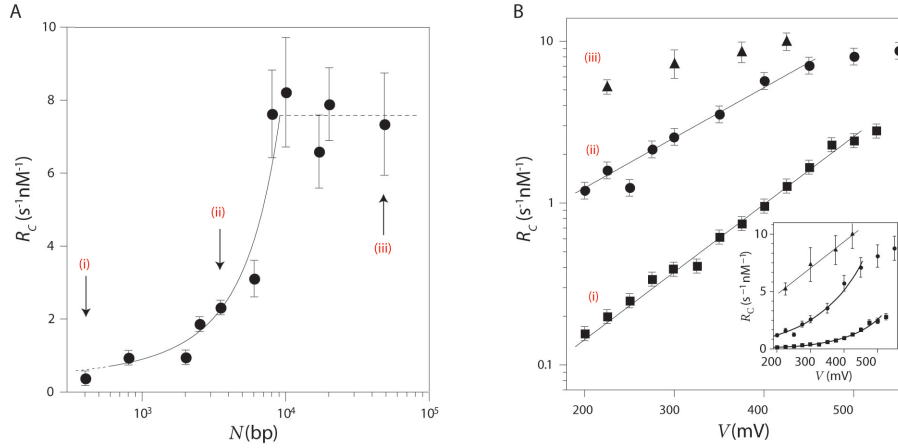


FIGURE 1.13 – (A) Taux de capture en fonction de la longueur de l’ADN double-brin pour $\Delta V = 300$ mV. (B) Taux de capture en fonction de la différence de potentiel appliquée (notée V ici) pour des ADN de : (i) 400, (ii) 3500 et 48502 paires de base. Adapté de [186].

celui-ci dès que cette taille dépasse quelques longueurs de persistance [121, 24]; le flux de contre-ions généré par le mouvement des charges de la chaîne compensant les interactions hydrodynamiques à longue distance. La définition du rayon de capture r_c se traduit par l’égalité $V(r_c) = D_{\text{diff}}/\mu$ où V est le potentiel électrique et D_{diff} le coefficient de diffusion de l’ADN. Cette égalité donne

$$r_c = \frac{D^2 \mu \Delta V}{8\ell D_{\text{diff}}} \quad (1.32)$$

avec D et ℓ le diamètre et la longueur du pore respectivement.

Le taux K avec lequel une molécule est capté par une hémisphère de rayon r_c est donné par la théorie de Smoluchowski et vaut

$$K = 2\pi D_{\text{diff}} r_c c \propto \mu \Delta V \quad (1.33)$$

Si l’on suppose que le taux de capture est dominé par la diffusion jusqu’à l’entrée du pore et non par le passage de la barrière énergétique du confinement, alors $K_c = K \propto \mu \Delta V$. Ce cas de figure correspond aux mesures de Wanunu et *coll.* pour les ADN longs pour lesquels le taux de capture est indépendant de N et croît linéairement avec ΔV . L’absence de barrière énergétique au passage d’ADN double-brin a également été décrite dans [29, 60].

Si l’on suppose maintenant que la capture d’ADN est dominée par le confinement représenté par une barrière U , alors le taux de capture peut s’écrire :

$$K_c = \omega \exp \left[\frac{q\Delta V - U}{k_B T} \right] \quad (1.34)$$

où q est la charge effective du segment au bout de la chaîne, indépendante de N . ω correspond à un taux d’essai, c’est-à-dire la fréquence avec laquelle une chaîne tente de pénétrer dans le pore lorsque celle-ci se situe à son entrée. Le second terme correspond à une probabilité de passage exactement comme dans le modèle de succion.

Une chaîne va tenter de pénétrer dans le pore si elle se situe à une distance R_g de celui-ci et lorsqu’une de ses extrémités est alignée avec l’entrée. La probabilité qu’une chaîne se trouve à une distance R_g du pore en l’absence de potentiel électrique vaut cR_g^3 . En présence d’un potentiel $V(r)$,

celui-ci tire la chaîne vers le pore et multiplie cette probabilité par un facteur $\exp(\alpha Ne\Delta V/k_B T)$ avec α la proportion de charge par monomère. L'alignement des charges, donc de la chaîne, imposé par le champ électrique est en compétition avec les fluctuations thermiques de la chaîne caractérisées par son temps de relaxation τ donné par le temps de Zimm et $\tau \propto R_g^3$. Plus la chaîne est courte, plus ce temps est court et moins elle a de charges donc plus il est difficile d'aligner une de ses extrémité avec le pore. Wanunu et *coll.* propose une expression du taux de capture tenant compte des éléments considérés ci-dessus, de la forme :

$$K_c \simeq c\Delta V \exp\left(\frac{q\Delta V - U}{k_B T} + \frac{e\Delta V}{k_B T} \frac{\alpha D^2}{al} \left(\frac{N}{4N_p}\right)^{1/2}\right) \quad (1.35)$$

où a est la taille d'une paire de base, N_p le nombre de paires de base correspondant à la longueur de persistance. Cette expression est valable pour $N > 4N_p$ et reproduit bien les dépendances observées expérimentalement.

La conclusion assez contre-intuitive de cette discussion sur le taux de capture est que les polyélectrolytes les plus longs sont plus aisément captés par le pore, ce qui est dû à leur nombre de charges plus important et leur dynamique plus lente qui permet un alignement plus rapide avec l'entrée du pore.

Dynamique de translocation

Une fois le polyélectrolyte capturé par le pore, celui-ci doit encore le traverser complètement, ce qui constitue l'étape de translocation. Le temps de translocation détermine la durée des blocages de courant mesurés. Ce temps doit logiquement dépendre de la taille du polyélectrolyte, de sa rigidité, des interactions spécifiques – affinités chimiques entre le polymère et la paroi, particulièrement présentes pour les pores protéiques – et non-spécifiques – flux de contre-ions lié à la présence de charges de surfaces par exemple – avec le pore et de la différence de potentiel.

Kasianowicz et *coll.* [75] et Meller et *coll.* [108, 109] ont mis en évidence une dépendance linéaire du temps de translocation t_{trans} avec le nombre de monomère N (Figure 1.14 (A) et (C)) en mesurant la dynamique de translocation d'ADNs simple-brin synthétisés par assemblage de quelques dizaines de bases identiques (adénine ou uracile) ou d'un mélange de deux bases (cytosine et thymine). Une vision naïve de la translocation au travers du pore d' α HL est de considérer que l'ADN traverse avec ses bases alignées dans l'axe du pore à une vitesse constante. La vitesse de l'ADN est maximale à l'intérieur du pore où la force d'entraînement par le champ électrique est maximale. La vitesse maximale v_{max} sera alors proportionnelle au nombre de charges du polymère présentes dans le pore N_e (ce nombre est fixé par la longueur du pore) et à ΔV . La durée de translocation est, dans cette approximation, à peu près égale à la longueur du brin divisé par la vitesse maximale soit

$$t_{\text{trans}} \simeq \frac{L_c}{v_{\text{max}}} \propto \frac{Na}{N_e \Delta V} \propto \frac{N}{\Delta V} \quad (1.36)$$

Cette expression simple correspond aux observations de Kasianowicz et *coll.* de dépendance linéaire de t_{trans} avec N et avec l'inverse de ΔV (Figure 1.14 (B)). Les résultats de Meller et *coll.* montrent cependant les limites de ce modèle simpliste pour des ADNs extrêmement courts ($N < 12$) et pour de faibles différences de potentiel ($\Delta V < 120$ mV (D)). Dans ces conditions les interactions avec le

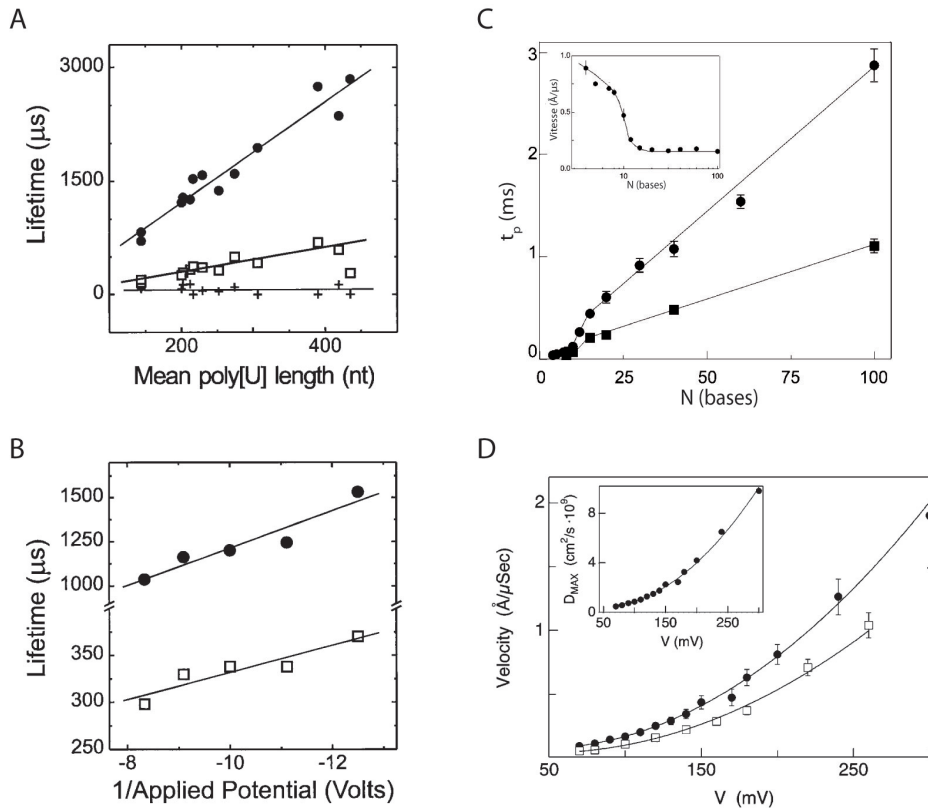


FIGURE 1.14 – Durée de vie des blocages de courant induits par la translocation d'ADN simple-brin (poly(U)) au travers d'un pore d' α HL en fonction : (A) de longueur moyenne des ADNs, (B) de l'inverse de la différence de potentiel, adaptés de [75]. (C) Durée de translocation la plus probable en fonction de la taille de poly(dA) (cercles) et poly(dCdT) (carrés) à travers un pore d' α HL. L'encadré montre l'évolution de la vitesse de translocation. Adapté de [109]. (D) Vitesse de translocation de poly(dA) de taille $N = 12$ (cercles) et $N = 30$ (carrés) en fonction de la différence de potentiel, l'encadré donne l'évolution du coefficient de diffusion maximal, adapté de [108].

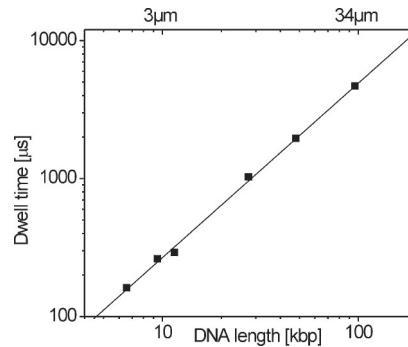


FIGURE 1.15 – Temps de translocation en fonction de la longueur d’ADN double-brin. Extrait de [168].

pore deviennent prépondérantes et impactent la dynamique de passage. Le rôle de ces interactions est également mis en évidence courbe (C) où des ADN de compositions différentes donnent des temps de translocation sensiblement différents.

Si l’on s’intéresse au passage de molécule d’ADN double-brins de plus grande taille (plusieurs milliers de paires de base), la dépendance linéaire du temps de translocation avec N ne tient plus comme l’ont montré Dekker et *coll.* [168]. En mesurant la translocation d’ADN double-brins de 6 500 à 97 000 paires de base à travers un pore solide de 10 nm de diamètre, ils ont montré que t_{trans} devrait varier comme R_g^2 – soit $N^{6/5}$ pour une chaîne gonflée – à cause de la traînée hydrodynamique freinant le passage de la portion de la chaîne n’ayant pas encore franchi le pore (Figure 1.15), et mesure une dépendance en $N^{1,27}$ qui est en bon accord avec l’exposant 6/5 attendu théoriquement.

1.3.2 Quelques exemples d’applications

Séquençage

Une des premières applications envisagée après l’introduction de la méthode de détection électrique avec un pore d’ α HL est le séquençage de molécules d’ADN ou d’ARN [75, 12, 41]. La technique repose sur la capacité de discriminer la signature électrique du passage d’une base spécifique au travers d’un pore. Akeson et *coll.* [2] en ont fourni la preuve de principe en montrant qu’il est possible de discriminer des homo-polymères de différentes bases (poly A, poly U, poly C) comme illustré Figure 1.16 (A). Depuis ces premières expériences le domaine du séquençage par un nanopore a été exceptionnellement dynamique et nous renvoyons le lecteur à la revue exhaustive de M. Wanunu [185] qui offre un panorama des avancées du domaine depuis le début des années 2000.

On peut distinguer aujourd’hui trois méthodes majeures de tentative de séquençage par un nanopore qui diffèrent principalement dans la manière de faire progresser l’acide nucléique dans le pore. La première est celle classique d’entraînement par une différence de potentiel dans quel cas on va chercher à obtenir la meilleure résolution en courant possible [120, 199, 170]. Les deux autres méthodes font appel à des enzymes placées à l’entrée du pore, soit pour y enfiler l’acide nucléique base par base (polymérases) ce qui permet des blocages plus long [8, 34], soit pour découper les bases (exonucléases) qui sont détectées individuellement en passant dans le pore [102, 45] (Figure 1.16 (B)).

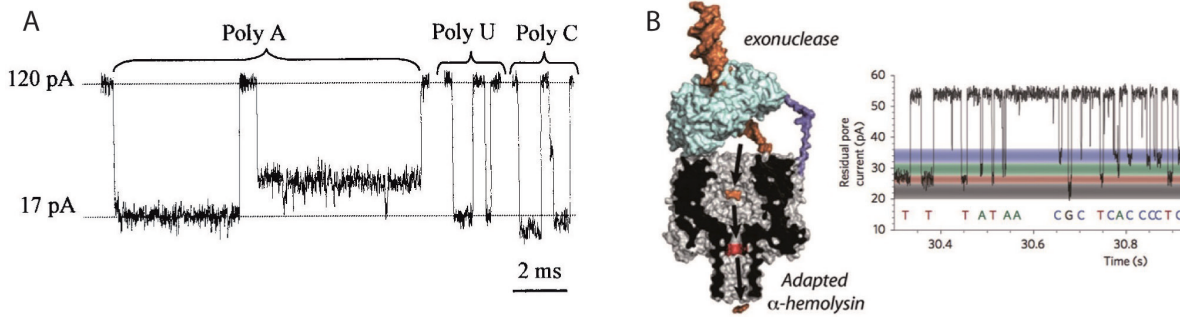


FIGURE 1.16 – (A) Courant électrique dans un pore d'αHL lorsque occupé par des homo-polymères de poly A, poly C, poly U d'environ 150 nucléotides. Extrait de [2]. (B) Principe de séquençage par une exonuclease associée à un pore d'αHL modifié. Les traces à droite correspondent à des mesures réelles du passage de mononucléotides en solution. Adapté de [185].

Ouverture de structure secondaire d'ADN et dénaturation de protéines

Le pore d'αHL n'est pas assez large pour accommoder le passage d'ADN double-brin. Mathé et *coll.* [105] ont utilisé cette propriété pour étudier l'ouverture de structure secondaire d'ADN en épingle à cheveux (*hairpin*). Pour ce faire, une séquence d'ADN simple-brin formant un *hairpin* est introduite dans un pore d'αHL par son extrémité simple-brin, la différence de potentiel est alors augmentée pour ouvrir le *hairpin* et le dézipper comme illustré Figure 1.17.

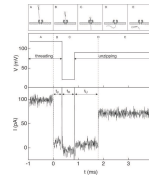


FIGURE 1.17 – (haut) Schématisation du passage du *hairpin* d'ADN à travers un pore d'αHL. (centre) Tension appliquée dans le temps. (bas) Courant électrique dans le pore en fonction du temps. Extrait de [105].

Leur mesure donne accès à la force ainsi qu'au temps nécessaire pour ouvrir l'*hairpin* et montre que ce processus est similaire au franchissement d'une barrière énergétique dont la hauteur est l'énergie de liaison entre bases du *hairpin*.

On peut utiliser un principe similaire à celui-ci pour l'étude de la dénaturation de protéines [127]. Une protéine structurée est trop rigide pour franchir le pore d'αHL. Il est alors possible de déterminer la concentration en agent dénaturant (chlorure de guanidinium par exemple) suffisante pour que la protéine soit suffisamment dé-structurée pour passer dans le pore, et de corrélérer son degré de dénaturation à son temps de passage.

Autres

Nous pouvons également mentionner les mesures de force sur des brins d'ADN réalisées par Keyser et *coll.* en combinant l'insertion dans un nanopore ou un nanocapillaire de verre avec des pinces optiques [78, 77]. Les méthodes de détection électrique ont aussi servi à l'étude de la livraison d'antibiotiques

dans les bactéries, voir la revue de Pagès, James et Winterhalter [128].

1.3.3 Détection optique associée à une actuation électrique

Plusieurs groupes ont eu recours à une détection optique, combinée ou non à une détection électrique, pour observer le passage d'ADN entraîné par un champ. Keyser et *coll.* [174] et Kurz et *coll.* [81] ont visualisé le passage d'ADN fluorescent à travers un nanocapillaire de verre et à travers un nanopore de SiN respectivement (Figure 1.18 (A) et (C)). Tous deux montrent une bonne corrélation entre la diminution du courant électrique induit par le passage de l'ADN et son observation en fluorescence.

Angeli et *coll.* ont réalisé une expérience similaire avec des nanoparticules fluorescentes à travers un nanopore transparent. Ivankin et *coll.* [69] utilisent une détection optique indirecte du passage d'ADNs non-marqués en mesurant la fluorescence activée par le transport d'ions Ca^{2+} en aval d'un nanopore. L'intensité de la fluorescence en aval du pore dépend directement du flux de Ca^{2+} le traversant ; ainsi lorsqu'un ADN traverse, le flux est réduit et ils observent une chute du signal lumineux (Figure 1.18 (B)). Enfin nous pouvons encore mentionner les travaux de Ando et *coll.* [6] qui ont observé le mouvement d'ADN fluorescent proche d'un nanopore et la disparition du brin d'ADN lorsqu'il le traverse.

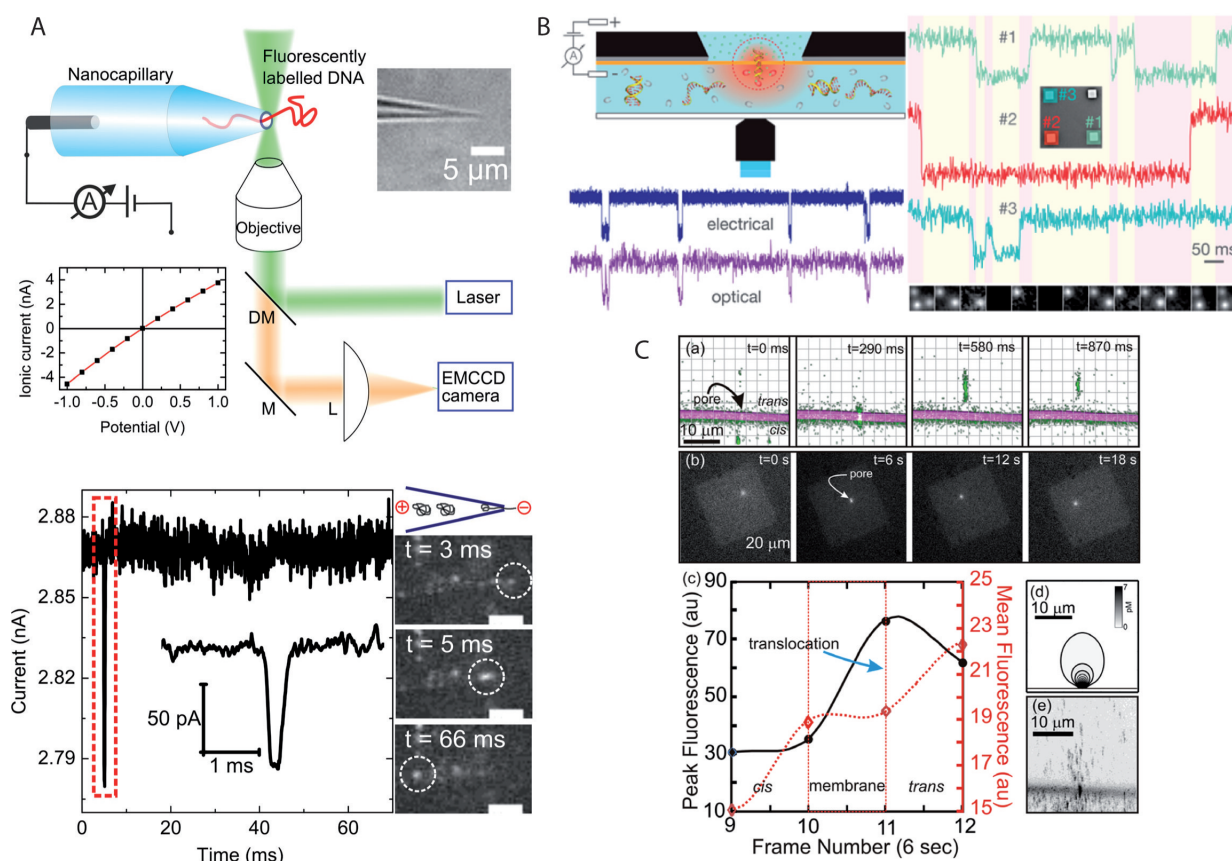


FIGURE 1.18 – (A) Détection optique et électrique du passage d'ADN fluorescent dans un nanocapillaire, extrait de [174]. (B) Mesure indirecte du passage d'ADN non-marqué dans un nanopore de SiN par fluorescence et par détection électrique, extrait de [69]. (C) Détection optique et électrique du passage d'ADN fluorescent dans un nanopore de SiN, extrait de [81].

Peu de temps après la publication de notre système de détection optique [10] exploitant l'effet *Zero-Mode Waveguide* (ZMW) [89] – que nous détaillons en 4 –, Larkin et *coll.* [85] ont également combiné une détection optique ZMW avec une détection et une actuation électrique en plaçant un nanopore de 5 nm de diamètre en série avec une cavité ZMW de 70 nm d'épaisseur dans une matrice de SiN (Figure 1.19). Les signatures électriques qu'ils mesurent coïncident avec une augmentation de la fluorescence liés à la présence de l'ADN dans la cavité ZMW et ils sont capable de maintenir l'ADN dans celle-ci grâce au champ électrique pendant plus d'une centaine de secondes. Ce dispositif présente un intérêt pour l'étude des interactions entre l'ADN et une polymérase, par exemple.

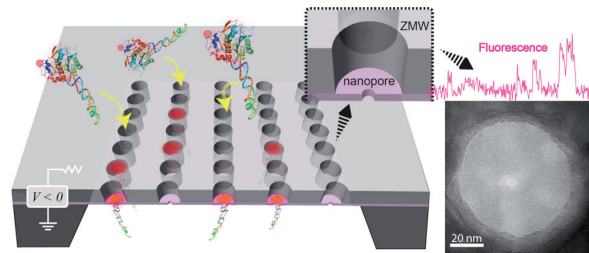


FIGURE 1.19 – Réseau de nanopores couplés à des cavités ZMW permettant une détection électrique et optique du passage de molécules d'ADN. Adapté de [85].

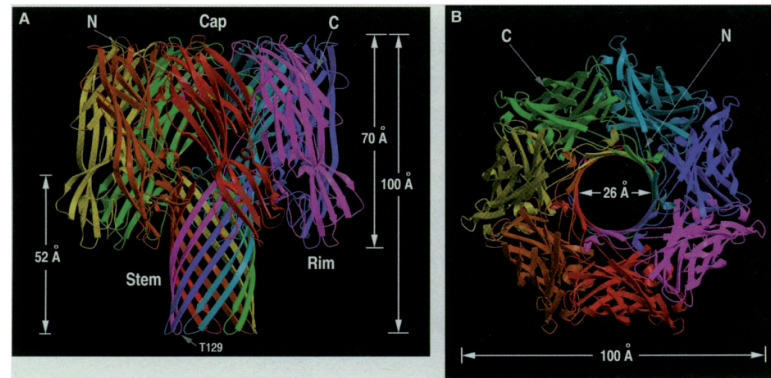
1.3.4 Pores naturels et fabrication de pores artificiels

La mise en place d'un pore protéique dans une bicouche lipidique ou la fabrication d'un pore solide de seulement quelques nanomètres de diamètre représentent des défis technologiques. Nous allons détailler ici les procédés classiques de mise en œuvre de pores protéiques et de fabrication de pores synthétiques ainsi que les matériaux utilisés.

Pores protéiques

Mueller et Rudin ont montré en 1962 [117] qu'il est possible de former une bicouche de lipides plane de taille macroscopique suspendue dans de l'eau. Ces bicouches servent depuis de support à l'insertion de protéines membranaires et à leur étude *in vitro*. C'est le cas de l'étude des canaux ioniques par la méthode de *patch-clamp* [152]. Les canaux ioniques ont un diamètre intérieur trop faible pour permettre le passage de polymères, il existe cependant des protéines membranaires plus large, comme l' α -hémolysine ou le pore d'anthrax, qui l'autorisent. L' α HL est une toxine sécrétée par le staphylocoque doré et est la protéine transmembranaire la plus utilisée pour l'étude de la translocation de polymères. Sa structure a été résolue par diffraction des rayons X [164]. Elle est constituée d'un assemblage de sept sous-unités identiques délimitant un pore de 2,6 nm de diamètre et 5 nm de long.

L'assemblage de bicouches lipidiques associées à un pore protéique se fait désormais de manière standard et des systèmes clés-en-main [25] sont aujourd'hui proposés par des sociétés comme *Nanion*.

FIGURE 1.20 – Structure de l' α -hémolysin, extrait de [164].

Fabrication de pores synthétiques

Si les pores protéiques représentent une source aisément implémentable de pores de très petite taille, leur dimensions sont fixes et ils sont peu stables (en particulier les membranes lipidiques qui les supportent) aux variations de pH, de température et de salinité. Les pores fabriqués dans des matériaux solides n'ont pas ces défauts et permettent de plus de modifier les propriétés de leur surface et de pouvoir être intégrés dans des dispositifs microfluidiques.

Il existe deux méthodes classiques de fabrication de pores solides. La première, chronologiquement, est l'irradiation de membranes en polymère organique (polycarbonate, polyimides) par des ions lourds de haute énergie suivie d'une phase de révélation chimique (*etching*) (nous reviendrons plus en détail sur cette méthode dans la partie 3.1). Cette technique permet la fabrication de pores de diamètre allant jusqu'à 2 nm [161].

La seconde méthode, plus récente, est due à Golovchenko et *coll.* [90] et consiste à percer des membranes en céramique – usuellement des espèces dérivées de silicium : carbure de silicium (SiC), oxyde de silicium (SiO) ou nitrure de silicium (SiN) – par des faisceaux focalisés d'ions (FIB) ou d'électrons (avec un microscope électronique à transmission ou TEM) (Figure 1.21 (A) et (B)). Le principe est que les particules (ions ou électrons) ont une énergie suffisante pour venir arracher de la matière et creuser la membrane (c'est le *sputtering*). Le bombardement est arrêté dès que des particules sont détectées de l'autre côté de la membrane, celle-ci est alors percée. Il est envisageable de refermer partiellement le pore après perçage si la résolution moléculaire n'est pas satisfaisante, soit par dépôt d'alumine [28] soit par application d'un faisceau d'ions ou d'électrons au bord du trou pour forcer la diffusion au voisinage du pore [167] comme illustré Figure 1.21 (C). Ces techniques de perçage permettent d'atteindre un diamètre de pore de 1 nm.

Plus récemment encore (2010), plusieurs groupes se sont intéressés au perçage de pores dans une matrice de graphène [58, 156, 110]. Le graphène, du fait de ses excellentes propriétés isolantes et de son épaisseur (potentiellement) monomoléculaire, est un matériau très intéressant pour les expériences de translocation. La technique de fabrication est la même que pour les membranes à base de silicium.

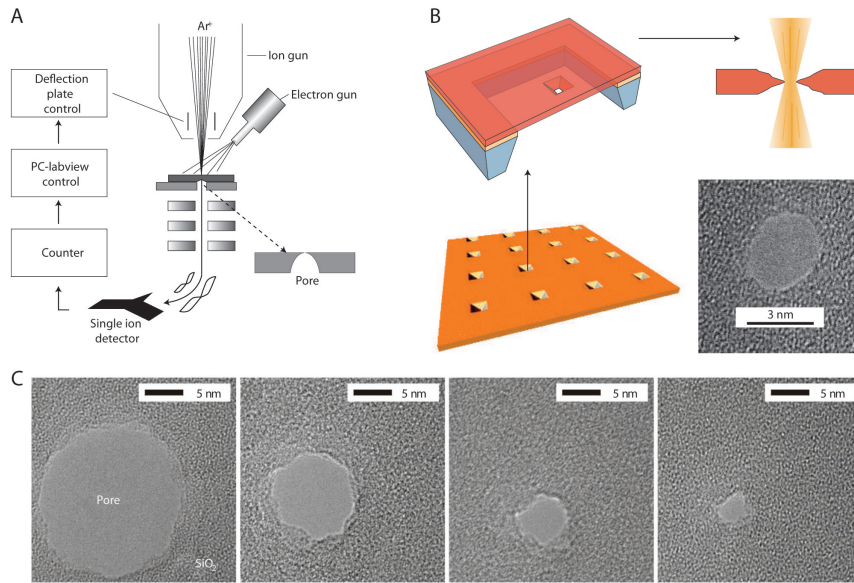


FIGURE 1.21 – Perçage d’une membrane à base de silicium par (A) FIB et (B) TEM. Adapté de [43]. (C) Fermeture d’un pore dans une matrice de silicium par TEM, adapté de [167].

1.4 En résumé

Le transport d’un (bio)polymère à travers un nanopore peut se résumer à la compétition entre l’entraînement par une force extérieure – qu’elle soit hydrodynamique, osmotique ou électrique – qui veut faire pénétrer le (bio)polymère dans le pore et la force nécessaire au confinement. Le confinement se manifeste par une barrière énergétique à l’entrée du pore que le polymère doit franchir. Nous avons détaillé principalement deux modes d’entraînement permettant le franchissement de la barrière de confinement, l’entraînement par un flux et l’entraînement par un champ électrique. Chacun implique une méthode de caractérisation spécifique de la translocation des (bio)polymères avec des avantages et inconvénients que nous allons résumer ici.

La méthode électrique utilise une différence de potentiel imposée par des électrodes de part et d’autre du pore pour entraîner un polyélectrolyte et la mesure du courant électrique entre les électrodes pour la détection du passage du polymère qui se manifeste par une baisse du courant mesuré. Cette technique est intéressante car elle permet l’observation directe du passage d’un polymère avec une résolution temporelle de l’ordre de la microseconde. Elle permet donc d’accéder à la fréquence et à la dynamique de passage (temps et vitesse de translocation). Ces données reflètent les propriétés des (bio)polymères (taille, charges, rigidité etc.) et du pore (géométrie, taille, charges, éléments chimique etc.) et permettent ainsi leur caractérisation, dont le séquençage est un exemple.

Cependant l’élaboration d’un modèle complet du transport par un champ électrique est extrêmement difficile car celui-ci fait intervenir de nombreux effets physiques complexes comme l’électro-osmose, les effets de charge de surfaces et de variation de constante diélectrique pour ne citer qu’eux. D’autre part, la fabrication de nanopores nécessite l’accès à un matériel lourd et extrêmement coûteux (FIB ou TEM) et un savoir-faire spécifique.

La méthode d’entraînement par un flux utilise une différence de pression imposée de part et d’autre

d'une membrane poreuse pour générer un écoulement du solvant qui va étirer le polymère et permettre ainsi son passage au travers d'un pore. Contrairement à la méthode électrique, la translocation n'est pas directement observée mais caractérisée par mesure de la concentration en polymère en aval de la membrane par spectrophotométrie. Nous n'avons donc pas accès à la fréquence ni à la dynamique de passage, ce qui constitue le principal inconvénient de cette technique comparée à la détection électrique.

En revanche, l'entraînement par un flux est aisément modélisable puisqu'il ne fait intervenir que des interactions hydrodynamiques entre la chaîne et le solvant et les effets de rigidité de la chaîne dans le pore (dans le cas des chaînes semi-flexibles), il ne se limite pas à l'étude des polyélectrolytes et utilise des membranes poreuses commerciales bon marché.

Chapitre 2

Le pore nucléaire : structure et transport

Les cellules eucaryotes encapsulent leur matériel génétique dans une double bicouche lipidique appelée enveloppe nucléaire (EN). Cette enveloppe délimite le noyau et sépare son contenu du cytoplasme. La vie cellulaire nécessite cependant des échanges nombreux entre noyau et cytoplasme : ARNs, protéines, eau, ions et sucres doivent pouvoir franchir l'EN. Ces échanges sont assurés par des portes bidirectionnelles hautement sélectives appelées pores nucléaires (NPC, Nuclear Pore Complex) présents au sein de l'EN. Leur fonction est de transporter les ARNs et protéines spécifiquement désignés par la cellule et de permettre la diffusion libre de petites molécules (ions et sucres) tout en empêchant le passage de macromolécules non-désignées pour le transport. Les NPCs jouent également un rôle d'ancrage dans certaines étapes du cycle cellulaire, rôle auquel on ne s'intéressera pas dans ce manuscrit.

Dans ce chapitre consacré au pore nucléaire, nous allons dans un premier temps présenter l'organisation des protéines (structurées et non-structurées) qui le composent et comment cette organisation lui permet d'assurer ses fonctions. Nous nous intéresserons ensuite aux mécanismes et acteurs de l'import et de l'export de macromolécules au travers du NPC avant de discuter des principaux modèles proposés pour expliquer la sélectivité du transport nucléocytoplasmique.

2.1 Structure du pore nucléaire

2.1.1 Organisation et composition protéique

En microscopie électronique, le pore nucléaire apparaît comme une structure cylindrique à symétrie octogonale de 100 à 150 nm de diamètre et 50 à 70 nm d'épaisseur selon l'organisme [190, 92] qui est insérée dans l'EN et de laquelle émanent 8 filaments du côté cytoplasmique et 8 du côté nucléaire. Les filaments nucléaires forment une structure en panier (Figure 2.1). Les premières reconstructions 3D par microscopie électronique ont été réalisées sur des NPCs d'EN d'ovocyte de *Xenopus laevis* (xénope) [3, 67] ou d'EN de levures [193]. Des observations plus récentes par cryo-tomographie électronique sur des noyaux isolés de xénope [166] et sur des noyaux de *Dictyostelium discoideum* [14, 15] ont permis une mesure précise de la taille des éléments structurels du NPC. Les filaments cytoplasmiques et la

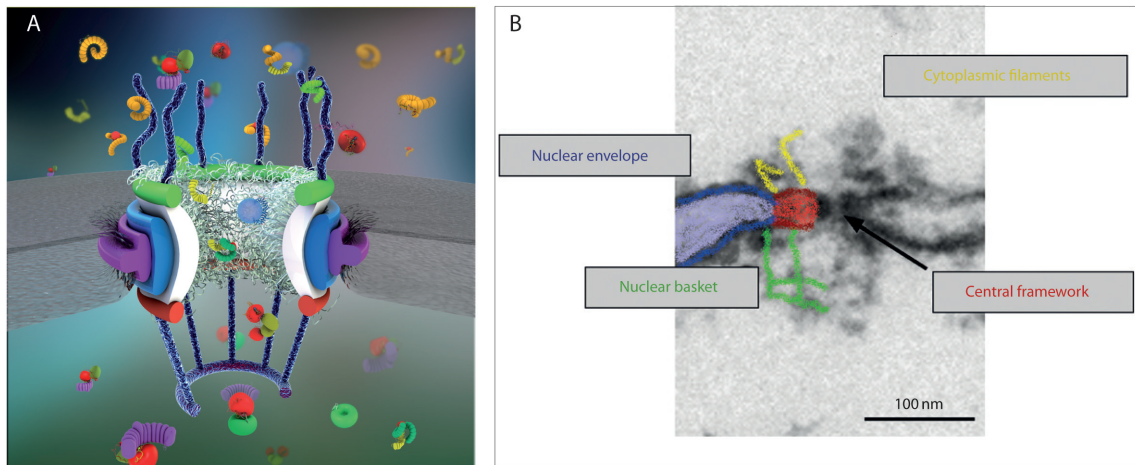


FIGURE 2.1 – (A) Représentation schématique 3D du pore nucléaire et de la machinerie de transport. (B) Image d'un pore nucléaire en microscopie électronique, adapté de [92].

panier nucléaire (*nuclear basket*) de *Dictyostelium* font environ 35 nm et 60 nm de long respectivement, la matrice centrale (notée central framework fig 2.1) environ 50 nm d'épaisseur pour un diamètre de 125 nm [14, 15]. Les dimensions du pore nucléaire varient selon l'espèce considérée mais sa structure tri-dimensionnelle est conservée [51, 193, 79]. La matrice centrale clôtüre le pore central en forme de sablier qui a un diamètre de 60 à 70 nm côté cytoplasmique et nucléaire, et de 45 nm environ dans le plan médian NPC/EN [14, 15, 166]. Le pore central est la voie communicante entre cytoplasme et noyau et est par conséquent le lieu des échanges entre les deux. Le pore central n'est pas vide, mais occupé par des filaments fluctuants formant un réseau complexe.

Récemment, le développement des méthodes de super-résolution optique STED (STimulated-Emission Depletion) [115], PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) [18] et STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [151], ont permis l'observation des pores nucléaires par marquage fluorescent [62, 141, 95]. Ces techniques n'ont pas la résolution de la microscopie électronique, mais sont moins invasives – imagerie en conditions physiologiques –, moins chères et permettent d'utiliser les méthodes d'immunofluorescence.

Composition protéique

Le pore nucléaire est composé d'environ 30 protéines différentes appelées nucléoporines (Nups) dont l'arrangement dans l'architecture du NPC est désormais connu pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les vertébrés [150, 36, 158, 177]. Ces protéines sont arrangées en une sous-unité répétée à l'identique pour former la structure octogonale du NPC. Chaque protéine est classiquement présente en 16 copies dans le NPC. On distingue trois groupes de nucléoporines en fonction de leur structure secondaire [46, 4, 42] :

- les nucléoporines transmembranaires qui forment l'anneau le plus externe du NPC. Elles ont une structure en hélice- α ou forment un repli de cadhérine (*cadherin-fold*) [*luminal ring*];
- les nucléoporines de la matrice centrale en structure de feuillet- β ou feuillet- α qui forment la structure interne du NPC [*core scaffold*];

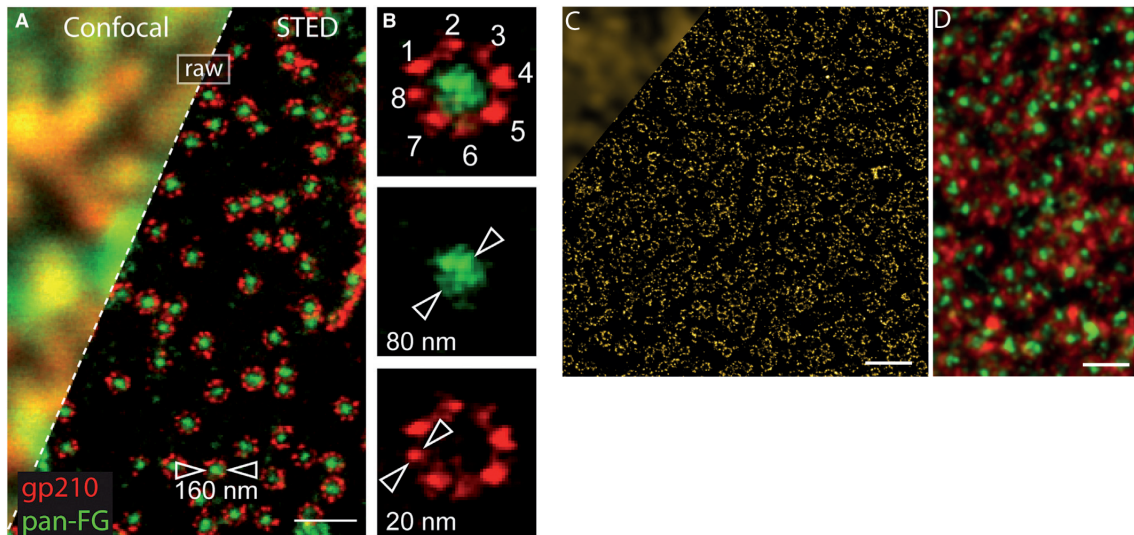


FIGURE 2.2 – (A) Image STED de NPC d’ovocyte de xénope marqué par immunofluorescence, (B) zooms sur un NPC; extrait de [62]. Image dSTORM d’une EN d’ovocyte de xénope marquée avec : (C) l’anticorps anti-gp210 et (D) anti-gp210 (rouge) et WGA (vert), barre d’échelle 0,5 μm , crédit Cyndéllia Guillaume non-publié.

- les FG-nucléoporines (FG-Nups) constituées de répétitions de phénylalanine-glycine (FG) associées à une super-hélice (coiled coil) [*symmetric FG nups, cytoplasmic FG nups, nucleoplasmic FG nups, cytoplasmic filaments, nuclear basket*] qui se fixent sur la matrice centrale et s’étendent vers le centre du pore. Les FG-Nups constituent environ 30% de l’ensemble des nucléoporines.

La localisation de ces différents groupes au sein du NPC est schématisée Figure 2.3, les correspondances des éléments du schéma avec les groupes ont été indiquées entre crochets dans les définitions précédentes.

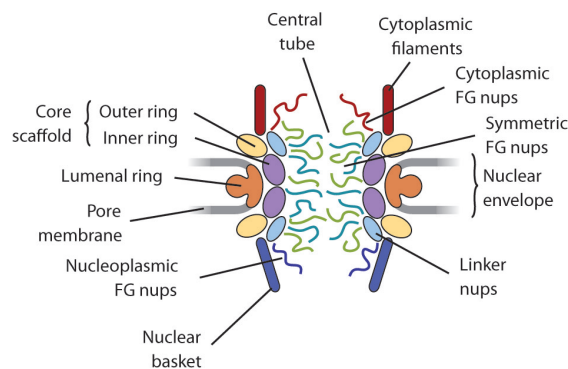


FIGURE 2.3 – Structures majeures et organisation des nucléoporines au sein du NPC. Extrait de [191].

Les FG-Nups ont été identifiées comme les médiatrices directes du transport nucléocytoplasmique [143, 169, 88]. Nous allons dans un premier temps nous intéresser à leur fonction de barrière contre le passage de macromolécules non-spécifiques et à la diffusion libre de molécules de petites tailles (environ $< 8\text{ nm}$) qu’elles autorisent. Nous verrons dans une seconde partie comment les FG-Nups assurent le transport sélectif.

2.1.2 Barrière sélective

Les FG-Nups font partie de la classe des protéines intrinsèquement non-structurées caractérisées par l'absence de structure secondaire, une grande flexibilité et un grand rayon hydrodynamique [44]. Elles sont constituées de long blocs de copolymères riches en FG formant une séquence hydrophobe séparée par des blocs hydrophiles [150, 13]. Les parties hydrophobes s'attirent avec une énergie d'interaction de l'ordre de $k_B T$ qui provoque la formation d'une maille ou d'un réseau de FG-Nups [44, 5]. Ce réseau constitue une barrière, dont la nature entropique ou énergétique est débattue (voir les modèles de barrière plus bas), qui exclut les macromolécules non-désignées pour le transport nucléocytoplasmique [91]. En l'absence des FG-Nups, le NPC perd sa sélectivité et se comporte comme un pore passif de même dimension rempli d'eau.

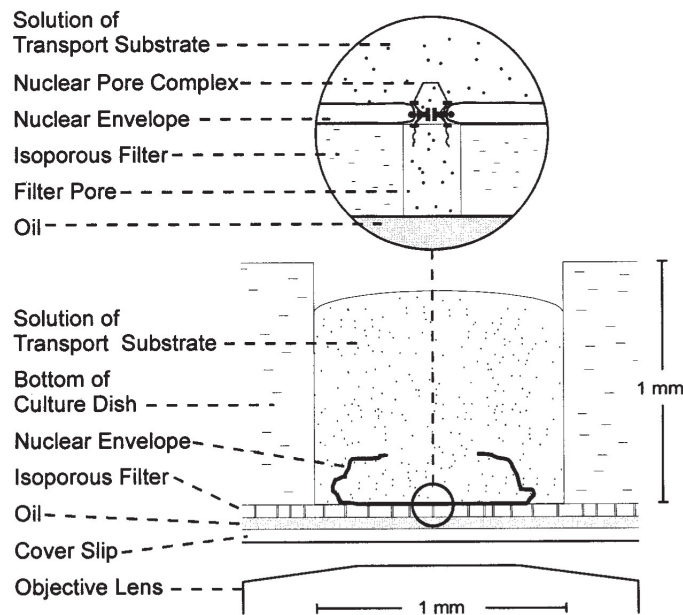


FIGURE 2.4 – Schéma de principe de l'OSTR pour la mesure de la diffusion de molécules fluorescentes à travers une EN d'ovocyte de xénope. Extrait de [76].

Le réseau de FG-Nups possède en son centre un canal de diffusion de quelques nanomètres de diamètre, perméable aux molécules de masse ≤ 40 kDa [130, 137, 52, 76]. Paine et *coll.* [130] et Feldherr et *coll.* [52] ont évalué ce diamètre en injectant, respectivement, des dextrans radioactifs ou des particules d'or recouvertes de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) dans le noyau d'ovocytes de xénopes. Ils ont alors quantifié leur diffusion à travers l'EN et dans le cytoplasme par cryofixation et autoradiographie dans un cas et par microscopie électronique dans l'autre.

Peters et *coll.* ont mis au point une technique similaire basée sur la cinétique de restauration de la fluorescence après bleaching qu'ils ont nommée *microphotolysis* (voir [138]). Du dextran marqué en fluorescence est injecté dans un ovocyte de xénope. Après un temps d'incubation, la fluorescence est tuée dans le noyau puis sa restauration dans le temps est mesurée. La cinétique de récupération de la fluorescence est directement liée à la diffusion des dextrans du cytoplasme vers le noyau donc au diamètre du canal de diffusion des NPCs.

La technique d'OSTR (Optical Single Transporter Recording) développée par Peters et *coll.* [187,

[178, 76] adapte le principe de la *microphotolysis* à la microscopie confocale en fluorescence. L'OSTR utilise une membrane poreuse en polycarbonate comme support pour l'EN d'ovocyte de xénope isolée selon une méthode développée par Smith et coll. [163]. L'EN sépare une solution de dextrans fluorescents des pores de la membrane dans lesquels l'intensité de la fluorescence est mesurée par microscopie confocale (Figure 2.4). Là encore, l'évolution de l'intensité de la fluorescence est corrélée au diamètre accessible au sein du NPC pour la diffusion du dextran. Nous adapterons cette technique à notre dispositif expérimental pour l'étude du transport au travers de l'EN d'ovocyte de xénope comme détaillé dans la partie 8 consacrée à cette étude.

2.2 Transport sélectif et directionnel

2.2.1 Machinerie de transport et cycles d'import et d'export

De nombreuses molécules transitant par le pore nucléaire ont une masse supérieure à 40 kDa (protéines, ARN-t, unités ribosomales) [98]. Le NPC peut accommoder des cargos de diamètre allant jusqu'à 39 nm [131]. Les macromolécules de diamètre plus important sont capables de passer dans le pore moyennant un changement de conformation de la macromolécule [37]. Le changement de conformation et le passage d'un complexe d'ARN-m avec une protéine d'environ 50 nm ont été observés par Mehlin et coll. [107]. Ces molécules sont transportées de manière active au travers du NPC à l'aide d'un ensemble de protéines attenantes à celui-ci :

- de courtes séquences d'acides aminés appelées *nuclear localization sequences* (NLSs) ou *nuclear export sequences* (NESs) qui marquent un cargo pour l'import ou l'export respectivement ;
- les karyophérines (importines, exportines, transportines), des facteurs de transport solubles (capables de traverser le NPC) qui identifient les NLSs/NESs, se lient au cargo marqué et l'assistent dans sa translocation ;
- un gradient de RanGTP/RanGDP qui fournit l'énergie nécessaire au transport et impose sa directionnalité. Il permet également l'association et la dissociation du complexe cargo–karyophérine.

Les NLSs contiennent toute l'information nécessaire au marquage d'un cargo et sont suffisants à l'import dans le noyau même dans le cas d'une protéine non-nucléaire [61]. Ils existent plusieurs types distincts de NLSs et NESs pour les protéines [61, 47] mais l'ensemble des séquences possibles pour chaque récepteur (karyophérine) n'a pas été établi [191]. Le mécanisme de reconnaissance de la séquence a été étudié en détail pour un récepteur (Kap β 2) [86] et met en évidence l'importance de l'absence de structure secondaire des NLSs et de leur charge.

Plus d'une vingtaine de familles de karyophérines ont été recensées chez les métazoaires [135] ; on en compte 17 chez les vertébrés. Les karyophérines se fixent directement sur leur cargo ou par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice dans certains cas. En plus de leur domaine de liaison avec le cargo, les karyophérines possèdent également un ou plusieurs domaines de liaison avec le NPC et avec les Ran GTPase [98].

La Ran GTPase régule l'association et la dissociation du complexe cargo–karyophérine en se liant directement à la karyophérine [100, 35]. Des études *in vitro* ont montré que les complexes d'import sont dissociés par liaison d'une RanGTP et inversement les complexes d'export sont formés par liaison

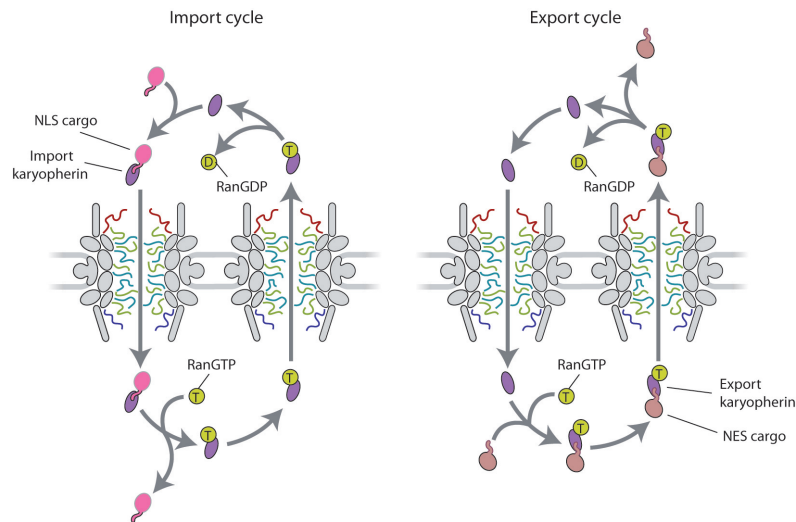


FIGURE 2.5 – Cycles de transport des karyophérines et de leur cargos au travers du NPC. Extrait de [191].

d'une RanGDP [147, 54, 30, 82]. En étudiant la localisation des protéines activatrices des Ran GTPase (RanGAP) dans le cytoplasme et des facteur d'échange de Ran avec la Guanine (RanGEF) dans le noyau, il a été montré que la Ran cytoplasmique est principalement dans l'état associé à la GDP tandis que la Ran nucléaire est majoritairement associée à la GTP et qu'il existe un gradient de RanGTP à travers le NPC [73]. Ce gradient est indispensable à la directionnalité du transport par l'intermédiaire des karyophérines [119].

Cycles d'import et d'export

Le cycle de transport nucléocytoplasmique actif est aujourd'hui bien compris [188, 173] et schématisé en Figure 2.5. Lors de l'import, une karyophérine reconnaît un cargo qui lui est désigné par un NLS et s'y lie dans le cytoplasme où la concentration en RanGTP est faible. La karyophérine permet l'association du complexe d'import avec le NPC et le transport à travers celui-ci. Arrivé dans le noyau, la présence de Ran-GTP induit la séparation de la karyophérine du cargo. La karyophérine est alors recyclée vers le cytoplasme associée à une Ran-GTP. Enfin l'hydrolyse de la GTP côté cytoplasmique libère la karyophérine qui peut interagir avec un nouveau cargo. Ran réduit l'affinité de la karyophérine pour son cargo dans le cas de l'import [98, 35].

L'export se déroule par un processus similaire mais dans ce cas la liaison avec RanGTP augmente l'affinité de la karyophérine pour le cargo à exporter [132, 114]. Aucune énergie n'est nécessaire pour le mouvement au sein du NPC. La présence du gradient de RanGTP (entretenu par hydrolyse de la GTP, catalysée par RanGAP) et les basculements d'affinités avec Ran suffisent au transport et à la libération des cargos.

2.2.2 Translocation à travers la barrière de FG-Nups

Si la machinerie assurant le transport nucléocytoplasmique actif est connue, il n'existe pas de consensus sur le mécanisme permettant le passage de la barrière formée par les FG-Nups dans le pore central. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire l'organisation des FG-Nups et la passage à travers celle-ci.

Le modèle de *virtual gating* [149] suppose que la barrière qui s'oppose au passage des macromolécules est entropique et s'effondre lorsque celles-ci sont associées à une karyophérine à cause de son affinité pour les FG-Nups. Le complexe diffuserait ainsi non-obstrué à travers le NPC en se liant successivement aux FG-Nups.

Le modèle de gel hydrophobe [148] prédit que les FG-Nups forment un gel par interaction hydrophobe entre leurs résidus FG et postule que les complexes cargo-karyophérine, hydrophobes, sont en mesure de dissoudre localement le gel et de diffuser ainsi au travers du pore. Dans ce modèle la barrière est énergétique. Cette interprétation est basée sur les observations expérimentales que l'ajout de solvants hydrophobes perturbe le réseau de FG-Nups et provoque une ouverture non-sélective du NPC [148, 159].

Le modèle de réduction de dimension (*reduction-of-dimensionality*) [139] part de l'hypothèse que la paroi du NPC est recouverte de motifs FG qui s'étendent en filaments. La sélectivité est assurée par un réseau lâche de chaînes peptidiques hydrophiles non-structurées qui occupe le pore central et restreint le passage dans un tube de 8 à 10 nm de diamètre. Les complexes cargo-karyophérine sont captés par les filaments à l'entrée du NPC puis parcourent la paroi couverte de FG vers la sortie par une diffusion 2D.

Patel et *coll.* [133] ont proposé un modèle à deux-portes basé sur leur observation expérimentale dans la levure qui combine des éléments du *virtual gating* et du gel hydrophobe. Dans celui-ci, les domaines FG dans le pore central forment un réseau cohésif par interaction hydrophobe tandis que les filaments de FG-Nups périphériques se repoussent et forment une barrière entropique. La première porte en périphérie est franchie par association des karyophérines avec les FG-Nups et la seconde, dans le pore, par interaction hydrophobe.

Plus récemment des études ont suggéré que les facteurs de transport contribuent activement à la sélectivité du pore en entrant en compétition avec les macromolécules non-spécifiques qui ont une affinité plus faible pour les FG-Nups que les karyophérines [176, 196]. Lim et *coll.* proposent que les karyophérines font en réalité partie intégrante du réseau formé par les FG-Nups [124, 157, 74, 183]. Dans ce modèle, les karyophérines non-complexées saturent et étendent les domaines FG formant ainsi une barrière entropique. Ces karyophérines ont une cinétique lente et bloquent l'accès aux FG-Nups aux macromolécules non-spécifiques. En revanche les karyophérines complexées à un cargo voient leur affinité pour les FG diminuée par cette association et ne restent pas piégées dans le réseau mais diffusent en 2D comme dans le modèle de réduction de dimension cité plus haut. Ce modèle est illustré en Figure 2.6.

Le modèle se base sur les expériences *in vitro* réalisées par Lim et *coll.* [157, 74, 183] et sur le développement théorique de Zilman et *coll.* [124, 196] que nous détaillerons en 8.2.3. Lim et *coll.* ont créé *in vitro* des brosses composées d'un type de FG-Nups par greffage sur une surface d'or avec une densité similaire à celle estimée dans le NPC. Ils ont alors mesuré la hauteur de la brosse par résonance

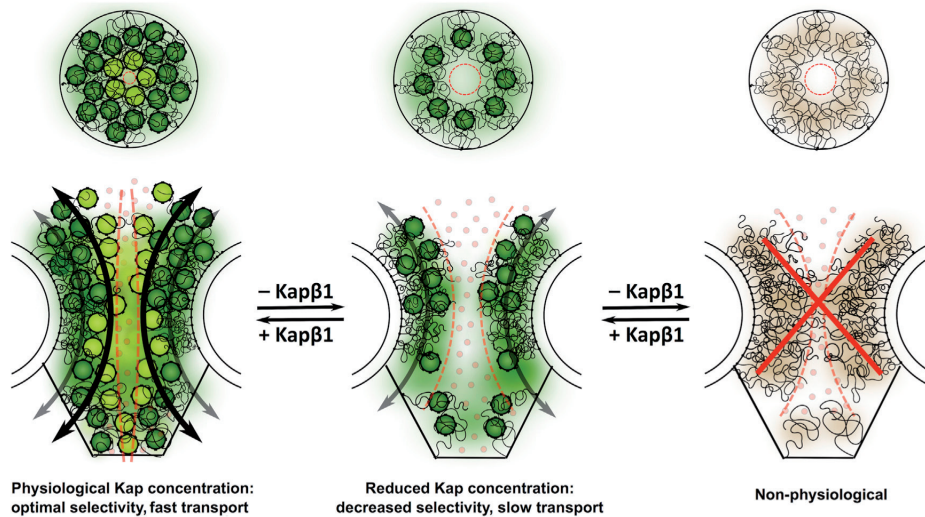


FIGURE 2.6 – Illustration de l'effet de la concentration en $\text{Kap}\beta 1$ (une karyophérine) sur l'organisation du réseau de FG-Nups. Les molécules représentées en vert foncé correspondent aux $\text{Kap}\beta 1$ avec une cinétique lente, celles en vert clair les $\text{Kap}\beta 1$ avec une cinétique rapide. Extrait de [74].

de plasmons de surface en fonction de la concentration en $\text{Kap}\beta 1$ (une importine). Ils ont observé différentes évolutions de la hauteur de la brosse de FG-Nups avec la concentration en $\text{Kap}\beta 1$ selon le type de FG-Nup utilisé (Nup214, Nup62, Nup98, Nup153). La tendance globale est cependant à un effondrement de la brosse à basse concentration suivi d'une réextension à plus forte concentration, comme prédit par [124].

D'autres expériences *in vitro* réalisées par Görlich et *coll.* [83, 56] ont montré que les FG-Nups forment un hydrogel en solution. Ces travaux et ceux de Milles et *coll.* [112] suggèrent que le confinement joue un rôle prépondérant dans l'arrangement des FG-Nups. Ceci a été confirmé par les travaux de Atkinson et *coll.* [9] qui ont mesuré *in vivo*, par fluorescence polarisée, l'organisation des FG-Nups dans le NPC de levures et de cellules mammifères. Ils montrent que l'organisation des FG-Nups est nématique au centre du NPC avec celles-ci alignées parallèlement à l'axe du pore, tandis que les FG-Nups périphériques sont moins ordonnées (Figure 2.7 (B)). De manière générale, les FG-Nups sont plus rigides à leur base et plus flexibles à leur extrémité (Figure 2.7 (A)). Leurs mesures font apparaître une indépendance de l'organisation des FG-Nups avec la concentration en karyophérines à l'encontre des observations *in vitro* de Lim et *coll.* Nous proposerons une expérience *ex vivo* permettant de tester l'influence de la concentration en karyophérine sur la configuration d'un réseau natif de FG-Nups.

L'organisation proposée par Atkinson et *coll.* est compatible avec le modèle de *ratchet* Brownien [160, 113] dans lequel le cargo se lie à une seule FG-Nup provoquant un changement de conformation qui le tire au travers du pore (Figure 2.7 (C)). Cardarelli et *coll.* ont observé par *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS) [26], en molécule unique, le mouvement d'un cargo lors de son transport à travers un NPC. Ils mesurent un déplacement rapide et discret du cargo et de la nucléoporine Nup153 entre deux positions au sein du NPC qu'ils interprètent comme signature d'une dynamique de *ratchet* Brownien.

Des études *in silico* de l'organisation des FG-Nups dans le NPC et des interactions avec les facteurs de transport sont venues compléter les observations expérimentales. Cette approche permet de s'affranchir de la complexité inhérente au pore nucléaire et d'identifier ainsi les éléments nécessaires et suffisants

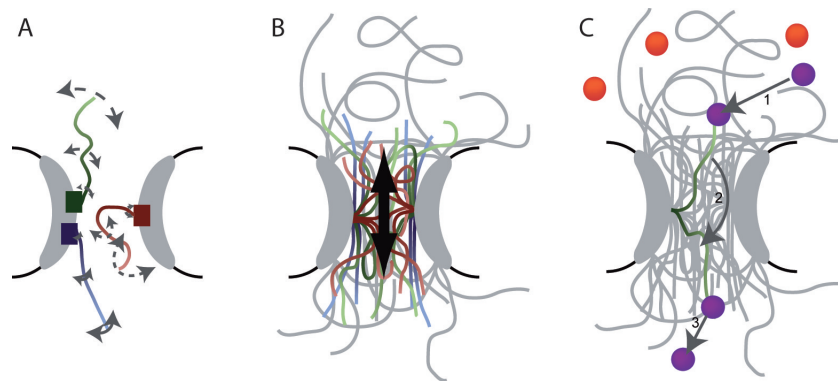


FIGURE 2.7 – (A) Représentation des degrés de liberté et de la rigidité des FG-Nups selon leur position. (B) Ordonnement des FG-Nups selon leur localisation. (C) Illustration du modèle de ratchet Brownien. Adapté de [9].

au fonctionnement de celui-ci. Différentes techniques de modélisation ont été employées au cours des dernières années, nous allons brièvement les présenter en suivant la classification établie par Osmanovic et *coll.* dans leur revue [125].

Une première méthode est celle dite de *jigsaw puzzle* qui vise à connaître la configuration des FG-Nups dans le NPC à partir de ce qui est connu expérimentalement sur leurs structures et affinités [192]. Ce modèle prédit deux configurations pour les FG-Nups, une étendue et une en forme d'amas sphériques.

Une autre technique est la dynamique moléculaire (DM) qui est basée sur la résolution des équations du mouvement pour chaque particule du système. La DM a été utilisée pour modéliser le NPC complet en *coarse-grain* [113, 116] ou pour la modélisation de la structure d'une FG-Nup seule en *all-atom* (Figure 2.8) [111]. Les capacités actuelles de calcul ne permettent pas une modélisation DM *all-atom* du NPC.

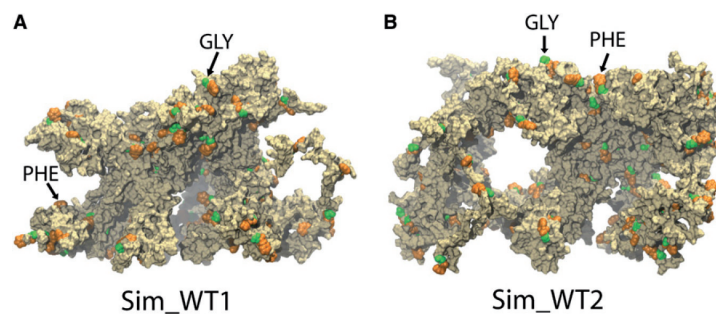


FIGURE 2.8 – Simulation *all-atom* des structures de SimWT1 (A) et SimWT2 (B). Extrait de [111].

Enfin nous citerons la technique dite de « calculs à l'équilibre » qui utilise une théorie en champ moyen pour modéliser l'organisation des Nups dans le NPC [134, 125]. Celle-ci permet d'obtenir des résultats quantitativement proches de ceux en DM mais avec un coût en calcul largement inférieur. Cependant étant une technique de modélisation à l'équilibre, elle ne donne pas accès à la dynamique du pore nucléaire.

2.3 En résumé

Les éléments constitutifs du NPC et leur arrangement pour former sa structure sont aujourd'hui bien connus. De même, les processus de transport nucléocytoplasmique et les acteurs externes au NPC (facteurs de transport, NLS/NES, gradient de Ran) impliqués ont été identifiés et leur rôles spécifiques dans ces processus ont été établis. Nous savons que les protéines non-structurées tapissant la paroi interne du pore appelées FG-Nups sont responsables de la sélectivité du NPC. En revanche il n'y a actuellement pas de consensus sur les mécanismes physiques leur permettant d'accomplir à la fois un rôle de barrière au passage de macromolécules non-spécifiques et d'assurer le transport sélectif à haute efficacité de cargos désignés. Plusieurs modèles d'arrangement du réseau de FG-Nups et du mécanisme de transport ont été proposés (*virtual gating*, gel hydrophobe, réduction de dimension, *ratchet* Brownien, *etc.*), chacun ayant des éléments de validation expérimentale. Un modèle hybride de brosse de polymères incluant des interactions de type gel hydrophobe paraît aujourd'hui le plus prometteur. Il a également été proposé que les facteurs de transport jouent un rôle actif dans la sélectivité du NPC et dans la structure formée par les FG-Nups.

Diverses approches *in vivo* (levures, cellules de mammifères, ovocytes intactes), *in vitro* (brosses et solution de FG-Nups, pores biomimétiques) et *in silico* (modèles théoriques, modélisations et simulations numériques) sont employées pour tenter d'élucider les mécanismes de transport complexes du pore nucléaire.

Projet de thèse

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à deux problématiques de confinement de biopolymères dans un nanopore, à savoir la translocation d'acides nucléiques entraînés par un flux à travers une membrane nanoporeuse, et l'évolution de la structure de réseaux de FG-Nucléoporines de pores nucléaires extraits d'ovocytes de *Xenopus laevis* avec la concentration en importin β 1, une karyophérine qui interagit avec ce réseau.

Nous avons pour cela développé et utilisé une méthode expérimentale originale de détection optique du passage de biopolymères fluorescents à travers une membrane nanoporeuse basée sur l'effet *Zero-Mode Waveguide* (ZMW) [10].

Motivations

Translocation d'ADN entraîné par un flux à travers une membrane nanoporeuse

Si la translocation de polyélectrolytes à travers un nanopore par un entraînement électrique a été abondamment étudiée, le cas de l'entraînement par un flux à lui fait l'objet de peu de travaux malgré sa simplicité comparé au cas électrique et un important intérêt technique : filtration, chromatographie, extraction pétrolière *etc.* En particulier il n'existe pas d'étude dynamique et à l'échelle de la molécule unique de ce phénomène. Comme nous l'avons vu, les résultats de la littérature se basent sur des mesures à posteriori de la concentration en aval d'une membrane poreuse, mesures qui sont perturbées par les effets de polarisation en amont de la membrane.

Nous proposons une méthode optique, en molécule unique, de quantification du passage d'ADN fluorescent au travers d'une membrane nanoporeuse *track-etched* par application d'une différence de pression. L'ADN est un biopolymère semi-flexible classiquement utilisé dans les expériences sur les polymères confinés (*cf.* 1) et dont la structure et les propriétés physico-chimiques sont bien connues. Notre méthode nous permet de nous affranchir du problème de polarisation de la membrane puisque nous observons directement le passage de l'ADN, nous n'avons donc pas besoin de connaître la concentration proche de la membrane. La détection en molécule unique est grandement améliorée par le dépôt d'une couche d'or de faible épaisseur sur la membrane qui, conjuguée à une illumination laser, génère un effet ZMW [89]. L'effet ZMW permet une amélioration du rendement de la fluorescence dans un très faible volume (zeptolitres) par génération d'ondes évanescentes à l'entrée du pore. Nous reviendrons en détail sur cet effet plus loin.

La détection optique est spécifique et garantit que les événements mesurés correspondent bien à des translocations complètes et non à des faux où le polymère entre partiellement puis s'échappe, ce que

ne permet pas la détection électrique. Du fait qu'il est possible de marquer une molécule de manière spécifique, la détection optique permet également d'étudier les interactions entre différentes molécules ou de discriminer de manière fiable une molécule d'une autre, alors que la détection électrique ne le permet que dans certains cas (différence de taille ou de charge) et moyennant des efforts considérables. En revanche cette dernière est plus quantitative et offre une meilleure résolution temporelle, de l'ordre de la microseconde, là où celle de l'optique est de l'ordre de la milliseconde.

Etude de la structure du réseau de FG-Nups de NPCs d'ovocytes de xénope

L'enveloppe nucléaire d'ovocyte de xénope est un objet d'étude classique des mécanismes de transport dans le pore nucléaire, en témoigne les nombreux travaux sur ce système cités dans la partie précédente. Nous proposons une méthode de mesure optique du transport diffusif de biopolymères nanométriques à travers une EN de xénope inspirée de la technique d'OSTR introduite par Peters et coll. [76] pour l'étude de la structure du réseau de FG-Nups dans le pore central du NPC.

Par fixation de l'EN de xénope sur la couche d'or recouvrant nos membranes nanoporeuses nous pouvons directement appliquer la méthode de détection optique développée pour l'étude de la translocation d'ADN. Cette méthode nous donne accès à la dynamique de diffusion des biopolymères à travers l'EN et par conséquent à la taille du canal central du NPC où ces polymères diffusent. Ce système est bien adapté à l'étude des interactions entre transporteurs (karyophérines) et le réseau formé par les FG-Nups, en particulier sur leur impact potentiel sur la structure de ce réseau. Nous avons alors choisi d'étudier l'impact de la concentration en importin β 1 sur la structure du réseau de FG-Nups suivant les expériences *in vitro* réalisées par Lim et coll. [157, 74, 183].

L'avantage de notre dispositif est d'étudier ces effets sur un système *ex vivo* de NPC natifs dans lequel nous pouvons contrôler l'environnement extérieur : concentration en karyophérines, en Ran GTP et GDP, en ATP *etc.*, et dans lequel des mesures en molécule unique sont envisageables.

Suite du manuscrit

La suite de ce manuscrit va s'articuler autour de deux parties : une consacrée aux méthodes et l'autre aux expériences et aux résultats.

La partie Méthodes recense le matériel et les techniques expérimentales et analytiques utilisés au cours de ma thèse. En particulier nous nous attarderons sur les membranes *track-etched* : leur fabrication et leurs caractéristiques ; sur l'effet Zero-Mode Waveguide (théorie et applications) et le dispositif de microscopie à effet ZMW que nous avons mis au point ; sur la manipulation des ovocytes de xénope, l'extraction de leur EN et l'expérience de diffusion que nous avons développée. Enfin nous expliciterons également les méthodes d'acquisition et d'analyse des données que nous avons utilisées ou développées.

La partie Expériences et Résultats détaille les expériences réalisées durant ma thèse, les résultats obtenus ainsi que leur interprétation via des modèles que nous avons développés ou existants dans la littérature. Cette partie est séparée en deux chapitres : le premier sur les expériences de translocation d'acides nucléiques, et le second sur l'étude du pore nucléaire.

Nous avons étudié le transport par un flux de différents ADNs : ADN double-brin de phage λ , de phage T4 ; ADN simple-brin de phage ϕX . Mais aussi d'ARN de phage $\phi 6$. Nous détaillons également

des expériences d'entraînement électrique à travers des membranes de SiN (et non *track-etched*) réalisées avec de l'ADN- λ .

Les expériences sur l'EN de xénope ont consisté dans un premier temps à valider le dispositif expérimental en vérifiant l'étanchéité de l'ensemble EN-membrane *track-etched*, et en mesurant le rayon moyen du canal central des NPCs en l'absence de karyophérines. Après avoir fait la preuve de la validité du dispositif et de notre méthode de mesure, nous avons étudié l'influence de la concentration en importin β 1 sur le rayon moyen du canal central.

Les deux chapitres expérimentaux étant séparés thématiquement nous proposons une conclusion rassemblant les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives de recherche envisagées à la fin de chacun d'entre eux.

Deuxième partie

Méthodes

Chapitre 3

Préparation et caractérisation des membranes poreuses

Les membranes *track-etched* sont des outils classiques pour l'étude de phénomènes en milieux confinés [16, 140, 72]. Faites de polycarbonate, polyester ou polyimide, elles présentent une forte densité de pores – de l'ordre de 10^8 pores/cm² – dont la polydispersité est raisonnable avec un écart-type moyen de l'ordre de 15% par rapport à la valeur nominale [16]. Elles sont acquérables commercialement à bas coût – environ un euro la membrane – ce qui les rend attractives, la fabrication de pores solides aux dimensions nanométriques étant technologiquement difficile et coûteux comme nous l'avons détaillé en 1.3.4. En effet, les méthodes standards de fabrication de nanopores solides reposent sur le perçage de substrats de SiN ou SiO₂ par un faisceau focalisé d'ions ou par un faisceau d'électrons produits par une sonde ionique focalisée ou un microscope électronique à transmission respectivement. Ces méthodes sont particulièrement adaptées à la fabrication de nanopores uniques (ou d'un réseau de nanopores) dont on veut précisément contrôler la taille, mais en aucun cas en mesure d'atteindre les densités de pores offertes par les membranes *track-etched*. Or comme nous le verrons en 7.1, une densité de pores élevée (supérieure à 10^6 pores/cm²) est nécessaire dans nos expériences.

C'est donc pour leur accessibilité, leur importante densité de pores ainsi que leur faible coût que nous avons choisi d'utiliser des membranes *track-etched* dans nos travaux. Nous avons également utilisé, dans le cas de mesures électriques, des pores percés individuellement par FIB dans des membranes de SiN ou SiC dont nous donnerons les caractéristiques dans ce chapitre.

3.1 Fabrication et caractéristiques

Les membranes *track-etched* sont fabriquées par exposition d'un film d'épaisseur micrométrique de polymère (polycarbonate, polyester, polyimide) à un bombardement d'ions lourds (¹⁷⁰Au, ²⁰⁶Pb, ²³⁸U) à haute énergie (de l'ordre du MeV/u). En traversant le polymère les ions ionisent le matériau en perdant de l'énergie laissant une trace latente. Cette perte d'énergie est liée à différents types d'interaction :

- excitation et ionisation des électrons cibles ;

- excitation et ionisation des projectiles ;
- capture d'électron ;
- collisions élastiques avec les atomes cibles ;
- radiation électromagnétique (Bremsstrahlung, effet Cherenkov) ;

Une fois la trace créée, il est possible, en utilisant l'agent corrosif adapté au polymère utilisé (par exemple de la soude pour le polycarbonate), de graver le matériau irradié plus vite que le matériau brut et de créer ainsi des pores en lieu et place des traces (Figure 3.1). La taille des pores est ajustable selon le temps de corrosion et l'agent corrosif. Des pores de quelques nanomètres de diamètre et de différentes formes (cylindre, cône) peuvent ainsi être fabriqués. Pour une revue plus détaillée de ces méthodes de fabrication voir [154].

TABLE 3.1 – Spécification des membranes track-etched, source Whatman

Rayon nominal de pore (nm) (+0%, -20%)	25	40	50	100
Densité nominale de pore (pores/cm ²) (± 15%)	6.10 ⁸	4.10 ⁸	4.10 ⁸	3.10 ⁸
Épaisseur nominale (μm) (± 10%)	6	6	6	10
Flux d'eau nominal (mL/min/cm ²)*	0,4	0,6	2,5	10

*Mesuré à une pression de 10 psid

Pour nos expériences nous utilisons des membranes *track-etched* Whatman Nuclepore (GE Healthcare) en polycarbonate avec des pores cylindriques de 50, 80, 100 ou 200 nm de diamètre. Ces membranes sont vendues sous forme de disque de 25 mm de diamètre et de quelques microns d'épaisseur. Notre choix s'est porté sur le polycarbonate en raison de sa faible interaction avec les polymères et les protéines. Les caractéristiques relatives à chacune des tailles de pore sont fournies en tableau 3.1. Ces membranes sont semi-transparentes et peuvent être utilisées jusqu'à une température de 140 °C. Les surfaces des membranes sont rendues hydrophiles par traitement au polyvinylpyrrolidone (PVP). Pour des informations complémentaires voir [171].

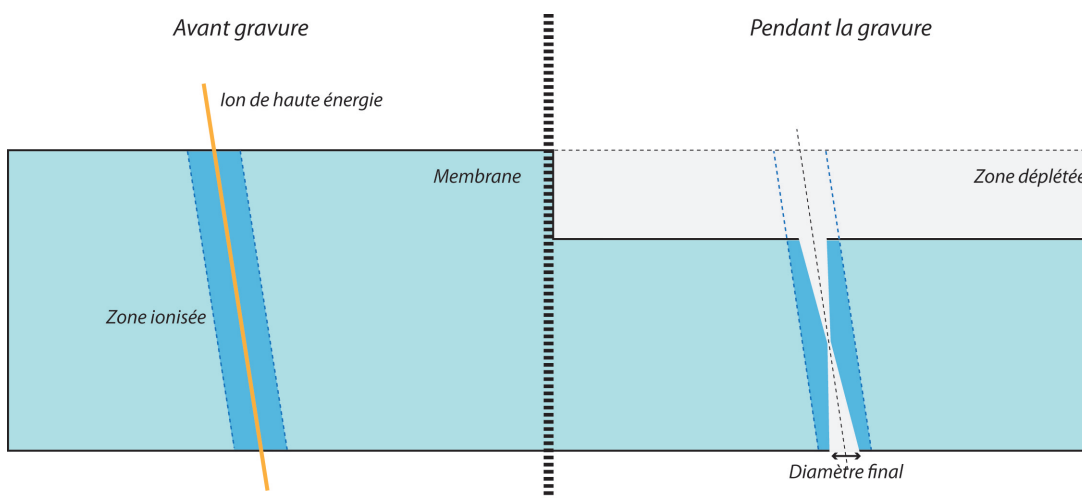


FIGURE 3.1 – Principe de fabrication des membranes *track-etched*

3.2 Métallisation et caractérisation

La méthode de détection que nous utilisons repose sur l'effet ZMW (*cf.* Projet de thèse). Les pores de la membrane *track-etched* forment une cavité de diamètre suffisamment faible pour générer un mode de guidage nul dans le visible à la condition d'avoir un matériau diélectrique. Par évaporation il est possible de réaliser un dépôt métallique de faible épaisseur – quelques dizaines de nanomètres – qui ne recouvre pas les pores (Figure 3.2). On obtient alors une couche métallique poreuse dont les pores forment un guide d'onde de mode nul. Pour nos expériences, nous avons choisi d'utiliser de l'or en raison de sa compatibilité avec les systèmes biologiques et de sa neutralité chimique.

3.2.1 Méthode d'évaporation

Le dépôt d'or est réalisé dans la salle blanche du bâtiment Condorcet à l'Université Paris Diderot sur un évaporateur Plassys MEB 550 S (Plassys SAS, Marolles-en-Hurpoix France). Les membranes *track-etched* sont disposées sur le porte échantillon et maintenues à l'aide d'anneaux métalliques de diamètre équivalent à celui des membranes sur lesquels viennent appuyer des tiges. Les anneaux permettent de garder les membranes à plat sur le support sans les abimer ni les froisser. L'or est déposé après un décapage ionique de faible intensité. Le décapage sert à éliminer la couche de PVP et les impuretés qui ont pu se déposer sur la membrane. L'évaporation est réalisée à une pression inférieure à 10^{-6} Pa, de l'or Au IV est déposé à une vitesse de 0.2 nm/s. La vitesse et l'épaisseur du dépôt sont mesurées par une balance à quartz. Plusieurs épaisseur de la couche d'or ont été testées : 15 nm, 30 nm, 50 nm, et 100 nm. Une épaisseur de 50 nm offre la meilleure opacité sans obstruer les pores de polycarbonate.

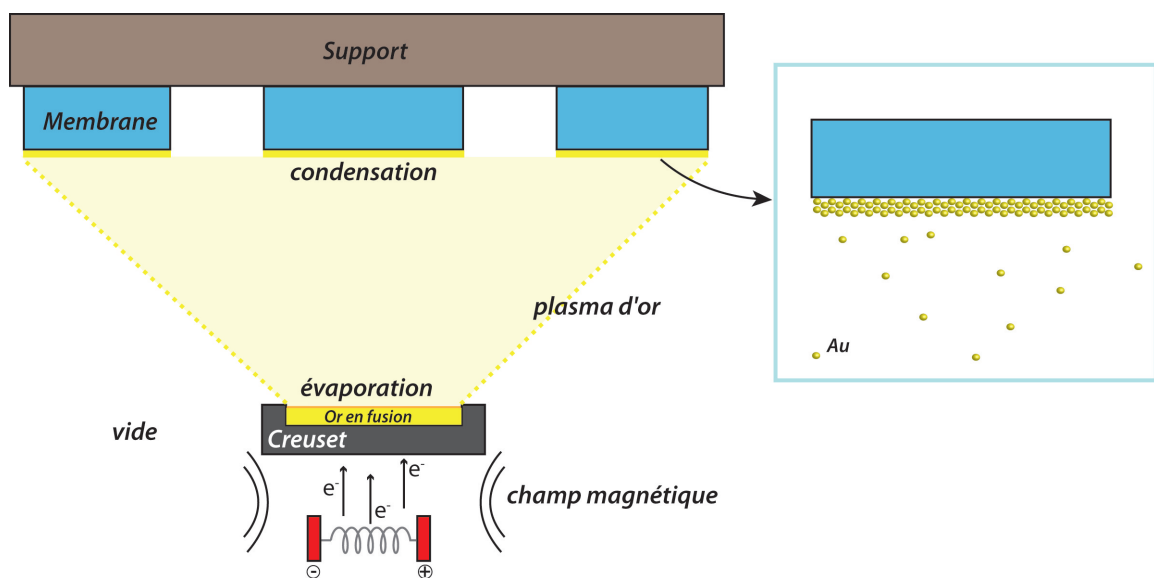


FIGURE 3.2 – Principe de dépôt d'or par évaporation : un fil conducteur est soumis à une tension de plusieurs kV et émet des électrons qui sont focalisés par un champ magnétique vers le creuset rempli d'or. L'or, chauffé par les électrons absorbés, s'évapore et va se condenser sur la cible par atome ou petit groupes d'atomes.

3.2.2 Caractérisation du dépôt métallique

Pour s'assurer que le dépôt d'or n'a ni obstrué, ni altéré les dimensions des pores, nous avons imagé les membranes en microscopie électronique à balayage (MEB). La Figure 3.3 présente une image MEB réalisée sur la plateforme de microscopie électronique du bâtiment Condorcet de l'Université Paris Diderot d'une membrane *track-etched* après métallisation en vue de dessus (B) et en coupe (C). Pour réaliser l'image en coupe, nous avons brisé la membrane par cryofracture – refroidit à -80°C puis fracturée – ce qui explique les distorsions observées par endroit.

TABLE 3.2 – Rayons nominaux des membranes *track-etched* et rayons mesurés après métallisation

Rayon nominal (nm)	Rayon mesuré (nm)
25	21 ± 0.25
40	44 ± 0.35
50	45 ± 0.35
100	110 ± 0.9

Comme on peut le voir, la métallisation n'obstrue pas les pores et ceux-ci sont bien cylindriques. Nous avons mesuré le rayon des pores à partir des images MEB pour des membranes avec des pores de différents rayons nominaux, les résultats sont regroupés dans le tableau 3.2. Les écarts avec les valeurs nominales que nous mesurons sont en accord avec ceux donnés par le constructeur et ceux mesurés par Béguin et *coll.* [16].

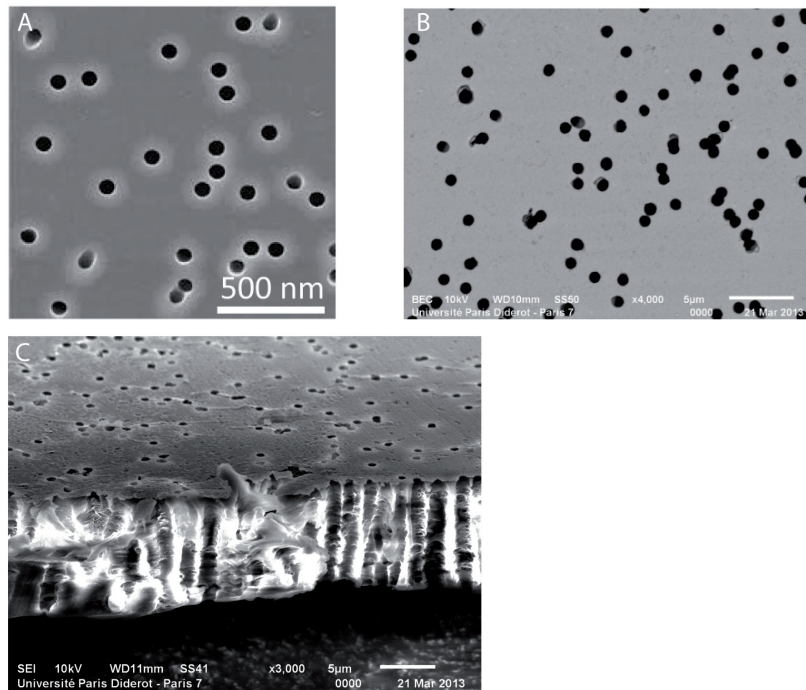


FIGURE 3.3 – (A) Image MEB d'une membrane *track-etched* (source *Whatman*). Image MEB d'une membrane *track-etched* recouverte d'un dépôt d'or de 50 nm d'épaisseur en vue de dessus (B) et en coupe (C). Les distorsions sur l'image (C) sont dues à la cryofracture.

3.3 Réseaux de nanopores en SiN/SiC

Pour nos expériences de translocation d'ADN par un entraînement électrique (7.4) nous avons eu recours à des réseaux de 5×5 pores percés à façon par l'équipe de J.Gierak au Laboratoire de Photonique et de Nanostructures de Marcoussis dans des matrices de nitrure de silicium (SiN) ou carbure de silicium (SiC) de 50 nm d'épaisseur recouverte de 50 nm d'or. Ces pores sont percés par FIB (voir 1.3.4 pour une description de cette technique) et leur taille est caractérisée à posteriori par imagerie MEB. Nous avons utilisé des réseaux de pores de 100 nm, 110 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm et 170 nm de diamètres. L'erreur sur le diamètre des pores a été évaluée à ± 2 nm par imagerie MEB.

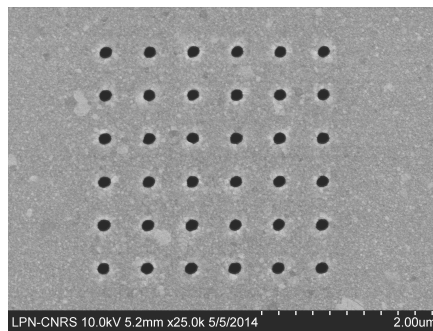


FIGURE 3.4 – Image MEB d'un réseau de 6×6 pores dans une matrice de SiC de 50 nm d'épaisseur recouverte de 50 nm d'or. Crédit : Adrien Hemamouche, LPN

Afin que nous puissions manipuler facilement les réseaux de pores, ceux-ci sont percés dans une fenêtre de 50 nm d'épaisseur au sein d'un châssis de SiN ou SiC de quelques micromètres d'épaisseur, comme illustré Figure 3.5, sur lequel a été déposée une couche d'or par évaporation. Nous utiliserons le terme de membrane SiN/SiC pour désigner l'ensemble réseau de pores et châssis SiN/SiC. Cette membrane SiN/SiC est rigide ce qui nous permet de la manipuler de la même manière que les membranes de polycarbonate.

Le comportement résistif de ces membranes est discuté dans la section 7.4 consacrée aux expériences de transport par entraînement électrique.

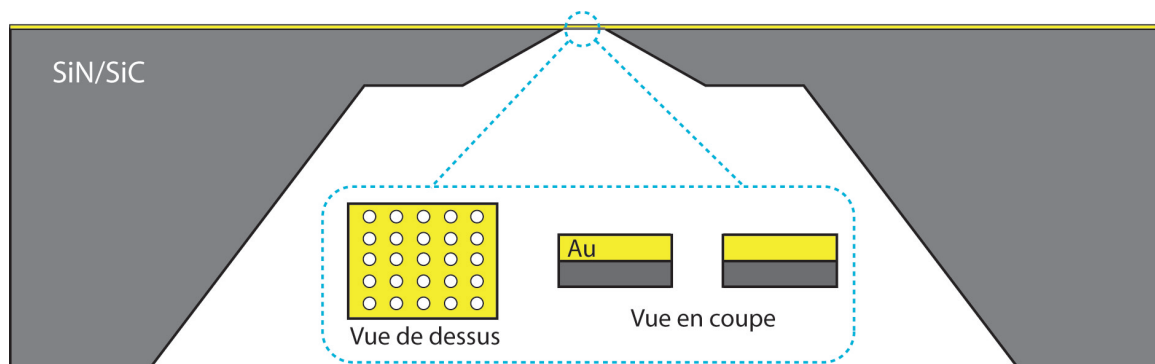


FIGURE 3.5 – Schéma de la membrane de SiN/SiC incorporant le réseau de pores.

Chapitre 4

Microscopie à effet *Zero-Mode Waveguide*

4.1 L'effet *Zero-Mode Waveguide*

Principe

Un guide d'onde métallique possède une fréquence de coupure au-dessus de laquelle aucun mode ne se propage. Cette fréquence de coupure dépend de la forme et de la taille du guide d'onde. Pour un guide d'onde cylindrique de diamètre d , la longueur d'onde de coupure $\lambda_c = 1,7d$ et toute longueur d'onde dans le milieu de propagation λ_m telle que $\lambda_m > \lambda_c$ est évanescente et son intensité I décroît exponentiellement en fonction de la profondeur z du guide d'onde comme $I(z) = e^{-z/\Lambda}$ avec

$$\frac{1}{\Lambda} = 2\sqrt{\frac{1}{\lambda_c^2} - \frac{1}{\lambda_m^2}} \quad (4.1)$$

Pour une longueur d'onde d'illumination dans le vide de 488 nm, utilisée dans nos expériences, et un diamètre de pore $d = 50$ nm, $\Lambda = 43,6$ nm. Le volume d'observation à l'intérieur de la cavité dépend de l'efficacité de couplage et du rendement quantique du fluorophore que l'on peut supposer proportionnel au profil d'intensité $I(z)$, on a alors un profil d'observation qui décroît exponentiellement avec la profondeur dans le guide d'onde $S(z) = e^{-3z/\Lambda}$ et le volume d'observation est donné par [153]

$$V_{obs} = \frac{\pi d^2}{4} \frac{(\int S(z) dz)^2}{\int S^2(z) dz} = \frac{\pi d^2 \Lambda}{24} \quad (4.2)$$

et est de l'ordre du zeptolitre (10^{-21} L) (dans le cas du calcul précédent $V_{obs} = 14$ zL). C'est ce principe que Levene *et coll.* [89] ont appelé *Zero-Mode Waveguide* (ZMW), et exploité pour réaliser des expériences en molécules uniques (schéma de principe en figure 4.1). A l'aide d'une simulation par éléments finis en 3D – dont les résultats sont présentés en figure 4.2 – Levene *et coll.* ont calculé le volume d'observation pour différents diamètres de ZMW ainsi que la concentration nécessaire pour avoir en moyenne une molécule d'intérêt dans ce volume. Cette concentration peut être déterminée simplement en considérant que pour une concentration C , on aura en moyenne une molécule dans un volume $V_p = 1/C$. Par conséquent la concentration telle que l'on ait en moyenne une molécule dans le volume d'observation est donnée par $C = 1/V_{obs}$. Pour un guide d'onde de 50 nm de diamètre C

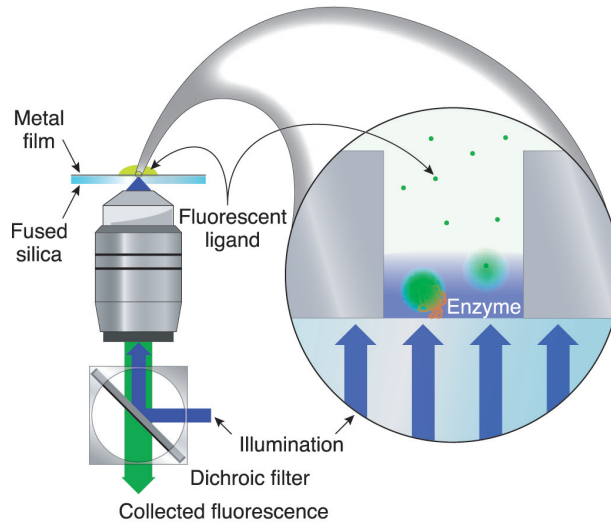


FIGURE 4.1 – Expérience d’enzymologie basée sur l’effet ZMW. Extrait de [89]

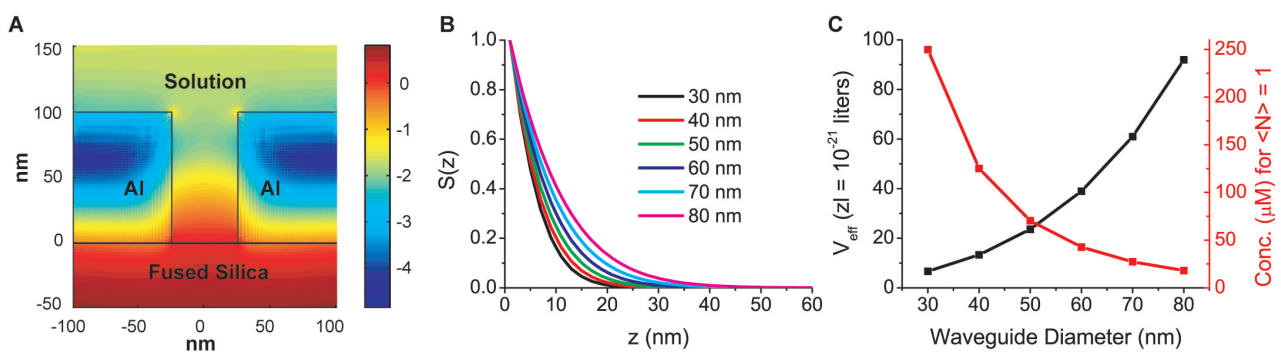


FIGURE 4.2 – (A) Simulation 3D par éléments finis de la distribution de l’intensité en échelle log pour un guide d’onde de 50 nm de diamètre et 100 nm de long. (B) Courbes représentant $S(z)$ pour différents diamètres de guide d’onde. (C) Volume d’observation V_{eff} et la concentration correspondante pour laquelle en moyenne une seule molécule occupe le volume en fonction du diamètre du guide d’onde. Extrait de [89]

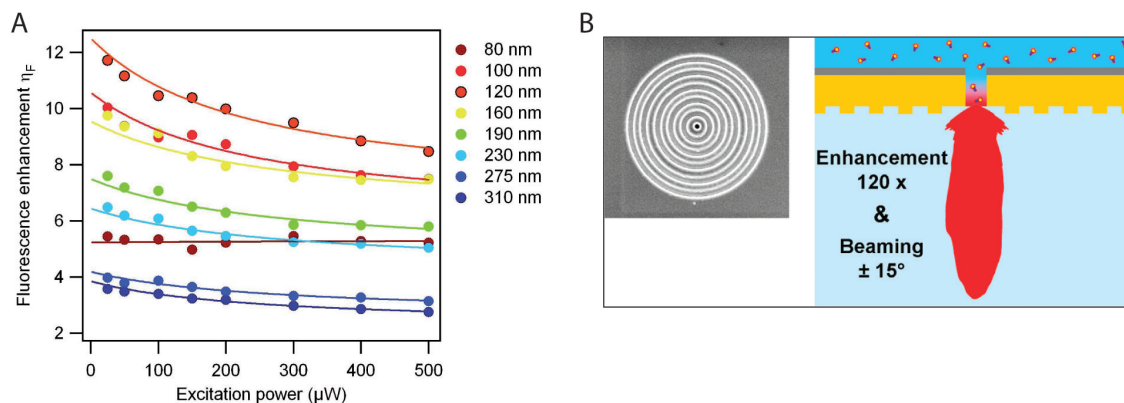


FIGURE 4.3 – (A) Facteur d’amélioration de la fluorescence en fonction de la puissance de l’émission pour différents diamètres de pores, extrait de [189]. (B) Image en microscopie électronique du pore et de la microstructure en anneau servant à la focalisation des plasmons (à gauche) et représentation schématique de la situation expérimentale et du signal fluorescent attendu (à droite); adapté de [7].

est de l’ordre de la centaine de micromolaires. Classiquement la limite de résolution d’un microscope photonique est de $0,2 \mu\text{m}$ ce qui nous donne un volume d’observation minimum de 8000 zL et donc une concentration maximum de $0,2 \mu\text{M}$. L’intérêt du ZMW est donc de permettre des mesures en molécules uniques à des concentrations qui ne seraient pas atteignables en microscopie classique (près de mille fois supérieure) et qui sont plus proches des concentrations observées dans les milieux biologiques.

L’intérêt du ZMW ne se limite pas au volume d’observation extrêmement faible qu’il permet d’obtenir. Wenger et coll. [189] ont montré que l’intensité de la fluorescence émise dans la zone d’excitation en champ évanescent dans des pores de 80 à 310 nm de diamètre et 200 nm d’épaisseur percés dans une couche d’or est significativement plus élevée (jusqu’à près de 12 fois) que celle émise en solution (Figure 4.3). Cette augmentation est liée aux interactions du champ évanescent avec les plasmons de surface générés dans la couche de métal par l’illumination laser comme cela a été montré dans un modèle théorique [142] et par des simulations numériques [101]. Leur résultats sont en accord avec les observations expérimentales [189, 59].

Il est possible de contrôler les plasmons de surface par gravures de structures micrométriques autour ou proches du pore. Celles-ci permettent de focaliser les plasmons sur le pore pour fortement augmenter (jusqu’à 120 fois) le rendement de la fluorescence [48, 7] et de mieux contrôler sa directionnalité (Figure 4.3 (B)).

Quelques exemples d’applications du ZMW

Nous avons déjà mentionné l’utilisation du ZMW en combinaison avec une détection électrique [85]. Outre cette application, l’effet ZMW a été utilisé pour étudier divers phénomènes biologiques. Edel et coll. [49] l’ont exploité pour quantifier le mouvement de lipides dans la membranes de cellules vivantes. Vilfan et coll. [182] et Uemura et coll. [179] ont observé respectivement la transcription et la translocation d’ADN dans une cavité ZMW en temps réel. Enfin nous mentionnerons la technique de séquençage d’ADN *Single Molecule, Real-Time* (SMRT) développée par Eid et coll. [50] dont le principe est de suivre l’incorporation de nucléotides – ayant chacun une couleur qui leur est associée

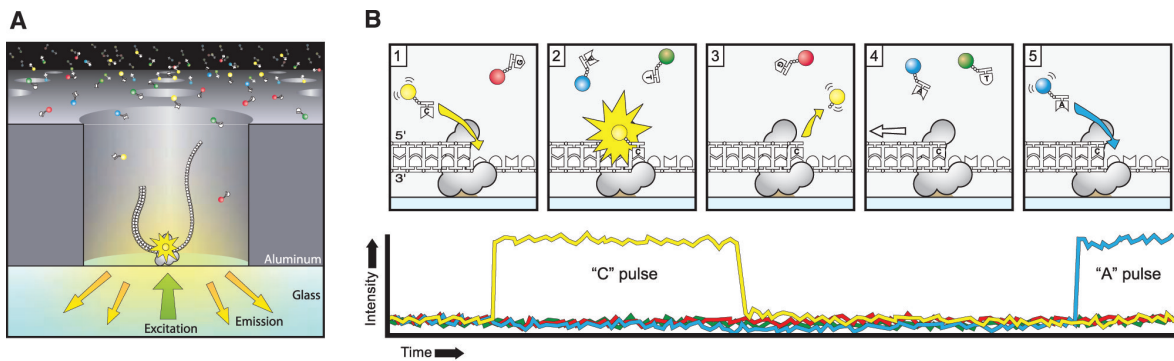


FIGURE 4.4 – Principe du SMRT : (A) Schéma du dispositif expérimental. (B) Représentation schématique du processus d’incorporation des nucléotides « colorés » et des mesures d’intensité de fluorescence attendues en ZMW. Extrait de [50].

selon leur type – sur une chaîne d’ADN par une polymérase, maintenue au sein d’une cavité ZMW (Figure 4.4). Cette méthode est en mesure de séquencer l’ADN avec une précision de 99% à un rythme de 400 *kbp* par jour par cavité ZMW.

4.2 Dispositif expérimental

4.2.1 Principe

Le dispositif expérimental que nous avons mis au point est présenté schématiquement en Figure 4.5. Il est composé de deux chambres séparées par une membrane poreuse en polycarbonate recouverte par une couche d’or de 50 nm d’épaisseur. La chambre *trans* est reliée à un contrôleur de pression permettant d’appliquer une différence de pression allant jusqu’à 1 bar. Le polymère, marqué par des fluorophores, est placé dans la chambre *trans* et par application d’une différence de pression transporté dans la chambre *cis* par le flux ainsi généré. La membrane est illuminée côté or par un laser et les polymères sont observés à la sortie des pores (côté *cis*).

L’ajout d’une couche d’or sur la membrane poreuse forme des guides d’onde de dimension inférieure à celle de la longueur d’onde d’illumination et permet un gain important en rapport signal/bruit par deux effets : un isolement lumineux entre les deux chambres – les polymères dans la chambre *trans* ne reçoivent aucune radiation lumineuse – et une amplification du signal fluorescent par effet ZMW. Cette amplification est mise en évidence sur la chronologie présentée en Figure 4.5.

4.2.2 Montage et matériel

Le dispositif expérimental est construit comme une expérience classique de microscopie en fluorescence constituée d’un microscope inversé avec une boîte de filtres – contenant plusieurs couples de filtres d’excitation et d’émission et un miroir dichroïque associé – reliée à une caméra EMCCD (*Electron Multiplying Charge Coupled Device*). Nous disposons de deux sources d’illumination pour l’excitation :

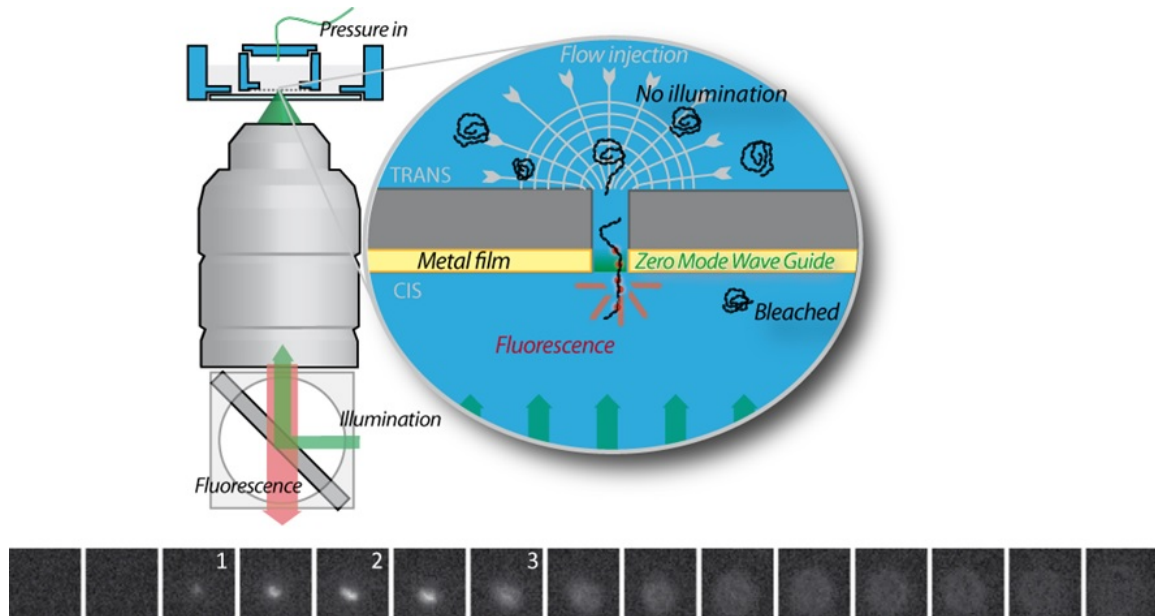


FIGURE 4.5 – Schéma dispositif expérimental (haut) et chronologie de l'observation de la sortie d'un brin d'ADN- λ (bas)

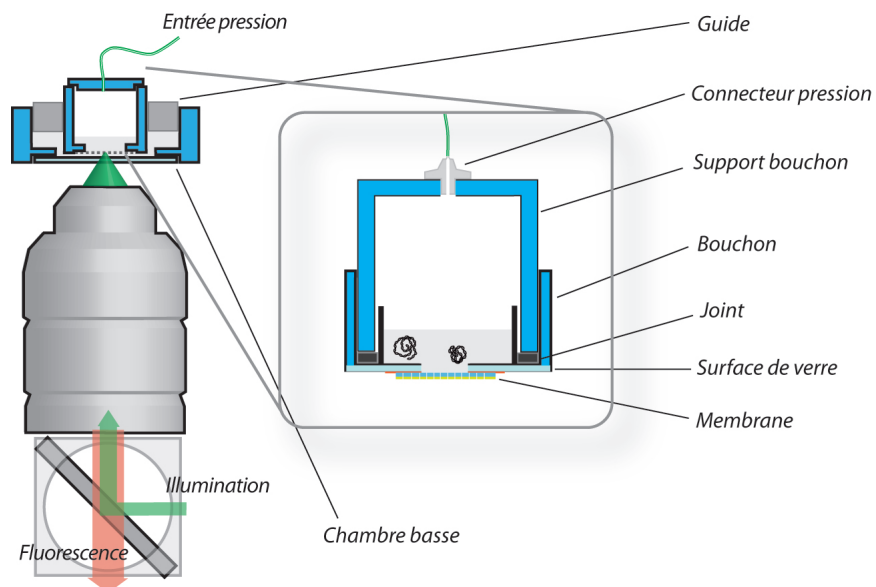


FIGURE 4.6 – Schéma détaillé du montage expérimental

- un laser (*Cobolt blues 50, Cobolt AB*) émettant à la longueur d'onde de 473 nm. Le faisceau est élargi par un télescope et suit un chemin optique tel que le faisceau soit parallèle en sortie de l'objectif.
- une lampe de fluorescence (*Uvico, Optoelectronic GmbH*) reliée directement par une fibre optique au microscope. Deux longueurs d'ondes sont disponibles : 488 nm ou 568 nm.

Un miroir permet de passer d'une source à l'autre. Seul le laser est utilisé pour les mesures, la lampe de fluorescence sert uniquement au repérage de l'échantillon.

Comme présenté en Figure 4.6, le support de nos expériences est constitué de plusieurs parties :

- une « chambre basse » constituée d'un anneau en téflon sur lequel est collé une lame de verre de 0,17 mm d'épaisseur ;
- un bouchon (*Nanion*). Le verre est pré-percé d'un trou de 0,1 mm de diamètre que nous agrandissons à environ 2 mm de diamètre et sur lequel un morceau de membrane dorée de 3 mm de diamètre est collée ;
- un support relié au contrôleur de pression sur lequel est visé le bouchon. L'étanchéité est assurée par la présence d'un joint à l'intérieur du bouchon ;
- un anneau en *Téflon* placé autour du bouchon fixé au support pour les maintenir verticalement à l'intérieur de la chambre basse.

Le support est positionné au-dessus de l'objectif au sein d'une platine mobile tri-directionnelle qui permet de parcourir l'échantillon dans le plan.

Matériel utilisé

Le microscope inversé est un *Axiovert 200* de *ZEISS* sur lequel est monté un objectif à eau *ZEISS C-Apochromat* avec un grossissement de 63x, une ouverture numérique de 1,2 et une distance de travail de 0,28 mm pour une lame de verre de 0,17 mm (épaisseur de la lame doit être comprise entre 0,14 – 0,19 mm).

La platine montée sur le microscope est une *Micro-Drive* de *Mad City Labs Inc.* Elle permet des déplacements dans les trois directions de l'espace avec une précision de l'ordre du micromètre. Le contrôle de la platine est effectué par ordinateur via une interface *Micromanager*.

Nous disposons de plusieurs paires de filtres d'excitation/émission adaptés aux spectres des molécules fluorescentes que nous avons utilisé qui sont montés dans une boîte de filtres sur le microscope. Cette disposition nous permet de passer rapidement d'une paire de filtre à une autre sans avoir à interrompre les mesures.

La caméra EMCCD est une *Andor Ixon+* disposant d'un système de refroidissement allant jusqu'à -80°C . En prise d'image directe, elle affiche une résolution maximum de 512×512 pixels en 32 bits et une fréquence de rafraîchissement maximum de 60 Hz.

Deux contrôleurs de pression fabriqués par *Fluigent* ont été utilisés : un MFCS-Flex comportant 4 canaux dont 3 allant de 0 mbar à 1 bar avec une précision de 1 mbar et un allant de 0 mbar à 69 mbar avec

une précision de 0,1 mbar. Et un MFCS-4C comportant lui aussi 4 canaux et qui permet d'exercer une différence de pression négative allant de 0 mbar à 100 mbar. Chaque appareil est contrôlé par ordinateur via un logiciel dédié.

Pour coller membrane et lame de verre, nous avons eu recours à une colle silicone bio-compatible (*Silcomet JS 533 Rouge, Loctite*), ne relâchant pas de solvants en solution.

4.3 Préparation des échantillons et marquage des polymères

Au cours de nos expériences nous avons utilisé différents polymères biologiques : ADNs et ARNs. Nous allons expliciter comment nous avons manipulé et marqué ces polymères.

4.3.1 Manipulation et marquage des ADNs

L'ADN est un polymère résistant qui ne nécessite pas de précaution particulière de manipulation ; les méthodes que nous allons détailler s'appliquent à tous les types d'ADNs que nous avons utilisés, à savoir :

- ADN- λ : ADN linéaire double-brin du bactériophage (*Escherichia coli*) λ constitué de 48 502 paires de base (32 300 kDa) avec des terminaisons 5' simple-brin de 12 paires de base complémentaires (l'ADN- λ peut donc se circulariser spontanément). Obtenu au près d'*Invitrogen* en solution de 500 μg à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans 10 mM Tris-HCl et 1 mM EDTA.
- ADN- λ /Hind III : ADN- λ digéré par *Hind III* en fragments d'ADN double-brin de 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 et 23130 paires de base. Obtenu au près d'*Invitrogen* en solution de 500 μg à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans 10 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl et 0,1 mM EDTA.
- ADN-T4 : ADN linéaire double-brin de bactériophage (*Escherichia coli*) T4 GT7 constitué de 166 000 paires de base (1,08.10⁵ kDa). Obtenu au près de *Nippon Gene* en solution de 70 μg à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans 10 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 25 °C) et 1 mM EDTA.
- ADN- ϕX : ADN circulaire simple-brin de bactériophage (*Escherichia coli*) ϕX174 constitué de 5386 bases (1 700 kDa). Obtenu au près de *New England Biolabs* en solution de 250 μg à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans 10 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 25 °C) et 1 mM EDTA.

À partir des solutions mères d'ADN nous préparons des solutions diluées à 0,5 ng/ μL dans 1 mL de 10 mM Tris-KCl à pH 7,5 que nous allons marquer en fluorescence.

Pour marquer les solutions d'ADN nous utilisons du YOYO-1. Le YOYO-1 est un intercalant vert de la famille des cyanines, c'est un homodimère tétra-cationique d'oxazole (Figure 4.7 A). Le YOYO-1 se fixe à l'ADN par intercalation bis de ses deux unités chromophores. Il est quasi non-fluorescent en solution mais une fois lié avec l'ADN forme un complexe plus de 1000 fois plus intense avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission à 491 nm et 509 nm respectivement (spectre en Figure 4.7 B). Le YOYO-1 est acquis au près de *Molecular probes* qui le fournis en solution de 200 μL à une concentration de 1 mM dans du DMSO.

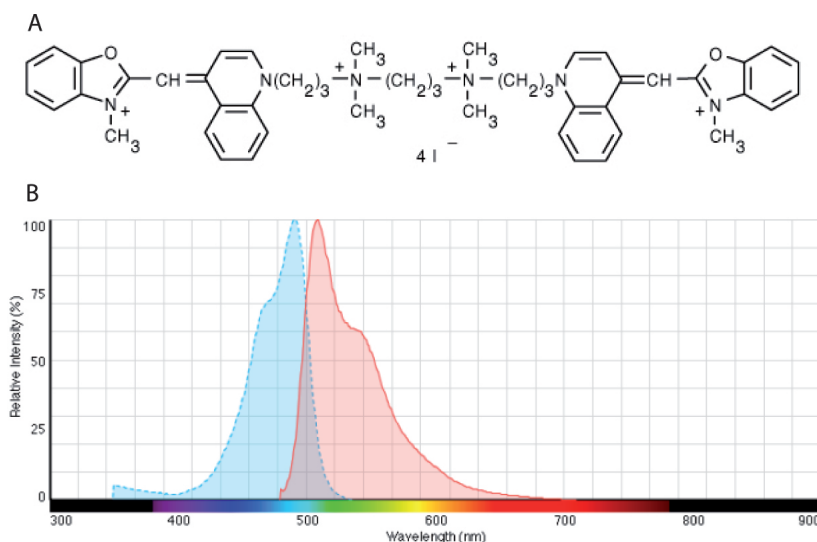


FIGURE 4.7 – (A) Structure chimique du YOYO-1 de formule moléculaire : $C_{49}H_{58}I_4N_6O_2$. (B) Spectre de fluorescence (excitation en bleu et émission en rouge) du YOYO-1

Nous ajoutons $0,3 \mu\text{L}$ de YOYO-1 à 1 mM à la solution diluée d'ADN et nous laissons incuber à 4°C pendant 30 minutes ; la solution est ensuite conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Cette solution est stable sur plusieurs mois mais nous l'avons renouvelée tous les six mois maximum pour éviter toute dégradation.

Dans le cas de l'ADN- λ qui peut se circulariser spontanément, il peut s'avérer utile de chauffer la solution d'ADN – avant marquage, sous peine de détruire le YOYO-1 – au bain-marie à 70°C pendant 15 minutes afin de linéariser tout ADN qui serait déjà circularisé. Dans nos expériences cette étape n'est pas nécessaire, la liaison entre les terminaisons 5' étant détruite par le cisaillement généré par le flux.

Enfin nous avons utilisé, dans nos expériences avec l'ADN simple-brin, une solution mixte de nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, cTTP) pour PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de concentration 10 mM (pour chaque nucléotide) dans de l'eau produite par *Roche*.

4.3.2 Manipulation et marquage des ARNs

Contrairement à l'ADN, l'ARN est à manipuler avec grande précaution. En effet, pour nous protéger de l'ARN viral, notre organisme sécrète des ribonucléases (ou RNases), des enzymes catalysant la dégradation de l'ARN. Ces RNases sont donc présentes sur notre peau et sur tout objet ou substrat ayant été en contact avec la peau. Le détail du protocole de manipulation de l'ARN est donné en Annexe A mais nous rappellerons ici l'essentiel :

- porter des gants ;
- décontaminer la RNase des gants, objets et surfaces qui seront en contact avec l'ARN (avec DCPE ou RNase AWAY) ;
- utiliser des équipements jetables stériles traités sans-RNases ;

- ajouter à toute solution contenant de l'ARN un inhibiteur de RNases (RNasin).

Dans nos expériences nous avons utilisé un mélange équimolaire de trois ARNs linéaires double-brin de bactériophage $\phi 6$ de 2 948 (S), 4 063 (M) et 6 374 (L) paires de bases. Nous l'avons obtenu au près de *Thermo Fisher* en solution de 20 μg à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA. La concentration relative de chaque segment S, M et L est de 110, 150 et 240 $\text{ng}/\mu\text{L}$ respectivement.

Nous avons marqué les ARNs avec le YOYO-1 qui, étant un intercalant, est aussi adapté au marquage de l'ARN. Pour nos expériences, nous utiliserons la même concentration en ARN (0,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) et en YOYO-1 (30 nM).

Chapitre 5

Acquisition des données et analyse

5.1 Acquisition des données

Le paramétrage de l’acquisition et l’acquisition des données se fait via le logiciel de contrôle de la caméra *Andor Solis*. Nous ne détaillerons pas ici de manière exhaustive tout ce qu’il est possible de faire avec ce logiciel, uniquement les fonctionnalités que nous avons utilisées.

La caméra dispose d’un système de refroidissement intégré et toutes les mesures ont été réalisées à un refroidissement de -80°C afin de réduire le bruit thermique. Cette fonctionnalité est essentielle et a un effet important sur le rapport signal sur bruit. Une autre fonctionnalité est la possibilité de régler le gain qui commande le taux d’amplification du signal par le système intégré à la caméra. Toutes les mesures sont réalisées à la valeur de gain maximum et est ajusté en cas de saturation.

Nous avons réalisé deux types de mesures distincts dans nos études (*cf.* Projet de thèse 2.3), des mesures en molécule unique et des mesures en volume, qui ont nécessité des méthodes d’acquisition (et par conséquent d’analyse) différentes. Nous allons désormais nous attarder plus en détail sur chacune de ces méthodes. Dans la suite nous emploierons le terme « évènement » pour désigner un biopolymère unique effectuant une translocation complète au travers d’un pore.

5.1.1 Mesures en molécule unique

Ces mesures ont été menées dans le cas de l’étude de la translocation de polymère au travers de nanopores solides. Dans ces expériences nous cherchons à mesurer l’évolution de la fréquence (d’occurrence) des évènements en fonction de la différence de pression appliquée au système. L’objectif est donc de réussir à détecter les évènements et à les comptabiliser sur la durée de la mesure. Pour ce faire, nous avons utilisé la possibilité d’acquérir des séquences d’images avec la caméra. La résolution de l’image, le nombre d’images dans la séquence ainsi que l’intervalle de temps entre chaque images sont des paramètres ajustables. Il est à noter que deux modes de visualisation sont disponibles et influent sur la fréquence minimum d’acquisition : une visualisation en temps réel qui retranscrit immédiatement à l’écran l’image acquise par la caméra, et une visualisation à posteriori. Nos mesures ont été réalisées en temps réel avec une résolution d’image de 512×512 pixels et un intervalle de prise d’image

de 30 ms qui correspond au minimum accessible dans ces conditions d'acquisition. Il n'existe pas de limite supérieure quant à la taille de la séquence, mais nous avons pris des séquences de 500 images – ajustable selon la fréquence des événements que l'on souhaite observer –, ce qui correspond à un film de 15 s, afin de limiter la consommation d'espace de stockage, ces séquences étant volumineuses (un film fait environ 500 Mo).

L'intervalle d'acquisition peut paraître élevé comparé à celui atteignable en mesure électrique qui descend bien en-deçà de la microseconde, mais le transport de l'ADN par le flux se fait également bien plus lentement que par application d'un champ électrique (environ 30 mm.s^{-1} [55]). Si l'on considère que le polymère (une fois entré dans le pore) se déplace à la même vitesse que le flux alors pour un pore de rayon $R = 25 \text{ nm}$ et de longueur $L = 10 \text{ }\mu\text{m}$ et une différence de pression de $\Delta P = 30 \text{ mbar}$, la vitesse moyenne de l'écoulement suivant la loi de Poiseuille vaut $v_{\text{moyenne}} = 23 \text{ }\mu\text{m.s}^{-1}$ avec :

$$v_{\text{moyenne}} = \frac{\Delta P}{8\eta L} R^2 \quad (5.1)$$

où η est la viscosité. Ainsi avec un temps d'acquisition de 30 ms le polymère se déplace de $0,7 \text{ }\mu\text{m}$ entre chaque acquisition ; nous sommes donc parfaitement à même de visualiser ces événements.

TABLE 5.1 – Rapport signal/bruit pour différent polymères

Polymère	Taille (kpb)	Rapport signal/bruit		
		Moyenne	Max	Min
ADN- ϕX	5	2	5, 1	1, 7
ARN- $\phi 6$	3 – 6	2, 8	3, 4	1, 8
ADN- λ	48	10, 8	51, 7	1, 9
ADN-T4	166	5	77	2, 3

Le rapport signal sur bruit varie selon le polymère utilisé. En effet, le nombre de fluorophores associés au polymère varie linéairement avec la taille de ce dernier, ainsi on s'attend à ce que plus le polymère est grand et plus il sera fluorescent par conséquent meilleur sera le rapport signal sur bruit. Nous présentons en tableau 5.1 les rapports signal/bruit calculés pour les polymères que nous avons utilisés. Pour calculer ces valeurs nous avons procédé de la manière suivante pour chaque polymère :

- i.* pour une séquence d'acquisition où un grand nombre d'événements est observé, nous choisissons au hasard dans la séquence certains événements pour lesquels nous mesurons la valeur maximale de signal émis et que nous divisons par la valeur moyenne du bruit sur l'image correspondant à ce maximum. Ceci nous donne un rapport signal/bruit pour un événement.
- ii.* on effectue les mêmes opérations pour plusieurs séquences d'acquisition et on moyenne l'ensemble des résultats. Le rapport signal/bruit obtenu correspond à la valeur présentée en tableau 5.1.

Comme on peut le constater, le rapport signal/bruit n'est pas particulièrement élevé (entre 2 et 10) dans nos expériences même s'il est suffisant pour permettre la détection des événements. Par ailleurs, ce rapport croît en moyenne avec la taille du polymère comme attendu, à l'exception du cas de l'ADN-T4 par rapport à l'ADN- λ . Cette différence s'explique par le fait que nous observons plus d'ADN-T4 coincés dans les pores qu'avec les autres ADN – nous reviendrons sur ce fait quand nous traiterons

de la translocation d'ADN-T4 en 7.2.2. Or ces ADNs coincés, qui ne sont pas comptés comme des évènements, génèrent du bruit et dégrade par conséquent le rapport signal/bruit.

5.1.2 Mesures en volume

Les expériences de diffusion au travers du pore nucléaire ne sont pas réalisées en molécule unique mais font appel à des mesures en volume. Nous procédons ainsi car les molécules en mesure de diffuser au travers des pores nucléaires ont une taille inférieure à 60 kDa et la quantité de fluorophores qu'elles peuvent fixer est trop faible pour qu'elles puissent être détectées en molécule unique avec notre dispositif. Nous faisons alors une mesure de l'intensité moyenne de la fluorescence dans le volume d'observation de l'objectif (voir 8).

Ces mesures se font avec les mêmes réglages de la caméra (résolution de 512×512 , temps d'acquisition de 30 ms) qu'en molécule unique mais au lieu d'acquérir des séquences d'images, nous acquérons une seule image résultat de l'accumulation de 5 mesures. L'accumulation, qui correspond à la somme des valeurs d'intensité sur les pixels, permet d'acquérir un signal plus intense.

5.2 Analyse des données

Les techniques d'acquisitions variant selon le type de mesure, molécule unique ou volume, nous avons développé des méthodes d'analyses des données spécifiques à chacune.

5.2.1 Détection des évènements en molécule unique

Les séquences d'images ont été traitées via un script *MATLAB* ou via le logiciel *Fiji*. Les séquences étant enregistrées au format SIF, il est nécessaire d'utiliser un script ou un plug-in (*gui_sifread.m* et *Read SIF* respectivement) fournis par *Andor* pour ouvrir ces fichiers sur l'un ou l'autre logiciel.

Nous avons utilisé *Fiji* pour la visualisation et la détection « à l'œil nu » des évènements et *MATLAB* pour une détection par traitement d'image. *Fiji* dispose d'une interface utilisateur et d'un ensemble de fonction de traitement d'image intégré permettant une manipulation aisée des séquences contrairement à *MATLAB* qui est plus indiqué pour l'écriture de scripts (ou fonctions) personnalisés.

Détection des évènements par l'utilisateur

La méthode la plus simple pour détecter et compter les évènements sur une séquences d'images est encore de faire défiler la séquence et de détecter à l'œil les évènements à mesure qu'ils se produisent. Il suffit alors de les dénombrer au court de la séquence pour avoir une estimation du nombre d'évènements. L'œil est un excellent détecteur d'objets dynamiques et gère très bien les faibles différences de contraste, de fait un utilisateur aguerri peut acquérir une grande sensibilité et repérer jusqu'au évènements d'intensités les plus faibles. La limite de cette méthode repose principalement sur la faculté à compter des évènements rapprochés dans le temps. En effet, même si l'œil a repéré tous les évènements s'étant

produits dans un faible intervalle de temps, l'utilisateur n'est pas nécessairement en mesure de tous les dénombrer sur ce même intervalle de temps. Heureusement les outils de visualisation de la séquence d'images permettent dans la majorité des cas de remédier à cette difficulté en contrôlant la vitesse de défilement image par image et en offrant la capacité de revenir en arrière. Plusieurs visionnages (et dénombrements) permettent également de réduire l'erreur. Si cela n'est pas suffisant, nous avons mis au point un script de comptage pour le cas d'une forte fréquence d'évènements que nous détaillerons par la suite. Nous montrerons aussi qu'il est, de manière générale, plus efficace d'avoir recours au comptage à la main.

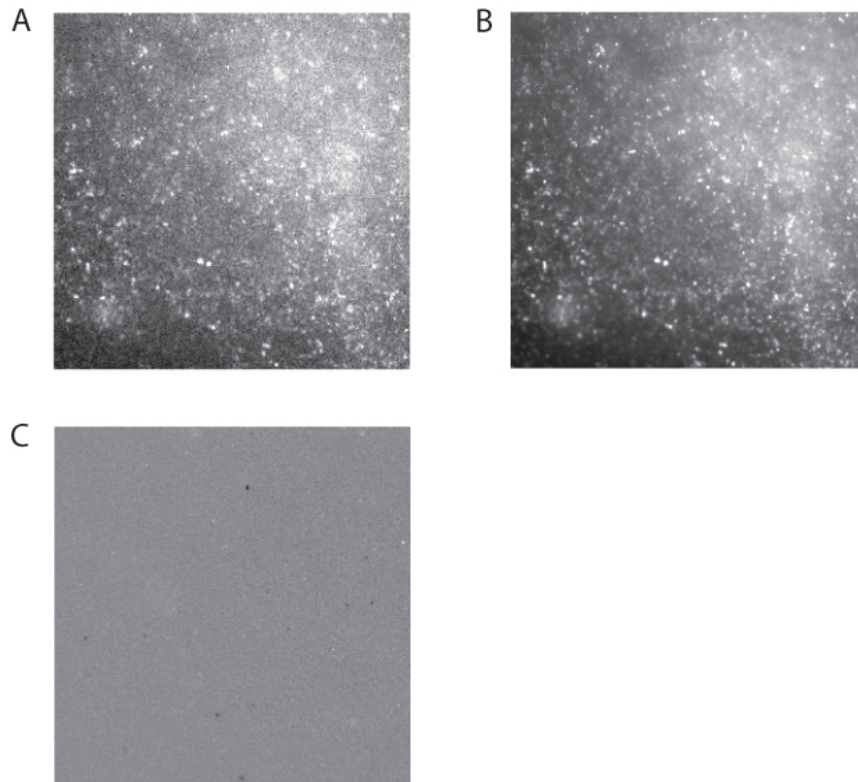


FIGURE 5.1 – (A) Image extraite d'une séquence d'une expérience de translocation d'ADN- λ avant traitement. (B) Image représentant la valeur moyenne pour chaque pixel pour l'ensemble de la séquence. (C) Image résultante de la soustraction de B à A.

Pour faciliter la détection des évènements, nous réalisons plusieurs opérations sur la séquence que l'on souhaite analyser afin de la rendre plus lisible (Figure 5.1 (A)). Pour mieux comprendre celles-ci, il est nécessaire de connaître la nature des données que nous utilisons. Les séquences d'images se présentent comme des matrices tri-dimensionnelles de la forme $M(x, y, z)$ où chaque coordonnée du plan (x, y) représente un pixel de l'image et z le temps (la taille de la matrice sera donc donnée par : nombre de pixel dans la direction horizontale \times nombre de pixel dans la direction verticale \times taille de la séquence soit typiquement dans nos expériences $512 \times 512 \times 500$).

Premièrement nous effectuons une moyenne de l'ensemble des images dans la direction z (fonction *Z-project* sur *Fiji*) ce qui nous donne l'intensité moyenne par pixel. Le résultat est une image contenant tous les éléments statiques ainsi qu'une valeur moyenne du bruit pour chaque pixel (Figure 5.1 (B)). Cette image est soustraite à l'ensemble des images de la séquence (fonction *Image Calculator* sur *Fiji*) afin de supprimer les éléments fixes (polymères bloqués/collés, éléments parasites fluorescent etc.) ainsi

que le bruit ce qui augmente fortement la lisibilité des images (Figure 5.1 (C)). Enfin il est nécessaire d'ajuster l'échelle d'intensité ainsi que le contraste et la luminosité aux valeurs d'intensité sur l'image (fonction *Adjust* sur *Fiji*).

Détection des évènements par un script

Lorsque la fréquence d'occurrence des évènements est trop importante pour nous permettre de dénombrer manuellement les évènements, nous faisons appel à un script *MATLAB*. Ce script fonctionne de la manière suivante pour une séquence d'images donnée :

- i. l'utilisateur désigne au sein de la séquence des ensembles de pixels correspondants à des évènements ainsi que des ensembles correspondants à du bruit ;
- ii. à partir des valeurs d'intensité extraites de ces ensembles le script définit un seuil de détection et remplace les valeurs des pixels dans la matrice de la séquence par :
 - 1 si la valeur contenue dans ce pixel dépasse la valeur seuil
 - 0 sinon ;
- iii. le script crée des objets à partir de groupe de pixels=1 ayant une connectivité supérieure à une valeur définie initialement ; cet objet est alors comptabilisé comme un évènement ;
- iv. le script renvoie le nombre d'évènement ainsi comptabilisé.

Pour que l'utilisateur puisse indiquer au script les pixels correspondant à des évènements, le script affiche une série de coupes temporelles de la séquence d'images. Ces coupes temporelles correspondent à une projection d'une direction du plan (x, y) sur l'autre pour un intervalle donné dans la direction z (le temps). Par exemple si l'on choisit de représenter l'axe y en fonction de z , un pixel de coordonnée y aura pour valeur la somme des valeurs des pixels dans la direction x de coordonnée y . Cette représentation permet de visualiser un évènement dans le temps comme montré en Figure 5.2. La séquence n'est pas représentée dans son intégralité pour deux raisons : la principale est que les évènements, qui s'étalent en moyenne sur une vingtaine d'images, seraient écrasés et donc difficiles à identifier et à marquer. La seconde est que cela permet de mieux ajuster les niveaux de gris pour chaque coupe et ainsi avoir une meilleure visualisation.

La taille des coupes est ajustable et définie initialement par l'utilisateur qui les parcourt successivement en désignant des évènements. Indiquer tous les évènements n'est pas nécessaire et serait contre productif, ici il s'agit de choisir un ensemble d'évènements représentatifs pour calculer une valeur seuil en mesure de discriminer les évènements du bruit pour que le script puisse effectuer le comptage lui-même. Il est aussi nécessaire de désigner des pixels correspondant à du bruit. La valeur de l'intensité seuil I_s est calculée comme :

$$I_s = I_b + \frac{5}{6}(I_e - I_b) \quad (5.2)$$

où I_b est l'intensité médiane du bruit et I_e est l'intensité médiane des évènements marqués par l'utilisateur. Le facteur $5/6$ a été choisi empiriquement et est celui offrant le meilleur accord entre le nombre d'évènements fournis par le script et celui compté manuellement pour des séquences tests pour 3 itérations du script. Il est en effet nécessaire d'effectuer au minimum 3 comptages sur la même séquence avec le script pour obtenir une valeur fiable du nombre d'évènements.

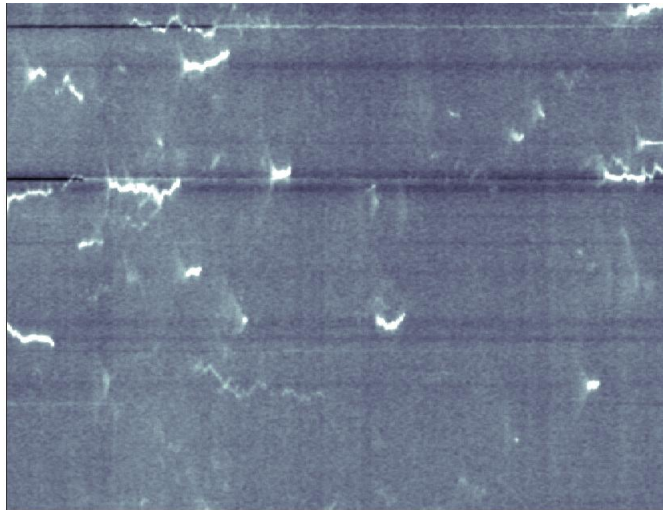


FIGURE 5.2 – Représentation en coupe temporelle de la translocation d'ADN- λ

Pour qu'une séquence soit traitée par le script il est nécessaire d'effectuer les mêmes opérations que celles décrites pour la détection à la main afin de supprimer, dans la mesure du possible, les éléments parasites et de diminuer le bruit.

La nécessité de devoir désigner au script un ensemble d'évènements ainsi que celle d'itérer au minimum 3 fois celui-ci pour une même séquence rend l'utilisation de ce dernier de manière routinière (à comprendre, pour remplacer complètement le comptage manuel) non-efficace. Il est plus rapide pour une personne aguerrie d'effectuer le comptage manuellement – quitte à le faire plusieurs fois si nécessaire – que de faire appel au script, en particulier pour les séquences où l'occurrence des évènements est faible. L'usage du script est donc à réserver au cas où l'occurrence est trop élevée pour permettre un comptage manuel fiable.

Il est indéniable qu'une méthode automatisée de détection des évènements fiable et ne nécessitant pas l'intervention de l'utilisateur est envisageable et permettrait un gain de temps considérable. Cela dit l'élaboration de celle-ci n'est pas aisée du fait du rapport signal/bruit peu élevé et de l'aspect dynamique des objets à détecter. J'ai par conséquent jugé préférable de ne pas investir de temps dans l'élaboration d'une telle méthode.

5.2.2 Analyse des mesures en volume

Les expériences de diffusion à travers l'enveloppe nucléaire impliquent de suivre l'évolution de l'intensité moyenne de la fluorescence dans le volume en fonction du temps (*cf.* 8.1). Pour ce faire nous effectuons une mesure en volume à des intervalles de temps donnés, il suffit ensuite de calculer l'intensité lumineuse moyenne pour chaque mesure. Nous effectuons ce calcul sur *MATLAB* de manière simple : les données sont sous forme d'une matrice bidimensionnelle (il n'y a qu'une image, ceci n'est pas une séquence) et l'on moyenne l'intensité dans une dimension puis dans l'autre en utilisant la fonction *mean* de *MATLAB*.

En effectuant une mesure du bruit avant l'incorporation des molécules fluorescentes on peut calculer

le rapport signal/bruit pour chaque mesure. Ce rapport varie entre chacune d'entre elles, la quantité de molécules fluorescentes contribuant au signal diminuant à mesure qu'elles diffusent au travers de la membrane. Pour avoir une valeur représentative du rapport signal/bruit sur l'ensemble d'une expérience de diffusion il convient de calculer la médiane des rapports signal/bruit sur l'ensemble des mesures. En faisant ainsi et en moyennant sur plusieurs expériences, on obtient un rapport signal/bruit médian moyen de $12,7 \pm 0,7$ pour les mesures en volume.

Chapitre 6

Extraction et manipulation des enveloppes nucléaires d'ovocytes de xénope

Ce chapitre est consacré aux méthodes d'extraction et de manipulation des enveloppes nucléaires d'ovocytes de *Xenopus laevis* (que l'on abrègera par xénope désormais) ainsi qu'à la préparation des tampons, des solutions de marqueurs et des solutions de protéines et autres biomolécules dont nous nous sommes servis dans nos expériences.

6.1 Élevage de *Xenopus laevis* et extraction des ovocytes

Nous avons accès aux ovocytes de xénope grâce à une collaboration avec May Penrad-Mobayed de l'Institut Jacques Monod. L'Institut dispose d'une animalerie où les grenouilles sont élevées et opérées. Les ovocytes sont prélevés par grappes d'une centaine d'ovocytes au moyen d'une incision sur le flanc au niveau de la patte postérieure. L'opération est réalisée par May Penrad-Mobayed ou par un membre de son équipe Caroline Perrin. Une fois extraits, les ovocytes sont conservés pendant un maximum de 5 jours à 18 ° C dans une solution de *Modified Barth's Saline* (MBS).

6.2 L'ovocyte de xénope

Les ovocytes de xénope sont des cellules géantes présentant 6 stades de développement (Figure 6.1) ; au stade 6 ils atteignent un diamètre d'environ 1,2 mm avec un noyau d'environ 500 μm de diamètre [155]. Cette grande taille permet de manipuler ovocyte et noyau avec une relative aisance ce qui fait leur intérêt. Par ailleurs le diamètre important du noyau implique une surface d'enveloppe nucléaire importante elle aussi, ce qui est primordial dans notre étude, comme nous le verrons en 8.

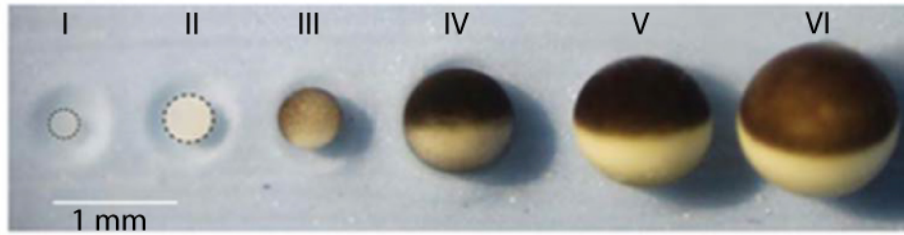


FIGURE 6.1 – Les six stades de développement de l’ovocyte de *Xenopus laevis*.

6.3 Extraction de l’enveloppe nucléaire et déposition sur une membrane dorée

Nous allons ici détailler comment nous avons extrait et manipulé une enveloppe nucléaire afin de l’étaler sur la couche d’or recouvrant une membrane en polycarbonate dont les pores font 200 nm de diamètre, comme schématisé en Figure 6.2, en adaptant un protocole développé par R. Peters [140].

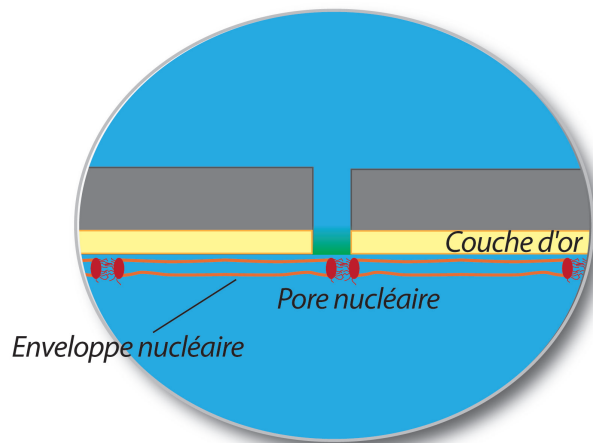


FIGURE 6.2 – Schéma représentant l’enveloppe nucléaire collée sur la couche d’or d’une membrane en polycarbonate.

Pour manipuler les noyaux dans de bonnes conditions et pour que l’enveloppe nucléaire adhère à l’or, il faut utiliser des solutions tampons adaptées. Nous utilisons les solutions tampons 3:1 et Mock 3 (voir Annexe B) qui ont un pH de 7,2 et 7,3 respectivement. Les compositions de ces deux solutions tampons sont proches, la principale différence tient à la présence d’ions calcium dans le Mock 3. Le calcium présent en faible concentration permet l’adhésion de l’enveloppe nucléaire sur l’or ; si celui-ci est absent ou s’il est présent en trop grande quantité, l’enveloppe nucléaire n’adhèrera pas [140].

Pour permettre l’adhésion il est indispensable que la surface d’or soit propre. A cette fin nous plaçons la membrane dorée dans un bain d’acide nitrique à 30% pendant une heure. La membrane est ensuite rincée à l’eau Millipore et séchée.

Protocole

Matériel utilisé :

- une loupe binoculaire
- une paire de pinces chirurgicales Dumont modèle suisse n° 5 fine (MORIA)
- une pipette pasteur et une tétine
- 3 « salières » : cuvette hémisphérique dans un socle rectangulaire en verre
- une pipette pasteur au bout arrondi : l'extrémité d'une pipette pasteur est fondue pour former une boule
- deux aiguilles de dissection de drosophile
- une membrane dorée (pores de 200 nm de diamètre) fixée sur un support (un bouchon voir 4.2.2)
- une solution de BSA à 1 mg/mL

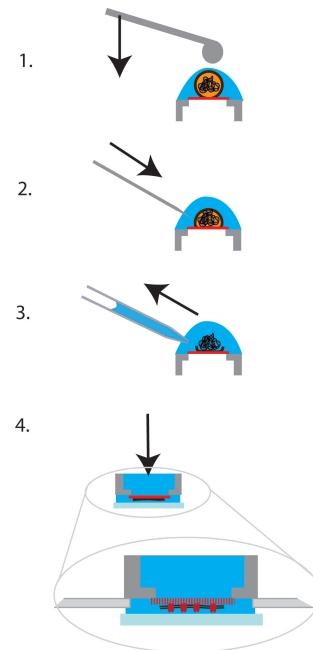


FIGURE 6.3 – Etalement de l'enveloppe nucléaire

Avant toute manipulation, passiver salière, pipettes (standard et arrondie), aiguilles et pinces avec la solution de BSA pour éviter toute adhésion indésirable de la membrane sur ces éléments. Il est important de bien rincer après passivation pour éviter d'avoir de la BSA en solution par la suite.

Sous la binoculaire, on isole à l'aide des pinces chirurgicales un ovocyte de la grappe que l'on place dans une salière contenant du 3:1. Il s'agit maintenant d'ouvrir l'ovocyte pour en extraire le noyau. Pour ce faire l'on pince la membrane de l'ovocyte à l'intersection entre la zone blanche et la zone noire (voir Figure 6.1) avec les deux pinces et on écarte délicatement pour déchirer la membrane ; continuer le mouvement jusqu'à ouverture complète de l'ovocyte. Si l'ouverture a été réalisée au bon endroit (et avec un peu de chance) le noyau est immédiatement visible comme étant le seul élément translucide au milieu du vitellus qui lui est blanc – le vitellus désigne l'ensemble des protéines stockées dans l'ovocyte qui seront nécessaires au développement de l'embryon. Si le noyau n'est pas visible il faut alors créer un léger courant à l'aide de la pipette pour écarter le vitellus jusqu'à ce que le noyau soit localisé.

Une fois le noyau en vue, il faut le dégager du vitellus en exerçant de faibles courants avec la pipette. Une fois le noyau dégagé du reste de l'ovocyte, il faut le transférer vers une autre salière contenant du 3:1 pour le rincer et éliminer un maximum de vitellus qui serait accroché au noyau. Pour ce faire, il faut l'aspirer délicatement avec la pipette et l'expulser dans le nouveau contenant.

Une fois dans la seconde salière, effectuer les opérations de pipetage et d'expulsion du noyau autant de fois que nécessaire pour le nettoyer c'est-à-dire qu'il n'y est plus de vitellus sur le noyau. Nettoyé celui-ci est quasiment transparent et son contenu est clairement visible. Lorsqu'il est propre transférer le noyau dans la troisième salière contenant du Mock 3.

Il faut maintenant venir déposer le noyau sur la surface d'or. Pour cela pipeter le noyau en prenant

soin de prélever au minimum $200\ \mu\text{L}$ de tampon avec celui-ci. Déposer le noyau en vidant doucement le contenu de la pipette au-dessus du jour de la surface d'or, là où se situe le trou dans la surface de verre du bouchon. La solution va former une goutte hémisphérique à la surface du bouchon. Une fois hors de la pipette le noyau vient spontanément se déposer sur la surface d'or.

Afin de maximiser la surface du noyau en contact avec l'or, nous appuyons délicatement sur celui-ci à l'aide de la pipette à bout arrondi (6.2 1.). Une fois cette étape accomplie, le noyau prend la forme d'une demi-sphère que nous ouvrons à l'aide des aiguilles (6.2 2.). Une fois ouvert, nous évacuons le contenu du noyau et étalons sur l'or les parties de la demi-sphère suspendue en solution (6.2 3.). Contrairement à la zone plate de la demi-sphère qui adhère fortement à l'or, les parties que nous étalons forment des plis en se fixant sur l'or et n'offre pas une surface d'étude idéale. Une fois toutes ces étapes effectuées, l'échantillon est lavé 3 fois avec une solution de Mock 3 puis conservé dans $100\ \mu\text{L}$ de Mock 3.

6.4 Molécules utilisées pour l'étude de la diffusion à travers le pore nucléaire

Pour réaliser les expériences de diffusion au travers des enveloppes nucléaires, nous avons utilisé diverses molécules :

- la molécule dont nous mesurons la diffusion est un complexe dextran 3kDa – Alexa488. Il a été choisi pour son rayon de giration d'environ 2 nm lui permettant de diffuser librement au travers du pore nucléaire et car le dextran n'est pas chargé et n'a pas d'interactions avec les protéines du pore. Nous l'avons acquis au près de *Molecular Probes* en conditionnement déshydraté de 2 mg. Nous l'utilisons en solution de $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ dans du Tris-KCl 10 mM.
- pour visualiser l'enveloppe nucléaire nous avons utilisé deux marqueurs fluorescents :
 - un complexe WGA – Tétraméthylrhodamine. La WGA est une lectine d'environ 38 kDa qui se fixe sur la partie cytoplasmique du pore nucléaire [53] et inhibe le transport sélectif mais pas le transport diffusif. Ce complexe nous permet donc de voir l'enveloppe nucléaire par marquage des pores nucléaires (nous n'avons pas ici la résolution pour voir les pores individuellement). Le tétraméthylrhodamine a ses maximas d'excitation et d'émission à 557 nm et 576 nm respectivement (spectres en Figure 6.4). Ce complexe est disponible au près de *Molecular Probes* conditionné déshydraté en lot de 5 mg. Nous préparons une solution de $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ dans du Tris-KCl 10 mM.
 - le DIL (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate), une molécule lipophile de 934 Da qui vient s'insérer dans l'enveloppe nucléaire. Son spectre est proche de celui du tétraméthylrhodamine (550/570 nm). Acquérable au près de *Molecular Probes* en lot de 100 mg. Nous préparons une solution de $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ dans du Tris-KCl 10 mM.
- pour éliminer les ARNs présents dans les pores nucléaires nous utilisons de la RNase A extraite de pancréas de bovin fournie par *Sigma Aldrich* sous forme lyophilisée. Nous préparons une solution de 1 mg/mL dans du Tris-KCl 10 mM.
- enfin dans les expériences nous étudions l'influence de la concentration en importin β 1 humaine. L'importin β 1 est une karyophérine de 97 kDa achetable chez *Sigma Aldrich* en solution de $100\ \mu\text{L}$

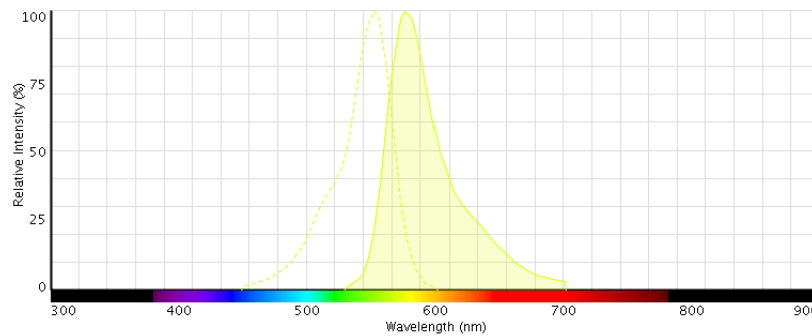


FIGURE 6.4 – Spectre d’excitation et émission du fluorophore tétraméthylrhodamine

à $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ dans 20 mM d’HEPES (pH 7,5), 110 mM d’acétate de potassium, 2 mM d’acétate de magnésium, $0,5 \text{ mM}$ EGTA, $0,1 \text{ mM}$ ATP, 2 mM DTT, 5% glycérol, sont ajoutés des inhibiteurs de protéases. Nous avons utilisé l’importin β 1 à différentes concentrations détaillées dans les résultats.

6.5 Mesure de la densité de pore nucléaire

La densité de pore nucléaire chez l’ovocyte de xénope de stade VI a été quantifiée à partir d’images prises par microscopie de super-résolution optique dSTORM par Cyndélia Guillaume à la plateforme d’imagerie de l’Institut Jacques Monod de l’Université Paris-Diderot.

Les EN d’ovocytes de xénope sont extraites comme décrit précédemment et étalées sur une lamelle de verre tel qu’illustré Figure 6.5 (A). L’EN est marquée par un complexe WGA–Alexa647 qui se fixe dans le canal central du pore nucléaire. L’échantillon est alors imagé par microscopie dSTORM.

Le principe de l’imagerie STORM [151] est de mettre en solution avec l’échantillon à imager un agent qui active et désactive les fluorophores de manière stochastique. Il est ainsi possible de distinguer le signal provenant de deux fluorophores même si ceux-ci sont à une distance inférieure à la limite de diffraction en les allumant successivement. En appliquant un filtre (classiquement gaussien) aux tâches d’Airy provenant de ces sources isolées, on peut localiser leur position au sein de ces tâches avec une précision de quelques nanomètres. En accumulant un grand nombre d’images de résolution optique classique, l’on peut alors reconstruire une image super-résolue par ce procédé. Cette technique nous permet d’observer les pores nucléaires individuellement comme illustré Figure 6.5 (B).

La densité de pores nucléaires est mesurée sur les images issues du dSTORM par un script MATLAB qui effectue un seuillage. Par ce procédé nous mesurons une densité de pores $\sigma = 36 \text{ pores}/\mu\text{m}^2$ pour des ENs extraites d’ovocytes de xénope de stade VI.

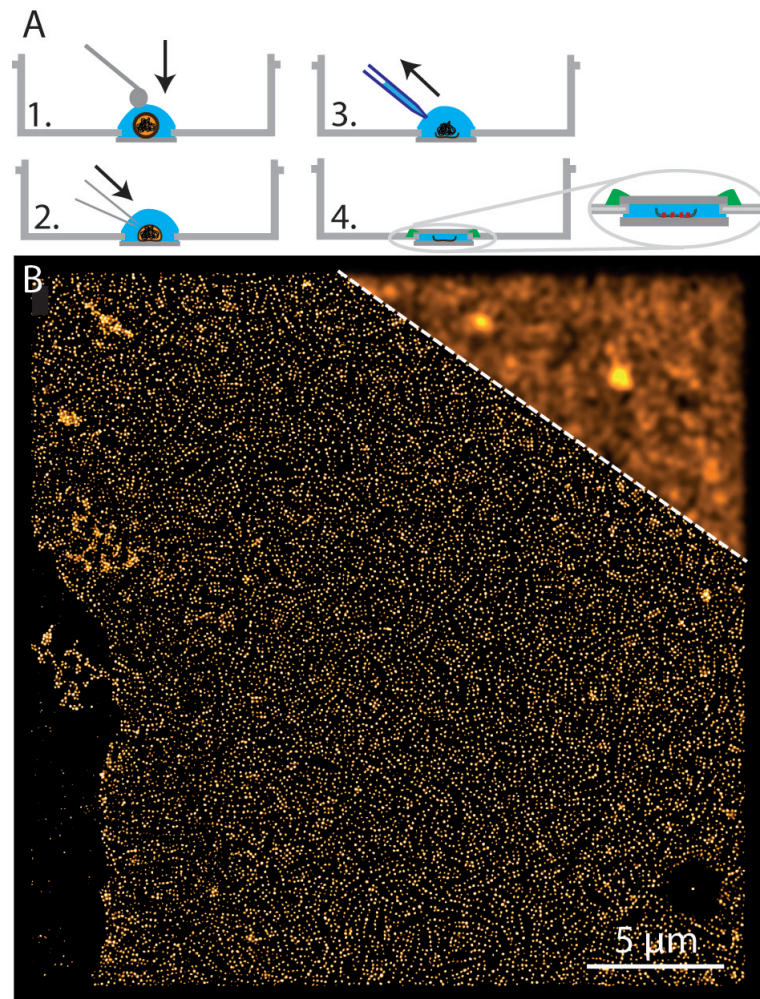


FIGURE 6.5 – Image dstorm d'une membrane nucléaire d'ovocyte de *Xenopus laevis*, marquage du canal central par WGA-Alexa647. Crédit : Cyndélia Guillaume, non-publiée.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 7

Translocation d'acide nucléique entraîné par un flux ou un champ électrique

Ce chapitre décrit les expériences menées sur la translocation de biopolymères entraînés par un flux ou un champ électrique au travers de nanopores solides. Celles-ci reposent sur le dispositif expérimental présenté en 4.2. À l'aide de ce dispositif nous avons étudié la translocation d'ADNs double-brin (phage λ et T4), d'ADNs simple-brin (phage ϕ X) ainsi que d'ARNs (phage ϕ 6) injectés par un flux à travers des membranes *track-etched* et nous avons étudié la translocation d'ADN- λ entraîné par un champ électrique à travers un réseau de pores en SiN ou SiC. Pour ce faire nous avons mesuré la fréquence de sortie de ces biopolymères en fonction de la différence de pression ou de la différence de tension appliquée dans notre système et dans le cas de l'ADN- λ , nous nous sommes également intéressés à la variation de la vitesse de sortie en fonction de la pression ainsi qu'à l'impact d'une fonctionnalisation des pores par des polymères neutres sur la relation fréquence de sortie-pression.

7.1 Translocation d'ADN- λ

L'ADN de phage λ est un ADN très couramment utilisé dans les expériences nécessitant des biopolymères (*cf.* 1). Il comporte $N = 48\,502$ paires de bases et a une masse molaire de 32,3 MDa. Comme indiqué dans la partie Méthodes, nous manipulons l'ADN- λ dans une solution de 10 mM de Tris-KCl de pH 7,1 à une concentration de 0,5 ng/ μ L soit 15,5 pM. À cette concentration l'ADN se trouve en régime dilué, la distance moyenne entre deux molécules en solution étant de 4,75 μ m. Dans nos conditions de pH et de force ionique, la longueur de persistance l_p de l'ADN- λ est d'environ 54 nm ce qui correspond à 150 paires de bases [104]. Pour être en mesure de visualiser l'ADN, nous le complexons à un marqueur fluorescent, le YOYO-1, qui vient s'intercaler entre ses bases. Le YOYO-1 rigidifie l'ADN ce qui se caractérise par une augmentation de sa longueur de persistance. Dans nos conditions la longueur de persistance du complexe ADN- λ /YOYO-1 est de 66 nm [136].

Nous calculons le rayon de giration du complexe ADN- λ /YOYO-1 en le considérant comme une chaîne idéale dont les segments ont pour longueur la longueur de Kuhn. Pour une chaîne idéale en bon

solvant le rayon de giration en 3D est donné par :

$$R_g = \frac{\sqrt{\langle R^2 \rangle}}{\sqrt{6}} = \frac{b\sqrt{N_s}}{\sqrt{6}} \quad (7.1)$$

avec $\langle R^2 \rangle$ la moyenne du carré de la distance entre les deux bouts de la chaîne, b la taille d'un segment de Kuhn égale à deux fois la longueur de persistance ($b = 2l_p$) et N_s le nombre de segments. Pour l'ADN- λ , $R_g = 634$ nm.

Le rayon de giration peut aussi être calculé dans le cadre du modèle de Worm Like Chain (WLC) pour lequel

$$\langle R^2 \rangle = 2l_p L \left[1 - \frac{l_p}{L} \left(1 - e^{-L/l_p} \right) \right] \quad (7.2)$$

avec L la longueur de la chaîne. On trouve alors $R_g = 683$ nm. Les valeurs sont proches pour les deux modèles ce qui est attendu dans la limite $L \gg l_p$, ce qui est le cas pour l'ADN- λ .

Smith et *coll.* [162] ont étudié le comportement hydrodynamique de l'ADN et montré qu'il est décrit par le modèle de Zimm. Ils ont mesuré le rayon de giration pour de l'ADN- λ complexé à du TOTO-1 (un autre intercalant) dans 10 mM NaCl et trouve $R_g = 730$ nm et à partir du coefficient de diffusion qu'ils ont mesuré nous calculons un rayon hydrodynamique $R_h = 490$ nm. Leur valeurs sont en accord avec un modèle de chaîne à volume exclu, ce qui explique l'écart avec les rayons de giration calculés à partir des modèles de chaîne idéale et WLC. Nous utiliserons dans la suite de ce manuscrit les rayons de giration et hydrodynamique mesurés par Smith et *coll.*

En conclusion, le rayon de giration ainsi que le rayon hydrodynamique de l'ADN- λ sont supérieurs au diamètre maximum des pores que nous avons utilisé soit 200 nm. Ceci justifie l'utilisation de cet ADN dans nos expériences qui devra bien subir un confinement pour traverser le pore.

7.1.1 Protocole

Pour détailler les étapes du protocole, nous ferons appel à la terminologie établie en Figure 4.6 désignant les éléments du montage expérimental. Pour toutes les expériences de translocation d'ADN- λ nous utilisons la solution diluée à 15,5 pM donnée en méthode.

Préparation de l'échantillon

Nous désignons par échantillon l'ensemble formé d'un bouchon avec un morceau de membrane poreuse dorée collée sur sa surface de verre et d'une solution de biopolymères dans la chambre interne de ce bouchon. Les membranes de polycarbonate sont manipulées avec des pinces chirurgicales à bout plats afin de ne pas arracher d'or ni percer la membrane.

Pour préparer un tel échantillon nous procédons comme suit :

- un disque de 3 mm de diamètre de membrane de polycarbonate dorée est extrait à l'aide d'un poinçon ;
- un anneau de colle de faible épaisseur est étalé autour de l'ouverture circulaire dans le verre sur lequel l'on dépose le morceau de membrane découpé ;
- attendre de 20 à 30 minutes que la colle sèche ;

- après déposition d'une goutte d'eau sur l'objectif, la chambre basse est placée au-dessus de celui-ci ;
- 500 μL de solution de Tris-KCl 10 mM sont placés dans la chambre basse ;
- 100 μL de solution de Tris-KCl 10 mM sont placés dans la chambre interne du bouchon dans lesquels on ajoute 2 μL de solution d'ADN- λ ;
- le bouchon est vissé sur le support relié au contrôleur de pression et vient s'appuyer sur le guide en téflon ; l'ensemble est déposé dans la chambre basse.

Déroulement de l'expérience de translocation

Les expériences se déroulent avec la caméra refroidie à -80°C comme suit :

- la surface de la membrane est repérée à l'aide de la lampe de fluorescence à 488 nm et placée dans le plan focal, nous basculons alors sur le laser qui génère un bruit moins important ;
- nous augmentons graduellement la différence de pression jusqu'à voir apparaître des événements. La différence de pression déforme la membrane ce qui impose d'ajuster le plan focal pour chaque nouvelle valeur de la différence de pression. Cette étape rend l'automatisation du procédé expérimental difficile ;
- nous réalisons alors une série de films couvrant une gamme de pression allant de celle minimum nécessaire à l'observation d'un événement (typiquement 20 mbar pour des pores de 50 nm de diamètre) jusqu'à celle à partir de laquelle il n'est plus possible de distinguer deux événements successifs (typiquement 40 mbar pour des pores de 50 nm de diamètre). Les valeurs des différences de pression minimum et maximum ainsi que les intervalles entre chaque mesure varient selon le diamètre des pores utilisés ;

La durée standard d'une expérience est d'environ 15 à 20 minutes. Une fois la prise des films terminée, l'échantillon est nettoyé et un autre est mis en place. Seuls les bouchons et la chambre basse sont réutilisés d'une expérience à l'autre dans la limite de l'intégrité de leur surface de verre respective. Lorsque celles-ci sont détériorées (apparition de craquelures ou salies) un bouchon neuf est utilisé et/ou la lamelle de verre est remplacée sur la chambre basse.

7.1.2 Expériences et résultats

Nous avons réalisé des expériences de translocation pour des diamètres de pores de 50 nm, 80 nm, 100 nm et 200 nm. Pour chacun de ces diamètres plusieurs séries d'acquisition ont été effectuées. Nous avons extrait deux mesures de ces expériences, la fréquence de sortie des ADN ainsi que leur vitesse de sortie en fonction de la différence de pression appliquée. Nous allons traiter ces deux types de mesures séparément et discuter des résultats obtenus.

Fréquence de sortie

Pour déterminer la fréquence de sortie à une différence de pression donnée, nous procédons comme détaillé dans le chapitre 5 traitant de l'acquisition des données en comptant les événements à l'œil ou

à l'aide d'un script. Les courbes fréquence *vs* pression obtenues pour des pores de 50 nm, 100 nm et 200 nm de diamètres sont présentées en Figure 7.1. Nous observons une transition douce d'un régime non-passant vers un régime passant linéaire pour les pores de 50 nm de diamètre et partiellement pour ceux de 100 nm de diamètre. Dans le cas des pores de 200 nm de diamètre, nous n'observons pas la transition mais uniquement le régime linéaire. Cette évolution de la fréquence de sortie correspond qualitativement aux prédictions du modèle de succion détaillé en 1.2.2 et aux observations de Long et coll. [94] et Béguin et coll. [16].

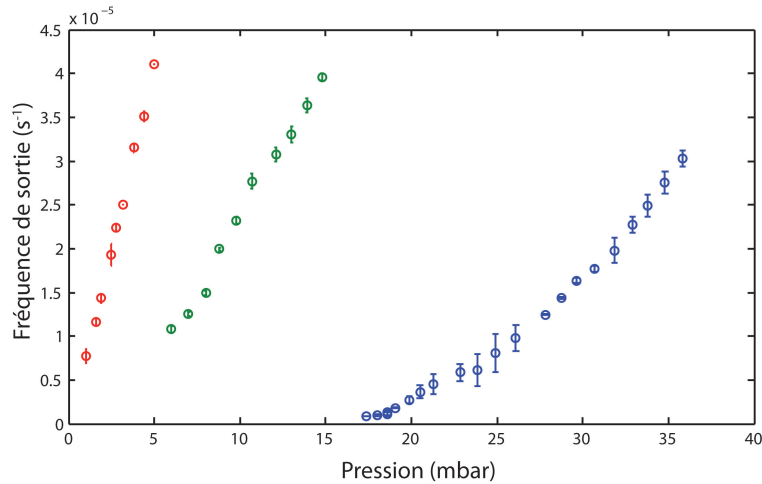


FIGURE 7.1 – Courbes fréquence de sortie par pore en fonction de la différence de pression pour des diamètres de pores de 50 nm (bleu), 100 nm (vert) et 200 nm (rouge)

Pour comprendre la dépendance de la fréquence de passage avec la pression, nous proposons un modèle basé sur le modèle de succion. Le modèle de succion représente l'entrée du pore comme une barrière énergétique dont la hauteur ΔF^* est calculée égale à

$$\Delta F^* = k_B T \frac{J_c}{J} \quad (7.3)$$

où $J_c = k_B T / \eta$ est le flux critique défini comme le flux tel que la barrière vaut $k_B T$. On définit alors la probabilité de passage P_p d'un ADN comme la probabilité de franchir la barrière soit

$$P_p = \exp\left(-\frac{\Delta F^*}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{J_c}{J}\right) \quad (7.4)$$

La fréquence de passage (ou de sortie) f va, dans ce cadre, être donnée par le produit de cette probabilité de passage par une fréquence d'essai f_e – c'est le même raisonnement que ce que nous avons vu dans le cas de l'entraînement par un champ électrique en 1.3.1 – de sorte que $f = f_e P_p$. La fréquence d'essai représente deux processus en série : la fréquence à laquelle un ADN est capté par le pore et la fréquence à laquelle il essaie de pénétrer dans le pore. Nous allons montrer que dans nos expériences, le second processus est dominant.

A la différence du cas électrique, le flux n'interagit avec l'ADN que très près du pore. En effet, nous avons montré (1.2.2) que la vitesse de l'écoulement v décroît rapidement avec la distance au pore ($v(r) = J/r^2$). Nous pouvons donc négliger le terme de dérive de l'ADN vers le pore. L'ADN est alors capté par le pore lorsque celui-ci diffuse jusqu'à une région proche du pore où l'interaction avec

le flux devient non-négligeable. On peut estimer ce rayon d'interaction R_{int} en le définissant comme le rayon à partir duquel la vitesse d'entraînement par le flux est du même ordre que la vitesse par déplacement Brownien sur une distance caractéristique qui est le rayon hydrodynamique de la pelote d'ADN, c'est-à-dire :

$$v(R_{int}) = \frac{D_{diff}}{R_h} \quad (7.5)$$

où D_{diff} est le coefficient de diffusion de l'ADN. L'ADN suit une dynamique de Zimm donc la vitesse de la pelote est égale à la vitesse de l'écoulement soit J/r^2 et $D_{diff} = k_B T / (6\pi\eta R_h)$. En remplaçant dans (7.5) et après calcul on obtient :

$$R_{int} = \sqrt{\frac{6\pi\eta J}{k_B T}} R_h = \sqrt{6\pi \frac{J}{J_c}} R_h \quad (7.6)$$

Pour $J = J_c$, $R_{int} = 2,1 \mu\text{m}$. La fréquence f_{cap} à laquelle un ADN diffuse dans l'hémisphère de rayon R_{int} – et est donc capté par le flux – est donné par la théorie de Smoluchowski [186]. Pour une concentration c en ADN cette fréquence est donnée par

$$f_{cap} = 2\pi D_{diff} R_{int} c \quad (7.7)$$

Dans nos conditions et à $J = J_c$, nous trouvons un temps de capture $\tau_{cap} = 1/f_{cap}$ d'environ 18 s. Ce temps est court devant le temps mesuré entre deux évènements qui est de l'ordre de 10^5 s pour $J \simeq J_c$ (Figure 7.1), bien que celui-ci soit surestimé comme nous en discuterons par la suite.

L'étape limitante pour le passage de l'ADN est donc de franchir la barrière d'entrée du pore. Nous supposons alors que nous avons en permanence un ADN à l'entrée du pore qui essaie de pénétrer avec une fréquence f_e . Cette fréquence correspond au taux avec lequel le flux déforme la pelote d'ADN à l'entrée du pore. Nous avons vu dans le cadre du modèle de déformation affine 1.2.2 que ce taux s vaut $J/\pi r^3$. À l'entrée du pore $r = R$ le rayon du pore et (en ignorant les facteurs numériques)

$$f_e = \frac{J}{R^3} \quad (7.8)$$

Nous proposons en 7.1.2 un autre raisonnement, basé sur la théorie de Kramers, qui permet d'arriver au même résultat. L'expression de f_e nous donne l'expression pour la fréquence de passage :

$$f = f_e P_p = \frac{J}{R^3} \exp\left(-\frac{J_c}{J}\right) = k \frac{J}{J_c} \exp\left(-\frac{J_c}{J}\right) \quad (7.9)$$

où nous définissons $k = J_c/R^3$ comme la fréquence d'essai pour $J = J_c$. On peut exprimer f en fonction de la différence de pression P en introduisant P_c la pression critique telle que $P_c = R_H J_c$ avec $R_H = 8\eta L/\pi R^4$ la résistance hydraulique du pore pour un écoulement de Poiseuille :

$$f = k \frac{P}{P_c} \exp\left(-\frac{P_c}{P}\right) \quad (7.10)$$

Nous avons ajusté nos données par l'expression (7.10) avec k et P_c pour paramètres ajustables. Nous utilisons l'application ou Toolbox « Curve Fitting » de MATLAB pour l'obtention des valeurs de ces paramètres. Pour ce faire nous appliquons un algorithme dit à région de confiance (un algorithme d'optimisation différentiable) en imposant, si nécessaire, des bornes aux valeurs des paramètres. L'algorithme utilise la méthode des moindres carrés pour minimiser le moment d'ordre 4 (option « Robuste »)

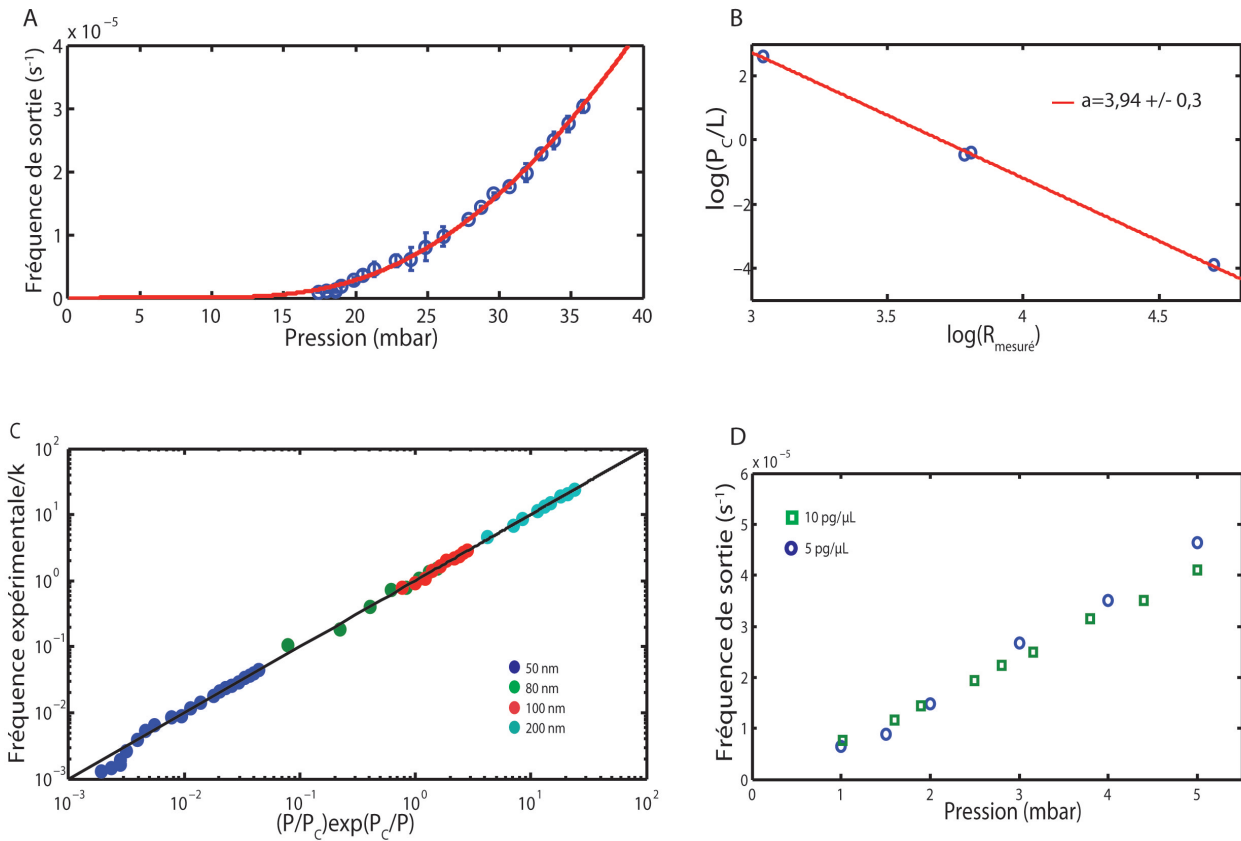


FIGURE 7.2 – (A) Courbes fréquence de sortie par pore en fonction de la différence de pression pour un diamètre de pores de 50 nm et fit (ligne rouge) par l’expression théorique de f . (B) Représentation log–log de la pression critique P_c divisée par l’épaisseur des pores L en fonction du rayon mesuré des pores $R_{\text{mesuré}}$. (C) Fréquence expérimentale normalisée en fonction de l’expression $(P/P_c)e^{-P_c/P}$ pour les différents diamètres de pores. (D) Courbes fréquence/pression pour un diamètre de pore de 200 nm à deux concentrations en ADN différentes : 5 et 10 pg/ μL .

d’une fonction sur l’ensemble du domaine de la courbe en opérant par itération sur une partie du domaine ou région. Si l’algorithme atteint une minimisation acceptable dans cette région il l’agrandit et recommence l’optimisation, s’il ne l’atteint pas il diminue la taille de la région et cherche un minimum sur cette nouvelle région, et ainsi de suite.

L’ajustement sur les données des pores de 50 nm de diamètre est présenté en Figure 7.2 A. Les valeurs des paramètres ajustables obtenues pour l’ensemble des diamètres de pores sont données en tableau 7.1. À partir des valeurs de P_c , nous pouvons calculer le flux critique pour chaque diamètre avec $J_c = P_c/R_H$, où R_H est la résistance hydraulique du pore.

La courbe maitresse en 7.2 C montre que l’on a un très bon accord entre le modèle de succion et les données expérimentales sur plusieurs décades. Par ailleurs nous montrons que la valeur du flux critique est invariante – dans la limite de l’erreur expérimentale – quelque soit le diamètre de pore utilisé et que la pression critique évolue comme une fonction de L/R^4 (Figure 7.2 B) c’est-à-dire de la résistance hydraulique dans un régime d’écoulement de Poiseuille, comme attendu.

Nous avons étudié l’influence de la concentration en ADN pour des pores de 200 nm de diamètre.

TABLE 7.1 – Valeurs de k , P_c et J_c pour les diamètres de pores utilisés (les valeurs de diamètres indiquées sont celles mesurées)

Diamètre (nm)	k (10^{-5} s^{-1})	P_c (mbar)	J_c ($10^{-2} k_B T / \eta$)
$42 \pm 0,5$	$71,3 \pm 9,2$	82 ± 4	$2,5 \pm 0,2$
$88 \pm 0,7$	$4,79 \pm 0,77$	$3,8 \pm 4$	$2,4 \pm 0,2$
$90 \pm 0,7$	$1,44 \pm 1,26$	$4 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,21$
$220 \pm 1,8$	$0,17 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,22$

Pour une concentration deux fois moindre en ADN- λ nous obtenons une courbe en fréquence identique (Figure 7.2 (D)) et des valeurs de k et P_c qui sont les mêmes que pour la concentration standard. Ce résultat confirme que la pression critique est indépendante de la concentration comme prédit par le modèle de succion. On s'attend à observer un effet de la concentration lorsque l'on sort du régime dilué et que les chaînes commencent à interagir entre elles.

Évolution du pré-facteur k

Les valeurs de k obtenues (tableau 7.1) montrent qu'il varie comme $R^{-\beta}$ avec $\beta = 3,5 \pm 0,3$ en bon accord avec l'expression que nous avons dérivée :

$$k = \frac{J_c}{R^3} \quad (7.11)$$

Cependant les valeurs de k obtenues dans nos expériences sont faibles, de l'ordre de 10^{-5} s^{-1} , comparées aux valeurs calculées avec l'expression 7.11, de l'ordre de 10^2 s^{-1} , pour les valeurs de J_c mesurées. Ceci s'explique par le fait que nous surestimons le nombre de pores ouverts – ou passants – pour l'ADN et qu'en réalité seule une fraction est effectivement franchissable par celui-ci. Or nous normalisons la fréquence de sortie mesurée par le nombre de pores calculé à partir de la densité nominale indiquée par le constructeur. Cette densité étant surestimée par rapport à la densité réelle de pores passants, la valeur de k est, elle, sous-estimée. Nous n'avons malheureusement pas de moyen de mesurer cette densité réelle.

L'étude de l'influence de la concentration donne des valeurs de k identiques pour deux concentrations différentes. Ce résultat justifie notre hypothèse de régime indépendant de la concentration où il y a toujours un ADN à l'entrée des pores. Cette hypothèse est valable tant que la fréquence de capture f_{cap} (7.7) est suffisamment grande. Il existe donc une concentration à partir de laquelle nous sortons de ce régime.

Nous allons déterminer l'expression de la fréquence de passage (et donc de k) par un autre raisonnement que celui proposer précédemment, basé sur la théorie de Kramers [80]. Nous supposons que le paysage énergétique à l'entrée du pore a la forme donnée par Kramers présenté Figure 7.3. Déterminons alors le flux d'ADN allant de A vers C.

Le flux d'ADN j à l'entrée du pore est la somme de deux composantes : un flux diffusif $j_d = -D\partial c/\partial x$ et un flux d'entraînement $j_e = cv_e = c\mu f_e$, avec D le coefficient de diffusion, c la concentration en x ,

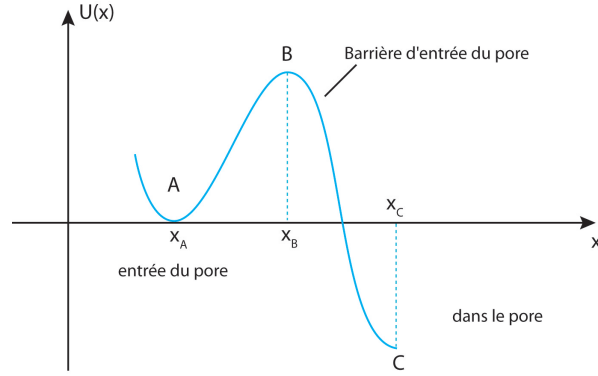


FIGURE 7.3 – Paysage énergétique tel que proposé par Kramers

μ la mobilité de l'ADN et f_e la force d'entraînement. Si on note $U(x)$ l'énergie potentielle en x alors $f_e = -\nabla U = -dU/dx$. Le flux j s'écrit donc

$$j = -D \left(\frac{\partial c}{\partial x} + \beta \frac{dU}{dx} c \right) \quad (7.12)$$

avec $\beta = 1/k_B T$.

À l'équilibre $j = 0$, et la concentration d'équilibre est donnée par

$$c(x) = c_0 e^{-\beta U(x)} \quad (7.13)$$

avec c_0 la concentration loin du pore.

On peut réécrire l'expression du flux j sous la forme

$$\frac{j}{D} e^{\beta U} = -\frac{\partial}{\partial x} (c e^{\beta U}) \quad (7.14)$$

On intègre l'expression de droite entre x_A et x_C

$$\int_{x_A}^{x_C} -\frac{\partial}{\partial x} (c e^{\beta U}) \simeq c(x_A) e^{\beta U(x_A)} \quad (7.15)$$

car $c(x_C) \ll c(x_A)$ (on peut également le justifier par $U_A \gg U_C$).

Pour $x \simeq x_B$ le développement à l'ordre de deux de U donne

$$U(x) \simeq U_B - \frac{1}{2} K_B (x - x_B)^2 \quad (7.16)$$

où K_B est la dérivée seconde de U en x_B et représente la courbure du potentiel en B . La région du potentiel déterminante pour la translocation est celle autour de B . On intègre le membre de gauche de (7.14) en utilisant l'expression du potentiel au voisinage de B :

$$\frac{j}{D} \int_{x_A}^{x_C} e^{\beta U} dx \simeq \frac{j}{D} e^{\beta U_B} \int_{-\infty}^{+\infty} \exp \left[-\frac{\beta}{2} K_B (x - x_B)^2 \right] dx = \frac{j}{D} e^{\beta U_B} \sqrt{\frac{2\pi}{\beta K_B}} \quad (7.17)$$

Le même raisonnement peut être appliqué en $x \simeq x_A$. Par convention nous prenons l'énergie potentielle nulle en A et le point A comme origine des x , d'où $U(x) = \frac{1}{2} K_A x^2$. Le nombre d'ADNs n_A (par unité de surface) présents autour de A est donné par :

$$n_A = \int_{-\infty}^{+\infty} c_0 e^{-\beta U(x)} = c_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \exp \left[-\frac{\beta}{2} K_A x^2 \right] dx = c_0 \sqrt{\frac{2\pi}{\beta K_A}} \quad (7.18)$$

j/n_A donne la probabilité (par unité de temps) qu'un ADN passe de A vers C et

$$j/n_A = D \frac{c_A}{c_0} \sqrt{\frac{\beta K_A}{2\pi}} \sqrt{\frac{\beta K_B}{2\pi}} e^{-\beta U_B} = D \frac{\sqrt{K_A K_B}}{2\pi k_B T} e^{-\beta U_B} \quad (7.19)$$

en supposant que $c_A \simeq c_0$.

Nous avons établi l'expression de U au voisinage de B dans le modèle de suction. Nous avons alors montré que pour x/R blobs de rayon R , le rayon du pore, $U(x)$ s'écrit

$$U(x) = k_B T \frac{x}{R} - \eta J \frac{x^2}{R^2} \quad (7.20)$$

U_B correspond au maximum de $U(x)$, et $K_B = \frac{d^2 U}{dx^2} |_{x=x_B}$, d'où

$$U_B = k_B T \frac{J_c}{J} \text{ et } K_B = \frac{k_B T}{R^2} \frac{J}{J_c}$$

avec $J_c = k_B T / \eta$.

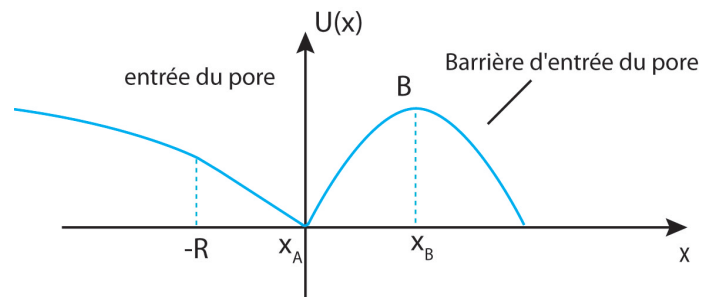


FIGURE 7.4 – Paysage énergétique à l'entrée du pore

Il nous reste à déterminer K_A , la courbure du potentiel à l'entrée du pore. À l'entrée la distance caractéristique d'interaction de l'ADN avec le flux est de l'ordre de R car la vitesse de l'écoulement $v(r) = v(-x)$ varie comme J/x^2 pour $|x| \geq R$ et est constante pour $-R \leq x < 0$ égale à la vitesse dans le pore $v(x) \simeq J/R^2$. Considérons alors la force exercée par le flux sur un blob de taille R à l'entrée, celle-ci est donnée par $\eta R v(R) = \eta J/R$. On peut abusivement dire que cette force dérive du potentiel $U_f(x) = -\eta J x/R$ pour $-R \leq x < 0$, ou encore

$$U_f(x) = -k_B T \frac{J}{J_c} \frac{x}{R} \quad (7.21)$$

La pente du potentiel à gauche de l'entrée s'écrit donc $-(k_B T/R)(J/J_c)$. Le paysage énergétique n'a pas exactement la forme de celui de Kramers mais plutôt celle dessinée Figure 7.4. Le raccord des pentes du potentiel à gauche et à droite en $x_A = 0$ impose

$$K_A = \frac{k_B T}{R^2} \frac{J}{J_c} \quad (7.22)$$

On obtient la même expression en divisant la pente à gauche par la taille du piège de potentiel.

Finalement la fréquence de translocation f s'écrit en remplaçant dans (7.19) par les expressions trouvées

$$f = \frac{D}{2\pi R^2} \frac{J}{J_c} e^{-J_c/J} \quad (7.23)$$

Le coefficient de diffusion D est celui d'un blob de taille R , d'où $D = k_B T / (6\pi\eta R)$ et, en ignorant les facteurs numériques, nous obtenons

$$f \simeq \frac{J}{R^3} e^{-J_c/J} = k \frac{J}{J_c} e^{-J_c/J} \quad (7.24)$$

avec $k = J_c/R^3$. Nous retrouvons les expressions de f et k dérivées à partir du modèle de suction.

Temps de sortie

De nos données expérimentales nous pouvons également extraire le temps nécessaire à un biopolymère d'ADN pour sortir du pore, c'est-à-dire le temps entre le moment où nous le détectons, ce qui correspond au moment où il entre dans le volume d'illumination du ZMW, et celui où il quitte ce dernier (Figure 7.5 (A)); c'est que nous appelons le temps de sortie qui peut aussi être interprété comme la durée d'un évènement.

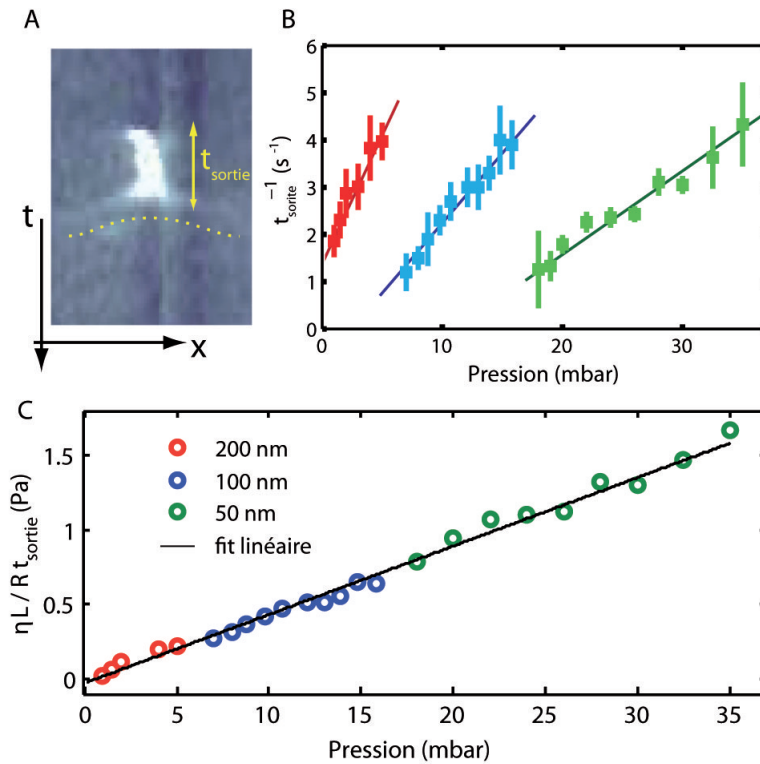


FIGURE 7.5 – (A) Représentation temporelle d'un évènement : le début est marqué par une soudaine augmentation de la fluorescence mesurée et la fin par une élongation conique floue (ligne pointillée). (B) Évolution de l'inverse du temps de sortie en fonction de la différence de pression appliquée pour des diamètres de pore de 200 nm (rouge), 100 nm (bleu) et 50 nm (vert). (C)

Pour déterminer ce temps de sortie, nous utilisons un script basé sur celui de détection automatique des évènements présenté en 5.2.1. Celui-ci permet de visualiser les évènements dans le temps comme montré en Figure 7.5 (A), il nous suffit alors d'indiquer le début et la fin de ceux-ci pour l'ensemble des évènements et le script fournit une moyenne du temps de sortie sur cet ensemble. Les résultats ainsi obtenus pour des diamètres de pores de 200 nm, 100 nm et 50 nm sont présentés en Figure 7.5 (B).

Ces résultats montrent que l'inverse du temps de sortie croît linéairement avec la pression comme on pourrait s'y attendre si l'on suppose qu'une fois la barrière de l'entrée du pore franchie, l'ADN est entraîné par le flux et a une vitesse proportionnelle à celle du flux au travers et hors du pore sans autres obstacles. La vitesse du solvant v_s dépend linéairement de la pression appliquée comme $v_s = P/R_H S_p$ avec S_p la surface du pore. Par conséquent, en notant d la distance sur laquelle l'ADN est dans la zone d'illumination du ZMW, le temps de sortie t_{sortie} varie comme l'inverse de la vitesse de l'ADN v_{ADN} avec $t_{\text{sortie}} = d/v_{\text{ADN}} \propto d/v_s$ donc finalement $t_{\text{sortie}}^{-1} \propto P$.

Si l'on considère que $v_{\text{ADN}} = v_s$, on peut obtenir une expression pour le temps de sortie :

$$t_{\text{sortie}} = \frac{8\eta L d}{R^2 P} \quad (7.25)$$

avec L et R la longueur et le rayon du pore respectivement. d est proportionnelle au rayon du pore (cf. 4). On peut alors écrire le temps de sortie comme :

$$t_{\text{sortie}} \propto \frac{8\eta L}{R P} \quad (7.26)$$

La Figure 7.5 (C) représente l'expression $\eta L/R t_{\text{sortie}}$ en fonction de la pression pour 200 nm, 100 nm et 50 nm de diamètre. Toutes les courbes tombent sur une courbe maîtresse en accord avec notre modèle élémentaire d'entraînement par le flux.

Conclusions et discussion

Nos résultats constituent la première observation en molécule unique et en temps réel du passage d'ADN au travers d'une membrane nanoporeuse ainsi que la première mesure du flux critique, tel que défini dans le modèle de succion de Brochard et de Gennes, pour un biopolymère semi-flexible comme l'ADN. Ceux-ci viennent confirmer les conclusions de Long et *coll.* et Béguin et *coll.* sur l'indépendance du flux critique vis-à-vis de la taille des pores. Nous mesurons $J_c = 0,025 k_B T/\eta$, ce qui nous situe entre la valeur obtenue par Béguin et par Long à $0,22 k_B T/\eta$ et celle obtenue par Wu à $0,006 k_B T/\eta$ [16].

Nos mesures sont aussi les premières à fournir une information quantitative sur la dynamique de passage, via la mesure de la fréquence de passage et du temps de sortie. Nous montrons que nous sommes dans un régime dominé par le confinement pour $J \leq J_c$ où le temps de diffusion de l'ADN jusqu'au pore est négligeable devant le temps nécessaire au passage de la barrière. Nous avons essayé d'observer la dynamique d'entrée en aspirant les ADN dans les pores côté or, cependant l'accumulation des molécules à l'entrée des pores à bas flux ($J \leq J_c$) rend ces mesures impossibles car nous ne sommes alors plus capables de distinguer individuellement les ADN.

On pourrait cependant discuter de la validité du modèle de succion pour les pores de 50 nm de diamètre. En effet, l'applicabilité du régime de blobs de de Gennes lorsque le diamètre D du pore devient plus petit que la longueur de Kuhn de l'ADN est discutable.

Plaçons nous dans le cas où $D < l_p$. Nous sommes alors dans le régime de Odijk, illustré Figure 7.6, où l'ADN s'organise dans le pore en segment de Odijk de longueur $\lambda_s = (l_p D^2)^{1/3}$ avec un angle de déviation θ avec la paroi. Reprenons le raisonnement du modèle de succion dans cette configuration :

La variation d'énergie libre pour faire entrer une portion d'ADN sur une longueur X du pore va être



FIGURE 7.6 – Configuration de l'ADN à l'intérieur du pore en régime de Odijk.

donnée par l'énergie libre de confinement de $X/(\lambda_s \cos \theta)$ segments de Odijk et par le travail fourni par l'écoulement sur ces segments. Le premier terme s'écrit (cf. 1.2.1)

$$\Delta F_{\text{conf}} = k_B T \frac{X}{\lambda_s \cos \theta} \quad (7.27)$$

L'écoulement interagit avec la section des segments d'Odijk orthogonale au pore sur une distance X , le travail qu'il fournit s'écrit alors

$$W = -\eta \lambda_s \sin \theta \cdot v \cdot \frac{X}{\lambda_s \cos \theta} X \quad (7.28)$$

La variation totale d'énergie libre ΔF est donc

$$\Delta F = k_B T \frac{X}{\lambda_s \cos \theta} - \eta J \tan \theta \left(\frac{X}{D} \right)^2 \quad (7.29)$$

en remplaçant v par son expression en fonction de J . Si l'on se place dans le cas où $D \ll l_p$ alors $\theta \simeq D/\lambda_s$, $\cos \theta \simeq 1$ et $\tan \theta \simeq \theta$, d'où

$$\Delta F = k_B T \frac{X}{\lambda_s} - \eta J \left(\frac{X}{\lambda_s D} \right)^2 \quad (7.30)$$

On calcule le maximum de ΔF par rapport à X et on obtient

$$\Delta F^* = k_B T \frac{J_c D}{J \lambda_s} = k_B T \frac{J_c}{J} \left(\frac{D}{l_p} \right)^{1/3} \quad (7.31)$$

Dans ce régime la hauteur de la barrière dépend du diamètre du pore et nous remarquons que pour D très petit la barrière est quasi-nulle. Ce cas de figure est similaire aux cas de bâtonnets rigides étudié par L.Auvray [11] où il propose que la seule contrainte à l'entrée d'un bâtonnet dans un pore de taille petite devant la longueur du bâtonnet est d'aligner l'axe du bâtonnet avec celui du pore. Pour D très petit, le passage de l'ADN dans le pore serait donc dominé par le temps nécessaire à l'alignement d'une extrémité de la chaîne avec l'entrée du pore et non par le passage de la barrière – similairement au cas de l'entraînement par un champ électrique. L'étude de cette cinétique pose un intéressant problème de physique statistique.

Si nous supposons l'expression (7.31) valable pour l'ADN dans un pore de 50 nm de diamètre alors on trouve un flux critique J'_c tel que

$$J'_c = J_c \left(\frac{D}{l_p} \right)^{1/3} = 0,91 J_c \quad (7.32)$$

L'erreur sur la mesure du flux critique est proche de 10% dans nos expériences. On ne peut donc pas distinguer le régime de blobs du régime d'Odijk expérimentalement. Pour $D = 50$ nm la condition d'alignement n'est pas pertinente, la cinétique d'entrée est donc la même que l'on considère un régime de blob ou un régime d'Odijk.

7.1.3 Fonctionnalisation des pores avec des polymères neutres

Comme nous l'avons montré dans les paragraphes précédents, notre dispositif expérimental est particulièrement adapté à l'étude de polymères en molécule unique. Les expériences de translocation d'ADN- λ constituent une référence à partir de laquelle d'autres phénomènes peuvent être examinés qu'ils soient de nature physique ou chimique. En effet, il est possible de modifier l'interaction entre le pore et l'ADN en greffant des polymères sur la couche d'or. Analyser l'impact de ce greffage sur la fréquence de sortie permet de remonter à la modification de la barrière énergétique à l'entrée et d'en tirer des informations quantitatives sur l'interaction en jeu.

Nous avons réalisé de telles expériences en greffant des polymères de polyéthylène glycol (PEG) avec une terminaison thiol (PEG-SH) permettant de fixer les polymères sur la couche d'or par une interaction forte entre l'atome de soufre du thiol et l'or. Nous avons observé l'effet du greffage de PEG-SH neutres, chimiquement et électriquement, de trois masses moléculaires différentes : 356 Da, 10 kDa et 30 kDa sur le passage d'ADN- λ .

Matériel

Le matériel suivant a été nécessaire :

- mPEG-thiol 356 Da, fourni par *Polypure* en solution de 1 g ;
- 1 g PEG-SH 10 kDa déshydraté, fourni par *Interchim Ultima* ;
- 1 g PEG-SH 30 kDa déshydraté, fourni par *Interchim Ultima* ;
- 1 mL de solution d'acide chloridrique de Tris(2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP) à 0,5 M, fournie par *Sigma-Aldrich*.

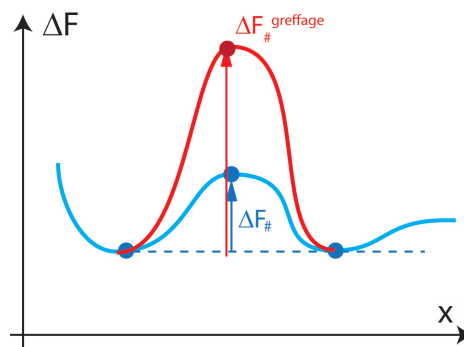


FIGURE 7.7 – Modification de la hauteur de la barrière énergétique par le greffage de polymère sur les pores.

Protocole de greffage

Nous suivons le protocole détaillé dans [72] pour le greffage des polymères de PEG-thiol sur la couche d'or à l'exception que nous n'utilisons pas d'urée, non-nécessaire dans notre cas (aucunes protéines en solution).

Le protocole est le suivant :

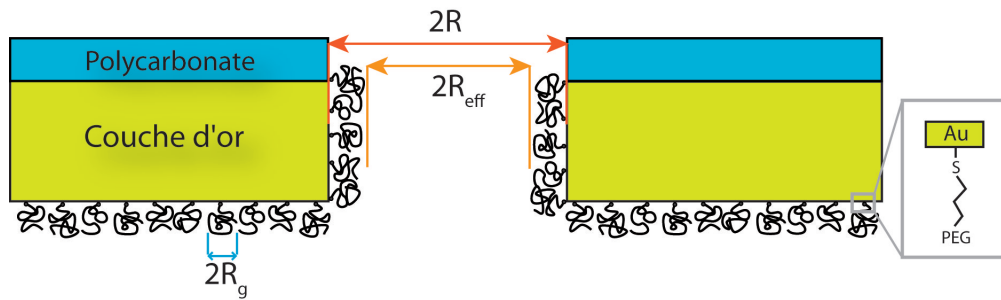


FIGURE 7.8 – Schéma illustrant un pore après fonctionnalisation par des PEG-SH. La densité de greffage est telle que les polymères de PEG-SH prennent une forme en champignon.

- faire baigner une membrane dorée dans une solution de HNO_3 à 30% sous hôte pendant une heure, puis rincer à l'eau *milli-Q* ;
- déposer $100 \mu\text{L}$ d'une solution à 2 mM PEG-SH et 5 mM TCEP sur la surface d'or de la membrane et laisser incuber pendant 30 minutes sous atmosphère humide ;
- rincer à l'eau *Milli-Q* pour éliminer l'excédant de PEG-SH.

La concentration en PEG-SH choisie est standard pour obtenir un greffage dense [96] rapidement. En présence d'oxygène la terminaison thiol peut être oxydée et former une liaison disulfure avec un autre thiol, c'est pourquoi nous ajoutons un réducteur, le TCEP, afin de détruire les liaisons disulfures qui pourraient se former et maintenir la capacité de greffage des thiols. Il est aussi envisageable d'effectuer le greffage sous atmosphère inerte, mais ceci complique l'opération et nécessite un équipement spécifique (boîte à gant).

La membrane une fois fonctionnalisée se conserve au maximum une journée dans une solution de TCEP. Au-delà de ce délai, les terminaisons thiol s'oxydent et les chaînes forment des agrégats qui bouchent les pores.

Résultats

Les résultats présentés ici sont fruits d'expériences faites par moi-même pour le mPEG-thiol (356 Da) et par Charisios Zandes pour les autres greffages, dans le cadre d'un stage de Master 2.

Les expériences de translocation se déroulent exactement comme décrit dans le cadre des pores nus. Nous avons mesuré l'évolution de la fréquence de sortie en fonction de la différence de pression appliquée. Les courbes obtenues sont bien ajustées par l'expression (7.10) de la fréquence de sortie établie avec le modèle de succion et les pressions critiques déterminées à partir des fits sont données en tableau 7.2. Nous n'avons pas analysé l'évolution du pré-facteur k car nous n'avons pas obtenu des résultats suffisamment reproductibles. Le manque de reproductibilité provient du fait que nous ne contrôlons pas la densité de pores passants après greffage, celle-ci variant d'un greffage à l'autre.

TABLE 7.2 – Données fonctionnalisation PEG : Valeurs de P_c pour les différents polymère de PEG greffés sur des pores de 50 nm de diamètre

Fonctionnalisation	P_c (mbar)
PEG-SH 356 Da	172 ± 22
PEG-SH 10 kDa	256 ± 3
PEG-SH 30 kDa	583 ± 15

Nos résultats montrent que la fonctionnalisation modifie la pression critique. Nous allons proposer un modèle d'encombrement du pore qui permet d'expliquer les variations observées.

Nous faisons l'hypothèse que les polymères n'ont aucune interaction avec l'ADN, que par conséquent ils n'ont qu'un effet d'encombrement stérique dans le pore, réduisant le diamètre accessible au flux. Pour mieux caractériser cet effet il nous faut connaître la structure des polymères de PEG-SH à l'intérieur du pore. Nous supposons que les PEG-SH se comportent comme des chaînes idéales en bon solvant. Lorsque ceux-ci viennent se greffer sur la surface d'or, ils forment des « champignons » (Figure 7.8) ou plus précisément des boules de rayon R_g , le rayon de giration du polymère. Les liaisons thiols (et de fait les polymères avec elles) migrent sur la surface d'or. Au bout de quelques minutes, un état d'équilibre est atteint où la densité de polymère est maximum et telle que la surface est entièrement recouverte de champignons qui se touchent. Il n'est alors plus possible d'ajouter un polymère supplémentaire, mais des échanges ont lieu avec la solution.

Pour atteindre une densité de greffage supérieure et obtenir une brosse de polymères étendus, il faut employer une autre stratégie de greffage en faisant croître les polymères sur des précurseurs fixés sur la surface d'or à la densité désirée.

Dans le cas du PEG de 356 Da considérer qu'il forme un champignon n'est pas pertinent cependant. En effet, si nous désignons par monomère de PEG une unité de PEG (C_2H_4O) d'une masse molaire de 44 g.mol^{-1} alors le PEG-SH de 356 Da a un nombre de monomères $N = 8$, celui de 10 kDa $N = 227$ et celui de 30 kDa $N = 682$.

Dans le cas d'une chaîne idéale, on peut exprimer l'énergie libre de la chaîne F en fonction de la distance bout à bout r comme [40] :

$$F(r) = F(0) + \frac{3}{2}k_B T \frac{r^2}{R_g^2} \quad (7.33)$$

où F_0 est une constante. Pour passer d'une configuration idéale où $r = R_g$ à une configuration étendue où $r = l_c$ il faut donc une énergie

$$\Delta F = \frac{3}{2}k_B T \left(\frac{l_c^2}{R_g^2} - 1 \right) \propto k_B T (N - 1) \quad (7.34)$$

L'énergie nécessaire pour atteindre la configuration étendue est donc de quelques $k_B T$ pour le PEG de 356 Da. On s'attend alors à ce qu'il forme une brosse de hauteur l_c la longueur de contour avec $l_c = bN$ où b est la taille d'un monomère avec $b = 0,37 \text{ nm}$ d'après [103] [87] à l'intérieur du pore. Pour le 356 Da, $l_c = 3 \text{ nm}$ et nous définissons un rayon effectif pour le pore fonctionnalisé R_{eff} tel que $R_{\text{eff}} = R - l_c$.

Nous voyons également que pour les PEG plus longs (10 et 30 kDa), l'énergie nécessaire à les étendre

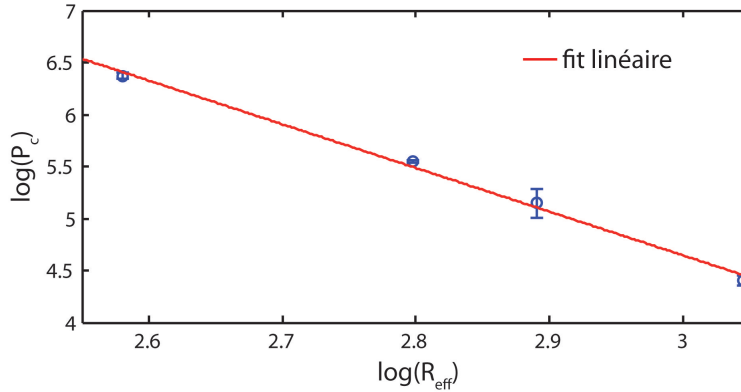


FIGURE 7.9 – Rayon efficace R_{eff} du pore fonctionnalisé en fonction de la pression critique P_c en échelle log–log.

TABLE 7.3 – Données fonctionnalisation : Valeurs de k et P_c pour les différents polymère de PEG greffés sur des pores de 50 nm de diamètre

Fonctionnalisation	R_g (nm)	R_{eff} (nm)	P_c (mbar)
sans PEG-SH		21 ± 0.25	82 ± 4
PEG-SH 356 Da	$l_c = 3$	18 ± 0.25	172 ± 22
PEG-SH 10 kDa	2, 3	16.4 ± 0.25	256 ± 3
PEG-SH 30 kDa	3, 9	13.2 ± 0.25	583 ± 15

est de plusieurs centaines de $k_B T$, ils ne seront donc jamais spontanément dans cette configuration. Ils forment donc une couche de polymère en « champignon » telle que présentée en Figure 7.8 où nous définissons un rayon effectif R_{eff} pour le pore tel que $R_{\text{eff}} = R - 2R_g$.

Nous sommes dans la situation où le flux est imposé par une différence de pression au travers d'un pore de rayon R_{eff} . Ceci est effectivement le cas car la déformation imposée par le flux de solvant est plus longue que le temps de relaxation des polymères de PEG (contrairement à l'ADN dont le temps de relaxation est bien plus important car bien plus long). Le flux sent donc des sphères rigides formées par les PEGs.

Le tableau 7.3 donne les valeurs de R_g (l_c pour le 356 Da), R_{eff} et P_c pour chaque fonctionnalisation. La courbe $\log(P_c)$ en fonction de $\log(R_{\text{eff}})$ (Figure 7.9) montre une loi de puissance avec un coefficient $\alpha = -4,2 \pm 0,1$. On a donc $P_c \propto R_{\text{eff}}^{-4}$ en accord avec un régime de Poiseuille où le rayon accessible à l'écoulement est égal au rayon efficace tel que nous l'avons défini.

Ces résultats sont en accord avec le modèle de pore encombré que nous avons proposé et valide les modèles de la couche de PEG-SH utilisés. Ils montrent aussi la grande sensibilité de notre technique, en mesure de détecter des changements de diamètre de pore de 14%. Nous avons également montré que nous pouvons directement relier la taille du pore à l'organisation de la couche de polymère.

7.2 Translocation de fragments d'ADN- λ , d'ADN de phage T4 et d'ARN

Le flux critique de translocation d'un polymère déterminé par le modèle de succion ne dépend pas de la taille du polymère. Nous avons testé cette indépendance en comparant les résultats obtenus pour l'ADN- λ avec ceux obtenus pour l'ADN de phage T4 qui est plus de trois fois plus long, des fragments d'ADN- λ (Hind III) et de l'ARN de phage $\phi 6$. Par ailleurs, le modèle de succion ayant été développé pour des polymères flexibles et les biopolymères que nous utilisons étant semi-flexibles, l'utilisation de l'ARN nous permet d'étudier l'effet d'un changement de la longueur de persistance, celle de l'ARN différant de celle de l'ADN, et d'observer l'impact éventuel de ce changement.

7.2.1 Translocation de fragments d'ADN- λ *Hind III*

L'ADN- λ est digéré par l'enzyme *Hind III* en 7 fragments comprenant de 564 à 23 130 paires de base. Nous suivons le même protocole expérimentale que pour l'ADN- λ pour effectuer les expériences de translocation. Les résultats obtenus pour des pores de 100 nm de diamètre sont présentés en Figure 7.10. La courbe de fréquence de sortie des fragments d'ADN- λ /HIII est linéaire et se superpose à celle de l'ADN- λ ce qui est en accord avec la prédiction d'indépendance du flux critique avec la taille de l'ADN du modèle de succion. Si ce n'était pas le cas, l'on s'attendrait à observer des changements de pente successifs à mesure que les ADN de taille de plus en plus grande passent et la superposition avec la courbe de l'ADN- λ ne serait pas possible. Nous n'observons pas d'effet de seuil sur la courbe avec les fragments d'ADN- λ /HIII car le fragment le plus petit a un rayon de giration de seulement 63 nm (WLC).

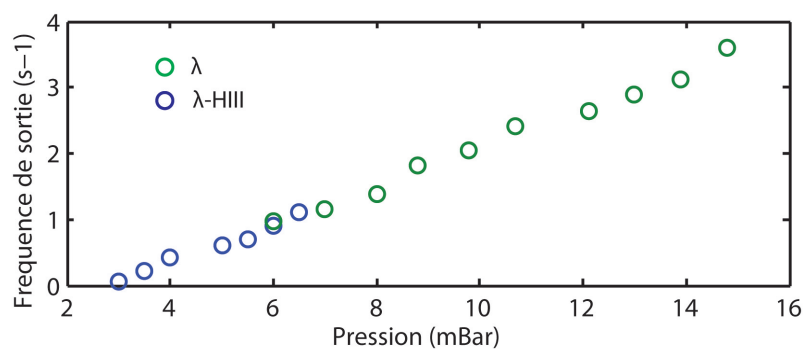


FIGURE 7.10 – Fréquence de sortie normalisée en fonction de la pression pour l'ADN- λ (vert) et pour les fragments d'ADN- λ /HIII (bleu) au travers de pores de 100 nm de diamètre.

7.2.2 Translocation d'ADN de phage T4

L'ADN de phage T4 est un ADN de 166 000 paires de base, son rayon de giration est de $1,17 \mu\text{m}$ (chaîne idéale). Le protocole expérimental suivi est le même que pour l'ADN- λ . Les résultats obtenus sont présentés en Figure 7.11 et en tableau 7.4.

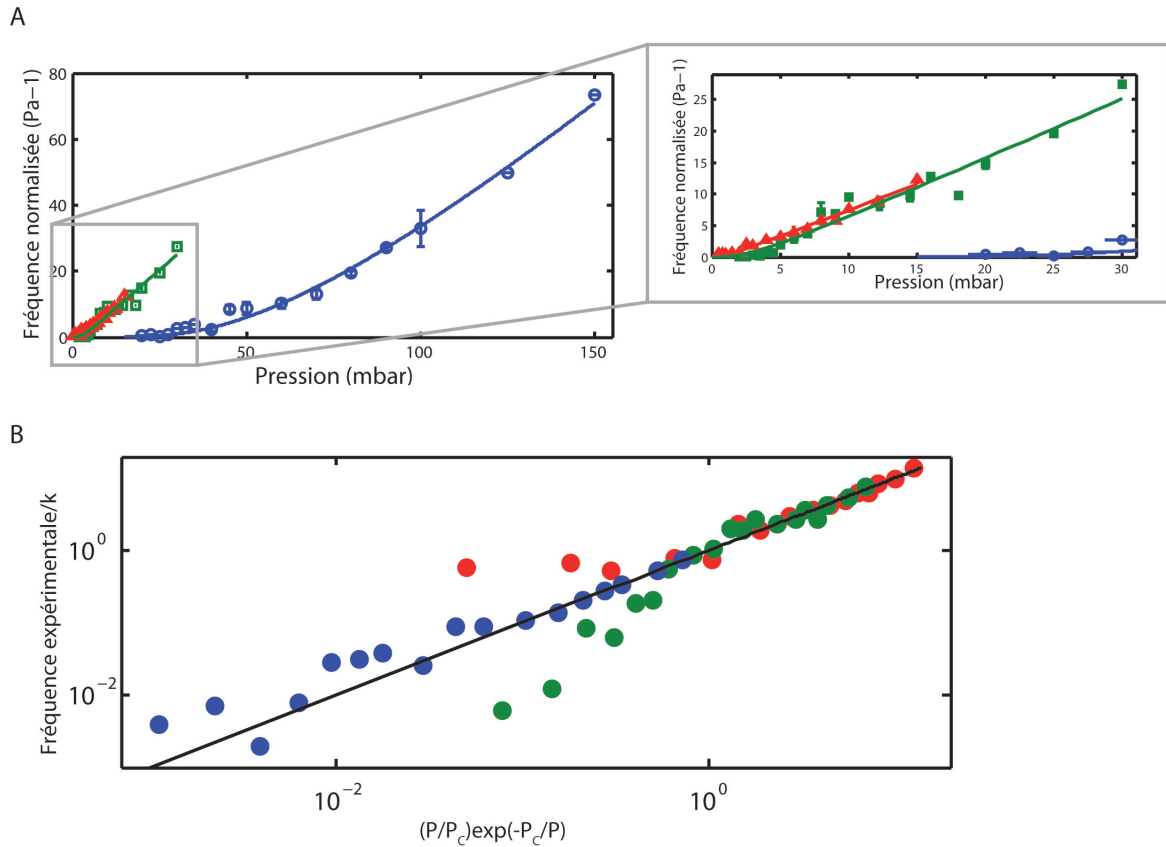


FIGURE 7.11 – (A) Fréquence normalisée en fonction de la pression pour de l'ADN-T4 dans des pores de 200 nm (rouge), 100 nm (vert) et 50 nm (bleu) de diamètre. L'encadré est un agrandissement de la courbe autour des basses pressions. (B) Courbe maîtresse représentant la fréquence expérimentale normalisée par le pré-facteur k en fonction de l'expression $(P/P_c)\exp(-P_c/P)$ pour les diamètres de pore de 200 nm (rouge), 100 nm (vert) et 50 nm (bleu).

La courbe (B) Figure 7.11 montre que l'expression (7.10) de la fréquence de passage f est également en accord avec nos mesures dans le cas de l'ADN-T4, et les valeurs de P_c et J_c obtenues sont similaires à celle mesurées pour l'ADN- λ malgré une erreur importante que nous justifierons par la suite. Ces résultats sont conformes à la prédiction du modèle de succion d'indépendance du flux critique vis-à-vis de la longueur du polymère et confirment les observations de Long et de Béguin.

TABLE 7.4 – Données ADN-T4 : Valeurs de k , P_c et J_c pour les diamètres de pores utilisés

Diamètre nominal (nm)	Diamètre (nm)	k (10^{-5} s^{-1})	P_c (mbar)	J_c ($10^{-2} k_B T / \eta$)
50	$42 \pm 0,5$	$34,4 \pm 15,5$	111 ± 11	$3,5 \pm 0,4$
100	$90 \pm 0,7$	$4,9 \pm 1,9$	$3,3 \pm 2,7$	$2,2 \pm 2$
200	$220 \pm 1,8$	$0,48 \pm 0,1$	$0,7 \pm 1,1$	$9,9 \pm 15$

La Figure 7.11 (A) représente la fréquence mesurée normalisée par un facteur $a = k/P_c$ qui a la dimension d'une fréquence sur une pression. Ce facteur représente la « pente » de la courbe.

Le modèle de succion ajuste parfaitement nos données pour chaque expérience, mais contrairement à ce que nous avons observé avec l'ADN- λ le facteur a peut varier pour un même diamètre de pore

dans le cas du T4. Nous l'expliquons par une plus forte interaction du T4 avec le pore. En effet, dans le développement de notre modèle, nous avons fait l'hypothèse que l'ADN n'a aucune interaction (électrostatique, adhésive, frottements) avec le pore et nos résultats avec l'ADN- λ ont montré quelles sont négligeables dans ce cas là. Cependant ce n'est sans doute plus vrai pour l'ADN-T4, 3 fois plus long, donc plus sensible à ces interactions surfaciques et qui va dès lors avoir plus de chance de rester coincé dans le pore. Déjà dans le cas de l'ADN- λ nous observions des ADNs fixés, ceux-ci paraissaient bloqués à l'intérieur du pore. Avec le T4 nous observons d'avantage encore de ces blocages, en témoigne le rapport signal/bruit inférieur à celui de l'ADN- λ (voir 5.1.1) – les molécules bloquées émettant de la fluorescence mais n'étant pas considérées comme des événements. La conséquence de ces blocages est que le nombre réel de pores passants varie d'une membrane à l'autre ce qui justifie un facteur a variable (voir la discussion sur le facteur k). Pallier à ce problème nécessiterait de passiver les pores ce qui impacterait également les mesures (*cf.* fonctionnalisation) et n'est donc pas envisageable.

Quoiqu'il en soit, en normalisant la fréquence mesurée par le facteur a pour chaque expérience, nous pouvons obtenir une courbe expérimentale moyenne pour chaque diamètre de pore (figure 7.11 (A)). Là encore nous avons un très bon accord entre les données expérimentales et le modèle de succion comme en atteste la courbe maîtresse en figure 7.11 (B). Nous observons cependant un léger décrochage pour les pores de 100 nm de diamètre et dans une moindre mesure pour ceux de 200 nm de diamètre. Cela est dû à une erreur plus importante liée à la non-reproductibilité des expériences comme expliqué plus haut.

Nous avons déterminé les valeurs de k données en tableau 7.4 en utilisant la moyenne des valeurs de a obtenues pour chaque diamètre. Nous trouvons $k \propto R^{-\beta}$ avec $\beta = 2,6 \pm 0,4$ en assez bon accord avec l'expression (7.11) et ses valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour l'ADN- λ pour chaque diamètre. Ceci confirme l'indépendance de k vis-à-vis de la concentration, puisque nous travaillons à concentration massique fixe d'une expérience à l'autre, la concentration molaire en ADN-T4 n'est donc pas la même que celle en ADN- λ . Et ceci confirme également son indépendance avec la taille de l'ADN conformément à notre modèle de fréquence d'essai où la dimension caractéristique pertinente est celle du blob et non celle de la chaîne.

En résumé, malgré une reproductibilité moins bonne que pour les expériences avec l'ADN- λ due à la longueur plus importante de l'ADN-T4, nous mesurons un flux critique et des valeurs de k similaires à ce qui a été mesuré pour l'ADN- λ confirmant ainsi l'invariance du flux critique avec la taille de l'ADN et notre modèle de fréquence d'essai.

7.2.3 Translocation d'ARN- $\phi 6$

L'ARN de phage $\phi 6$ est un ARN linéaire double-brin. Nous disposons de trois longueurs 2 948, 4 063 et 6 374 paires de base en solution équimolaire. Leur rayon de giration est de 200 nm, 236 nm, et 297 nm (WLC avec $l_c = 80$ nm) respectivement. Les expériences ont été réalisées en suivant le protocole donné en annexe A et le déroulement des mesures de translocation se fait de la même manière que pour l'ADN- λ . Les résultats obtenus sont présentés en Figure 7.12 et en tableau 7.5.

Les mesures pour le diamètre de pore de 100 nm ont été écartées car il est apparu, après analyse,

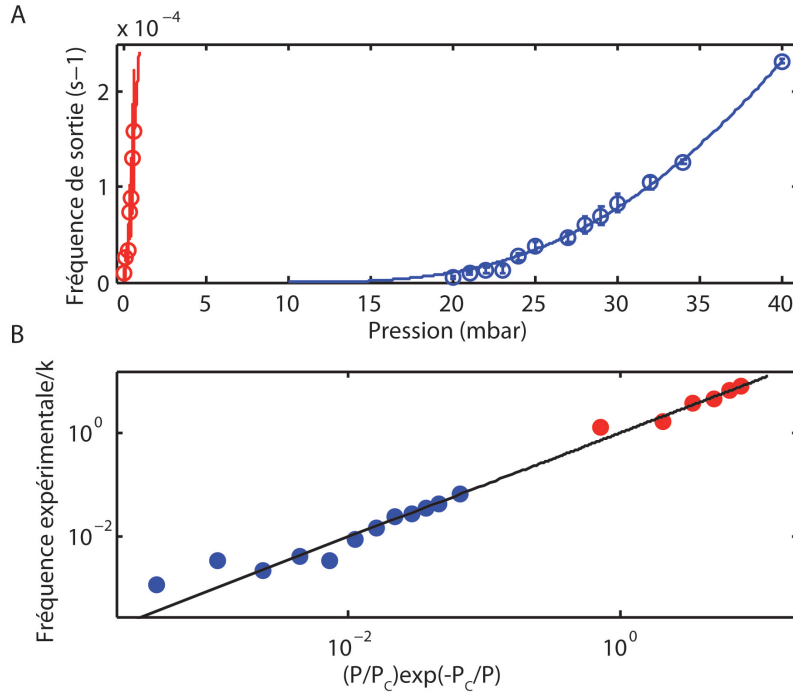


FIGURE 7.12 – (A) Courbe de la fréquence normalisée en fonction de la pression pour des pores de 200 nm (rouge) et 50 nm (bleu) de diamètre pour l'ARN- $\phi 6$. (B) Courbe maîtresse représentant la fréquence expérimentale normalisée par le pré-facteur k en fonction de l'expression $(P/P_c)\exp(-P_c/P)$ pour les diamètres de pore de 200 nm (rouge) et 50 nm (bleu).

TABLE 7.5 – Données ARN- $\phi 6$: Valeurs de k , P_c et J_c pour les diamètres de pores utilisés.

Diamètre nominal (nm)	Diamètre (nm)	k (10^{-5} s^{-1})	P_c (mbar)	J_c ($10^{-2} k_B T / \eta$)
50	$42 \pm 0,5$	$61,4 \pm 12,5$	96 ± 7	$3,0 \pm 0,2$
200	$220 \pm 1,8$	$0,2 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,12$	$1 \pm 1,7$

que nous ne pouvions pas garantir que le diamètre des pores utilisés était bien de 100 nm.

Les mesures sur les pores de 50 nm et 200 nm de diamètre sont bien décrites par le modèle de succion et notre expression de la fréquence de passage (Figure 7.12 (B)). Nous mesurons des flux critiques et des valeurs de k similaires à ceux obtenus pour les ADN λ et T4. k varie comme $R^{-\beta}$ avec $\beta = 3,5 \pm 0,3$; nous avons obtenu le même coefficient pour l'ADN- λ . Ces résultats confirment encore une fois l'invariance du flux critique et de la fréquence d'essai vis-à-vis de la taille du biopolymère et de sa concentration.

La chaîne d'ARN possède une longueur de persistance différente de celle de l'ADN. Elle a été mesurée à environ 63 nm [1] en absence de marquage, soit 15% plus longue que l'ADN non-marqué. Il n'existe pas, à notre connaissance, de mesure de la longueur de persistance de l'ARN associé au YOYO-1 dans la littérature. Nous supposons que le rapport entre la longueur de persistance avec marquage et sans marquage est inchangé entre ADN et ARN, ce qui donne $l_p = 80$ nm pour le complexe ARN/YOYO-1.

La variation de longueur de persistance n'a pas d'impact sur le flux critique mesuré. Ce résultat confirme que nous pouvons appliquer le modèle de succion même pour des diamètres inférieur à la

longueur de persistance, comme nos mesures avec l'ADN- λ le montraient déjà. Il serait intéressant de se placer dans une configuration où $D \ll l_p$, cas dans lequel les effets de la longueur de persistance devraient être importants.

En conclusion

Nous avons montré que les résultats obtenus pour l'ADN- λ sont généralisables à d'autres biopolymères, l'ADN-T4 et l'ARN- $\phi 6$, pour lesquels le modèle de succion et l'expression de la fréquence de passage restent valables. Nous avons également montré que le flux critique mesuré et les valeurs de k mesurées pour chaque diamètre de pore sont similaires d'un biopolymères à l'autre, confirmant ainsi l'invariance de ces grandeurs vis-à-vis de la taille de la chaîne et de la concentration. Enfin les expériences sur l'ARN- $\phi 6$ montrent qu'une faible augmentation (15%) de la rigidité de la chaîne n'affecte pas le flux critique mesuré.

7.3 Translocation d'ADN simple brin

Jusqu'à présent nous avons étudié des biopolymères semi-flexibles que nous avons modélisés comme des polymères flexibles dont les segments ont pour longueur la longueur de Kuhn. Nous allons ici nous intéresser à l'ADN- ϕX , un ADN simple brin de 5 386 bases qui forme des structures secondaires par appariement de ses bases. La présence de ses structures secondaires donne une rigidité à l'ADN simple brin qui adopte une forme de polymère branché et non une forme de pelote comme le montre le calcul de la structure de plus basse énergie du ϕX (Figure 7.13) à l'aide du serveur web [mfold](#) [198]. L'algorithme de mfold détermine les structures de plus faible énergie libre en utilisant la thermodynamique du plus proche voisin ; pour le détail complet de l'algorithme voir [197].

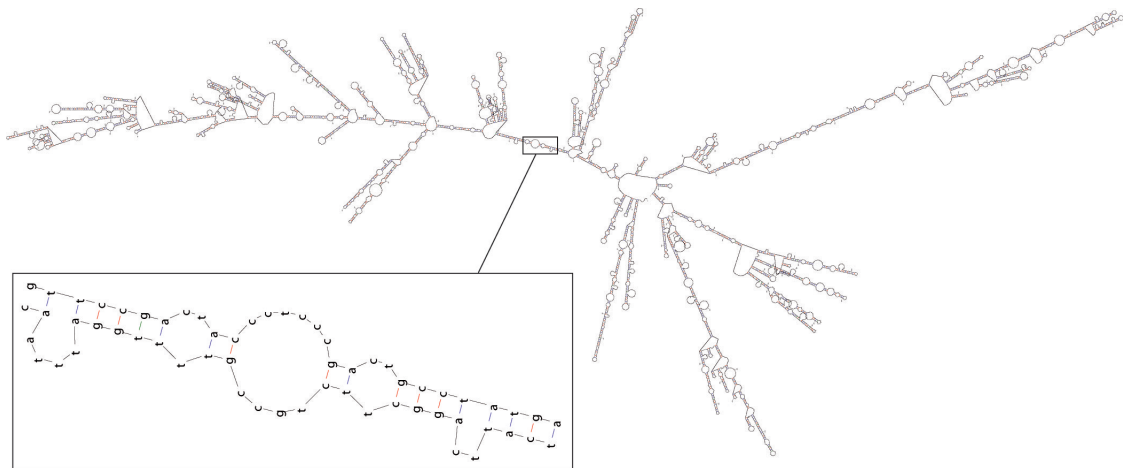


FIGURE 7.13 – Simulation de la structure de plus basse énergie de l'ADN- ϕX réalisée avec le serveur web mfold

7.3.1 Résultats

Les premières expériences effectuées avec l'ADN simple brin se sont montrées très peu reproductibles. Pour remédier à ce problème, nous avons effectué un recuit de l'ADN suivi d'une trempe afin d'obtenir une structure similaire des ADN d'une expérience à l'autre (Figure 7.14).

Pour se faire, nous plaçons un échantillon d'ADN- ϕX dans un bain marie à 80 ° C pendant 10 minutes pour le dénaturer complètement. Puis nous refroidissons l'échantillon à 4 ° C pendant 5 minutes. L'échantillon est ensuite marqué avec du YOYO-1 et les expériences sont réalisées selon le protocole habituel.



FIGURE 7.14 – Illustration du processus d'homogénéisation des structures de l'ADN- ϕX .

Les résultats pour des pores de 50 nm de diamètre sont présentés en Figure 7.15 (A). La fréquence de sortie évolue comme attendu par le modèle de succion aux basses pressions, en revanche, à mesure que la pression augmente, apparaît une saturation de la fréquence de sortie non-prédite par le modèle et que nous n'avons pas observée jusqu'à présent avec les ADN double-brin.

Nous attribuons cet effet de saturation à la présence des structures secondaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons créé des hétéroduplex de ϕX en ajoutant des nucléotides libres (noté dNTP) en excès 10 fois – pour chaque base sur le brin d'ADN, il y a 10 bases complémentaires disponibles – dans la solution d'ADN. Les nucléotides entrent en compétition avec les bases de l'ADN simple brin et viennent se substituer aux appariements tels que ceux mis en évidence Figure 7.13 car énergétiquement plus favorables, entropiquement et enthalpiquement : entropiquement car les nucléotides se fixent sur une base complémentaire sans créer de liaison avec les bases voisines et enthalpiquement car les nucléotides sont en excès.

Les courbes de translocation obtenues avec les hétéroduplex sont présentées en Figure 7.16 (A). L'ajout des nucléotides élimine la saturation de la fréquence de sortie et l'hétéroduplex se comporte tel un ADN double-brin conformément au modèle de succion. Les structures secondaires de l'ADN simple brin semblent donc responsables de la saturation en fréquence.

7.3.2 Modèle de succion pour l'ADN simple-brin

Le modèle de succion ne permet pas de comprendre intégralement les résultats obtenus pour l'ADN simple brin. Ceci n'est pas surprenant dans la mesure où celui-ci ne forme pas une pelote flexible mais une structure rigide et branchée. Nous proposons d'ajouter au modèle un terme d'interaction à l'entrée du pore. Cette interaction a un effet sur :

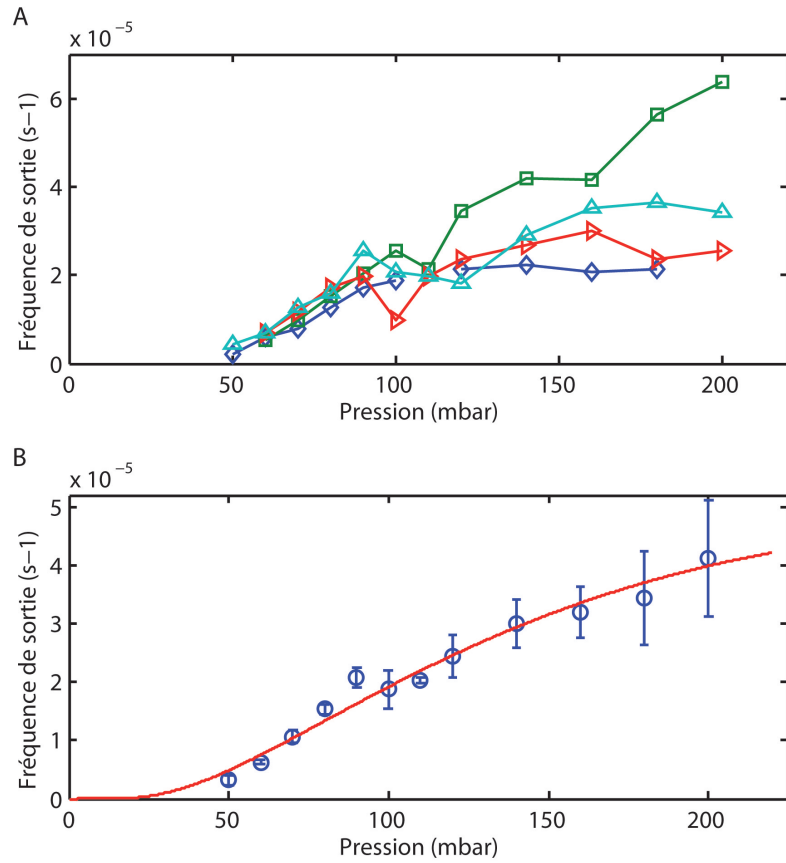


FIGURE 7.15 – Courbes fréquence de sortie en fonction de la pression pour de l'ADN- ϕX dans des pores de 50 nm de diamètre : (A) Quatre expériences. (B) Moyenne des courbes en (A) et fit (ligne continue rouge) avec l'expression (7.42).

i. le paysage énergétique, auquel nous ajoutons un terme de frottement effectif;

ii. la fréquence d'essai, pour laquelle il faut prendre en compte un temps caractéristique d'adhésion.

Nous allons alors déterminer l'expression de la probabilité de passage et de la fréquence d'essai en présence de l'interaction pour établir l'expression de la fréquence de passage.

Faire pénétrer l'ADN sur une longueur X du pore revient à faire pénétrer X/D blobs de diamètre D le diamètre du pore. Le travail de la force de frottement à l'entrée liée à l'introduction de X/D blobs s'écrit $W = \eta' DvX$ avec η' le coefficient de friction et v la vitesse du solvant. La variation d'énergie libre s'écrit alors :

$$\Delta F(X) = E_{confinement} - W_{flux} + W_{frottement} = k_B T \frac{X}{D} - \eta Dv \frac{X^2}{D} + \eta' DvX \quad (7.35)$$

Comme pour le modèle de succion on peut calculer la hauteur de la barrière en cherchant le maximum de ΔF . On obtient :

$$\frac{\Delta F^*}{k_B T} = \frac{J_c}{J} + \left(\frac{\eta'}{\eta} \right)^2 \left(\frac{J}{J_c} \right) + \frac{\eta'}{\eta} \quad (7.36)$$

avec $J_c = k_B T / \eta$, identique au modèle de succion. Nous supposons que $\eta' \ll \eta$ autrement dit que l'interaction à l'entrée est faible devant l'interaction avec le flux. On peut alors négliger le terme de

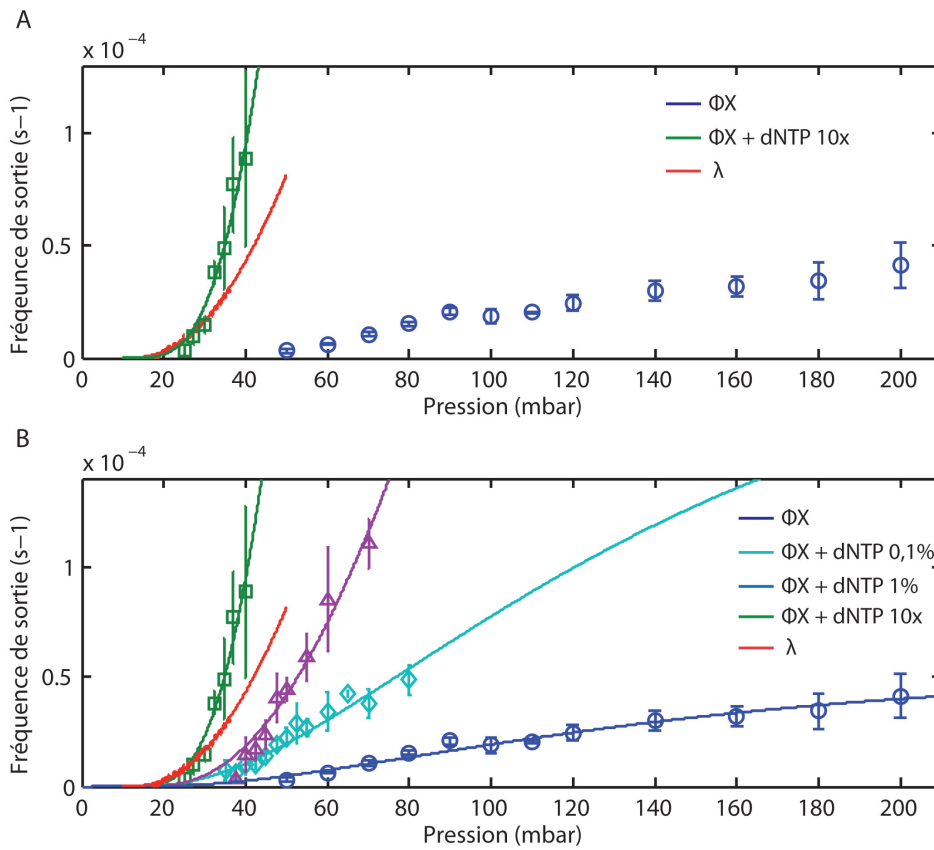


FIGURE 7.16 – (A) Courbes fréquence de sortie en fonction de la pression de l'ADN- ϕX , d'hétéroduplex d'ADN- ϕX et d'ADN- λ pour des pores de 50 nm de diamètre. (B)

second ordre en η'/η dans l'expression de ΔF^* qui devient

$$\frac{\Delta F^*}{k_B T} = \frac{J_c}{J} + \frac{\eta'}{\eta} \quad (7.37)$$

L'interaction à l'entrée du pore ajoute un terme indépendant du flux à la barrière. La probabilité de passage est $P_p = \exp\left(-\frac{J_c}{J} - \frac{\eta'}{\eta}\right)$. Pour $J \gg J_c$, $P_p \simeq \exp(-\eta'/\eta)$ ce qui veut dire que la fréquence de passage sera plus faible que dans le cas sans interactions mais ceci ne permet pas d'expliquer la saturation observée.

Nous définissons la fréquence d'essai à partir de l'intervalle de temps entre deux tentatives de passage τ . Ce temps est la somme du temps caractéristique de déformation d'un blob par le flux τ_f et d'un temps caractéristique d'adhésion τ_a , tel que $\tau = \tau_f + \tau_a$. Le temps caractéristique de déformation est par définition l'inverse du taux de déformation $s = J/R^3$ qui correspond à la fréquence d'essai dans le cas sans adhésion. Pour déterminer l'expression de τ_a en fonction de η' nous considérons que la friction effective est thermiquement activée : $k_B T = \eta' R^3 / \tau_a$. Autrement dit les barrières énergétiques dues à l'adhésion sont surmontées par les fluctuations thermiques. τ_a s'écrit alors

$$\tau_a = \frac{\eta' R^3}{k_B T} \quad (7.38)$$

Ce qui donne

$$\tau = \tau_f + \tau_a = \frac{R^3}{J} + \frac{\eta' R^3}{k_B T} \quad (7.39)$$

Par définition la fréquence d'essai f_e est égale à l'inverse de τ d'où

$$f_e = \frac{J}{R^3 [1 + (\eta'/\eta)(J/J_c)]} \quad (7.40)$$

Connaissant la fréquence d'essai et la probabilité de passage nous obtenons l'expression de la fréquence de passage :

$$f = f_e P_p = \frac{J}{R^3 [1 + (\eta'/\eta)(J/J_c)]} \exp\left(-\frac{J_c}{J} - \frac{\eta'}{\eta}\right) \quad (7.41)$$

$$= k \frac{P/P_c}{1 + (\eta'/\eta)(P/P_c)} \exp\left(-\frac{P_c}{P} - \frac{\eta'}{\eta}\right) \quad (7.42)$$

avec $k = J_c/R^3$ défini comme dans le modèle de succion.

Lorsque $P \gg P_c$:

$$f \simeq \frac{k}{1 + \eta'/\eta} e^{-\eta'/\eta} \quad (7.43)$$

la fréquence de passage devient indépendante du flux lorsque celui-ci est grand devant J_c conformément à ce que nous observons expérimentalement. Notre interprétation est que l'interaction introduite représente la nécessité de détruire les structures secondaires pour permettre à l'ADN d'entrer dans le pore. Le terme de frottement correspond à la force à fournir pour l'ouverture des structures et la séparation des brins ; similairement à l'ouverture d'une fermeture éclair. Le terme d'adhésion donne la cinétique d'ouverture et de séparation des bases.

Nous avons ajusté les données expérimentales par l'expression (7.42) avec pour paramètres ajustables k et η' et P_c fixée à 82 ± 4 mbar la valeur mesurée pour l'ADN- λ . Nous obtenons un bon accord

comme montré en Figure 7.15 (B). Le fit donne $\eta' = (0,69 \pm 0,13)\eta$ et $k = (1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. η' est de l'ordre de η , notre hypothèse d'interaction faible ($\eta' \ll \eta$) est donc discutable.

Afin de confirmer que les structures secondaires sont responsables de la saturation observée conformément à notre interprétation, nous les avons déstabilisées par ajout d'une faible proportion de nucléotides libres. Pour ce faire, nous avons effectué des expériences de translocation avec des solutions d'ADNs simple-brin et de nucléotides présents à 1% et 0,1% en nombre, c'est-à-dire dans le premier cas 1 nucléotide pour 100 bases complémentaires et 1 pour 1000 dans le second. Les résultats sont présentés en Figure 7.16 (B) et montre que pour 1% de nucléotides nous retrouvons une allure correspondant à un ADN double-brin et pour 0,1% la saturation est quasiment absente et nous déterminons $\eta' = (0,94 \pm 0,28)\eta$.

Ces résultats indiquent que les structures secondaires sont peu stables et disparaissent pour une faible concentration en nucléotides, autrement dit qu'une perturbation d'une liaison sur 100 au sein de la structure peut entraîner son ouverture complète. Ces observations suggèrent que l'ouverture correspond à un processus de passage d'une barrière énergétique de hauteur l'énergie d'une liaison. Autrement dit une fois une liaison brisée, le reste de la structure s'ouvre de manière coopérative. Ceci est en accord avec le modèle de frottement effectif que nous proposons où le terme d'adhésion traduit alors la nécessité de séparer chaque liaison une après l'autre, une fois la barrière enthalpique franchie. La valeur du rapport η'/η obtenue – et le fait qu'elle ne varie pas en présence des nucléotides – est cohérente avec ce modèle de dézippage coopératif où la résistance à l'ouverture est inférieure à l'action exercée par le flux.

Cette interprétation est en accord avec les observations de Mathé et *coll.* [105] présentées en 1.3.2 où ils montrent que l'ouverture d'un *hairpin* d'ADN simple-brin peut être décrite par le passage d'une barrière énergétique de hauteur égale à l'enthalpie libre du *hairpin* comme observé par Vercoutere et *coll.* [181] et Howorka et *coll.* [68] également. Il est important de noter que nos mesures ne sont pas sensibles au franchissement de la barrière enthalpique comme c'est le cas dans ces travaux – celle-ci étant négligeable devant le confinement – mais à la cinétique d'ouverture des structures secondaires une fois cette barrière franchie, car ces structures concernent plusieurs milliers de bases.

En conclusion

Nous avons montré que notre dispositif expérimental permet d'étudier la présence de structures secondaires dans l'ADN simple-brin et que celles-ci induisent une saturation de la fréquence de passage pour un flux supérieur au flux critique. Cette saturation est imposée par la nécessité d'ouvrir ces structures secondaires pour permettre le passage de l'ADN dans le pore. Nous avons proposé un modèle introduisant un frottement effectif à l'entrée représentant cette ouverture et nous avons extrait un coefficient de frottement effectif de l'ordre de η . Nos résultats suggèrent que les structures secondaires sont peu stables et s'ouvrent de manière coopérative.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de faire passer des ADNs simple-brin formant des structures secondaires bien définies. Cependant il n'existe pas, à notre connaissance, de méthodes d'ingénierie moléculaire capable de designer des structures de taille suffisante pour ne pas franchir spontanément le pore.

7.4 Translocation d'ADN- λ par un champ électrique

En parallèle des mesures de translocation d'ADN induite par un flux, nous avons également effectué des mesures de translocation d'ADN forcé par un champ électrique. Notre dispositif expérimental est entouré d'une cage de Faraday et équipé d'un appareil de mesure *patch-clamp* qui nous permet d'imposer une différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane poreuse et de mesurer le courant électrique. Les membranes en polycarbonate sont cependant trop épaisses (une dizaine de microns) pour une telle étude; l'observation de translocation au travers de celles-ci nécessiterait une tension de plusieurs volts, ce que notre matériel n'est pas en mesure de fournir. Nous avons alors utilisé des membranes en SiC ou SiN de 50 nm d'épaisseur recouverte d'une couche d'or de 50 nm dans lesquelles un réseau carré de 5×5 pores a été percé par FIB (*cf.* 3.3). Ces membranes ont été fabriquées à façon par l'équipe de J.Gierak au Laboratoire de Photonique et de Nanostructures de Marcoussis. Nous avons eu des diamètres de pore de 170, 150, 140, 130 et 100 nm (ce dernier est uniquement en SiC).

7.4.1 Protocole

Le préparation de l'échantillon se fait de la même manière que pour les expériences en flux excepté que nous collons une membrane en SiC ou SiN sur le bouchon à la place d'une membrane en polycarbonate. Afin de pouvoir appliquer une différence de potentiel, nous introduisons des électrodes en chlorure d'argent (AgCl) dans le réservoir interne du bouchon ainsi que dans la chambre basse (Figure 7.17). Nous avons modifié le support pour permettre l'accès de l'électrode à l'intérieur du bouchon tout en maintenant l'étanchéité de l'ensemble nécessaire à une mise en pression.

L'expérience se déroule exactement comme dans le cas du forçage par un flux. Nous identifions une différence de potentiel à partir de laquelle nous observons des événements de translocation puis nous augmentons la tension jusqu'à ce que nous ne soyons plus capable de distinguer deux événements simultanés. Pour chaque incrément de différence de potentiel, nous enregistrons un film et nous relevons la valeur du courant.

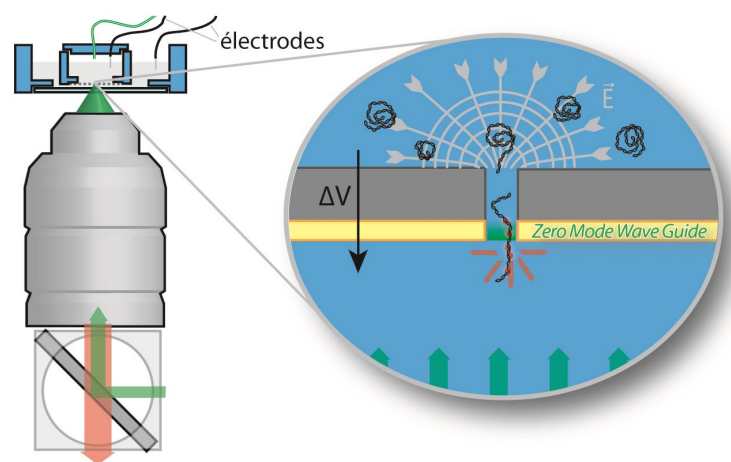


FIGURE 7.17 – Schéma illustrant une expérience de translocation en champ électrique.

7.4.2 Résultats

Les résultats de nos expériences de translocation au travers de pores de SiC et de SiN sont présentés en Figure 7.18 (A) et (B). La figure (C) donne les courbes *I vs V* pour les pores de SiC de diamètres 100 nm, 130 nm et 170 nm. Faute de membranes SiC en plus grande quantité nous n'avons pu effectuer qu'une série de mesure avec ce matériau.

Les courbes *I vs V* sont ajustées par une fonction linéaire conformément à la modélisation usuelle d'un pore comme une résistance électrique. Ces courbes ne passent cependant pas par l'origine, ceci est dû à une mauvaise compensation de la résistance du système de mesure.

Le pore est constitué d'une couche isolante en SiC/SiN de 50 nm suivi d'une couche conductrice en or de 50 nm. Nous avons donc un pore dont la longueur L est proche du diamètre D . Dans cette configuration où $L \simeq D$, nous modélisons le pore par une résistance d'accès $R_a = 1/(\sigma D)$ en série avec une résistance classique $R = L/(\sigma S)$ avec σ la conductivité de la solution et S la surface du pore. La résistance d'un pore s'écrit alors

$$R_p = \frac{1}{\sigma D} + \frac{4L}{\sigma \pi D^2} \quad (7.44)$$

Une membrane comprend 25 pores arrangés en un réseau carré. La résistance total de la membrane correspond donc à la résistance équivalente en parallèle des 25 pores, ainsi $R_{tot} = R_p/25$.

A partir des courbes *I vs V* Figure 7.17 (B) nous pouvons mesurer la conductance totale (ou équivalente) G_{tot} du réseau de pores pour chaque diamètre. Ces conductances sont regroupés dans le tableau 7.6 pour les pores de SiC et le tableau 7.7 pour les pores de SiN.

À partir de l'expression de R_{tot} et sachant que $R_{tot} = 1/G_{tot}$ nous pouvons calculer le diamètre des pores correspondant D_c . Pour une solution de 10 mM Tris KCl nous avons $\sigma = 0,11 \text{ S.m}^{-1}$ et nous obtenons des diamètres de 53 nm, 143 nm et 175 nm pour les pores de SiC de 100 nm, 130 nm et 170 nm respectivement. Et 134 nm, 154 nm et 160 nm pour les pores de SiN de 130 nm, 150 nm et 170 nm respectivement ; les valeurs de D_c pour le SiC et SiN sont regroupés en tableau 7.6 et 7.7 respectivement.

Les valeurs de D_c obtenues ont un écart inférieur à 10% avec les diamètres mesurés en microscopie électronique dans le cas du SiN et des pores de 130 et 170 nm de SiC. Notre modèle de résistance électrique du pore est donc adapté sauf dans le cas des pores de SiC de 100 nm pour lesquels le diamètre calculé est très différent du diamètre mesuré.

Afin d'interpréter l'évolution de la fréquence de passage en fonction de la différence de potentiel appliquée, nous proposons un modèle pour le transport électrique reprenant les arguments du modèle de suction.

Considérons un ADN à l'entrée d'un pore de diamètre $D > l_p$ et de longueur ℓ au travers duquel s'applique une différence de potentiel ΔV . Calculons alors la variation d'énergie libre nécessaire à faire pénétrer l'ADN sur une longueur X du pore. L'ADN forme X/D blobs de diamètre D de charge q_b et le champ électrique dans le pore vaut $\Delta V/\ell$. Le travail fourni par la force électrique pour faire entrer X/D blobs s'écrit alors :

$$W_e = -q_b \frac{\Delta V}{\ell} \frac{X^2}{D} \quad (7.45)$$

La variation d'énergie libre ΔF est donnée par

$$\Delta F = k_B T \frac{X}{D} - q_b \frac{\Delta V}{\ell} \frac{X^2}{D} \quad (7.46)$$

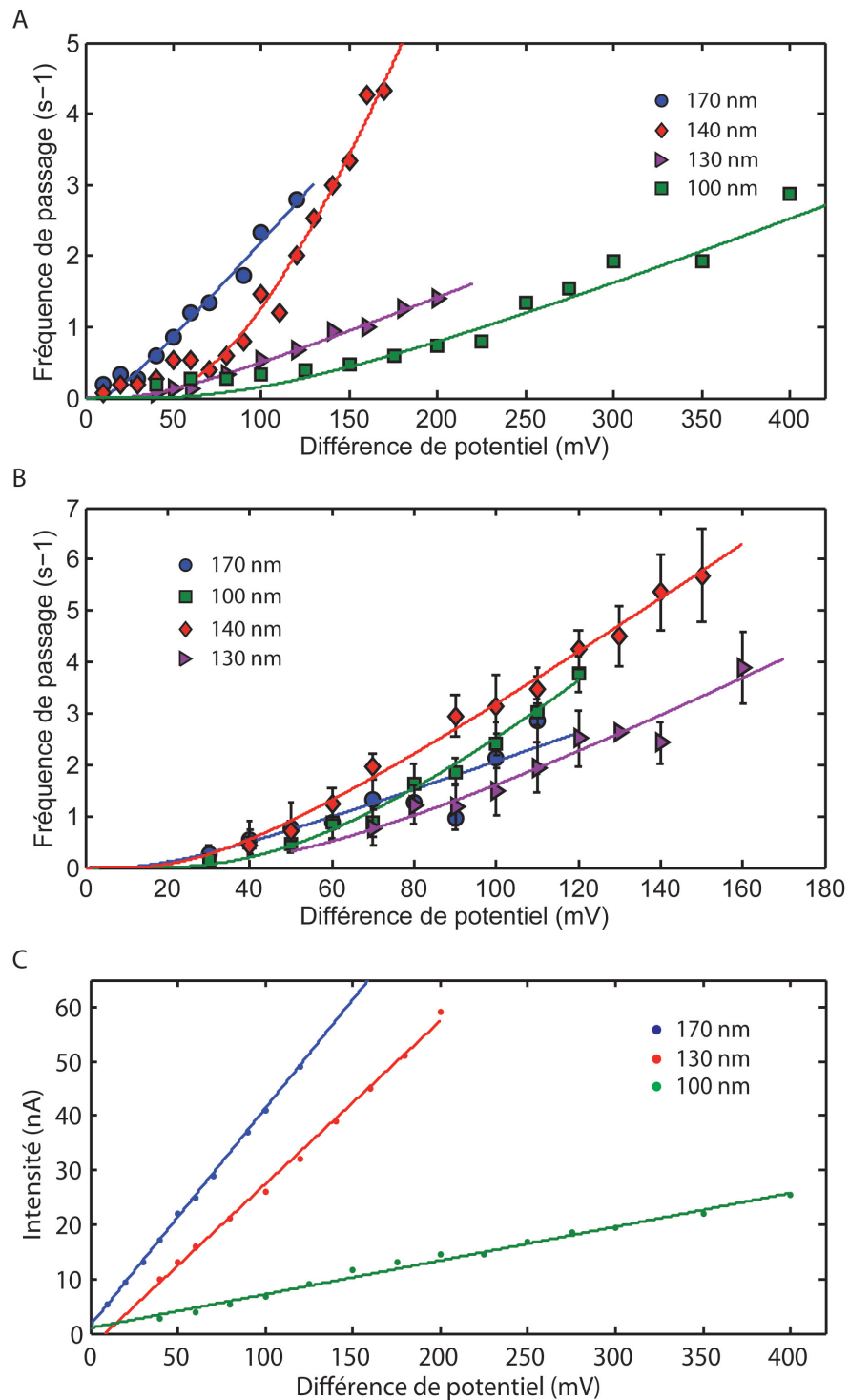


FIGURE 7.18 – Fréquence de passage de l'ADN- λ en fonction de la différence de potentiel appliquée au travers des réseaux de pores de (A) SiC et (B) SiN de diamètres 170 nm (cercles), 140 nm (losanges), 130 nm (triangles) et 100 nm (carrés) (chaque courbe correspond à une seule expérience dans le cas du SiC). (C) Intensité en fonction de la différence de potentiel appliquée pour des pores de SiC de diamètres 170 nm (vert), 150 nm (rouge), 130 nm (bleu).

TABLE 7.6 – V_c , k , G_{tot} et D_c pour les différents diamètres des réseaux de pores en SiC.

Diamètre (nm)	V_c (mV)*	k ($10^{-2}\text{s}^{-1}/\text{mV}$)*	G_{tot} ($10^{-7}\Omega^{-1}$)	D_c (nm)
100	185 ± 97	1 ± 0.35	$0,62 \pm 0,044$	53
130	$69,6 \pm 20$	1 ± 0.15	$3 \pm 0,13$	143
140	177 ± 49	$7,4 \pm 2,5$		
150	81 ± 97	$0,89 \pm 0,35$		
170	$24,5 \pm 11.5$	$2,8 \pm 0,6$	$4 \pm 0,07$	175

*l'erreur est celle du fit avec un intervalle de confiance de 95%

TABLE 7.7 – V_c , k , G_{tot} et D_c pour les différents diamètres des réseaux de pores en SiN.

Diamètre (nm)	V_c (mV)*	k ($10^{-2}\text{s}^{-1}/\text{mV}$)*	G_{tot} ($10^{-7}\Omega^{-1}$)	D_c (nm)
130	92 ± 55	$4,2 \pm 1,8$	2.7 ± 0.26	134 ± 6
140	56 ± 16	$5,6 \pm 0,7$		
150	109 ± 34	$7,5 \pm 0,25$	$3,3 \pm 0.27$	$154 \pm 8,5$
170	$53,5 \pm 37$	$3,9 \pm 1,6$	$3,5 \pm 0.09$	160 ± 5

*l'erreur est celle du fit avec un intervalle de confiance de 95%

On montre alors que la variation d'énergie libre a un maximum ΔF^* valant

$$\Delta F^* = \frac{(k_B T)^2 \ell}{q_b D \Delta V} = k_B T \frac{V_c}{\Delta V} \quad (7.47)$$

avec

$$V_c = \frac{k_B T \ell}{q_b D} \quad (7.48)$$

le potentiel critique défini de la même manière que le flux critique. La probabilité de passage d'un polymère au travers du pore est donné par la probabilité de passer la barrière d'énergie libre donnée par ΔF^* et vaut donc

$$P = \exp\left(-\frac{\Delta F^*}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{V_c}{\Delta V}\right) \quad (7.49)$$

La fréquence de passage f est donnée par le produit de la fréquence d'essai f_e avec la probabilité de passage P . Contrairement au cas de l'entraînement par le flux, f_e est ici dominée par la dérive et non par les fluctuations à l'entrée du pore car l'ADN est sensible au champ électrique même loin du pore. Dans un régime dominé par la dérive, f_e s'écrit [186]

$$f_e = \frac{c\pi D^2 \mu}{4\ell} \Delta V \quad (7.50)$$

où μ est la mobilité électrophorétique de l'ADN et c la concentration. La fréquence de passage à travers un pore est alors donnée par

$$f = \frac{c\pi D^2 \mu}{4\ell} \Delta V \exp\left(-\frac{V_c}{\Delta V}\right) \quad (7.51)$$

Nous avons ajusté nos données par l'expression $f = k\Delta V e^{-V_c/\Delta V}$ avec k et V_c comme paramètres ajustables. Cette expression est en bon accord avec nos données (Figure 7.18) et les valeurs de V_c et k obtenues sont regroupées en tableau 7.6 pour le SiC et 7.7 pour le SiN, et représentées en fonction du diamètre Figure 7.19. Ces résultats sont fortement bruités, ce qui peut s'expliquer par plusieurs

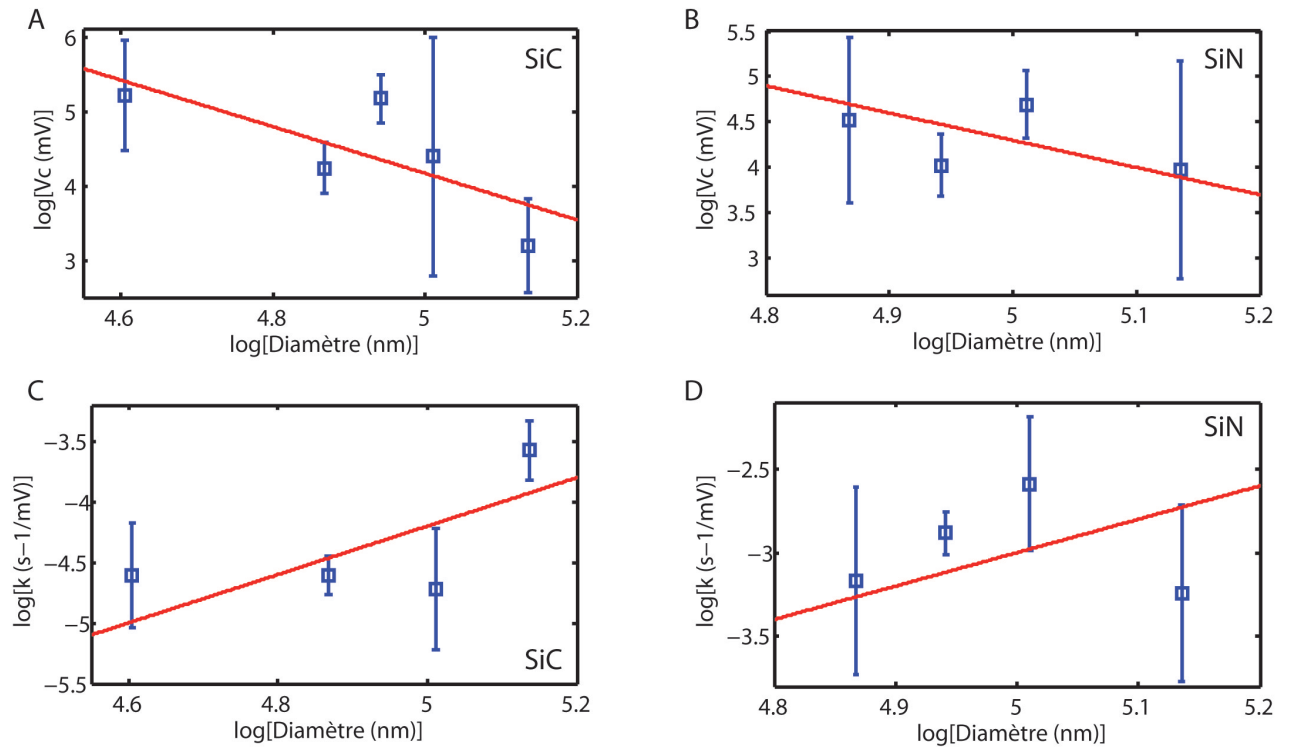


FIGURE 7.19 – Courbes log–log de V_c en fonction du diamètre D avec fit linéaire (rouge) pour : (A) membrane de SiC, coefficient directeur de $-3,1 \pm 0,5$; et (B) membrane de SiN, coefficient directeur de -3 ± 1 . Courbes log–log de k en fonction du diamètre D avec fit linéaire (rouge) pour : (C) membrane de SiC, coefficient directeur de $2 \pm 0,25$; et (D) membrane de SiN, coefficient directeur de $2 \pm 0,5$

facteurs : une faible statistique de données, une variabilité des charges de surface des pores liée au procédé de fabrication, une variabilité du nombre de pores passants pour l'ADN en fonction des membranes (comme dans le cas des membranes *track-etched*), ou encore une variabilité (d'une expérience à l'autre) du nombre de pores dans le champ d'observation – le réseau à une taille supérieure à la fenêtre d'observation, et si nous pouvons localiser le réseau nous ne pouvons pas repérer les pores individuellement.

Malgré le bruit important, nous pouvons tout de même identifier une tendance d'évolution de V_c et k avec le diamètre des pores. Nous trouvons que V_c varie comme $D^{-\alpha}$ et k comme D^β avec $\alpha = -3,1 \pm 0,5$ et $\beta = 2 \pm 0,25$ dans le cas du SiC, et $\alpha = -3 \pm 1$ et $\beta = 2 \pm 0,5$ dans le cas du SiN.

k a pour expression :

$$k = \frac{c\pi D^2 \mu}{4\ell} N_p \quad (7.52)$$

que nous obtenons en prenant simplement l'expression de la fréquence de passage à travers un pore f multipliée par le nombre de pores dans la fenêtre d'observation et passants N_p , dont nous ignorons la valeur exacte (N_p est compris entre 0 et 25). Les coefficients β sont donc en accord avec la dépendance en D^2 donnée par notre modèle.

L'expression (7.48) de V_c donne $V_c \propto 1/q_b D$. La valeur obtenue pour le coefficient $\alpha \simeq 3$ implique alors que la charge d'un blob dans le pore q_b – dont nous ne connaissons pas l'expression – varie comme D^2 , autrement dit seules les charges de surface contribueraient à la charge totale du blob dans le pore.

En conclusion

Nous avons montré que le dispositif de microscopie à effet ZMW est adaptable à l'observation en molécule unique du passage d'ADN entraîné par un champ électrique en mesurant la fréquence du passage d'ADN- λ à travers un réseau de pores percé dans une matrice de SiN ou SiC en fonction de la différence de potentiel appliquée. En adaptant le modèle de succion au cas électrique, nous avons dérivé une expression de la fréquence de passage en accord avec nos résultats expérimentaux.

Ces résultats diffèrent des observations de Wanunu et *coll.* qui ont mesuré une dépendance linéaire du taux de capture (équivalent de la fréquence de passage) d'ADN- λ avec la différence de potentiel à travers un pore de SiN de 7 nm de diamètre [186]. Ceci s'explique par le fait qu'ils sont dans un régime où la barrière due au confinement est négligeable. En effet, ils sont dans le cas où le diamètre du pore est très petit devant la longueur de persistance de l'ADN, c'est le régime d'Odijk pour lequel nous avons montré (7.1.2) que la barrière à l'entrée est négligeable lorsque $D \ll l_p$. Or nous utilisons des pores pour lesquels $D > 2l_p$, le confinement n'est alors plus négligeable et c'est pourquoi nous observons un comportement similaire à celui de l'entraînement par le flux.

Enfin l'étude de la tension critique V_c suggère que la charge d'un blob d'ADN à l'intérieur du pore est dominée par ses charges surfaciques. Ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être confirmés.

7.5 Conclusions et perspectives

Ce chapitre consacré à la translocation d'acides nucléiques a démontré la capacité de notre dispositif expérimental à observer – en temps réel et à l'échelle de la molécule unique – et caractériser cette translocation ainsi que sa sensibilité à de faibles variations du rayon des pores ainsi qu'à la présence de structures secondaires dans l'ADN. Nous avons montré que le passage de l'ADN à travers un pore est dominé par le franchissement de la barrière énergétique de confinement à son entrée, telle que décrite dans le modèle de succion développé par de Gennes et Brochard, et dérivé une expression de la fréquence de passage en accord avec nos mesures quelque soit le biopolymère utilisé. Nos résultats valident la prédiction d'invariance du flux critique d'insertion dans le pore vis-à-vis de la taille de l'ADN du modèle de succion déjà observé dans la littérature [16, 94], et montrent que la fréquence de passage est indépendante de la concentration en ADN et de sa taille.

Nous proposons un modèle adapté du modèle de succion pour décrire le passage d'ADN simple-brin qui incorpore l'ouverture des structures secondaires par un frottement effectif à l'entrée. Ce modèle décrit bien nos mesures expérimentales qui suggèrent une ouverture coopérative des structures secondaires une fois une barrière enthalpique surmontée, en accord avec les expériences d'ouverture de *hairpin* d'ADN simple-brin.

Enfin nous avons effectué des expériences de translocation d'ADN entraîné par un champ électrique et montré qu'un modèle inspiré du modèle de succion permet de décrire nos mesures. Là encore, et contrairement à ce qui a été observé pour des pores de très faible diamètre (< 10 nm), le passage est dominé par une barrière de confinement.

Pour compléter ces travaux, il conviendrait d'étudier divers aspects que nous n'avons pas explorés pour des raisons de temps ou de faisabilité. Nous allons ici détailler quelques uns d'entre eux.

En premier lieu il nous faudrait faire varier les paramètres influents sur le flux critique, à savoir la température et la viscosité. Nous avons essayé de faire varier la viscosité de la solution d'ADN par ajout de glycérol, cependant nous n'avons pas été en mesure d'observer de translocation dans ces conditions. Nous pensons que le glycérol provoque une agglomération de l'ADN due à la pression osmotique qu'il génère, bloquant ainsi tout transport. Une alternative serait d'utiliser des liquides ioniques qui ont une viscosité supérieure à l'eau et dans lesquels l'ADN est soluble [27].

L'étude de l'impact de la température est plus complexe puisqu'elle impose également une variation de la viscosité. Elle imposerait également d'isoler thermiquement le dispositif expérimental, ce qui nécessite un aménagement important.

Dans nos expériences, nous avons eu recours à des pores de taille proche ou supérieure à la longueur de persistance de l'ADN. Il serait intéressant d'explorer le régime de Odijk, où le diamètre des pores est petit devant la longueur de persistance (< 30 nm), et d'étudier la validité de l'expression (7.31) que nous avons dérivée à partir du modèle de succion pour ce régime. Nous sommes cependant rapidement limités en diamètre dans le cas de l'entraînement par un flux, les pressions à appliquer pour atteindre le flux critique devenant vite excessives lorsque l'on diminue le diamètre des pores.

Comme mentionné dans l'étude du pré-facteur k , nous n'avons pas étudié l'influence de la concentration en ADN de manière exhaustive. Il serait en particulier intéressant de se placer en régime semi-dilué, dans les conditions de forçage osmotique, pour se comparer aux études de Guillot et coll. [63].

Enfin, notre dispositif permettant de combiner entraînement par un flux et application d'un champ électrique, nous pouvons envisager de modifier le paysage énergétique par le champ électrique et mesurer son impact sur la valeur du flux critique. Des expériences similaires ont été réalisées par Lu et coll. [97] où ils ont montré qu'il est possible de ralentir le passage de l'ADN avec un flux opposé à l'entraînement par le champ électrique.

Chapitre 8

Évolution de la structure du réseau de FG-Nups avec la concentration en importin β 1

Le second aspect de ce travail a été l'étude des mécanismes de transport dans le pore nucléaire en adaptant les techniques d'observations développées pour la translocation de biopolymères. Comme nous l'avons vu en Introduction (2), ces mécanismes sont complexes et sont le résultats des interactions entre trois éléments : le pore nucléaire, le complexe cargo–transporteur et le gradient de RanGTP/RanGDP. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux pores nucléaires extraits d'ovocytes de *Xenopus laevis* (xénope) et en particulier à l'interaction entre le réseau de FG–nucléoporines présent à l'intérieur du pore nucléaire et une karyophérine, l'importin β 1, et plus spécifiquement à l'impact de la concentration en importin β 1 sur l'extension spatiale du réseau de FG-Nups.

Dans ce chapitre nous allons présenter l'expérience reposant sur la diffusion passive de biopolymère de très petite taille ($\simeq 2$ nm) que nous avons mise au point pour estimer la dimension du canal au centre du réseau de FG-Nups, les résultats que nous avons obtenus en absence d'importin β 1 et l'évolution de la taille du canal central en fonction de la concentration en importin β 1.

8.1 Diffusion à travers l'enveloppe nucléaire d'ovocytes de xénope

Dans toute la suite de ce travail, nous allons modéliser le canal central du pore nucléaire par un cylindre dont nous voulons déterminer le rayon et dont la longueur est l'épaisseur de l'enveloppe nucléaire. Afin d'estimer le rayon moyen du canal central des pores nucléaires d'ovocyte de xénope, nous avons adapté à notre dispositif expérimental la méthode d'OSTR (*Optical Single Transporter Recording*) développée par R. Peters [76] (voir 2.1.2) reposant sur la mesure de la diffusion de molécules sondes fluorescentes au travers de l'enveloppe nucléaire supportée par une membrane poreuse en polycarbonate. Le principe est simple : la membrane nucléaire sépare deux chambres dans l'une desquelles est placée à un instant zéro la molécule sonde ; puis l'on mesure l'évolution de la fluorescence dans le temps à partir de l'instant zéro dans l'une ou l'autre chambre. La fluorescence étant directement liée

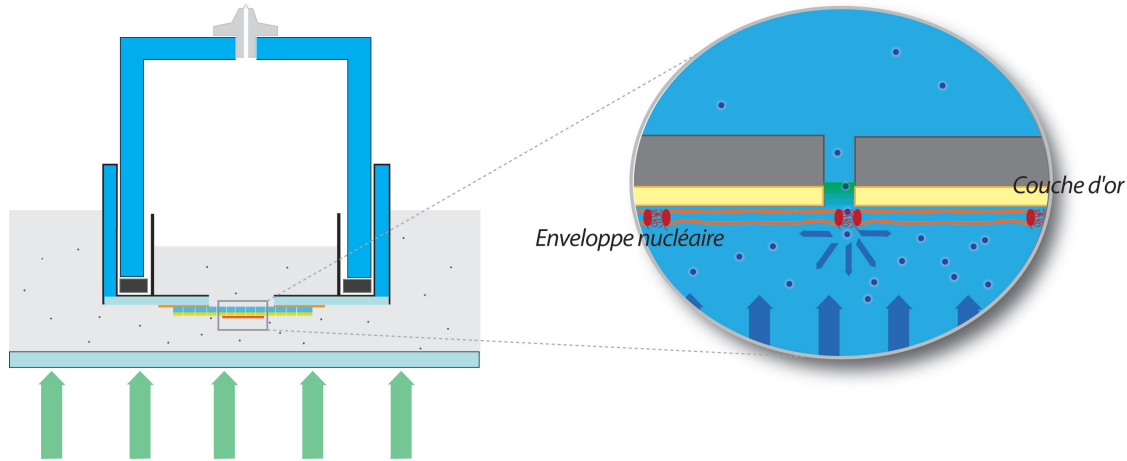


FIGURE 8.1 – Schéma du montage de mesure de diffusion au travers de l'enveloppe nucléaire

à la diffusion des molécules sondes, il est aisé d'extraire de ces mesures le rayon moyen des canaux de diffusion (le canal central des pores nucléaires) de l'EN.

Le dispositif expérimental est identique au montage de microscopie ZMW, la seule différence tient à la présence de l'enveloppe nucléaire collée sur la surface d'or de la membrane de polycarbonate (Figure 8.1). Nous utilisons des pores de 200 nm de diamètre, ce qui nous permet d'avoir en moyenne un pore nucléaire pour un pore solide. En effet le nombre moyen de pores nucléaires sur la surface du pore solide s'écrit :

$$N_p = \sigma \pi R^2 \quad (8.1)$$

avec σ la densité de pore nucléaire et R le rayon nominal du pore de polycarbonate. Pour un ovocyte de stade VI, nous avons mesuré $\sigma = 36 \text{ pores}/\mu\text{m}^2$ en super-résolution optique (cf. 6.5) d'où $N_p = 1,1$.

Keminer et col. [76] ont estimé le nombre de pore nucléaire par pore solide de manière plus fine en simulant des distributions de pores nucléaires à partir d'image de microscopie électronique, puis ont compté les correspondances avec une distribution de pores solides. Pour une densité $\sigma = 50 \text{ pores}/\mu\text{m}^2$ (cette valeur est une surestimation) et des pores de 180 nm de diamètre, ils ont trouvé que les pores solides contiennent pour environ 70% un pore nucléaire, 20% deux, 5% trois et moins de 3% n'en contiennent aucun. Dans notre étude nous faisons la supposition que nous n'avons qu'un pore nucléaire par pore solide, ce qui est une approximation raisonnable et justifiée par le fait que nous n'avons pas d'estimation précise de ce taux d'occupation.

8.1.1 Modèle diffusif

Nous souhaitons estimer le rayon du canal central R_p du pore nucléaire en mesurant la diffusion de molécule sonde. Pour ce faire nous modélisons notre système comme illustré en Figure 8.2, où l'enveloppe nucléaire d'épaisseur e repose sur la surface d'or d'une membrane de polycarbonate d'épaisseur ℓ dont les pores ont un rayon R . La distance entre l'enveloppe nucléaire et la surface de verre de la chambre basse est notée L .

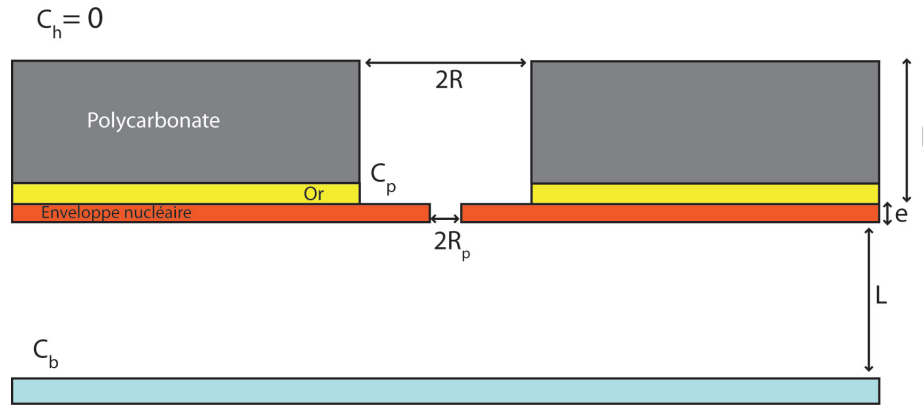


FIGURE 8.2 – Schéma simplifié d'un pore nucléaire sur la membrane de polycarbonate

A l'instant $t = 0$ s une concentration C_0 de molécules sondes est introduite dans la chambre basse. On note la concentration C_c dans la chambre basse, C_p la concentration dans le pore de polycarbonate et C_h la concentration dans la chambre haute. $C_h = 0 \text{ mol.m}^{-3}$ à tout t et $C_p = 0 \text{ mol.m}^{-3}$ à l'instant initial. Nous voulons déterminer le temps caractéristique de déplétion d'un volume de particules $V = LS$ sous l'enveloppe nucléaire avec S un élément de surface de l'enveloppe nucléaire. Le flux ϕ au travers du pore nucléaire est donné par :

$$\phi = p(C_b - C_p) \quad (8.2)$$

où p est la perméabilité d'un pore nucléaire avec :

$$p = \frac{Ds}{e} \quad (8.3)$$

où D est le coefficient de diffusion de la molécule sonde, s la surface du pore nucléaire telle que $s = \pi R_p^2$. Un bilan de particules sur le volume V donne

$$V \frac{dC_b}{dt} = -\phi S = -\sigma p S (C_b - C_p) \quad (8.4)$$

avec σ la densité de pores. Finalement on a l'équation différentielle suivante :

$$\tau \frac{dC_b}{dt} + C_b = C_p \quad (8.5)$$

où

$$\tau = \frac{eL}{\sigma D \pi R_p^2} \quad (8.6)$$

Pour résoudre l'équation 8.5, il nous faut connaître l'évolution de la concentration dans le pore. Le temps de diffusion d'une particule au travers du pore τ_p vaut ℓ^2/D . Pour une particule sphérique d'un rayon hydrodynamique de 2 nm son coefficient de diffusion D est d'environ $100 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ à 20°C en utilisant la formule de Stokes–Einstein. On obtient alors $\tau_p = 1$ s.

Dans l'expérience la distance L a été mesurée à $110 \mu\text{m}$, nous estimons alors un τ de 230 s en prenant un rayon pour le canal central du pore nucléaire de 5 nm et une épaisseur de l'enveloppe nucléaire de 50 nm ce qui correspond aux valeurs données dans la littérature [76, 137, 129].

On a donc $\tau \gg \tau_p$, on peut par conséquent négliger le temps de diffusion au travers du pore de

polycarbonate et considérer que $C_p = C_h = 0 \text{ mol.m}^{-3}$. Ceci nous permet de résoudre simplement l'équation 8.5 et on obtient :

$$C_b(t) = C_0 e^{-t/\tau} \quad (8.7)$$

Si nous supposons que l'intensité lumineuse I émise par les molécules sondes dans la chambre basse est directement proportionnelle à leur concentration telle que $I = k_{\text{fluo}} C_b$ avec k_{fluo} un facteur numérique représentant l'intensité lumineuse émise par une molécule sonde alors

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (8.8)$$

avec $I_0 = k_{\text{fluo}} C_0$. Dans ces conditions la mesure de l'évolution de la fluorescence dans le temps permet de calculer le rayon moyen du canal central du pore nucléaire.

Comme mentionné au début de cette section, nous supposons que nous avons un pore nucléaire par pore de polycarbonate. Si nous incluons dans notre développement la possibilité d'avoir deux pores nucléaires par pore de polycarbonate alors nous avons une densité de pores avec un taux d'occupation de 1, $\sigma_1 = 0,7\sigma$ et une densité de pores avec un taux d'occupation de 2, $\sigma_2 = 0,2\sigma$ en reprenant les statistiques de Keminer et *coll.*. Nous pouvons alors écrire la perméabilité de la membrane P comme $P = \sigma_1 p + \sigma_2 (2p) = 1,1\sigma p$ ce qui donne un $\tau = (eL)/(1,1\sigma D\pi R_p^2)$. En conclusion, si nous faisons l'hypothèse que nous avons la même statistique que Keminer et *coll.* nous aurions une erreur de 10% sur notre estimation du rayon en ne tenant pas compte des pores « doubles ». Cette erreur est tolérable en l'absence de statistiques robustes pour nos expériences.

8.1.2 Protocole expérimental

Une membrane de polycarbonate dorée est collée sur un bouchon *Nanion* identiquement aux expériences de translocations d'ADN. Une enveloppe nucléaire extraite d'un ovocyte de xénope est déposée sur la couche d'or selon le protocole détaillé en 6.3. À ce stade nous avons l'enveloppe nucléaire fixée sur la couche d'or de la membrane collée au bouchon et recouverte d'une goutte de 100 μL de Mock 3. Nous y ajoutons 1 μL d'une solution de RNase A à 1 mM que nous laissons incuber à température ambiante pendant 15 à 20 minutes. Cette étape est nécessaire car, au moment de l'ouverture de l'ovocyte, nous interrompons les échanges entre noyau et cytoplasme, des ARNs peuvent alors rester bloqués à l'intérieur des pores nucléaires ; la RNase permet d'éliminer ces ARNs. Nous verrons dans la suite que l'utilisation de la RNase provoque bien une ouverture du pore en le dégageant des ARNs l'obstruant partiellement.

Après cette période d'incubation, la RNase est rincée puis nous ajoutons un marqueur de l'enveloppe nucléaire, un complexe de WGA-tétraméthylrhodamine. Nous introduisons 10 μL d'une solution de WGA-tétraméthylrhodamine à 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et nous laissons incuber à température ambiante pendant 10 minutes. L'échantillon est ensuite rincé et prêt à être utilisé.

Nous introduisons 200 μL de Mock 3 dans la chambre basse et 100 μL de Mock 3 dans la chambre du bouchon. Le bouchon est alors vissé sur le support et introduit dans la chambre basse exactement comme dans les expériences de translocation.

L'enveloppe nucléaire ne recouvre pas la totalité de la surface d'or, seulement une portion, il faut donc la situer avant de pouvoir effectuer les mesures. En effet, si l'on suppose que l'on étale parfaitement

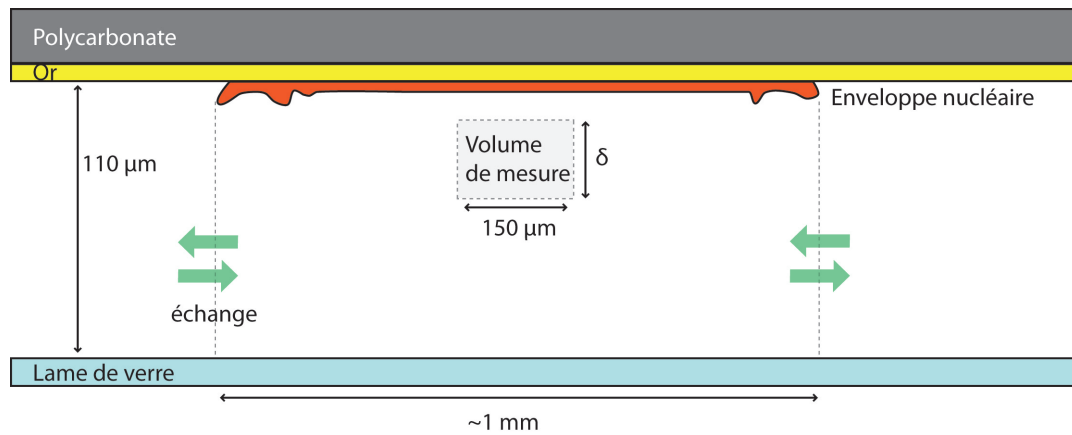


FIGURE 8.3 – Schéma représentant la mesure de l'intensité lumineuse en volume. δ représente la profondeur de champ de l'objectif utilisé. Les échelles ne sont pas respectées.

la totalité de l'enveloppe nucléaire sur l'or et que le noyau a un diamètre de $500\mu\text{m}$ alors elle occupe une surface $S_{\text{noyau}} = 0,78\text{mm}^2$ – ceci est une surestimation, en réalité des plis se forment – pour une surface d'or accessible à l'expérience $S_{\text{or}} = 3,1\text{mm}^2$, autrement dit l'enveloppe nucléaire occupe environ 25% de la surface d'or accessible. Nous ne disposons pas de méthode de repérage a priori de la membrane nous permettant de la situer sur la surface d'or, c'est pourquoi nous la marquons.

Comme mentionné en 6.4, la WGA inhibe le transport sélectif sans inhiber la diffusion passive au travers du pore nucléaire. Cependant, il est probable que la présence de la WGA impacte l'espace disponible à la diffusion passive, nous avons par conséquent utiliser la concentration minimum de marqueur nous permettant de repérer la membrane.

Nous avons choisi comme fluorophore la tétraméthylrhodamine car son spectre ne recouvre pas celui de l'Alexa 488, ce qui est nécessaire pour visualiser la membrane sans que celle-ci ne parasite ensuite les mesures de diffusion.

La fenêtre d'observation de notre dispositif est un carré de $150\mu\text{m}$ par $150\mu\text{m}$ soit une surface de 0.0225mm^2 ce qui est inférieure à la surface occupée par l'enveloppe nucléaire étalée. Nous disposons la fenêtre d'observation au centre de l'enveloppe dans une zone avec un minimum d'inhomogénéités (plis, résidu du contenu du noyau etc.). Nous plaçons alors la fenêtre d'observation en retrait d'une vingtaine de micromètres de l'enveloppe afin que nos mesures ne soient pas parasitées par la fluorescence émise par celle-ci ou par la couche d'or. Nous prenons alors une mesure de l'intensité lumineuse dans le volume (voir 5.1.2), cette mesure correspond au bruit.

Keminer et col. [76] ont montré que du dextran 4kDa diffuse librement au travers de l'enveloppe nucléaire d'ovocyte de xénope et mesuré un rayon hydrodynamique de 2,4 nm. Dans nos expériences, nous suivons la diffusion au travers de l'enveloppe nucléaire de dextran 3kDa complexé à de l'Alexa 488. A cette fin, nous préparons $300\mu\text{L}$ d'une solution de 40ng/mL de dextran 3kDa dans du Mock 3 à partir d'une solution de dextran 3kDa de $2\mu\text{g/mL}$.

Les $300\mu\text{L}$ de solution de dextran sont injectés dans la chambre basse au temps $t = 0\text{s}$ qui marque le début de l'expérience de diffusion. Une mesure en volume de l'intensité lumineuse est effectuée au temps $t = 0\text{s}$ et toutes les 10s jusqu'à $t = 120\text{s}$, puis toutes les 30s jusqu'à $t = 300\text{s}$ et enfin toutes

les 60 s jusqu'à $t = 600$ s.

Pour chaque mesure, nous calculons l'intensité lumineuse moyenne correspondante en utilisant la méthode décrite en 6.4. Ces données sont alors ajustées par l'expression dérivée dans notre modèle :

$$I_0 e^{-t/\tau} + I_\infty \quad (8.9)$$

Enfin nous représentons nos données en utilisant une intensité lumineuse normalisée I_{norm} telle que

$$I_{\text{norm}} = \frac{I - I_\infty}{I_0} \quad (8.10)$$

où I est l'intensité lumineuse moyenne mesurée. Tous les courbes présentées dans la suite de cette partie représentent l'intensité lumineuse normalisée en fonction du temps. Ceci nous permet de comparer différentes expériences entre elles, les valeurs de I_∞ et I_0 variant d'une expérience à l'autre.

8.1.3 Pertinence du modèle

Le schéma Figure 8.3 illustre les conditions expérimentales de la mesure de l'intensité lumineuse en volume. Le volume en question est donnée par la fenêtre d'observation sur la profondeur de champ de l'objectif notée δ . La profondeur de champ est donnée par :

$$\delta = \frac{n\lambda}{ON^2} \quad (8.11)$$

avec n l'indice de réfraction de l'eau, λ la longueur d'onde et ON l'ouverture numérique. Pour l'objectif utilisé $ON = 1,2$, et $\lambda = 488$ nm nous obtenons $\delta = 450$ nm. Ce qui donne un volume de mesure de $10\,000 \mu\text{m}^3$.

Ce volume est faible devant le volume total sous la portion d'enveloppe que nous regardons – c'est-à-dire le volume entre l'enveloppe et la lame de verre pour une surface de la taille de la fenêtre d'observation – mais cette mesure est tout de même pertinente car nous pouvons considérer la concentration en dextran homogène sur la hauteur L . En effet, pour le dextran de 3 kDa dont le rayon hydrodynamique est inférieur à 2,4 nm (rayon hydrodynamique du dextran 4 kDa) le coefficient de diffusion D est d'environ $100 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Or on a $D\delta t = L^2$ où δt est le temps moyen nécessaire à une molécule de dextran pour parcourir L et $\delta t = 120$ s. δt est inférieur au temps total de l'expérience de 600 s, l'hypothèse de concentration homogène en dextran est donc valable. Tout se passe comme si nous échantillonnons le volume total avec notre volume de mesure.

D'autre part, le modèle tient compte d'un volume sous l'enveloppe fermé. En réalité, l'enveloppe ne recouvrant pas toute la surface de l'or, il y a des échanges entre le volume situé hors de l'enveloppe et celui sous l'enveloppe. Nous l'avons vu, le temps de diffusion au travers des pores de polycarbonate est plus de 200 fois plus rapide qu'au travers de l'enveloppe nucléaire ce qui implique que la concentration sous l'or est bien plus faible que celle sous l'enveloppe. Il y a donc également une diffusion latérale qui vient diminuer la concentration en dextran dans le volume sous l'enveloppe. Cependant, pour un volume de mesure situé au centre de l'enveloppe le temps de diffusion moyen du centre vers le bord est de 2500 s ce qui est quatre fois supérieur à la durée de l'expérience. Nous pouvons donc raisonnablement négliger ce flux diffusif dans notre modèle.

Le modèle de diffusion au travers de l'enveloppe nucléaire que nous proposons est donc pertinent dans le cadre de nos expériences et pourra être utilisé pour estimer le rayon moyen du canal central des pores nucléaires.

8.2 Résultats

8.2.1 Validation du protocole expérimental

Afin de valider notre démarche expérimentale, nous avons réalisé plusieurs expériences tests :

- premièrement nous avons mesuré la diffusion du dextran 3 kDa au travers de la membrane de polycarbonate recouverte d'or, sans enveloppe nucléaire, pour évaluer la pertinence de notre modèle dans ce cas simple et avoir une référence à laquelle se comparer ;
- nous avons vérifié « l'étanchéité » de l'adhésion de l'enveloppe nucléaire avec la couche d'or en mesurant la diffusion d'une molécule qui ne diffuse pas passivement au travers des pores nucléaires, la BSA. Ceci nous permet également de vérifier l'hypothèse que nous pouvons négliger les échanges avec le volume hors-enveloppe ;
- enfin nous avons mesuré la diffusion du dextran 3 kDa à travers une enveloppe nucléaire marquée de deux manières différentes : marquage au DIL, ou marquage à la WGA-tétraméthylrhodamine. Ses expériences ont été effectuées sans traitement avec des RNases et sans karyophérines.

Diffusion de dextran 3 kDa au travers de la membrane de polycarbonate

La Figure 8.4 (A) présente les résultats obtenus pour la diffusion de dextran 3 kDa au travers de la membrane de polycarbonate. Nous observons une décroissance exponentielle de l'intensité lumineuse conforme à ce que le modèle de diffusion prédit et l'expression que nous avons dérivée du modèle $I_{\text{norm}} = e^{-t/\tau}$ décrit bien nos données. Nous nous sommes assurés que la décroissance de l'intensité lumineuse est bien due à la diffusion et non au photoblanchiment. En l'absence de membrane de polycarbonate nous n'observons pas de décroissance de l'intensité lumineuse sur la durée de l'expérience ce qui exclut le photoblanchiment.

Nous extrayons de ces données $\tau = 107 \pm 6$ s. Dans le cas de la diffusion au travers de la membrane de polycarbonate, nous connaissons l'épaisseur et la taille des pores, nous pouvons donc calculer le coefficient de diffusion des molécules de dextran 3 kDa à partir de l'expression (8.6), et

$$D = \frac{eL}{\sigma\pi R_p^2\tau} \quad (8.12)$$

ici $\sigma = 3.10^{12}$ pores.m⁻², $e = 10$ μm, $R_p = 110 \pm 0,9$ nm (rayon mesuré) d'où $D = (90 \pm 7)$ μm².s⁻¹. Keminer et *col.* ont mesuré par photoblanchiment [138] un coefficient de diffusion de 89 μm².s⁻¹ pour du dextran 4 kDa. Nous pouvons également calculer le coefficient de diffusion du dextran 3 kDa à partir de la relation de Stokes–Einstein. Le rayon hydrodynamique dépend de la taille du polymère comme $R_h \propto N^{1/2}$ pour une chaîne idéale. On peut calculer ainsi le rayon hydrodynamique du dextran 3 kDa

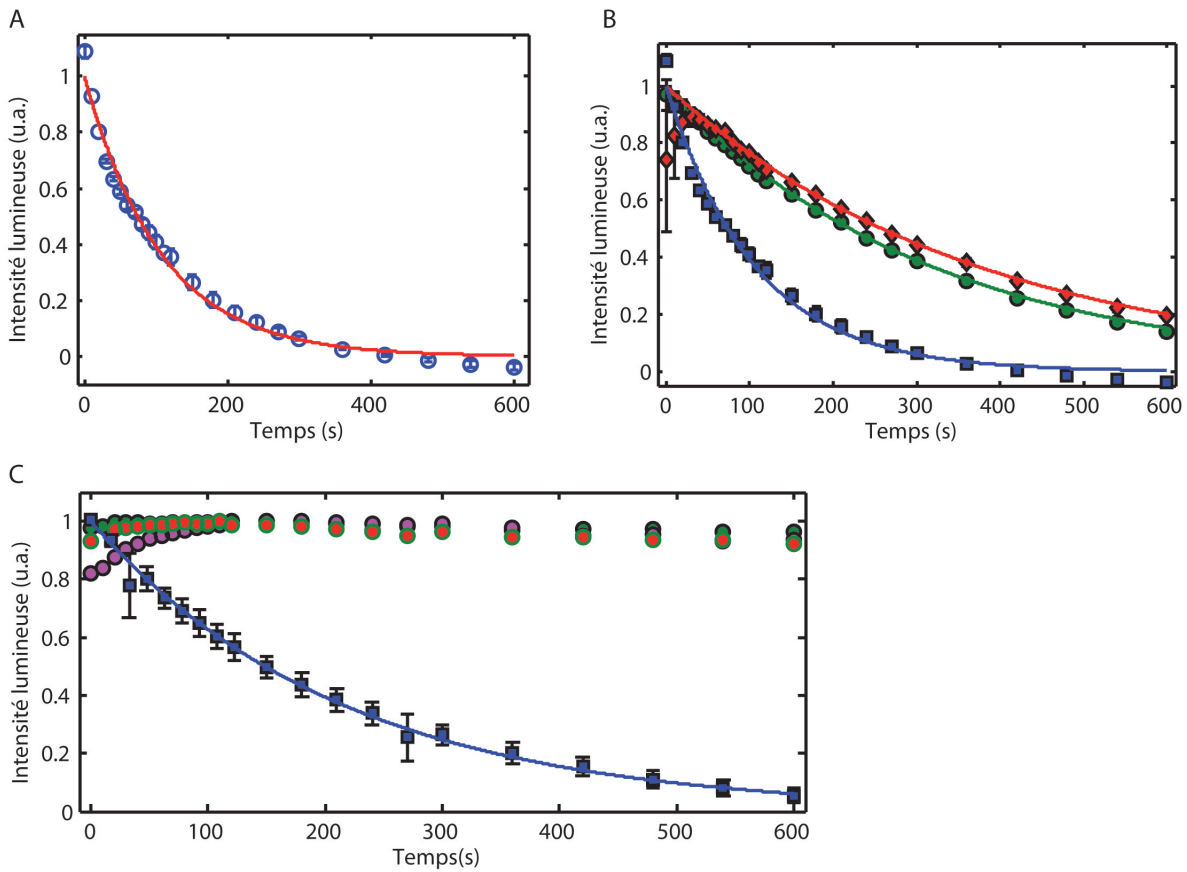


FIGURE 8.4 – Évolution de l'intensité lumineuse normalisée en fonction du temps pour : (A) Dextran 3 kDa–Alexa 488 au travers d'une membrane de polycarbonate avec des pores de 200 nm de diamètre. (B) Dextran 3 kDa–Alexa 488 au travers de l'enveloppe nucléaire marqué avec WGA (cercle vert) ou DIL (losange rouge), les carrés bleus correspondent à la courbe en A. (C) BSA–Alexa 488 au travers d'une membrane de polycarbonate avec des pores de 200 nm de diamètre (carré bleu) et au travers de l'enveloppe nucléaire (cercles). Les courbes ont été ajustées par $e^{-t/\tau}$.

connaissant celui du 4 kDa, ce qui nous donne $R_h = 2,1$ nm. La relation de Stokes–Einstein donne :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (8.13)$$

d'où $D = 102 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 20°C .

Le coefficient de diffusion extrait de nos résultats est cohérent avec les valeurs de la littérature et l'estimation théorique. Ce résultat valide notre modèle diffusif.

Diffusion de BSA

Nous avons mesuré la diffusion de molécules de BSA au travers de membranes de polycarbonate et au travers d'enveloppes nucléaires, les résultats obtenus sont présentés en Figure 8.4 (C). La BSA diffuse au travers de la membrane de polycarbonate conformément au modèle de diffusion avec un $\tau = 211 \pm 10$ s, en revanche elle ne diffuse pas au travers des enveloppes nucléaires puisque nous mesurons une intensité lumineuse constante.

Ce résultat est conforme à ce qui est observé dans la littérature [71] montrant que le pore nucléaire est non-perméable à la BSA. D'autre part, cela confirme que l'enveloppe nucléaire adhère de manière étanche à la surface d'or et est intègre ; autrement dit qu'elle n'est pas déchirée.

Le fait que l'intensité lumineuse ne varie pas sur la durée de l'expérience valide également l'hypothèse que nous pouvons négliger les échanges avec les bords sur cette durée.

Le τ mesuré pour la BSA donne un coefficient de diffusion $D_{\text{BSA}} = 46 \pm 3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ce qui correspond à un $R_{h,\text{BSA}} = 4,7 \pm 0,3$ nm. Ce rayon a été mesuré à $4,5 \pm 0,1$ nm [20] dans des conditions de pH et de force ionique similaires aux nôtres. Ce résultat est une autre confirmation de la validité de notre modèle.

Diffusion de dextran 3 kDa au travers d'enveloppes nucléaires

Les mesures de diffusion de dextran 3 kDa au travers d'enveloppes nucléaires marquées avec de la WGA ou du DIL sont présentées en Figure 8.4 (B) (cercles verts et losanges rouges respectivement), la courbe de diffusion au travers de la membrane de polycarbonate y figure également (carrés bleus) pour comparaison.

Là encore nos mesures sont en accord avec notre modèle et nous observons une décroissance nettement plus lente de l'intensité lumineuse comparée au cas sans enveloppe nucléaire. Nous mesurons les temps caractéristiques $\tau_{\text{DIL}} = 367 \pm 5,5$ s et $\tau_{\text{WGA}} = 312 \pm 16$ s pour les marquages au DIL et à la WGA respectivement, qui sont bien supérieurs au temps caractéristique de référence sans enveloppe nucléaire (107 s).

Nous calculons alors le rayon moyen du canal de diffusion au travers de l'enveloppe nucléaire R_p à partir de la mesure de référence en considérant que les grandeurs σ , D (dextran) et L sont inchangées, on a alors en utilisant 8.6 :

$$R_p = \sqrt{\frac{\tau_{\text{ref}} \cdot \epsilon_e}{\tau \cdot \epsilon_{\text{ref}}}} R_{\text{ref}} \quad (8.14)$$

avec e_e la longueur du canal diffusif, e_{ref} et R_{ref} l'épaisseur et le rayon des pores de la membrane de polycarbonate respectivement, et τ_{ref} le temps caractéristique de diffusion au travers de la membrane de polycarbonate.

La densité maximale de pores étant fixée par la densité de pore de la membrane de polycarbonate, σ demeure bien inchangée entre les expériences. De même la distance entre la membrane et la lamelle de verre L est fixée dans notre montage. Enfin nous réalisons nos expériences toujours dans les mêmes conditions, nous pouvons donc considérer le coefficient de diffusion du dextran D comme invariant.

Il n'existe pas de consensus quant à la longueur du canal diffusif du pore nucléaire – les mesures de structure du NPC en microscopie électronique donne une borne supérieure de 50 nm mais ne permettent pas de connaître la longueur du canal central qui est formé par les FG-Nups –, nous utiliserons donc comme valeur celle déterminée par Keminer et *coll.* de 44,5 nm. Nous avons donc $e_e = 44,5$ nm. En appliquant (8.14) nous obtenons $R_{p,\text{DIL}} = 3,96 \pm 0,07$ nm et $R_{p,\text{WGA}} = 4,30 \pm 0,14$ nm.

Ces valeurs sont cohérentes avec les rayons mesurés dans la littérature compris entre 4,4 et 6,1 nm [76, 129]. De plus, nous observons que le rayon varie peu d'un type de marquage à l'autre, ce qui confirme que la WGA n'impacte pas la diffusion libre au travers du pore nucléaire. De fait, nous utiliserons le marquage à la WGA pour les expériences à venir, celui-ci permettant une meilleure visualisation de l'enveloppe nucléaire.

Ces résultats montrent que nous avons pu adapter notre dispositif expérimental à la mesure de la diffusion libre de molécules au travers de l'enveloppe nucléaire et que nous sommes capable d'estimer un rayon moyen du canal central du pore nucléaire à partir de ces mesures.

8.2.2 Effet de la RNase sur le rayon du canal central

Il est probable que des ARNs soient présents à l'intérieur des pores nucléaires leur translocation ayant été interrompue par l'ouverture de l'ovocyte et de l'enveloppe nucléaire. Nous avons donc étudié l'impact de l'ajout de RNase A sur la taille moyenne du canal central de l'enveloppe nucléaire.

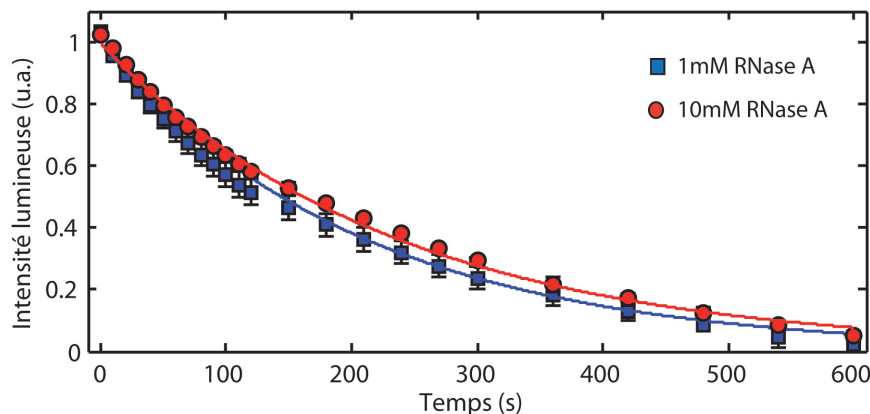


FIGURE 8.5 – Évolution de l'intensité lumineuse en fonction du temps pour la diffusion de dextran 3 kDa au travers de l'enveloppe nucléaire marquée à la WGA après incubation avec 1 mM (carrés bleus) et 10 mM (disques rouges) RNase A pendant 20 minutes.

Nous procédons comme indiqué dans le protocole expérimental et laissons donc l'enveloppe dans une solution de RNase A pendant 20 minutes avant marquage. Nous avons testé deux concentrations en RNase A, 1 mM et 10 mM.

Les résultats des mesures de diffusion au travers des enveloppes traitées à la RNaseA sont présentés en Figure 8.5. Nous mesurons des temps caractéristiques de 209 ± 25 s et 234 ± 10 s pour des concentrations de 1 mM et 10 mM respectivement. Nous estimons alors, en utilisant l'expression (8.14), des rayons moyens du canal central de $5,25 \pm 0,33$ nm et $4,96 \pm 0,16$ nm respectivement.

Le traitement à la RNase A induit une ouverture des pores d'environ 15% comparé à la mesure effectuée sans RNaseA. Conformément à notre hypothèse, il semblerait que des ARNs encombrant bien le canal central du pore nucléaire et que nous les détruisons par ajout de RNase. Nos résultats montrent également que nous détruisons tous les ARNs présents puisqu'une augmentation de la concentration en RNase A n'induit pas une ouverture plus importante du canal central. Nous utiliserons donc dans nos expériences une concentration de 1 mM en RNase A.

8.2.3 Évolution du rayon du canal central avec la concentration en importin β 1

Jusqu'à présent nous nous sommes intéressés aux pores nucléaires dans un environnement « minimum » où n'est présent qu'un tampon permettant le maintien de l'intégrité structurelle de celui-ci. Comme nous l'avons vu, dans l'environnement cellulaire, le pore nucléaire est en présence de diverses molécules biologiques : les facteurs de transport, les karyophérines, les NLS etc. Nous souhaitons étudier l'impact d'une karyophérine, l'importin β 1 (imp β 1) sur le rayon du canal central et comparé nos résultats sur un système *ex vivo* aux mesures *in vitro* de Lim et coll. [157, 74, 183].

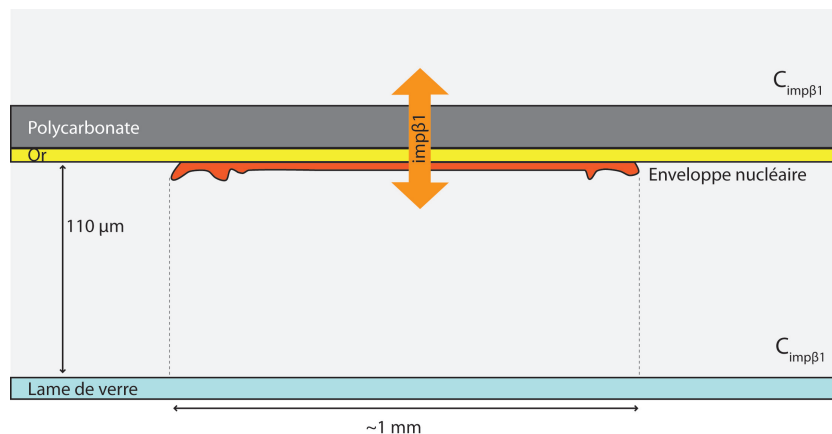


FIGURE 8.6 – Schéma du dispositif expérimental avant ajout du dextran 3 kDa marquant le début des mesures de diffusion. L'enveloppe baigne dans une solution de tampon et d'imp β 1 placée dans chaque chambre et celle-ci diffuse au travers des pores et s'y fixe en partie.

Le protocole expérimental est le même que pour les expériences avec traitement à la RNase A excepté que nous ajoutons de l'imp β 1 dans le tampon servant à l'expérience de diffusion après marquage de l'enveloppe ainsi que dans la solution de dextran. Nous laissons incuber l'enveloppe dans la solution d'imp β 1 pendant 5 minutes afin que cette dernière puisse diffuser à l'intérieur des pores. Nous sommes dans le cas schématisé en Figure 8.6.

TABLE 8.1 – Temps caractéristiques de décroissance de l'intensité lumineuse et rayon moyen estimé du canal central de pore nucléaire d'ovocyte de xénope

Concentration (nM)	τ (s)	R_p (nm)
0	209 ± 25	$5,25 \pm 0,33$
0,01	$302 \pm 8,9$	$4,37 \pm 0,11$
0,5	$335 \pm 5,2$	$4,15 \pm 0,07$
1	283 ± 23	$4,51 \pm 0,21$
100	$213 \pm 3,7$	$5,2 \pm 0,1$
200	$151 \pm 14,4$	$6,17 \pm 0,32$
1000	367 ± 27	$3,96 \pm 0,17$

Les résultats obtenus pour des concentrations en $\text{imp}\beta 1$ allant de 0,01 nM à 1 μM sont donnés en Figure 8.7 et les temps caractéristiques mesurés ainsi que les rayons calculés sont regroupés en tableau 8.1.

Nos résultats montrent un effet évident de la concentration en $\text{imp}\beta 1$ sur la taille du canal central du pore nucléaire de l'ovocyte de xénope celui-ci variant de 32% sur la gamme de concentration que nous avons étudiée.

Le rayon n'évolue pas de manière linéaire avec la concentration. En effet, nous n'observons pas de variation significative du rayon pour de faibles concentrations en revanche celui-ci augmente de plus de 30% à une concentration de 200 nM avant de se réduire à près de -10% de la valeur initiale (0,01 nM) pour une concentration de 1 μM .

Cette évolution n'est pas triviale et nécessite une analyse de l'interaction entre les $\text{imp}\beta 1$ et le réseau de FG–nucléoporines à l'intérieur du pore nucléaire.

Modélisation d'une brosse de polymère dans une solution de particules perméantes

Opferman et *coll.* ont élaboré un cadre théorique en champ moyen pour l'étude d'une brosse de polymères dans une solution de particules ayant une interaction attractive avec les polymères de la brosse [124]. Nous allons ici reprendre leur argumentation ainsi que quelques uns de leur résultats.

Considérons une couche de N_p polymères constitués de N monomères dont l'une des extrémités est greffée sur une surface plane, envahie par N_c nanoparticules de taille égale à celle des monomères et entourée d'une solution de nanoparticules de concentration C_0 . Nous souhaitons déterminer la hauteur h de la couche de polymère pour une constante d'interaction χ entre les nanoparticules et les polymères en fonction de la concentration en nanoparticules en solution. La hauteur h est imposée par l'équilibre entre l'entropie de la couche de polymère envahie par les nanoparticules et l'énergie d'interaction nanoparticules/polymères, et par l'équilibre du potentiel chimique et des pressions osmotiques entre les phases de nanoparticules en solution et celles dans la couche de polymère.

En d'autres termes, h résulte de la compétition entre le désir de la couche de polymères de minimiser son entropie et celui des nanoparticules de venir se fixer sur ceux-ci, ainsi que des échanges entre la solution de nanoparticules et la couche de polymères. On voit alors que h doit dépendre de la densité de

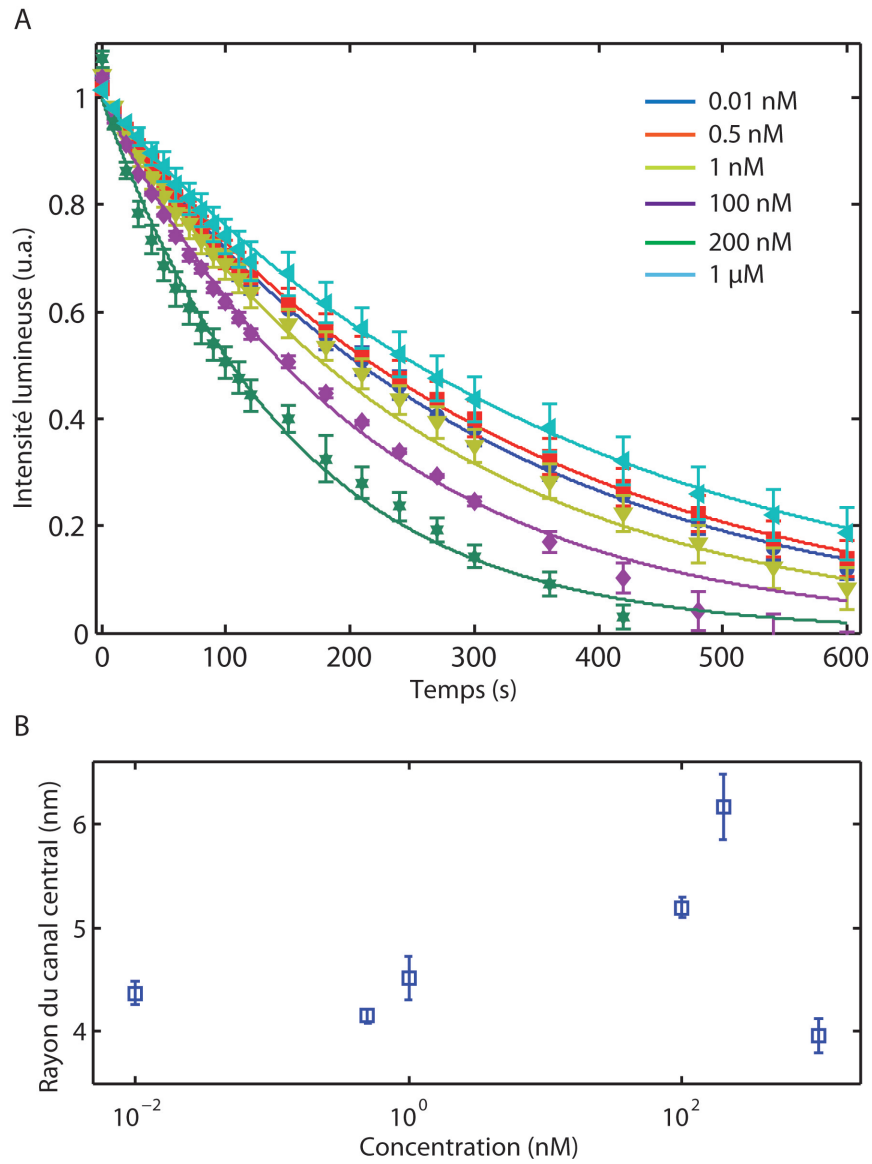


FIGURE 8.7 – (A) Ensemble des courbes de l'évolution de l'intensité lumineuse en fonction du temps pour différentes concentrations en importin β 1 en solution. (B) Evolution du rayon moyen estimé du canal central du pore nucléaire en fonction de la concentration en importin β 1 en solution (la concentration est représentée en échelle log).

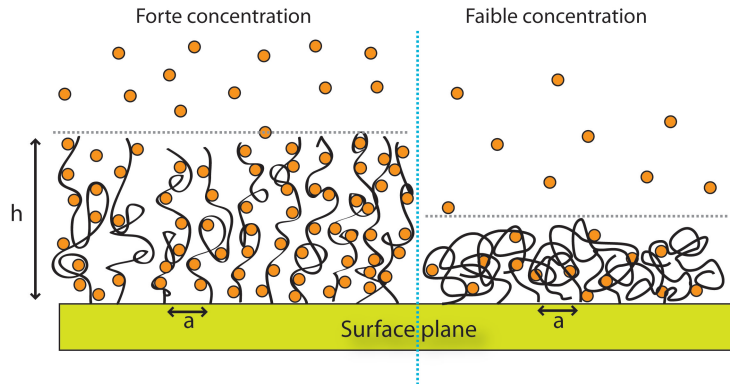


FIGURE 8.8 – Schéma de l'organisation d'une brosse de polymère greffée sur une surface plane pour une forte concentration en nanoparticules (droite) et une faible concentration en nanoparticule (gauche).

greffage des polymères, de leur taille (N), de la force de l'interaction entre nanoparticules et polymères (χ) et de la concentration de nanoparticules en solution (C_0).

Nous modélisons le système par un réseau et nous notons M_c le nombre de cellules (volumes) élémentaires disponibles dans la couche de polymères (M_c représente le volume de la couche de polymère) de taille b^3 , où b est la taille d'un monomère, et M_s le volume de la solution que nous définissons de la même manière que M_c . Nous définissons alors $\psi = N_m/M_c$ la densité de monomères dans la couche de polymère avec $N_m = N_p N$, $\phi = N_c/M_c$ la densité de nanoparticules dans la couche de polymère, et $C_0 = N_s/M_s$ la concentration de nanoparticules en solution avec N_s le nombre de nanoparticules en solution.

On peut alors montrer que l'énergie libre d'origine entropique d'un polymère (normalisée par le nombre de polymères) d'une brosse de polymères de densité ψ contenant une densité ϕ de nanoparticules s'écrit comme

$$F_{ent} = \frac{h^2}{2N} + M[\phi \ln \phi + (1 - \phi - \psi) \ln(1 - \phi - \psi)] \quad (8.15)$$

avec $M = M_c/N_p$. L'énergie totale d'interaction entre les nanoparticules et la couche de polymère s'écrit $E = M\chi\phi\psi$ (en unité $k_B T$), on a donc une énergie libre pour la brosse

$$F_B = \frac{h^2}{2N} + M[\chi\phi\psi + \phi \ln \phi + (1 - \phi - \psi) \ln(1 - \phi - \psi)] \quad (8.16)$$

Nous avons deux inconnues dans l'expression de F_B , la hauteur h de la brosse et la densité de nanoparticules ϕ . h et ϕ sont imposés par l'équilibre des potentiels chimiques et des pressions osmotiques entre les deux phases, la solution et la brosse de polymères. Le potentiel chimique des nanoparticules en solution s'écrit

$$\mu_s = \ln \left(\frac{C_0}{1 - C_0} \right) \quad (8.17)$$

et sa pression osmotique

$$\Pi_s = -\ln(1 - C_0) \quad (8.18)$$

Le potentiel chimique de la brosse de polymère s'obtient en dérivant l'énergie libre par rapport à N_c

$$\mu_B = \chi\psi + \ln \left(\frac{\phi}{1 - \phi - \psi} \right) \quad (8.19)$$

et sa pression osmotique en dérivant l'énergie libre par rapport à M_c

$$\Pi_B = \chi\phi\psi - \frac{h}{a^2N} - \psi - \ln(1 - \phi - \psi) \quad (8.20)$$

où a est la distance moyenne de greffage. Résoudre $\Pi_s = \Pi_B$ et $\mu_s = \mu_B$ simultanément nous donne le volume de la couche de polymère M_c et le nombre de nanoparticules liées N_c au minimum de l'énergie libre. Cela revient à minimiser le potentiel thermodynamique total

$$\Phi(M, N_B) = F_B(M, N_B) - \mu_s(C_0)N_B + \Pi_s(C_0)M \quad (8.21)$$

avec $N_B = N_c/N_p$.

Écrire l'égalité des potentiels chimiques à l'équilibre donne une expression de ϕ en fonction des paramètres du système

$$\phi = \frac{(1 - \psi)\gamma}{\gamma + \exp(\chi\psi)} \quad (8.22)$$

Nous pouvons alors écrire $\Phi(M, N_B)$ comme fonction d'une seule variable

$$\Phi = \frac{h^2}{2N} + M(1 - \psi) \ln(1 - \psi) - M \ln(1 - C_0) - M(1 - \psi) \ln[1 + \gamma \exp(-\chi\psi)] \quad (8.23)$$

Le potentiel thermodynamique total ne dépend plus que de M ou h , puisque $h = M/a^2$, les autres paramètres (C_0, N_p, a) étant fixes.

Opferman et *coll.* ont tracé le potentiel thermodynamique total Φ en fonction de la hauteur de la brosse de polymère h pour différentes concentration C_0 (Figure 8.9 (A) et (B)) et pour deux valeurs arbitraires de la constante d'interaction χ . Ils observent que pour une $|\chi|$ (χ est négatif dans le cas d'une interaction attractive) suffisamment élevé, deux minimas du potentiel thermodynamique peuvent exister selon la concentration C_0 . Ceci signifie que la brosse de polymère peut se trouver dans deux états, un étendu pour la valeur de h d'équilibre la plus élevée, et un effondré pour le h d'équilibre le plus faible.

Le tracé de l'évolution de h en fonction de la concentration (Figure 8.9 (C)) montre une transition continue d'un état effondré vers un état étendu à mesure que la concentration augmente (pour une $|\chi|$ suffisamment grande).

On peut interpréter cette évolution de h avec la concentration par le raisonnement suivant. À faible concentration, les particules se fixent dans la brosse en petit nombre créant des liens entre les chaînes de polymères ce qui provoque un effondrement de la brosse comparablement à la réticulation d'un gel. Si l'on augmente la concentration des particules en solution alors la pression osmotique augmente de même, par conséquent de plus en plus de particules sont forcées à l'intérieur de la brosse qui doit augmenter son volume (donc h) pour accommoder toujours plus de particules comme illustré en schéma Figure 8.8.

Évolution de l'extension du réseau de FG–Nups avec la concentration en importin

Le pore nucléaire constitue un cas similaire à celui décrit dans le modèle théorique : les FG-Nups sont greffés sur sa paroi à une densité fixe et forment une brosse de polymère, et les molécules d'imp β 1 jouent le rôle des nanoparticules. Il y a cependant des différences majeures :

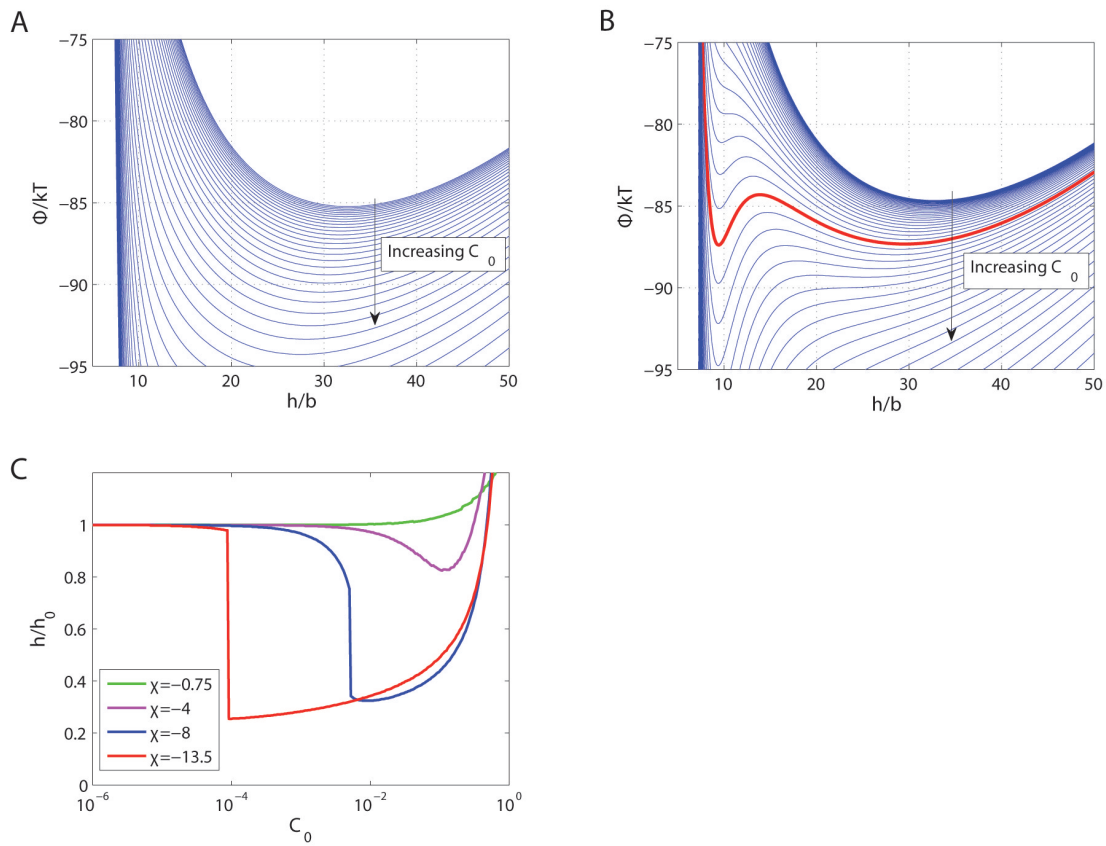


FIGURE 8.9 – Potentiel thermodynamique total Φ en fonction de la hauteur de la brosse de polymère h pour (A) $\chi = -6$ et $10^{-3} < C_0 < 10^{-1}$ et (B) $\chi = -10$ et $10^{-4} < C_0 < 10^{-2}$. (C) Hauteur de la brosse de polymère en fonction de la concentration en nanoparticules pour différentes valeurs de la constante d'interaction χ . (Courbes extraites de [124])

- la principale : l'imp β 1 a une taille très largement supérieure (97 kDa) à celles des acides aminés constituant les protéines ;
- la surface de greffage n'est pas plane mais courbe ;
- la brosse n'est pas formée de la répétition d'une protéine, mais de la répétition d'une dizaine de protéines différentes aux longueurs et caractéristiques physico-chimiques différentes.

Nous observons cependant une évolution de l'extension du réseau de FG–Nups similaire à celle décrite par le modèle théorique (Figure 8.7 (B)). Pour une concentration en imp β 1 comprise entre 10^{-2} et 1 nM nous n'observons pas de variation de l'extension du réseau. En revanche pour des concentrations de 100 et 200 nM nous mesurons un effondrement du réseau caractérisé par l'augmentation du rayon du canal du pore. Si nous augmentons encore la concentration en imp β 1 à 1 μ M, nous observons une diminution du rayon à une valeur proche de la valeur initiale (pour $C_{imp\beta 1} < 1$ nM) que nous attribuons à une ré-extension du réseau de FG–Nups due à l'insertion des imp β 1 au sein de celui-ci.

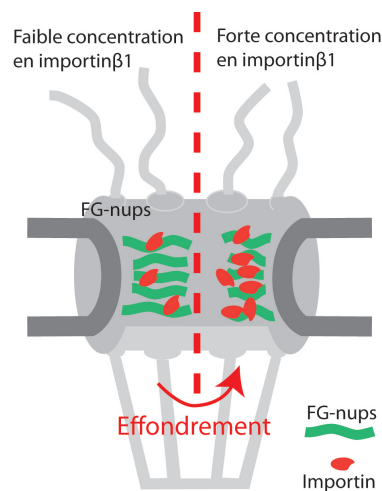


FIGURE 8.10 – Illustration de l'évolution du rayon du canal central du pore nucléaire avec la concentration en imp β 1.

Des résultats similaires ont été obtenus par Lim et *coll.* en reproduisant *in vitro*, de manière minimale, les conditions au sein du pore nucléaire [157, 74, 183]. Pour se faire ils ont greffé une FG–nucléoporeine présente dans le canal central du pore nucléaire d'ovocyte de xénope, la cNup62, sur une surface plane d'or avec une densité égale à celle estimée dans le pore. Ils ont alors mesuré, par résonance de plasmons de surface, l'évolution de la hauteur de la brosse de cNup62 avec la concentration en imp β 1 en solution.

Ils observent un effondrement de la brosse à faible concentration en imp β 1, puis une extension continue de la brosse à mesure que la concentration augmente, jusqu'à observer un régime « d'empilement » où la hauteur de la brosse atteint le double de sa valeur initiale (Figure 8.11) en accord avec les simulations de Opferman et *coll.*

Très récemment Zahn et *coll.* [195] ont réalisé des expériences *in vitro* similaires et montrent une extension modeste (20% dans le cas le plus marqué) de la brosse artificielle de FG–Nups greffée à mesure que la concentration en imp β 1 est augmentée en solution. Par ailleurs ils observent une extension continue avec la concentration en imp β 1, non pas les deux régimes (effondré et étendu) que Lim et *coll.* mesurent et que nos résultats suggèrent.

Des travaux théoriques par Ando et *coll.* [5] montrent également la transition d'un état étendu vers

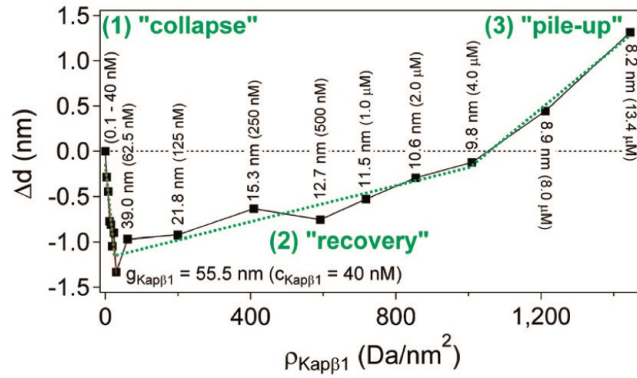


FIGURE 8.11 – Évolution de l'écart relatif de la hauteur de la brosse de cNup62 en fonction de la densité d'imp $\beta 1$ dans la brosse. (courbe extraite de [157])

effondré du réseau de FG-Nups induite par l'introduction de karyophérines. Leur modèle est similaire à celui de Opferman et *coll.* cependant ils modélisent les FG-Nups comme des bloc de copolymères, et non comme des chaînes flexibles, greffées dans un pore au lieu d'une surface plane.

Si nos résultats sont comparables qualitativement avec les expériences *in vitro*, il est difficile de les comparer de manière quantitative notre système d'étude ayant plus de variables étant *ex vivo*. En effet, comme évoqué précédemment, là où Lim et *coll.* et Zahn et *coll.* ont des brosses composées d'un seul type de FG-Nup, il y en a nativement plus d'une dizaine dans le pore nucléaire d'ovocyte de xénope. Par ailleurs nous contrôlons mal le matériel biologique résiduel après ouverture du noyau comme nous avons pu le constater avec le traitement à la RNase. Si nous pensons avoir éliminé la quasi-totalité de l'ARN résiduel, il se peut que d'autres molécules (en particulier des protéines) demeurent piégées au sein du pore nucléaire que nous n'avons pu évacuer.

D'autre part, l'étude d'une gamme de concentration plus étendue, en particulier dans les hautes concentrations (μM), est nécessaire pour conclure de manière affirmative sur l'observation d'une ré-Extension du réseau de FG-Nups. Nous ne disposons actuellement que d'une mesure à $1\ \mu\text{M}$ pour des raisons d'accès à l'imp $\beta 1$ et de coût. Nous n'avons pas le matériel ni le savoir-faire nécessaire au laboratoire pour synthétiser une telle protéine, or l'acheter en quantité nécessaire à la réalisation d'expérience de diffusion à haute concentration représenterait une dépense que nous ne souhaitons pas engager.

Nos résultats sont cependant très encourageants et sont les premiers obtenus sur l'impact de l'importin $\beta 1$ sur l'organisation de pores nucléaires d'ovocytes de xénope. Jusqu'à nos travaux seuls Atkinson et *coll.* [9] ont examiné l'impact des karyophérines sur l'organisation des FG-Nups dans des pores nucléaires natifs. Ils ne mesurent pas de changement de l'organisation des FG-Nups avec la concentration en karyophérine, cependant ils n'arrivent à imposer qu'une variation de 43% de la concentration en imp $\beta 1$ dans les NPCs ce qui n'est pas nécessairement suffisant à déclencher une réorganisation.

Nos expériences montrent le fort potentiel du système d'enveloppe nucléaire d'ovocyte de xénope associée à la microscopie ZMW pour l'étude du transport au travers de pores nucléaires.

8.2.4 Conclusions et perspectives

En utilisant la diffusion de dextran de petite taille, nous avons été en mesure d'estimer le rayon moyen du canal central de pores nucléaires d'ovocyte de xénope et d'étudier l'impact de la concentration en importin β 1 sur ce rayon. Les rayons obtenus sont en accord avec ceux mesurés par Peters et *coll.* ainsi que Paine et *coll.*, et l'évolution du rayon avec la concentration en importin β 1 est en accord avec les modèles théoriques et les simulations numériques de Opferman et *coll.* et Ando et *coll.* ainsi qu'aux observations expérimentales *in vitro* de Lim et *coll.* et Zahn et *coll.* Nos résultats suggèrent donc que la barrière de FG–Nups est hybride avec une structure de brosse de polymères et des interactions de type gel.

La suite naturelle de ce travail serait d'ajouter en complexité en se rapprochant des conditions physiologiques du transport. Dans la cellule, lors de son transfert au travers du pore, l'imp β 1 se lie à une molécule de RanGTP. Il serait intéressant de mesurer l'impact de ce complexe sur le réseau de FG–Nups, car il est possible que l'imp β 1 liée à Ran ne possède pas la même affinité pour les FG–Nups. Par ailleurs le complexe est plus volumineux que la molécule seule. Ces deux facteurs sont déterminants dans l'existence (ou non) des deux régimes observés pour l'importin seul : l'effondrement et la ré-extension du réseau de FG–Nups.

Une autre approche serait d'utiliser une autre karyophérine à notre disposition, l'exportin5, et d'observer si nous mesurons les mêmes effets qu'avec l'imp β 1.

Notre dispositif permet d'envisager une approche *bottom-up* où nous construisons des nanopores biomimétiques en greffant des FG–Nups sur la surface d'or d'une membrane *track-etched*, comme l'ont fait Talisman et *coll.* [71]. Un tel système nous permettrait de nous placer dans les mêmes conditions expérimentales que Lim et *coll.* ou Zahn et *coll.* (mêmes FG–Nups, même densité de greffage) mais dans une géométrie proche de celle du pore nucléaire. Ce système présente également un intérêt pour le développement de membranes de filtration sélectives.

Il n'aura probablement pas échappé au lecteur que nous n'avons pas réalisé de mesures en molécule unique exploitant l'effet ZMW dans les expériences effectuées sur les enveloppes nucléaires. La raison est que les molécules utilisés pour ces mesures (dextran 3 kDa) ont une fluorescence trop faible pour nous permettre de les suivre par une observation en molécule unique étant donné notre rapport signal/bruit. Cependant nous envisageons de pouvoir suivre, en molécule unique, le transport (import ou export) d'un ARN à travers un pore nucléaire dans un gradient de RanGTP/RanGDP en présence de karyophérines et de facteurs de transports. Le complexe ARN–karyophérine–Ran devrait être suffisamment lumineux pour être observé en molécule unique.

Annexe A

Protocole de manipulation de l'ARN

Recommandations générales

Pour ne pas dégrader l'ARN il convient de manipuler dans un environnement et avec des objets sans ribonucléases. Pour se faire il est recommandé de suivre les instructions suivantes :

- consacrer un espace et du matériel exclusivement aux expériences avec ARN et maintenir cet espace sans RNases en nettoyant à l'éthanol à 100%, ou avec une solution de diéthyl pyrocarbonate (ou DEPC), ou avec un décontaminant commercial du type *RNase AWAY* ;
- utiliser des équipements jetables stériles et certifiés sans RNases ;
- pour les équipements non jetables (première utilisation) :
 - en verre : placer à 180-200 ° C pendant 4 heures minimum
 - en plastique ou métal : rincer une solution de 0.1 M NaOH/1 mM EDTA pendant 2 heures minimum à 37 ° C puis avec de l'eau traitée au DEPC.par la suite un lavage rapide avec la solution de NaOH ou avec un décontaminant commercial devrait suffire ;
- traiter les solutions en ajoutant 0.05% de DEPC et laisser incuber pendant la nuit à température ambiante (**note importante**, le DEPC ne peut être utilisé avec des buffers à base de Tris). Si cette opération n'est pas réalisable (cas du Tris) ajouter à la solution un inhibiteur de RNases. Dans tous les cas il est recommandé d'ajouter un inhibiteur de RNases pour éviter toute contamination.
- conserver l'ARN à -80 ° C et le maintenir dans la glace si décongelé ;
- **toujours** porter des gants préalablement décontaminés. Ne pas entrer en contact avec du matériel ou une surface non-décontaminés.

Protocole de préparation des échantillons

Matériel nécessaire :

- hôte à flux laminaire ;

- spray *RNase AWAY* 475 mL (*Molecular Bio Products*);
- Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor (*Promega*), un inhibiteur de RNases;
- solution de Tris-KCl 10 mM;
- aliquote d'ARN décongelé;
- pro-pipettes de 1000 μL , 200 μL et 2 μL ;
- cônes stériles et certifiés sans RNases;
- tubes eppendorfs de 1,5 mL et 500 μL .

Afin d'éviter de trop nombreux cycles de congélation/décongélation, il est indispensable de diviser la solution mère d'ARN en aliquotes. Pour ce faire, décongeler la solution mère (normalement conservée à -80°C) dans de la glace et avant de manipuler l'ARN, nettoyer les gants puis les pro-pipettes, les boîtes de cônes, les tubes eppendorfs de 500 μL ainsi que la paillasse de la hôte avec un essuie-tout imbibé de *RNase AWAY*. Il est conseillé de mettre par avance les tubes eppendorfs qui accueilleront les aliquotes dans la glace afin de baisser leur température.

Une fois l'étape de nettoyage et décongélation accomplies il n'y a plus qu'à faire ses aliquotes de 1 μL sous la hôte puis placer ceux qui ne seront pas utilisés immédiatement à -80°C pour conservation.

Préalablement à l'expérience :

- laver la chambre basse, le guide en téflon et le bouchon dans 0,1 M NaOH/1 mM EDTA pendant 2 heures et rincer à l'eau traitée sans RNases;
- comme pour l'aliquotage, avant de manipuler l'ARN nettoyer les gants puis les pro-pipettes, les boîtes de cônes, les tubes eppendorfs ainsi que la paillasse de la hôte avec un essuie-tout imbibé de *RNase AWAY*.

Préparation de l'échantillon (sous la hôte) :

- marquage de l'ARN au YOYO-1 :
 - préparer 1 600 μL de Tris-KCl 10 mM et ajouter 5 μL de RNasin et mélanger;
 - ajouter 1 000 μL à l'aliquote de 1 μL d'ARN puis 0,3 μL de solution de YOYO-1.
- placer 500 μL de la solution de Tris dans la chambre basse et 100 μL dans le bouchon, enfin ajouter 2 μL de la solution d'ARN marqués dans le bouchon;
- fermer le bouchon avec le support de mise en pression et le positionner dans la chambre basse avec le guide en téflon. L'échantillon est prêt.

Annexe B

Solutions tampon

3:1 pH 7, 2

- 75 mM KCl
- 25 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl

Mock3 pH 7, 3

- 90 mM KCl
- 10 mM NaCl
- 10 mM Tris
- 2 mM MgCl₂
- 0,1 mM CaCl₂
- 1 mM H-EDTA

Les solutions tampons sont filtrées avant utilisation.

Bibliographie

- [1] J.A. Abels, F. Moreno-Herrero, T. van der Heijden, C. Dekker, and N.H. Dekker. Single-molecule measurements of the persistence length of double-stranded RNA. *Biophysical journal*, 88(4) :2737–2744, 2005.
- [2] M. Akeson, D. Branton, J.J. Kasianowicz, E. Brandin, and D.W. Deamer. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophysical journal*, 77(6) :3227–33, 1999.
- [3] Christopher W. Akey and Michael Radermacher. Architecture of the Xenopus Nuclear Pore Complex Revealed by Three-Dimensional Cryo-Electron Microscopy. *Journal of Cell Biology*, 122(1) :1831–1839, 1993.
- [4] Frank Alber, Svetlana Dokudovskaya, Liesbeth M. Veenhoff, Wenzhu Zhang, Julia Kipper, Damien Devos, Adisetyantari Suprpto, Orit Karni-Schmidt, Rosemary Williams, Brian T. Chait, Andrej Sali, and Michael P. Rout. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450(7170) :695–701, 2007.
- [5] David Ando, Roya Zandi, Yong Woon Kim, Michael Colvin, Michael Rexach, and Ajay Gopinathan. Nuclear pore complex protein sequences determine overall copolymer brush structure and function. *Biophysical journal*, 106(9) :1997–2007, may 2014.
- [6] Genki Ando, Changbae Hyun, Jiali Li, and Toshiyuki Mitsui. Directly observing the motion of DNA molecules near solid-state nanopores. *ACS Nano*, 6(11) :10090–10097, 2012.
- [7] Heykel Aouani, Oussama Mahboub, Nicolas Bonod, Eloïse Devaux, Evgeny Popov, Hervé Rigneault, Thomas W. Ebbesen, and Jérôme Wenger. Bright unidirectional fluorescence emission of molecules in a nanoaperture with plasmonic corrugations. *Nano Letters*, 11(2) :637–644, 2011.
- [8] Yann Astier, Orit Braha, and Hagan Bayley. Toward single molecule DNA sequencing : Direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *Journal of the American Chemical Society*, 128(5) :1705–1710, 2006.
- [9] Claire E. Atkinson, Alexa L. Mattheyses, Martin Kampmann, and Sanford M. Simon. Conserved spatial organization of FG domains in the nuclear pore complex. *Biophysical Journal*, 104(1) :37–50, 2013.

- [10] Thomas Auger, Jérôme Mathé, Virgile Viasnoff, Gaëlle Charron, Jean Marc Di Meglio, Loïc Auvray, and Fabien Montel. Zero-mode waveguide detection of flow-driven DNA translocation through nanopores. *Physical Review Letters*, 113(2) :1–5, 2014.
- [11] Loïc Auvray. Solutions de macromolécules rigides : effets de paroi, de confinement et d'orientation par un écoulement. *Journal de Physique*, 42 :79–95, 1981.
- [12] R. Baldarelli, D. Branton, G. Church, D.W. Deamer, and J. Kasianowicz. Characterization of Individual Polymer Molecules Based on Monomer-Interface Interactions. *US Patent*, 1998.
- [13] R. Bayliss, K. Ribbeck, D. Akin, H.M. Kent, C.M. Feldherr, D. Görlich, and M. Stewart. Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *Journal of molecular biology*, 293(3) :579–93, 1999.
- [14] Martin Beck, Friedrich Förster, Mary Ecke, Jürgen M. Plitzko, Frauke Melchior, Günther Gerisch, Wolfgang Baumeister, and Ohad Medalia. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 306(5700) :1387–90, 2004.
- [15] Martin Beck, Vladan Lucić, Friedrich Förster, Wolfgang Baumeister, and Ohad Medalia. Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature*, 449(7162) :611–615, 2007.
- [16] Lucie Béguin, Bruno Grassl, Françoise Brochard-Wyart, Mohammed Rakib, and Hervé Duval. Suction of hydrosoluble polymers into nanopores. *Soft Matter*, 7(4) :96, 2011.
- [17] C. Berrier, M. Bonhivers, L. Letellier, and A. Ghazi. High-conductance channel induced by the interaction of phage lambda with its receptor maltoporin. *FEBS letters*, 476(3) :129–33, jul 2000.
- [18] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(2006) :1642–1645, 2006.
- [19] Lydéric Bocquet and Elisabeth Charlaix. Nanofluidics, from bulk to interfaces. *Chemical Society reviews*, 39(3) :1073–95, mars 2010.
- [20] Ute Böhme and Ulrich Scheler. Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR. *Chemical Physics Letters*, 435(4-6) :342–345, 2007.
- [21] F. Brochard. Dynamics of polymer chains trapped in a slit. *Journal de Physique*, 38 :1285, 1977.
- [22] F. Brochard and P.-G. de Gennes. Dynamics of confined polymer chains. *The Journal of Chemical Physics*, 67(1) :52, 1977.
- [23] Françoise Brochard-Wyart and Karine Guevorkian. Polymers in Confined Geometries. In *P.G. de Gennes' Impact on Science, Volume II : Soft Matter and Biophysics*, pages 69–95. World Scientific, 2009.
- [24] D.M. Brown and A.R. Todd. *The Nucleic Acids*. 2(3108) :409–430, 1955.

- [25] Andrea Brüggemann, Sonja Stoelzle, Michael George, Jan C. Behrends, and Niels Fertig. Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording. *Small*, 2(7) :840–846, 2006.
- [26] Francesco Cardarelli, Luca Lanzano, and Enrico Gratton. Fluorescence correlation spectroscopy of intact nuclear pore complexes. *Biophysical journal*, 101(4) :L27–9, aug 2011.
- [27] Lena Cardoso and Nuno M. Micaelo. DNA molecular solvation in neat ionic liquids. *ChemPhysChem*, 12(2) :275–277, 2011.
- [28] Peng Chen, Toshiyuki Mitsui, Damon B. Farmer, Jene Golovchenko, Roy G. Gordon, and Daniel Branton. Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores. *Nano Letters*, 4(7) :1333–1337, 2004.
- [29] Peng Cheng, Jiajun Gu, Eric Brandin, Young-Rok Kim, Qiao Wang, and Daniel Branton. Probing Single Dna Molecule Transport Using. *Nano Letters*, 4(11) :2293–2298, 2004.
- [30] Neil C. Chi, J.H. Adam, and Stephen A. Adam. Different Binding Domains for Ran-GTP and Ran-GDP / RanBP1 on Nuclear Import Factor. *Biochemistry*, 272(10) :6818–6822, 1997.
- [31] Peter Cifra. Channel confinement of flexible and semiflexible macromolecules. *Journal of Chemical Physics*, 131(22), 2009.
- [32] Peter Cifra, Zuzana Benkova, and Tomas Bleha. Chain extension of DNA confined in channels. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(7) :1843–1851, 2009.
- [33] Vitaly Citovsky, Annu Rev, Stony Brook, New York, and Patricia Zambryski. Transport of nucleic acids through membrane channels : Snaking through small holes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1993.
- [34] James Clarke, Hai-chen Wu, Lakmal Jayasinghe, Alpesh Patel, Stuart Reid, and Hagan Bayley. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature nanotechnology*, 4(April) :265–270, 2009.
- [35] Atlanta Cook, Fulvia Bono, Martin Jinek, and Elena Conti. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annual review of biochemistry*, 76 :647–671, 2007.
- [36] Janet M. Cronshaw, A.N. Krutchinsky, W. Zhang, B.T. Chait, and M.J. Matunis. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology*, 158(5) :915–927, 2002.
- [37] B. Daneholt. Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13) :7012–7, 2001.
- [38] M. Daoud and P.G. De Gennes. Statistics of macromolecular solutions trapped in small pores. *Journal de Physique*, 38(1) :85–93, 1977.
- [39] S. Daoudi and F. Brochard. Flows of flexible polymer solutions in pores. *Macromolecules*, 11(4) :751–758, 1978.

- [40] P.-G. De Gennes. *Scaling Concepts in Polymer Physics*, chapter 1. Cornell, 1979.
- [41] David W. Deamer and Mark Akeson. Nanopores and nucleic acids : Prospects for ultrarapid sequencing. *Trends in Biotechnology*, 18(4) :147–151, 2000.
- [42] Jeffrey DeGrasse, Kelly N. DuBois, Damien Devos, T. Nicolai Siegel, Andrej Sali, Mark C. Field, Michael P. Rout, and Brian T. Chait. Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 8(9) :2119–30, 2009.
- [43] Cees Dekker. Solid-state nanopores. *Nature nanotechnology*, 2(4) :209–215, 2007.
- [44] Daniel P. Denning, Samir S. Patel, Vladimir Uversky, Anthony L. Fink, and Michael Rexach. Disorder in the nuclear pore complex : the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5) :2450–2455, 2003.
- [45] I.M. Derrington, T.Z. Butler, M.D. Collins, E. Manrao, M. Pavlenok, M. Niederweis, and J.H. Gundlach. Nanopore DNA sequencing with MspA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37) :16060–16065, 2010.
- [46] Damien Devos, Svetlana Dokudovskaya, Rosemary Williams, Frank Alber, Narayanan Eswar, Brian T. Chait, Michael P. Rout, and Andrej Sali. Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7) :2172–2177, 2006.
- [47] C. Dingwall, J. Robbins, S.M. Dilworth, B. Roberts, and W.D. Richardson. The nucleoplasmic nuclear localization sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J. Cell Biol.*, 107(September) :841–849, 1988.
- [48] Thomas W. Ebbesen, Cyriaque Genet, and Sergey I. Bozhevolnyi. Surface-plasmon circuitry. *Physics Today*, 61(5) :44, 2008.
- [49] Joshua B. Edel, Min Wu, Barbara Baird, and Harold G. Craighead. High spatial resolution observation of single-molecule dynamics in living cell membranes. *Biophysical journal*, 88(6) :L43–5, 2005.
- [50] John Eid, Adrian Fehr, Jeremy Gray, Khai Luong, John Lyle, Geoff Otto, Paul Peluso, David Rank, Primo Baybayan, Brad Bettman, Arkadiusz Bibillo, Keith Bjornson, Bidhan Chaudhuri, Frederick Christians, Ronald Cicero, Sonya Clark, Ravindra Dalal, John Dixon, Mathieu Foquet, Alfred Gaertner, Paul Hardenbol, Cheryl Heiner, Kevin Hester, David Holden, Gregory Kearns, Xiangxu Kong, Ronald Kuse, Yves Lacroix, Steven Lin, Paul Lundquist, Congcong Ma, Patrick Marks, Mark Maxham, Devon Murphy, Insil Park, Thang Pham, Michael Phillips, Joy Roy, Robert Sebra, Gene Shen, Jon Sorenson, Austin Tomaney, Kevin Travers, Mark Trulson, John Vieceli, Jeffrey Wegener, Dawn Wu, Alicia Yang, Denis Zaccarin, Peter Zhao, Frank Zhong, Jonas Korlach, and Stephen Turner. Single Polymerase Molecules. *Exchange Organizational Behavior Teaching Journal*, (January) :133–138, 2009.

- [51] Birthe Fahrenkrog, Eduard C. Hurt, Ueli Aebi, and Nelly Panté. Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex : Localization of Nsp1p subcomplexes. *Journal of Cell Biology*, 143(3) :577–588, 1998.
- [52] C.M. Feldherr and D. Akin. The location of the gate in the transporter element of the nuclear pores. *Molecular Biology of the Cell*, 8(S) :2475, 1997.
- [53] D.R. Finlay, D.D. Newmeyer, T.M. Price, and D.J. Forbes. Inhibition of invitro nuclear import by a lectin that binds to nuclear pores. *J. Cell. Biol.*, 104(February) :189–200, 1987.
- [54] Monique Floer and Günter Blobel. The nuclear transport factor karyopherin beta binds stoichiometrically to Ran-GTP and inhibits the Ran GTPase activating protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10) :5313–5316, 1996.
- [55] Daniel Fologea, James Uplinger, Brian Thomas, David S. McNabb, and Jiali Li. Slowing DNA Translocation in a Solid-State Nanopore. *Nano Letters*, 5 :1734–1737, 2005.
- [56] S. Frey, R.P. Richter, and D. Gorlich. FG-Rich Repeats of Nuclear Pore Proteins Form a Three-Dimensional Meshwork with Hydrogel-Like Properties. *Science*, 314(November) :815–817, 2006.
- [57] Derek N. Fuller, Dorian M. Raymer, John Peter Rickgauer, Rae M. Robertson, Carlos E. Catalano, Dwight L. Anderson, Shelley Grimes, and Douglas E. Smith. Measurements of single DNA molecule packaging dynamics in bacteriophage lambda reveal high forces, high motor processivity, and capsid transformations. *Journal of molecular biology*, 373(5) :1113–22, nov 2007.
- [58] S. Garaj, W. Hubbard, A. Reina, J. Kong, D. Branton, and J. Golovchenko. Graphene as a subnanometre trans-electrode membrane. *Nature*, 467(7312) :190–193, 2010.
- [59] Davy Gérard, Jérôme Wenger, Nicolas Bonod, Evgeni Popov, Hervé Rigneault, Farhad Mahdavi, Steve Blair, José Dintinger, and Thomas W. Ebbesen. Nanoaperture-enhanced fluorescence : Towards higher detection rates with plasmonic metals. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, 77(4) :1–8, 2008.
- [60] Marc Gershow and J. Golovchenko. Recapturing and trapping single molecules with a solid-state nanopore. *Nature Nanotechnology*, 2(12) :775–779, 2007.
- [61] David S. Goldfarb, Jean Gariépy, Gary Schoolnik, and Roger D. Kornberg. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature*, 322(6080) :641–644, 1986.
- [62] Fabian Göttfert, Christian A. Wurm, Veronika Mueller, Sebastian Berning, Volker C. Cordes, Alf Honigmann, and Stefan W. Hell. Coaligned dual-channel STED nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution. *Biophysical Journal*, 105(1) :6–8, 2013.
- [63] G. Guillot, L. Leger, and F. Rondelez. Diffusion of large flexible polymer chains through model porous membranes. *Macromol*, 18(12) :2531–2537, 1985.
- [64] Geneviève Guillot. *Transport de macromolécules en solution à travers des membranes poreuses modèles*. PhD thesis, Université de Paris-Sud, 1986.

- [65] Sarah E. Henrickson, Martin Misakian, Baldwin Robertson, and John J. Kasianowicz. Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Physical Review Letters*, 85(14) :3057–3060, 2000.
- [66] Bertil Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes*, chapter 3, pages 61–95. Sinauer Associates Inc., third edition, 2001.
- [67] J.E. Hinshaw, B.O. Carragher, and R. Milligan. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell*, 69(7) :1133–1141, 1992.
- [68] S. Howorka, L. Movileanu, O. Braha, and H. Bayley. Kinetics of duplex formation for individual DNA strands within a single protein nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23) :12996–3001, 2001.
- [69] Andrey Ivankin, Robert Y. Henley, Joseph Larkin, Spencer Carson, Michael L. Toscano, and Meni Wanunu. Label-free optical detection of biomolecular translocation through nanopore arrays. *ACS Nano*, 8(10) :10774–10781, 2014.
- [70] Fan Jin and Chi Wu. Observation of the First-Order Transition in Ultrafiltration of Flexible Linear Polymer Chains. *Physical Review Letters*, 96(23) :237801, jun 2006.
- [71] Tijana Jovanovic-Talisman, Jaclyn Tetenbaum-Novatt, Anna S. McKenney, Anton Zilman, Reiner Peters, Michael P. Rout, and Brian T. Chait. Artificial nanopores that mimic the transport selectivity of the nuclear pore complex. *Nature*, 457(7232) :1023–1027, feb 2008.
- [72] Tijana Jovanovic-Talisman, Jaclyn Tetenbaum-Novatt, Anna Sophia McKenney, Anton Zilman, Reiner Peters, Michael P. Rout, and Brian T. Chait. Artificial nanopores that mimic the transport selectivity of the nuclear pore complex. *Nature*, 457(7232) :1023–7, feb 2009.
- [73] Petr Kalab, Karsten Weis, and Rebecca Heald. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science*, 295(5564) :2452–2456, 2002.
- [74] Larisa E. Kapinos, Rafael L. Schoch, Raphael S. Wagner, Kai D. Schleicher, and Roderick Y.H. Lim. Karyopherin-centric control of nuclear pores based on molecular occupancy and kinetic analysis of multivalent binding with FG nucleoporins. *Biophysical Journal*, 106(8) :1751–1762, 2014.
- [75] J.J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D.W. Deamer. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24) :13770–3, nov 1996.
- [76] Oliver Keminer and Reiner Peters. Permeability of Single Nuclear Pores. *Biophysical Journal*, 77(1) :217–228, 1999.
- [77] U.F. Keyser, J. Van Der Does, C. Dekker, and N.H. Dekker. Optical tweezers for force measurements on DNA in nanopores. *Review of Scientific Instruments*, 77(10), 2006.
- [78] Ulrich F. Keyser, Bernard N. Koeleman, Stijn van Dorp, Diego Krapf, Ralph M.M. Smeets, Serge G. Lemay, Nynke H. Dekker, and Cees Dekker. Direct force measurements on DNA in a solid-state nanopore. *Nature Physics*, 2(7) :473–477, 2006.

- [79] Elena Kiseleva, Terence D. Allen, Sandra Rutherford, Mirella Bucci, Susan R. Wentz, and Martin W. Goldberg. Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *Journal of Structural Biology*, 145(3) :272–288, 2004.
- [80] H.A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7(4) :284–304, 1940.
- [81] Volker Kurz, Edward M. Nelson, Jiwook Shim, and Gregory Timp. Direct visualization of single-molecule translocations through synthetic nanopores comparable in size to a molecule. *ACS Nano*, 7(5) :4057–4069, 2013.
- [82] Ulrike Kutay, R. Bischoff, S. Kostka, R. Kraft, and D. Görlich. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nucleartransport factor. *Cell*, 90 :1061–1071, 1997.
- [83] Aksana a Labokha, Sabine Gradmann, Steffen Frey, Bastian B. Hülsmann, Henning Urlaub, Marc Baldus, and Dirk Görlich. Systematic analysis of barrier-forming FG hydrogels from *Xenopus* nuclear pore complexes. *The EMBO journal*, 32(2) :204–18, 2013.
- [84] Johan Lagerqvist, Michael Zwolak, and M. Di Ventra. Fast DNA Sequencing via Transverse Electronic Transport. *Nano Letters*, 6 :779–782, 2006.
- [85] Joseph Larkin, Mathieu Foquet, Stephen W. Turner, Jonas Korlach, and Meni Wanunu. Reversible positioning of single molecules inside zero-mode waveguides. *Nano Letters*, 14(10) :6023–6029, 2014.
- [86] Brittany J. Lee, Ahmet E. Cansizoglu, Katherine E. Süel, Thomas H. Louis, Zichao Zhang, and Yuh Min Chook. Rules for Nuclear Localization Sequence Recognition by KaryopherinBeta2. *Cell*, 126(3) :543–558, 2006.
- [87] Hwankyoo Lee, Richard M. Venable, Alexander D. Mackerell, and Richard W. Pastor. Molecular dynamics studies of polyethylene oxide and polyethylene glycol : hydrodynamic radius and shape anisotropy. *Biophysical journal*, 95(4) :1590–9, 2008.
- [88] Soo Jae Lee, Yoshiyuki Matsuura, Sai Man Liu, and Murray Stewart. Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature*, 435(7042) :693–696, 2005.
- [89] M.J. Levene, J. Korlach, S.W. Turner, M. Foquet, H.G. Craighead, and W.W. Webb. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*, 299(5607) :682–6, jan 2003.
- [90] Jiali Li, Derek Stein, Ciaran McMullan, Daniel Branton, Michael J. Aziz, and Jene Golovchenko. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*, 412(6843) :166–169, 2001.
- [91] Roderick Y.H. Lim, Ning-Ping P. Huang, Joachim Köser, Jie Deng, K.H. Aaron Lau, Kyrrill Schwarz-Herion, Birthe Fahrenkrog, and Ueli Aebi. Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25) :9512–9517, 2006.

- [92] Roderick Y.H. Lim, Katharine S. Ullman, and Birthe Fahrenkrog. Biology and Biophysics of the Nuclear Pore Complex and Its Components. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 267(08) :299–342, 2008.
- [93] Cheng An J. Lin, Ralph A. Sperling, Jimmy K. Li, Ting Ya Yang, Pei Yun Li, Marco Zanella, Walter H. Chang, and Wolfgang J. Parak. Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small*, 4(3) :334–341, 2008.
- [94] T.D. Long. Flow-Dependent Rejection of Polystyrene from Microporous Membranes. In *Journal of Polymer Science*, chapter 22, pages 1261–1281. Phys. ed. edition, 1984.
- [95] A. Loschberger, S. van de Linde, M.-C. Dabauvalle, B. Rieger, M. Heilemann, G. Krohne, and M. Sauer. Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *Journal of Cell Science*, 125(3) :570–575, 2012.
- [96] J. Christopher Love, Lara Estroff, Jennah K. Kriebel, Ralph G. Nuzzo, and George M. Whitesides. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical reviews*, 105(4) :1103–69, apr 2005.
- [97] Bo Lu, David P. Hoogerheide, Qing Zhao, Hengbin Zhang, Zhipeng Tang, Dapeng Yu, and Jene Golovchenko. Pressure-Controlled Motion of Single Polymers through Solid-State Nanopores. *Nano letters*, 13(7) :3048–3052, june 2013.
- [98] Ian G. Macara. Transport into and out of the Nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4) :570–594, 2001.
- [99] F.C. MacKintosh, J. Käs, and P.A. Janmey. Elasticity of semiflexible biopolymer networks. *Physical Review Letters*, 75(24) :4425–4428, 1995.
- [100] Alexis S. Madrid and Karsten Weis. Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma*, 115(2) :98–109, 2006.
- [101] F. Mahdavi, Y. Liu, and S. Blair. Modeling fluorescence enhancement from metallic nanocavities. *Plasmonics*, 2(3) :129–141, 2007.
- [102] Elizabeth A. Manrao, Ian M. Derrington, Mikhail Pavlenok, Michael Niederweis, and Jens H. Gundlach. Nucleotide Discrimination with DNA Immobilized in the MspA Nanopore. *PLoS One*, 6(10) :1–7, 2011.
- [103] J.E. Mark and P.J. Flory. The configuration of the polyoxyethylene chain. *Journal of the American Chemical Society*, 1015(2) :2–5, 1965.
- [104] J.F. Marko, E.D. Siggia, and S. Smith. Entropic Elasticity of X-Phage DNA Explicit and Implicit Learning and Maps of Cortical Motor Output. *Science*, 265(5178) :1599–1600, 1994.
- [105] Jérôme Mathé, Hasina Visram, Virgile Viasnoff, Yitzhak Rabin, and Amit Meller. Nanopore unzipping of individual DNA hairpin molecules. *Biophysical journal*, 87(5) :3205–12, 2004.

- [106] K.E. Matlack, W. Mothes, and T.A. Rapoport. Protein translocation : tunnel vision. *Cell*, 92(3) :381–90, feb 1998.
- [107] Hans Mehlín, Bertil Danesholt, and Ulf Sköglund. Translocation of a specific pre-messenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography. *Cell*, 69(4) :605–613, 1992.
- [108] A. Meller, L. Nivon, and D. Branton. Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. *Physical Review Letters*, 86(15) :3435–3438, 2001.
- [109] Amit Meller and Daniel Branton. Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore. *Electrophoresis*, 23(16) :2583–91, aug 2002.
- [110] Christopher A. Merchant, Ken Healy, Meni Wanunu, Vishva Ray, Neil Peterman, John Bartel, Michael D. Fischbein, Kimberly Venta, Zhengtang Luo, A.T. Charlie Johnson, and Marija Drndić. DNA translocation through graphene nanopores. *Nano Letters*, 10(8) :2915–2921, 2010.
- [111] Lingling Miao and Klaus Schulten. Transport-Related Structures and Processes of the Nuclear Pore Complex Studied through Molecular Dynamics. *Structure*, 17(3) :449–459, 2009.
- [112] Sigrid Milles, Khanh Huy Bui, Christine Koehler, Mikhail Eltsov, Martin Beck, and Edward A. Lemke. Facilitated aggregation of FG nucleoporins under molecular crowding conditions. *EMBO reports*, 14(2) :178–83, 2013.
- [113] Joshua S. Mincer and Sanford M. Simon. Simulations of nuclear pore transport yield mechanistic insights and quantitative predictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31) :351–358, 2011.
- [114] Thomas Monecke, Thomas Güttler, Piotr Neumann, Achim Dickmanns, Dirk Görlich, and Ralf Ficner. Crystal Structure of the Nuclear Export Receptor CRM1 in Complex with Snuportin1 and RanGTP. *Science*, 324 :1087–1091, 2009.
- [115] Gael Moneron and Stefan W. Hell. Two-photon excitation STED microscopy. *Optics Express*, 17(17) :14567–14573, 2009.
- [116] R. Moussavi-Baygi, Y. Jamali, R. Karimi, and M.R.K. Mofrad. Biophysical coarse-grained modeling provides insights into transport through the nuclear pore complex. *Biophysical Journal*, 100(6) :1410–1419, 2011.
- [117] P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, and W.C. Wescott. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194 :979–980, 1962.
- [118] M. Muthukumar. Theory of capture rate in polymer translocation. *The Journal of chemical physics*, 132(19) :195101, may 2010.
- [119] M.V. Nachury and K. Weis. The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17) :9622–9627, 1999.

- [120] Tammie Nelson, Bo Zhang, and Oleg V. Prezhdo. Detection of nucleic acids with graphene nanopores : Ab initio characterization of a novel sequencing device. *Nano Letters*, 10(9) :3237–3242, 2010.
- [121] Axel E. Nkodo, Jean M. Garnier, Bernard Tinland, Hongji Ren, Claude Desruisseaux, Laurette C. McCormick, Guy Drouin, and Gary W. Slater. Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis. *Electrophoresis*, 22(12) :2424–2432, 2001.
- [122] Theo Odijk. On the Statistics and Dynamics of Confined or Entangled Stiff Polymers. *Macromolecules*, 1344(3) :1340–1344, 1983.
- [123] Theo Odijk. Similarity Applied to the Statistics of Confined Stiff Polymers. *Macromolecules*, 17(3) :502–503, 1984.
- [124] M.G. Opferman, R.D. Coalson, David Jasnow, and Anton Zilman. Morphological Control of Grafted Polymer Films by Nanoparticle Binding. *Physical Review E*, 86, 2012.
- [125] Dino Osmanović, Ariberto Fassati, Ian J. Ford, and Bart W. Hoogenboom. Physical modelling of the nuclear pore complex. *Soft Matter*, 9(44) :10442, 2013.
- [126] A.G. Oukhaled, A.-L. Biance, J. Pelta, L. Auvray, and L. Bacri. Transport of Long Neutral Polymers in the Semidilute Regime through a Protein Nanopore. *Physical Review Letters*, 108(8) :1–4, 2012.
- [127] G. Oukhaled, J. Mathé, A.L. Biance, L. Bacri, J.M. Betton, D. Lairez, J. Pelta, and L. Auvray. Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording. *Physical Review Letters*, 98(15) :98–101, 2007.
- [128] J.M. Pages, C.E. James, and M. Winterhalter. The porin and the permeating antibiotic : a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6(12) :893–903, 2008.
- [129] P.L. Paine, L.C. Moore, and S.B. Horowitz. Nuclear envelope permeability. *Nature*, 254(5496) :109–114, 1975.
- [130] P.L. Paine and P. Scherr. Drag coefficients for the movement of rigid spheres through liquid-filled cylindrical pores. *Biophysical Journal*, 15(10) :1087–1091, 1975.
- [131] Nelly Pante and Michael Kann. Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of 39 nm. *Molecular biology of the cell*, 13(February) :425–434, 2002.
- [132] E. Paraskeva. CRM1-mediated Recycling of Snurportin 1to the Cytoplasm. *The Journal of Cell Biology*, 145(2) :255–264, 1999.
- [133] Samir S. Patel, Brian J. Belmont, Joshua M. Sante, and Michael F. Rexach. Natively Unfolded Nucleoporins Gate Protein Diffusion across the Nuclear Pore Complex. *Cell*, 129(1) :83–96, 2007.
- [134] Orit Peleg, Mario Tagliacuzzi, Martin Krüger, Yitzhak Rabin, and Igal Szleifer. Morphology control of hairy nanopores. *ACS Nano*, 5(6) :4737–4747, 2011.
- [135] Lucy F. Pemberton and Bryce M. Paschal. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 6(3) :187–198, 2005.

- [136] Thomas T. Perkins, Douglas E. Smith, Ronald G. Larson, and Steven Chu. Stretching of Single Tethered Polymer in a Uniform Flow. *Science*, 268(April) :83–87, 1995.
- [137] R. Peters. Nucleo-cytoplasmic flux and intracellular mobility in single hepatocytes measured by fluorescence microphotolysis. *The EMBO Journal*, 3(8) :1831–6, 1984.
- [138] R. Peters and K. Beck. Translational diffusion in phospholipid monolayers measured by fluorescence microphotolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(23) :7183–7187, 1983.
- [139] Reiner Peters. Translocation through the nuclear pore complex : Selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. *Traffic*, 6(5) :421–427, 2005.
- [140] Reiner Peters. Use of *Xenopus laevis* oocyte nuclei and nuclear envelopes in nucleocytoplasmic transport studies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 322 :259–72, jan 2006.
- [141] Tino Pleiner, Mark Bates, Sergei Trakhanov, Chung Tien Lee, Jan Erik Schliep, Hema Chug, Marc Böhning, Holger Stark, Henning Urlaub, and Dirk Görlich. Nanobodies : Site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope- mapping and native protein complex isolation. *eLife*, 4(December 2015), 2015.
- [142] Evgeny Popov, Michel Nevière, Jérôme Wenger, Pierre-François Lenne, Hervé Rigneault, Patric Chaumet, Nicolas Bonod, José Dintinger, and Thomas Ebbesen. Field enhancement in single subwavelength apertures. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 23(9) :2342–2348, 2006.
- [143] Aurelian Radu, Mary Shannon Moore, and Günter Blobel. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell*, 81(2) :215–222, 1995.
- [144] Walter Reisner, Jason P. Beech, Niels B. Larsen, Henrik Flyvbjerg, Anders Kristensen, and Jonas O. Tegenfeldt. Nanoconfinement-enhanced conformational response of single DNA molecules to changes in ionic environment. *Physical Review Letters*, 99(5) :3–6, 2007.
- [145] Walter Reisner, Keith J. Morton, Robert Riehn, Yan Mei Wang, Zhaoning Yu, Michael Rosen, James C. Sturm, Stephen Y. Chou, Erwin Frey, and Robert H. Austin. Statics and dynamics of single DNA molecules confined in nanochannels. *Physical Review Letters*, 94(19) :1–4, 2005.
- [146] Walter Reisner, Jonas N. Pedersen, and Robert H. Austin. DNA confinement in nanochannels : physics and biological applications. *Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain)*, 75(10) :106601, oct 2012.
- [147] Michael Rexach and Günter Blobel. Protein import into nuclei : association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, 83(5) :683–692, 1995.
- [148] Katharina Ribbeck and Dirk Go. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. 21(11), 2002.

- [149] Michael P. Rout, John D. Aitchison, Marcelo O. Magnasco, and Brian T. Chait. Virtual gating and nuclear transport : The hole picture. *Trends in Cell Biology*, 13(12) :622–628, 2003.
- [150] Michael P. Rout, John D. Aitchison, Adisetyantari Suprpto, Kelly Hjertaas, Yingming Zhao, and Brian T. Chait. The Yeast Nuclear Pore Complex. *The Journal of cell biology*, 148(4) :635–652, 2000.
- [151] Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei W. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 3(10) :793–795, 2006.
- [152] Bert Sakmann and Erwin Neher. *Single-Channel recording*. Springer, second edition, 1995.
- [153] K.T. Samiee, M. Foquet, L. Guo, E.C. Cox, and H.G. Craighead. λ -Repressor Oligomerization Kinetics at High Concentrations Using Fluorescence Correlation Spectroscopy in Zero-Mode Waveguides. *Biophysical journal*, 88(3) :2145–2153, 2005.
- [154] Birgitta Schiedt. *Characterization and application of ion track-etched nanopores*. PhD thesis, Heidelberg Germany, 2007.
- [155] Andrea Schlune, Victor Shahin, Karoline Enss, Herman Schillers, and Hans Oberleithner. Plugs in nuclear pores : Transcripts in early oocyte development identified with nanotechniques. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(3) :567–576, 2006.
- [156] Gregory F. Schneider, Stefan W. Kowalczyk, Victor E. Calado, Gregory Pandraud, Henny W. Zandbergen, Lieven M.K. Vandersypen, and Cees Dekker. DNA Translocation through Graphene Nanopores. *Nano Letters*, 10(8) :3163–3167, 2010.
- [157] Rafael L. Schoch, Larisa E. Kapinos, and Roderick Y.H. Lim. Nuclear transport receptor binding avidity triggers a self-healing collapse transition in FG-nucleoporin molecular brushes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(42) :16911–6, 2012.
- [158] Thomas U. Schwartz. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(2) :221–226, 2005.
- [159] Nataliya Shulga and David S. Goldfarb. Binding Dynamics of Structural Nucleoporins Govern Nuclear Pore Complex Permeability and May Mediate Channel Gating Binding Dynamics of Structural Nucleoporins Govern Nuclear Pore Complex Permeability and May Mediate Channel Gating. *Molecular and Cellular Biology*, 23(2) :534–542, 2003.
- [160] S.M. Simon, C.S. Peskin, and G.F. Oster. What drives the translocation of proteins? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9) :3770–3774, 1992.
- [161] Z. Siwy and A. Fuliński. Fabrication of a Synthetic Nanopore Ion Pump. *Physical Review Letters*, 89(19), 2002.
- [162] Douglas E. Smith, Thomas T. Perkins, and Steven Chu. Dynamical Scaling of DNA Diffusion Coefficients. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 29 :1372–1373, 1996.

- [163] L.D. Smith, W.L. Xu, and R.L. Varnold. Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol*, 36 :45–60, 1991.
- [164] L. Song, M.R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J.E. Gouaux. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294) :1859–66, 1996.
- [165] David Stoddart, Andrew J. Heron, Ellina Mikhailova, Giovanni Maglia, and Hagan Bayley. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19) :7702–7, 2009.
- [166] Daniel Stoffler, Bernhard Feja, Birthe Fahrenkrog, Jochen Walz, Dieter Typke, and Ueli Aebi. Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture : Implications for nucleocytoplasmic transport. *Journal of Molecular Biology*, 328(1) :119–130, 2003.
- [167] A.J. Storm, J.H. Chen, X.S. Ling, H.W. Zandbergen, and C. Dekker. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision. *Nature Materials*, 2 :537–540, 2003.
- [168] Arnold J. Storm, Cornelis Storm, Jianghua Chen, Henny Zandbergen, Jean François Joanny, and Cees Dekker. Fast DNA translocation through a solid-state nanopore. *Nano Letters*, 5(7) :1193–1197, 2005.
- [169] Lisa Strawn, Tianxiang Shen, Nataliya Shulga, David S. Goldfarb, and Susan R. Wentz. Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nature cell biology*, 6(3) :197–206, 2004.
- [170] Masateru Taniguchi, Makusu Tsutsui, Kazumichi Yokota, and Tomoji Kawai. Fabrication of the gating nanopore device. *Applied Physics Letters*, 95(12) :8–11, 2009.
- [171] GE Water & Process Technologies. GE Polycarbonate Track Etch (PCTE) Membrane. Technical report, 2010.
- [172] Jonas O. Tegenfeldt, Christelle Prinz, Han Cao, Steven Chou, Walter W. Reisner, Robert Riehn, Yan Mei Wang, Edward C. Cox, James C. Sturm, Pascal Silberzan, and Robert H. Austin. The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30) :10979–10983, 2004.
- [173] Laura J. Terry, Eric B. Shows, and Susan R. Wentz. Crossing the nuclear envelope : hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5855) :1412–6, 2007.
- [174] Vivek V. Thacker, Sandip Ghosal, Silvia Hernandez-Ainsa, Nicholas A.W. Bell, and Ulrich F. Keyser. Studying DNA translocation in nanocapillaries using single molecule fluorescence. *Applied Physics Letters*, 101(22), 2012.
- [175] Lasse H. Thamdrup, Anna Klukowska, and Anders Kristensen. Stretching DNA in polymer nanochannels fabricated by thermal imprint in PMMA. *Nanotechnology*, 19(12) :125301, 2008.

- [176] Benjamin L. Timney, Jaclyn Tetenbaum-Novatt, Diana S. Agate, Rosemary Williams, Wenzhu Zhang, Brian T. Chait, and Michael P. Rout. Simple kinetic relationships and nonspecific competition govern nuclear import rates in vivo. *Journal of Cell Biology*, 175(4) :579–593, 2006.
- [177] Elizabeth J. Tran and Susan R. Wenthe. Dynamic Nuclear Pore Complexes : Life on the Edge. *Cell*, 125(6) :1041–1053, 2006.
- [178] M. Tschödrich-Rotter and R. Peters. An optical method for recording the activity of single transporters in membrane patches. *Journal of Microscopy*, 192(2) :114–125, 1998.
- [179] Sotaro Uemura, Colin Echeverría Aitken, Jonas Korlach, Benjamin a Flusberg, Stephen W. Turner, and Joseph D. Puglisi. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, 464(7291) :1012–1017, 2010.
- [180] P. Utko, F. Persson, A. Kristensen, and N.B. Larsen. Injection molded nanofluidic chips : fabrication method and functional tests using single-molecule DNA experiments. *Lab Chip*, 11(2) :303–308, 2011.
- [181] W. Vercoutere, S. Winters-Hilt, H. Olsen, D. Deamer, D. Haussler, and M. Akeson. Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel. *Nature biotechnology*, 19(3) :248–252, 2001.
- [182] Igor D. Vilfan, Yu-Chih Tsai, Tyson A. Clark, Jeffrey Wegener, Qing Dai, Chengqi Yi, Tao Pan, Stephen W. Turner, and Jonas Korlach. Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), 2013.
- [183] Raphael S. Wagner, Larisa E. Kapinos, Neil J. Marshall, Murray Stewart, and Roderick Y.H. Lim. Promiscuous binding of karyopherinBeta1 modulates FG nucleoporin barrier function and expedites NTF2 transport kinetics. *Biophysical Journal*, 108(4) :918–927, 2015.
- [184] Yanwei Wang, Douglas R. Tree, and Kevin D. Dorfman. Simulation of DNA extension in nanochannels. *Macromolecules*, 44(16) :6594–6604, 2011.
- [185] Meni Wanunu. Nanopores : A journey towards DNA sequencing. *Physics of Life Reviews*, 9(2) :125–158, 2012.
- [186] Meni Wanunu, Will Morrison, Yitzhak Rabin, Alexander Y. Grosberg, and Amit Meller. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. *Nature nanotechnology*, 5(2) :160–5, 2010.
- [187] P. Wedekind, U. Kubitscheck, and R. Peters. Scanning microphotolysis : a new photobleaching technique based on fast intensity modulation of a scanned laser beam and confocal imaging. *Journal of microscopy*, 176 :23–33, 1994.
- [188] Karsten Weis. Regulating access to the genome : Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112(4) :441–451, 2003.

- [189] Jérôme Wenger, Davy Gérard, José Dintinger, Oussama Mahboub, Nicolas Bonod, Evgeny Popov, Thomas W. Ebbesen, and Hervé Rigneault. Emission and excitation contributions to enhanced single molecule fluorescence by gold nanometric apertures. *Optics Express*, 16(5) :3008–3020, 2008.
- [190] S.R. Wentz. Gatekeepers of the nucleus. *Science*, 288(5470) :1374–7, 2000.
- [191] Susan R. Wentz and Michael P. Rout. The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*, 2(10), oct 2010.
- [192] Justin Yamada, Joshua L. Phillips, Samir Patel, Gabriel Goldfien, Alison Calestagne-Morelli, Hans Huang, Ryan Reza, Justin Acheson, Viswanathan V. Krishnan, Shawn Newsam, Ajay Gopinathan, Edmond Y. Lau, Michael E. Colvin, Vladimir N. Uversky, and Michael F. Rexach. A Bimodal Distribution of Two Distinct Categories of Intrinsically Disordered Structures with Separate Functions in FG Nucleoporins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(10) :2205–2224, 2010.
- [193] Qing Yang, Michael P. Rout, and Christopher W. Akey. Three-Dimensional Architecture of the Isolated Yeast Nuclear Pore Complex : Functional and Evolutionary Implications. *Molecular Cell*, 1(2) :223–234, 1998.
- [194] Yingzi Yang, Theodore W. Burkhardt, and Gerhard Gompper. Free energy and extension of a semiflexible polymer in cylindrical confining geometries. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 76(1) :1–7, 2007.
- [195] Raphael Zahn, Dino Osmanović, Severin Ehret, Carolina Araya Callis, Steffen Frey, Murray Stewart, Changjiang You, Dirk Görlich, Bart W Hoogenboom, and Ralf P Richter. A physical model describing the interaction of nuclear transport receptors with FG nucleoporin domain assemblies. *eLife*, 5 :e14119, 2016.
- [196] Anton Zilman, Stefano Di Talia, Brian T. Chait, Michael P. Rout, and Marcelo O. Magnasco. Efficiency, selectivity, and robustness of nucleocytoplasmic transport. *PLoS computational biology*, 3(7) :e125, jul 2007.
- [197] M. Zuker, D.H. Mathews, and D.H. Turner. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction : a Practical Guide. *RNA Biochemistry and Biotechnology*, pages 11–43, 1999.
- [198] Michael Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13) :3406–3415, 2003.
- [199] Michael Zwolak and Massimiliano Di Ventra. Electronic signature of DNA nucleotides via transverse transport. *Nano Letters*, 5(3) :421–424, 2005.

Résumé

La translocation de biopolymères à travers un nanopore intervient dans de nombreux processus biologiques et technologiques, comme le transport nucléocytoplasmique dans le pore nucléaire des cellules eucaryotes, la sécrétion de protéines, le séquençage rapide de l'ADN ou l'électrophorèse capillaire.

Nous proposons une technique optique en molécule unique originale pour l'étude de la translocation de biopolymères à travers un nanopore basée sur l'effet *Zero-Mode Waveguide*. Nous nous sommes intéressés au passage d'ADN double-brin de plusieurs tailles, d'ADN simple-brin et d'ARN, entraînés par un flux à travers une membrane nanoporeuse *track-etched*. Nous montrons qu'il existe un flux critique régissant le passage des biopolymères indépendant du rayon des pores ainsi que de la taille des biopolymères et de leur nature, conformément aux prédictions théoriques de Brochard et de Gennes.

Le pore nucléaire est un nanopore biologique responsable du transport sélectif entre le noyau et le cytoplasme des cellules. Nous avons étudié l'influence de la concentration en importin β 1 – une protéine nécessaire au transport nucléocytoplasmique – sur l'organisation du canal central du pore nucléaire de *Xenopus laevis* en mesurant la diffusion de molécules de Dextran fluorescentes à travers celui-ci. Nous observons une ouverture du canal central à basse concentration suivi d'un rétrécissement de celui-ci à plus forte concentration. Cette évolution du rayon du canal central avec la concentration en importin β 1 est conforme aux modèles en champ moyen de Opferman *et coll.* et de Ando *et coll.* et aux observations expérimentales sur des systèmes reconstitués *in vitro* de Lim *et coll.* et Zahn *et coll.*

Abstract

The translocation of biopolymers through a nanopore is a feature common to many biological and technological processes such as the nucleocytoplasmic transport through the nuclear pore complex (NPC), protein secretion, fast DNA sequencing or capillary electrophoresis.

We have developed an original single molecule optical detection technique for the study of biopolymers translocation through a nanopore based on the Zero-Mode Waveguide effect. We studied the passage of double stranded DNA of different sizes, of single stranded DNA and of double-stranded RNA driven by a flux through track-etched nanoporous membranes. We demonstrate that translocation is governed by a critical flux independent of both biopolymer size and nature and of the pore radius in agreement with the theoretical predictions of Brochard and de Gennes.

The NPC is a biological nanopore responsible for the selective transport between cytoplasm and nucleus in cells. We studied the influence of importin β 1 concentration – a protein involved in the nucleocytoplasmic transport – on the structure of the central channel of the NPC of *Xenopus laevis* by assessing the diffusion of fluorescently labeled Dextran molecules through the NPC. We observe an opening of the central channel at low concentration followed by a shrinking at higher concentration in importin β 1 in agreement with mean-field models from Opferman *et al.* and Ando *et al.* and with experiments on biomimetic *in vitro* systems from Lim *et al.* and Zahn *et al.*