



Conception d'un nanopore unique pour mimer un canal biologique et pour la détection de bio-macromolécules

Mathilde Lepoitevin

► To cite this version:

Mathilde Lepoitevin. Conception d'un nanopore unique pour mimer un canal biologique et pour la détection de bio-macromolécules. Matériaux. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT226 . tel-01809029

HAL Id: tel-01809029

<https://theses.hal.science/tel-01809029>

Submitted on 6 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier**

**Préparée au sein de l'école doctorale
SCIENCES CHIMIQUES BALARD (SCB) – ED 459
Et de l'unité de recherche Institut Européen des
Membranes (UMR5635, CNRS, UM, ENSCM)**

Spécialité : **Chimie et Physicochimie des matériaux**

Présentée par **Mathilde P. LEPOITEVIN**

**CONCEPTION D'UN NANOPORE UNIQUE
POUR MIMER UN CANAL BIOLOGIQUE ET
POUR LA DETECTION DE
BIOMACROMOLECULES**

Soutenue le 25 Novembre 2016 devant le jury composé de

Mme Marie Claude CLOCHARD , Chercheur CEA, Ecole Polytechnique	Rapporteur
M. Laurent BACRI , Maître de conférences, Université d'Évry	Rapporteur
Mme Maguy JABER , Professeure, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
M. Marc CRETIN , Professeur, Université de Montpellier	Président
M. Jean-Baptiste THIBAUD , Directeur de Recherche, CNRS, IBMM	Examineur
M. Sébastien BALME , Maître de conférences, Université de Montpellier	Directeur de thèse
M. Mikhael BECHELANY , Chargé de Recherche, CNRS, IEM	Invité



Table des matières

Table des matières

Table des matières	1
Introduction générale	7
Chapitre 1.	13
Etude bibliographique	13
1. <i>Les nanopores</i>	15
1.1. Nanopores en biologie	15
1.2. Les nanopores solides	17
2. <i>Conduction ionique à travers un nanopore solide</i>	23
2.1. Double couche électrique	23
2.2. Transport ionique dans les nanopores	26
2.3. Rectification du courant ionique	28
3. <i>Principes de la détection de molécule à l'échelle unique</i>	32
4. <i>Modification de la surface et fonctionnalisation</i>	35
4.1. Dépôt sans électrodes (« <i>Electroless plating</i> »)	35
4.2. Dépôt par couche atomique (« <i>Atomic Layer Deposition</i> » ALD)	36
4.3. Modification chimique sur les fonctions en surface des nanopores	37
4.4. Auto-assemblage	41
4.5. Pulvérisation cathodique d'ions (<i>Ion Sputtering</i>) asymétrique	42
4.6. Evaporation physique ou chimique, fonctionnalisation asymétrique	42
4.7. Modification plasma	43
5. <i>Nanopore biomimétique</i>	44
5.1. Nanopore unique pH répondant	44
5.2. Nanopores thermo-répondants	45
5.3. Nanopores photosensibles	45
5.4. Nanopores métal ion- sensibles	46
5.5. Nanopores biomolécule-sensibles	46
5.6. Nanopore anti-bioadhérant	47
5.7. Nanopore nucléaire biomimétique	48
Chapitre 2.	51
Partie expérimentale.....	51
1. <i>Matériel</i>	53

1.1. Cellule de conductimétrie	53
1.2. Amplificateur patch-clamp	54
2. Mesures électriques	55
2.1. Mesure courant-voltage (I-V)	55
2.2. Pulsation résistive.....	57
3. Fabrication de nanopores uniques.....	58
3.1. Nanopores obtenus par la méthode de traces attaquées.....	58
3.2. Fabrication de nanopores en SiN	65
4. Modification et fonctionnalisation.....	65
4.1. Dépôt de couches atomiques (ALD)	65
Chapitre 3.	69
Nanopore fonctionnalisé stimuli-répondant	69
1. Fonctionnalisation irréversible.....	71
1.1. Fonctionnalisation de la surface interne du pore.....	71
1.2. Fonctionnalisation de la surface externe et interne du pore	74
1.2.1. Fonctionnalisation par avidine ou streptavidine.....	78
1.2.3. Détection de protéines biotinylées et d'anticorps	83
2. Fonctionnalisation réversible	87
2.1. Processus de fonctionnalisation	88
2.2. Détection de macromolécules.....	96
3. Discussion	98
Chapitre 4.	102
Détection de molécule unique : Influence de la surface du pore	102
1. Influence de la charge de surface d'un nanopore sur le passage d'homo-polynucléotides.....	104
1.1. Conception des nanopores et caractérisation.....	104
1.2. Influence de l'état de surface sur le passage de polynucléotides à travers le nanopore.....	105
1.3. Détection de polynucléotides.....	107
1.4. Influence sur la barrière entropique d'ions chélatants, exemple du magnésium.....	114
2. Détection d'ADN simple et double brins, courts, par des mesures de courant électrique en utilisant des nanopores coniques recouvert d'Al ₂ O ₃ par dépôt de couche atomique	117
2.1. Passivation par couche d'oxyde d'aluminium	117
2.2. Détection et discrimination grâce aux blocages de courant et temps de résidence.....	119

2.3. Rapport signal sur bruit	122
3. <i>Discussion</i>	123
Chapitre 5.	126
Détection d'agrégats d'amyloïdes par nanopores fonctionnalisés.....	126
1. <i>Fonctionnalisation des nanopores</i>	128
1.1. Fonctionnalisation interne et externe	128
1.2. Fonctionnalisation sélective de l'entrée du pore	131
1.3. Fonctionnalisation sélective à l'intérieur du pore	135
1.4. Hydrophilicité des matériaux fonctionnalisés	136
2. <i>Détection d'amyloïdes dans les nanopores fonctionnalisés.....</i>	138
2.1. Préparation des amyloïdes	138
2.2. Détection des amyloïdes par nanopore fonctionnalisé par auto-assemblage	140
3. <i>Discussion</i>	144
Conclusion générale	146
Index et références	150
<i>Index des figures</i>	152
<i>Index des tables</i>	160
<i>Références bibliographique</i>	161
Annexes	174

Introduction générale

Un nanopore artificiel est une ouverture de taille nanométrique faite dans un film mince synthétique (polymère ou inorganique). Aujourd'hui, la technologie du nanopore unique pour la détection de macromolécule, ou de nanoparticule est considérée comme l'une des avancées majeures dans le milieu des nanotechnologies depuis une vingtaine d'années. Parmi les applications potentielles le séquençage d'acide désoxyribonucléique (ADN) est la plus notable. Le succès dans ce domaine repose sur l'apparente simplicité des méthodes expérimentales. En effet, la détection de macromolécule est basée sur le principe du compteur Coulter. L'expérience consiste à enregistrer le courant induit par le transport ionique à travers un pore. La macromolécule est détectée grâce aux modifications de courant induites par son passage à travers le pore. Cette méthode d'analyse en temps réel permet d'entrevoir une large gamme d'application dans le domaine du diagnostic précoce dès lors qu'il sera possible de pouvoir discriminer avec un minimum d'erreur des cibles (protéines, amyloïdes, anticorps etc...) d'un mélange complexe (le sang) en un minimum d'étape de préparation (extraction simple du sérum par centrifugation). Bien que l'idée paraisse relativement simple, il est indispensable d'approfondir les recherches pluridisciplinaires dans les domaines de la biologie, la chimie et la physique.

Le terme de nanopore s'inspire des canaux biologiques qui se situent dans la membrane cellulaire, et qui permettent le transport d'ions ou de molécules entre les milieux intra- et extra-cellulaires. Ces canaux protéiques jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques puisqu'ils permettent le contrôle du flux d'ions et de molécules grâce à leurs sélectivités ou à leurs propriétés d'ouverture/fermeture, en réponse à un stimulus. Les nanopores uniques artificiels sont apparus il y a quinze ans, avec la capacité de fabriquer un nanopore unique dans des matériaux inorganiques ou polymères. Ils présentent de nombreux avantages par rapport aux biologiques, tels que la robustesse, le contrôle du nombre de pores, et une longue durée de vie (plusieurs jours ou semaines). Toutefois, comparés à leurs homologues biologiques, les limitations des nanopores solides sont leur manque de sélectivité et de réponse aux stimuli extérieurs tels que le pH, la force ionique, les inhibiteurs, et les anticorps. Ainsi des améliorations en ce qui concerne les nanopores doivent être apportés. Leur fonctionnalisation de surface est une solution qui permet d'améliorer à la fois leur propriété de transport sélective afin d'obtenir des membranes à hautes performances ainsi que leur capacité de détection de biomolécules pour la réalisation de biocapteurs permettant la détection de molécules (cibles) à faible concentration (fmol L^{-1}), en temps réel et/ou à l'échelle de la molécule unique. Bien que la plupart des recherches se soient focalisées sur le séquençage d'ADN, d'autres applications sont aussi étudiées, tels que la détection de protéines, d'amyloïdes ou la conception de membranes pour la séparation ionique ou stimuli-répondantes. Plusieurs défis doivent être relevés pour améliorer les propriétés des nanopores :

- Eviter l'adsorption non-spécifique de biomolécules (en particulier les protéines) est indispensable pour développer des biocapteurs.

- Développer les systèmes nanopores stimuli-répondants, particulièrement intéressants pour de nombreuses applications comme la délivrance de médicaments ou la fabrication de plateforme de relargage contrôlés.

Cette thèse s'intéresse à la conception et au développement de nanopores biomimétiques uniques synthétiques. Nos objectifs au cours de cette thèse ont été de fonctionnaliser des nanopores synthétiques uniques pour (i) limiter et éviter l'adsorption non-spécifique, (ii) obtenir des pores multifonctionnels répondant à plusieurs stimuli et réversibles, (iii) étudier l'influence de la modification de la surface sur le transport de macromolécules

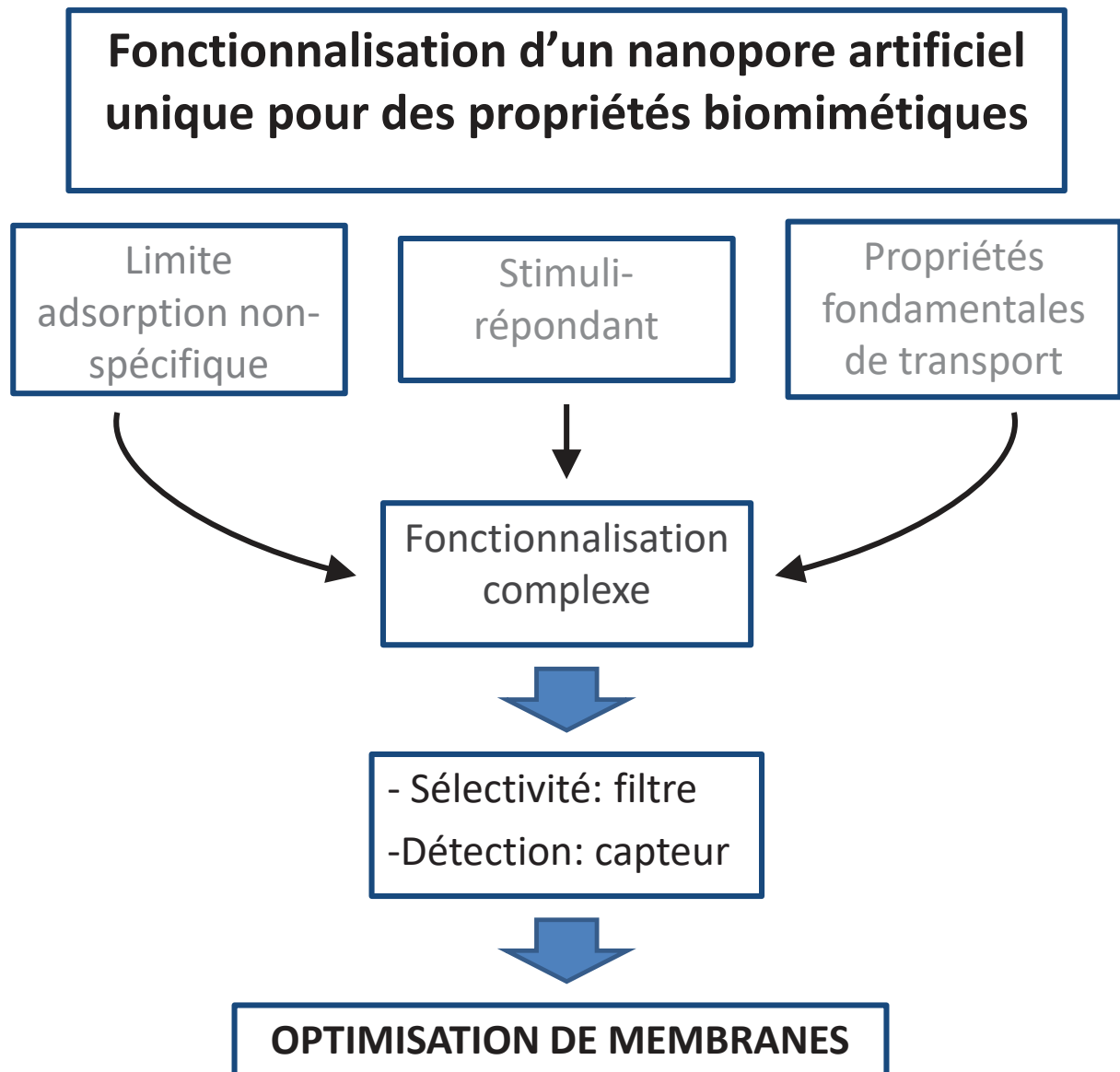


Figure 1: Synoptiques des objectifs attendus au cours de cette thèse

Ce manuscrit est organisé en cinq chapitres. Dans le premier chapitre, nous rappelons des généralités sur les nanopores. Est décrit ensuite le principe de la conduction ionique à travers un nanopore solide, ainsi que les bases fondamentales sur la détection de macromolécules à travers un nanopore synthétique. Puis sont décrites différentes techniques de modification et fonctionnalisation de surface. Nous donnons pour finir des exemples de nanopores biomimétiques et stimuli répondants.

Le deuxième chapitre est consacré à la partie expérimentale, les différents matériaux et méthodes utilisés au cours de cette thèse. Nous décrivons les méthodes d'obtention d'un nanopore unique ainsi que les techniques de caractérisation, et les principes de mesure électrique.

Le chapitre trois est consacré aux résultats et discussions concernant la fonctionnalisation de nanopores pour mimer des canaux biologiques stimuli-répondants. Nous décrivons deux méthodes de fonctionnalisation, utilisant des complexes avidine-biotine. La première est irréversible car utilisant des liaisons covalentes et la seconde est réversible grâce à des complexes polyélectrolyte-biotine.

Le quatrième chapitre présente la détection de molécule à l'échelle unique par la technique de pulsation résistive. Le passage de brins de polynucléotides ou d'ADN à travers des nanopores ayant subi des modifications de surface est étudié. Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'état de surface et de sa charge sur la capture de polynucléotides.

Enfin dans le dernier chapitre, nous discuterons comment nous avons tenté de combiner les propriétés pour empêcher l'adsorption non-spécifique tout en étudiant le passage de longs fibrilles d'amyloïde de lysozyme.

En conclusion, nous rassemblons l'essentiel de nos résultats et suggérons quelques perspectives concernant la suite des travaux.

Chapitre 1.

Etude bibliographique

Le travail réalisé au cours de cette thèse fait appel à des connaissances diverses. Ce premier chapitre a pour objectif d'introduire certaines notions fondamentales qui seront utiles dans les chapitres suivants. Il comporte cinq parties.

Tout d'abord nous allons décrire les différents types de nanopores et la fabrication des nanopores solides. Ensuite nous nous intéresserons à la conduction ionique à travers un nanopore, et nous décrirons les principes de détection de molécule à l'échelle unique par nanopore. Puis nous passerons en revue différentes techniques pour modifier et fonctionnaliser la surface. Nous présenterons quelques exemples de nanopores biomimétiques et stimuli-répondants.

1. Les nanopores

Un nanopore est défini comme un pore ayant un diamètre de un à plusieurs centaines de nanomètres. Ce terme a été employé en premier pour les canaux biologiques. Ces derniers jouent un rôle crucial dans presque tous les mécanismes du vivant. Depuis plusieurs années, un intérêt croissant s'est développé pour fabriquer leurs analogues synthétiques. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux nanopores uniques « solides ». Ils ont l'avantage d'être un système optimal pour étudier les propriétés de transport de différents électrolytes simples ou complexes, et permettent de détecter le passage d'une molécule à l'échelle unique.

1.1. Nanopores en biologie

1.1.1. Canaux ioniques

Les canaux ioniques sont majoritairement formés par des auto-assemblages de protéines pour former un pore dans les membranes cellulaires. Ils sont omniprésents et jouent un rôle vital dans presque tous les processus physiologiques ayant lieu dans les organismes vivants. Les canaux ioniques sont des éléments pouvant être excitables, présents dans les membranes des cellules nerveuses, des muscles ou d'autres tissus. Ils produisent et transmettent des signaux électriques dans les cellules vivantes. Ils sont signes de vie, car les fonctions physiologiques telles que le stockage d'énergie, la transduction de signal dans les nerfs et les muscles pour communiquer à travers le système cellulaire dépendent fortement de la régulation et du transport des ions à travers les barrières des cellules.¹ Les canaux ioniques biologiques stimulables s'ouvrent et se ferment en réponse à des stimuli externes, tel que le pH, la force ionique, la lumière, une différence de potentiel transmembranaire, etc... Leurs ouvertures/fermetures peuvent être étudiées par trois méthodes de mesures électriques : le courant ionique transitoire, les fluctuations de courant ionique, et les blocages de courant, qui sont dus aux changements de conformations à l'intérieur du pore. Les premiers à avoir étudié ces phénomènes furent Hodgkin et Huxley² en prenant comme modèle le potentiel d'action mesuré dans un axone géant de calmar. Ce modèle montre les changements de perméabilité en fonction du voltage pour différents ions. Il a été montré que les canaux ioniques ont un comportement permselectif en ce qui concerne le transport d'ions (ex., Na⁺, K⁺, Ca²⁺ ou Cl⁻).³⁻⁶ Ils peuvent également faciliter le flux d'eau et d'autres molécules organiques telles que des médicaments, des nutriments ou des toxines à travers les membranes biologiques. Une autre catégorie de pore protéique comprend, des antibiotiques peptidiques tels que la gramicidine (Figure 2e) et l'alaméthicine.^{7,8}

1.1.2. Alpha-hémolysine, aérolysine, OmpG, MspA

Parmi les différents canaux biologiques, l' α -hémolysine (α HL) est le plus largement et fréquemment utilisé dans les analyses nanopores. L' α -hémolysine (Figure 2a) est une toxine sécrétée par le *Staphylococcus aureus*. C'est un pore protéique de structure heptaédrique, qui est formé de l'auto-

assemblage de sept monomères identiques.⁹ Le pore d' α HL a été utilisé en tant que capteur hautement sensible pour la détection et le séquençage de molécules à l'échelle unique, i.e., ADN.^{10,11} Elle présente un vestibule et un tube constitué de feuillet β . La longueur de son canal est 10 nm, son diamètre est de 2,6 nm.

Un autre pore provenant d'une toxine, l'*Aeromonas hydrophila*, une bactérie Gram-négative, est l'aérolysine (Figure 2b). C'est un pore heptamérique, il n'a pas de vestibule et sa charge nette est hautement négative, ($Z = -52 e$). La longueur du canal est 10 nm, et son diamètre est estimé entre 1 et 1,7 nm.¹² Elle a été utilisée pour étudier le repliement de petites protéines,^{13,14} et la structure de peptides.¹⁵

D'autres pores biologiques utilisés à des fins de détection proviennent de porines.¹⁶ Un premier exemple est la porine OmpG (Figure 2c) qui est composée d'une seule chaîne peptidique. Elle se trouve dans la membrane extérieure de la bactérie Gram-négative, son intérêt provient du fait qu'il est plus facile d'effectuer une mutation en un seul point, comparée à l' α HL qui est un multimère.

La MspA (Figure 2d) est une autre porine provenant de *Mycobacterium smegmatis*.¹⁷ Le pore de MspA possède une courte et fine constriction dans son canal qui permet le séquençage d'ADN. La longueur de son canal est 9,6 nm, elle possède un vestibule de 9 nm de diamètre et le diamètre de la constriction est 1,2 nm.^{18,19}

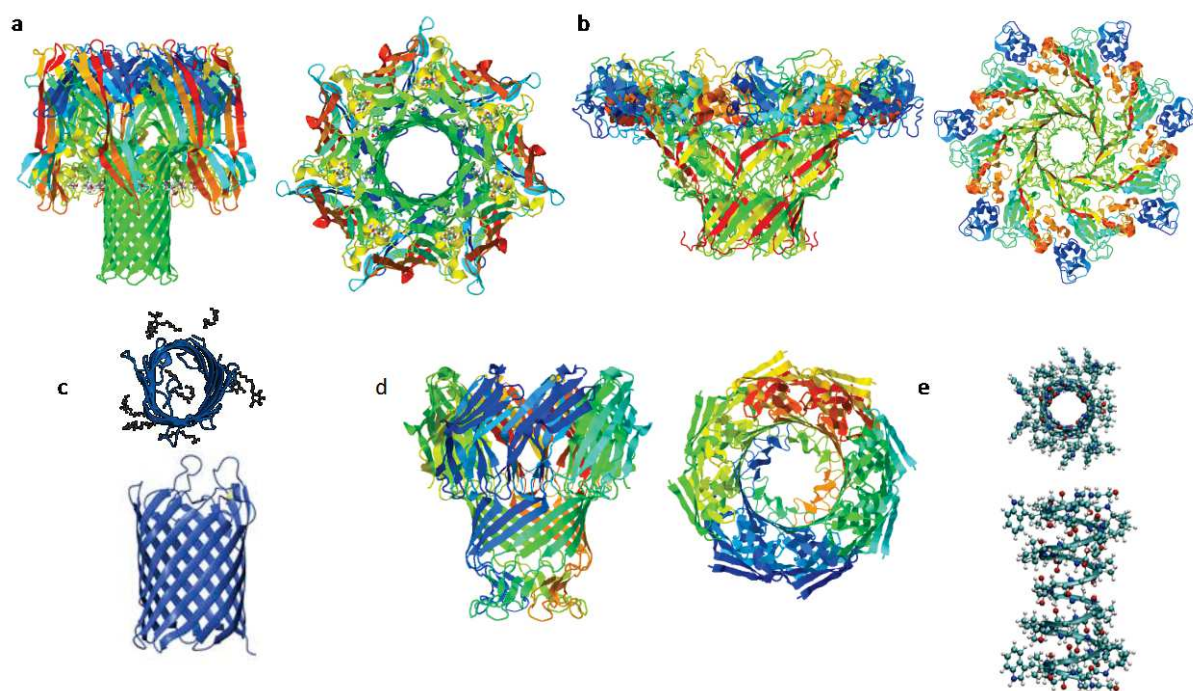


Figure 2: Exemples de différents canaux ioniques: a. α -hémolysine, b. aérolysine, c. OmpG, d. MspA, e. gramicidine A

Les nanopores biologiques peuvent être insérés dans des bicouches lipidiques. Ils sont préparés de façon reproductible et ont donc prouvé leurs valeurs ajoutées pour nombres d'applications intéressantes en

nano/biotechnologie telles que pour la détection et la manipulation de molécule unique. Cependant, la fragilité des bicouches phospholipidiques, qui dépend de paramètres extérieurs tels que le pH, la température, la concentration en sel, etc... limitent leurs utilisations. De plus, dans la plupart des cas, les protéines doivent être produites à façon. Cette production est onéreuse, car elle ne peut pas être effectuée à grande échelle. C'est probablement pour cela que les nanopores synthétiques fabriqués dans des matériaux solides et peu coûteux, intéressent tant les chercheurs.

1.2. Les nanopores solides

En s'inspirant des structures, propriétés, et modes de fonctionnement des pores biologiques, de nombreux chercheurs essayent toujours de comprendre les mécanismes d'ouverture/fermeture et de perméabilité caractéristiques des membranes biologiques. Pour ce faire, des nanopores artificiels sont fabriqués dans de nombreux matériaux organiques ou inorganiques.²⁰⁻²³ Les nanopores solides tout comme ceux biologiques sont des ouvertures de tailles nanométriques, qui sont formées dans des films minces synthétiques de quelques nanomètres à plusieurs micromètres d'épaisseur. Les nanopores synthétiques ont de nombreux avantages comparés aux biologiques tels que leur stabilité, des dimensions modifiables (taille et forme), la possibilité de les intégrer dans des systèmes nano-fluidiques, leurs facilité d'utilisation et leur coût. Ils peuvent également posséder des propriétés telles que des ouvertures/fermetures induites par des stimuli, et des perméabilités semblables à celle des pores biologiques. Ils ont à l'échelle de la membrane (multipores), des applications telles que la délivrance de médicaments, l'hémodialyse, la régénération de tissus et la bio-capture.²³⁻²⁷ La polyvalence des technologies nanopores permet d'obtenir des biocapteurs fiables, avec des prix abordables, qui peuvent être produits en série avec des capacités de détection à l'échelle de la molécule unique. De plus, cette technologie permet une analyse en parallèle, et de haute précision, de brins d'ADN, de protéines ou de nanoparticules. Ce chapitre se concentre sur le développement de nanopore dans des membranes synthétiques et les avantages et les challenges associés à cette technologie.

1.2.1. Matériaux pour la fabrication de nanopores

En fonction des conditions nécessaires pour chaque application spécifique, divers matériaux peuvent être sélectionnés pour préparer des nanopores:

- nitrure de silicium (SiN),²⁸
- dioxyde de silicium (SiO₂),²⁹
- oxyde d'aluminium (Al₂O₃),³⁰
- nitrure de bore,(BN)³¹
- graphène,^{32,33}
- membranes polymères.(PET, PVDF, PC, PI, etc...)³⁴

Les nanopores obtenus dans des semi-conducteurs, tels que les nitrures de silicium ont été largement étudiés en visant des applications de séquençages d'ADN.^{20,22,35,36}

Les films polymères en polyéthylène téréphtalate (PET), polyimide (PI), polycarbonate (PC), etc... sont utilisés pour préparer de nombreuses formes de nanopores grâce à l'utilisation de la technique de la trace attaquée.³⁷⁻⁴¹

Les matériaux composites ont la possibilité de combiner les avantages des différents matériaux. Par exemple, un pore asymétrique métal-polymère est stable, il possède des propriétés chimiques et structurales permettant des modifications grâce à des molécules fonctionnelles pour obtenir un système nanopore complexe.⁴²⁻⁴⁴ Les systèmes hybrides biologiques/solides ont un fort potentiel pour des applications en biotechnologie.^{8,45-51}

En fonction du matériau, différentes méthodes de fabrication des nanopores sont utilisées comme :

- la technique de la trace attaquée,³⁴
- la pulvérisation cathodique basée sur un faisceau d'électron,²⁹
- la sonde ionique focalisée,²⁸
- la technique de l'ablation par laser,⁵²
- la lithographie par faisceau d'électron,⁵³
- la microscopie par ion d'hélium,⁵⁴
- ou encore le claquage diélectrique.^{55,56}

Avec le développement des technologies de micro-fabrication, les nanopores peuvent être produit en séries.

1.2.1.1. Nanopores en polymères

Les nanopores faits dans des films polymères, (polyéthylène téréphtalate (PET), polycarbonate (PC) et poly-imide (PI)) sont obtenus par la technique de la trace attaquée.⁵⁷⁻⁵⁹ Cette technologie permet d'obtenir des canaux extrêmement homogènes dans un matériau polymère. Elle se base sur les principes suivants, quand un ion lourd traverse le film, son énergie est dissipée le long de sa trajectoire, il crée une zone endommagée : la trace latente. Ensuite en utilisant la solution appropriée, la trace peut être révélée, ce qui permet la formation du pore. En ajustant les conditions de l'attaque chimique, tels que le temps d'attaque, la température, et la concentration en solution alcaline, nous pouvons contrôler la taille et la forme du pore. L'irradiation et l'attaque sont les deux étapes de synthèse des nanopores, mais seule l'étape de l'attaque en détermine la géométrie. (Figure 3) Si la solution de révélation est présente des deux côtés, l'attaque est dite symétrique, le nanopore sera cylindrique.

Le principe de l'attaque réside dans le fait que la solution de révélation n'attaque pas le polymère à la même vitesse dans le volume et dans la trace, laissé par l'ion lourd. A ce niveau, le polymère sera d'autant plus fragilisé, que l'énergie de l'ion traversant le film est importante par rapport à l'épaisseur du film. Cela aura pour conséquence que la matière sera plus vite rongée. Pour ce type d'attaque, nous considérons un modèle à deux vitesses, $v_{\perp}$ est la vitesse dans le volume et $v_{\parallel}$ dans la trace. La (Figure 4) décrit les relations entre R , le rayon du côté de l'attaque, l'angle α , $v_{\perp}$ et $v_{\parallel}$.

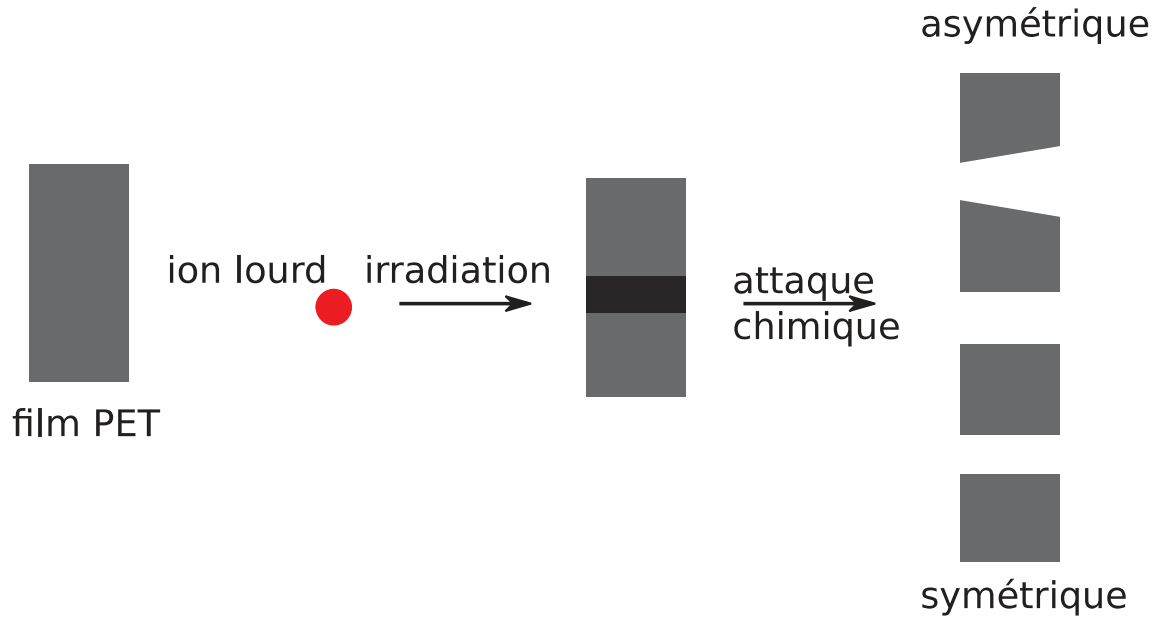


Figure 3 : Principe de la technique de la trace attaquée

La forme géométrique de l'attaque chimique est donc un cône, de demi-angle α , déterminé, par le rapport entre $v_{//}$ et $v_{\perp}$. Plus la trace est fragilisée, plus $v_{//}$ est grand devant $v_{\perp}$, et plus le pore aura une forme cylindrique parfaite.

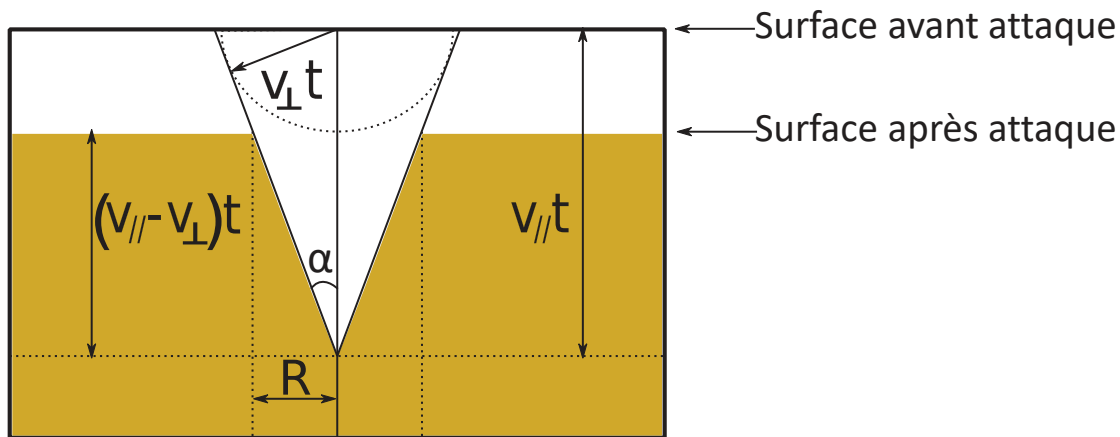


Figure 4 : Schéma d'une coupe transversale du film polymère lors de l'attaque

Il est également possible d'obtenir un nanopore conique, en effectuant l'attaque chimique seulement d'un côté du film, et en mettant une solution qui neutralise la première de l'autre côté du film. L'ouverture large est appelée « base », et la plus petite « tip ». Pour ralentir le processus d'attaque, un voltage peut être appliqué, qui permette contrôler l'ouverture en mesurant le courant. Il est appliqué de telle manière que les ions négativement chargés sont attirés du côté *tip*.⁵⁸ Les méthodes de préparation pour les nanopores fabriqués par la technique de la trace attaquée en polymères ont été étudiées et décrites en détails.^{37,39,41,58,60,61}

Des nanopores en forme de cigares ou semi-cigares peuvent également être produits grâce à l'utilisation de surfactants.^{39,62} Durant le processus d'attaque du film (PET, PI, ou PC), des groupements carboxylates chargés sont créés à la surface interne du nanopore.⁶⁰

1.2.1.2. Nanopores en SiN et SiO₂

Les films en SiN et SiO₂ ont été largement utilisés grâce à leur faible stress mécanique et leurs hautes stabilités chimiques.^{28,29,53} Ils sont souvent fabriqués par dépôt chimique de SiN ou SiO₂, en phase vapeur à haute température (800°C), sur un substrat de silicium. La photolithographie et la gravure en solution (« reactive ion » ou « wet etching ») sont utilisées pour ouvrir une fenêtre de taille micrométrique sur le substrat. Ensuite un faisceau d'ions ou d'électrons est utilisé pour éjecter les atomes hors de la surface de SiN pour former un trou en son centre. (Figure 5) Le diamètre du nanopore peut être contrôlé précisément.^{29,63} Une autre technique de fabrication est basée sur l'utilisation d'un fort champ électrique pour contrôler le claquage diélectrique (« *dielectric breakdown* »). Cette méthode est simple, peu coûteuse, et ne nécessite pas d'instrument lourd. Elle permet d'obtenir des nanopores créés directement en solution aqueuse, ce qui en facilite l'utilisation, et augmente le taux de nanopores utilisables car il n'y a plus de problème de remplissage.^{55,56,64}

La plupart des films en SiN utilisés pour des applications nanopore ont généralement une épaisseur inférieure à 100 nm.²⁰ Les nanopores en SiN et SiO₂ ont servis à étudier le passage d'un brin d'ADN unique à travers le pore. Les premières traces de courant indiquant le passage d'ADN simple brin dans un nanopore solide en SiN ont été mesurées en 2001.²⁸ Aujourd'hui, le séquençage grâce à un nanopore solide n'a pas encore été démontré.

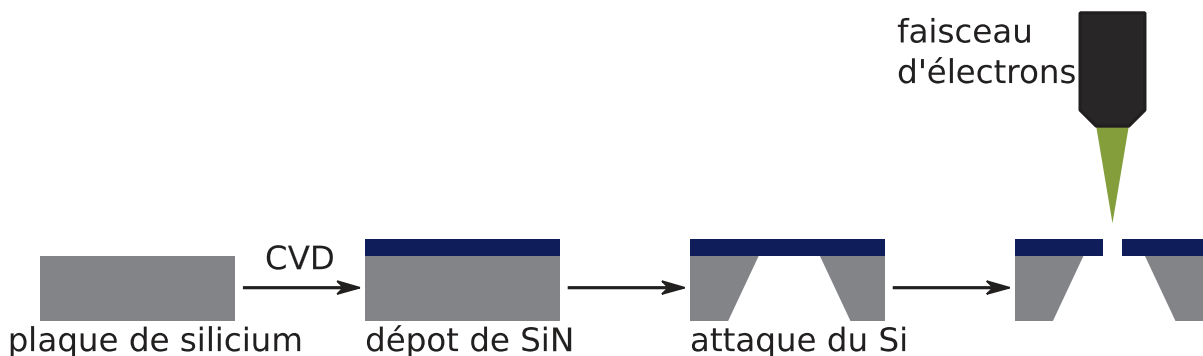


Figure 5: Processus de fabrication pour un nanopore en SiN, dépôt chimique en phase vapeur (CVD), puis gravure ionique réactive (RIE), puis formation du nanopore par faisceau d'ions ou d'électrons (FIB ou TEM)

1.2.1.3. Nanopores en oxyde métalliques

Il est possible d'obtenir ces pores par plusieurs méthodes. Le dépôt par couche atomique (ALD) peut être utilisé pour déposer de l'Al₂O₃, ZnO, TiO₂, HfO₂ sur un pore déjà formé.⁶⁵⁻⁶⁹ Ces matériaux

possèdent d'excellentes propriétés électriques et mécaniques. Le faisceau d'ions focalisés (FIB) ou la microscopie électronique en transmission (TEM) peuvent être utilisés pour la formation du nanopore dans les films minces d'oxyde métallique.^{30,68,70} L'intérêt des nanopores en Al_2O_3 , comparé au nanopore en SiO_2 et SiN , provient de meilleures performances électriques, et d'un rapport signal sur bruit plus élevé lors du passage de molécules à travers le pore.^{30,71} Le passage de l'ADN à travers un nanopore en Al_2O_3 est moins rapide que s'il est en SiN , ceci étant attribué aux interactions électrostatiques entre la charge de surface positivement chargée et les molécules d'ADN négativement chargées.³⁰

1.2.1.4. Nanopores en matériaux 2D

Bien que les nanopores solides fabriqués dans des films minces de semi-conducteur aient été largement utilisés pour l'étude du passage de protéines et d'ADN, ils ne possèdent pas de résolutions spatiales suffisantes pour obtenir des informations sur les macromolécules à l'échelle des constituants (acides aminés, ou nucléotides uniques). Les mono-feuillets de graphène, composés d'une seule couche atomique de carbones avec des propriétés électriques et mécaniques remarquables, peuvent être utilisés comme une alternative aux membranes traditionnelles.^{33,72-74} Les mono-feuillets en nitrure de bore (BN)^{31,75,76} et en disulfure de molybdène ($\text{MoS}_2 \sim 0.7 \text{ nm}$)^{77,78} ont également été étudiés pour leur résolution spatiale.

Les nanopores peuvent être fabriqués dans une monocouche suspendue, grâce à une exposition contrôlée à un faisceau d'électron grâce à un TEM.⁷⁹ L'avantage de l'utilisation de ces nanopores est donc que leur épaisseur est minimale (graphène $\sim 0.335 \text{ nm}$), et est équivalente à la distance entre deux bases dans une chaîne d'ADN.⁸⁰ La différence fondamentale entre le graphène et le MoS_2 , est que l'ADN s'adsorbe sur le graphène ce qui peut entraîner l'occlusion du pore. Ceci n'est pas le cas avec le MoS_2 , mais ce dernier est plus épais que le graphène, trois atomes d'épaisseur au lieu d'un, ce qui peut entraîner des limitations quand à la détection à l'échelle atomique.

1.2.1.5. Nanopores hybrides biologiques/artificiels

La plupart des expérimentations utilisant des nanopores se concentrent sur ceux biologiques⁸¹ et artificiels.²⁰ Les nanopores biologiques offrent une structure précise à l'échelle atomique,⁹ et peuvent être modifiés.⁸² Les nanopores solides offrent la longévité, et le contrôle sur la taille et la forme,²⁹ et sont également plus facile à intégrer dans des systèmes de «*lab on a chip*». Cependant, chaque type de nanopore a d'importantes limites, les nanopores biologiques sont difficiles à intégrer dans ce type de systèmes car ils s'appuient sur les délicates couches phospholipidiques. Les nanopores solides manquent de sélectivité. Ces limites peuvent être dépassées grâce à une stratégie qui combine les propriétés, à la fois des pores biologiques et synthétiques en insérant un nanopore biologique, l' α -hémolysine (αHL) dans un pore solide. Une première stratégie utilise un nanopore en SiN de 20 nm d'épaisseur, formé par TEM pour obtenir des diamètres de l'ordre de 2,4-3,6 nm, proche du diamètre du tube- β de l' α -hémolysine. Un mutant d' α -hémolysine est modifié avec un double brin d'ADN de 3000 paires de

bases, attaché grâce à une oligomère de 12 nucléotides sur une des protéines. Ce dernier est conduit électro-phorétiquement à travers le nanopore solide. L'insertion a été démontrée du fait qu'après celle-ci, la conductance diminue jusqu'à une valeur en adéquation avec celle obtenue pour l' α HL dans les bicouches lipidiques. Enfin cette structure hybride, s'est montrée durable et robuste.⁴⁶ La seconde stratégie consiste en l'insertion directe d' α HL non-modifiée, à l'entrée d'un nanopore de fort rapport d'aspect hydrophobe. Pour ce faire un nanopore d'environ 75 nm de diamètre et 13 μ m de long est fabriqué par la technique de la trace attaquée. Ce pore est ensuite réduit par ALD en alternant des bicouches $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$, puis subit une exposition à l'hexamethyldisilazane (HMDS) pour couvrir la surface du nanopore avec des fonctions $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Le diamètre final obtenu est d'environ 5,4 nm. L'insertion a été démontrée car quand des homo-polynucléotides sont insérés en solution avec le nanopore natif, il n'y a aucun signe de leurs passages à travers le pore, mais quand ils sont introduits, après l'insertion de l' α HL, des événements dus à leur passage sont observés. Il a été démontré que dans ce pore, l' α HL conserve ses propriétés de discrimination envers les polynucléotides et augmente le temps de passage de ces derniers du au long canal dans lequel la protéine est insérée. Donc une α HL peut être insérée dans un nanopore solide et conserver ses propriétés intrinsèques.⁴⁵

En utilisant une méthode similaire à celle de l'insertion d' α HL, décrite par Hall *et al.*⁴⁶ l'équipe de Keyser a réussi à insérer un nanopore en origami d'ADN, dans un nanopore solide en SiN de 13 à 18 nm de diamètre et 30 nm d'épaisseur.⁸³ Les origamis d'ADN sont en forme d'entonnoir, avec l'ouverture la plus petite de 7,5 x 7,5 nm où est attaché un double brin d'ADN de 2300 paires de bases, pour aider à la capture dans la meilleure orientation. Un voltage est appliqué pour amener l'origami dans le nanopore. Cette capture est parfaitement contrôlable et réversible. Une autre stratégie utilise un nano-feuillet fait par origami d'ADN (épaisseur 6nm, ouverture adaptable), déposé électriquement à la surface d'un nanopore en SiN de diamètre 18-25 nm et d'épaisseur 50 nm.⁸⁴

Une membrane hybride a également été fabriquée en utilisant un film mince en polycarbonate de 5 μ m d'épaisseur et de 15 nm de diamètre dans laquelle sont insérés des canaux ioniques de gramicidine A (gA).⁸ Bien que les membranes obtenues ne présentent pas les mêmes propriétés que la gA insérée dans une bicouche phospholipidique, elles présentent des propriétés de sélectivité intéressante puisqu'elles sont perméables aux cations tout en étant imperméable aux protons.^{51,85}

Les nanopores synthétiques peuvent également être recouvert d'une bicouche lipidique fluide pour contrôler le passage des protéines à travers un nanopore et limiter l'adsorption non-spécifique.⁴⁸ L'épaisseur et la chimie de surface peuvent être contrôlées grâce à l'utilisation de différents lipides. L'équipe de Bashir a utilisé une technique de fusion de vésicules pour former une bicouche lipidique avec une haute impédance sur un nanopore unique en Al_2O_3 .⁵⁰

2. Conduction ionique à travers un nanopore solide

Les nanopores permettent de détecter en temps réel des biomolécules par mesure des perturbations du courant ionique. De ce fait, il est indispensable de bien comprendre le transport des ions à l'intérieur d'un nanopore, notamment s'il est chargé

2.1. Double couche électrique

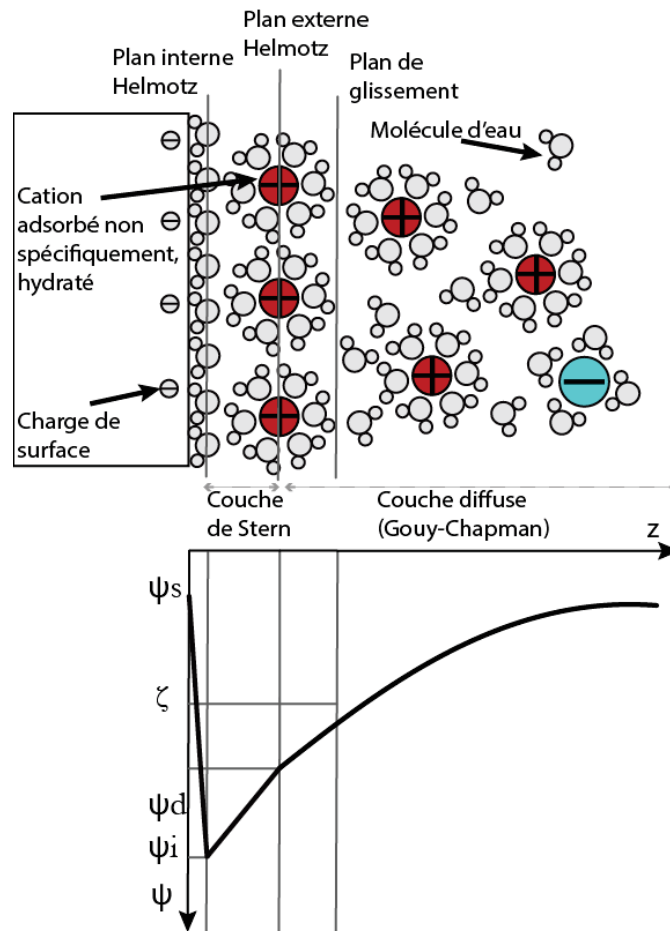


Figure 6: Modèle de Gouy-Chapman-Stern d'une interface solide-électrolyte, avec le potentiel de distribution correspondant, avec z la distance à la paroi. Le solide est une surface chargée négativement (Ψ_s) avec un potentiel de surface négatif. Le plan interne d'Helmholtz (Ψ_i) est constitué de co-ions et de contre-ions non hydratés. Le plan externe d'Helmholtz (Ψ_d) est constitué uniquement de contre-ions hydratés. La couche diffuse est définie après les plans d'Helmholtz. Au niveau du plan de glissement, le potentiel ζ peut être étudié expérimentalement, et comme la distance entre plan externe d'Helmholtz et le plan de glissement est négligeable dans la plupart des cas, le potentiel ζ est habituellement égal à Ψ_d . Adapté de Schoch, *et al.*⁸⁶

Dans le cas d'un pore chargé, une région riche en contre-ions se crée dans le liquide à l'interface solide pour maintenir l'électroneutralité. Cette région est appelée double couche électrique (« *Electrical*

« Double Layer » EDL) car elle est idéalement constituée de charges opposées, certaines sont dites « fixes » et d'autres « mobiles ». (Error! Reference source not found. et Figure 7)

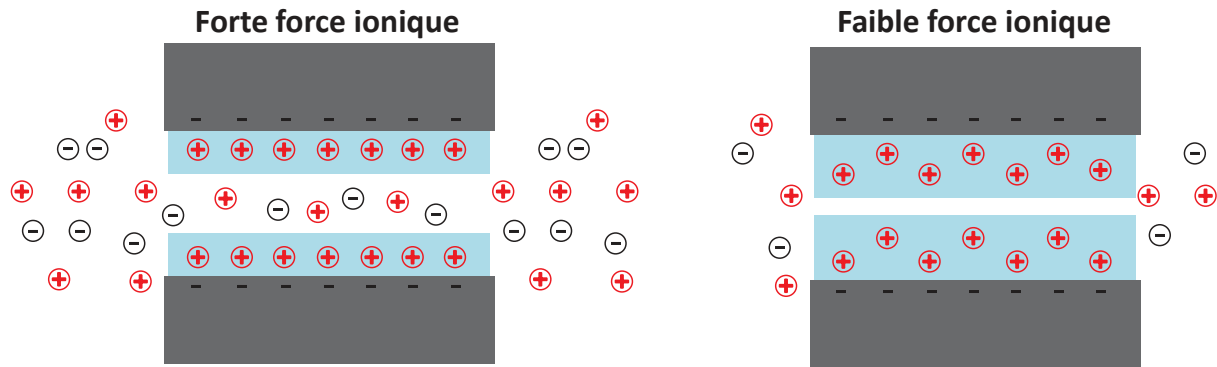


Figure 7 : Double couche électrique (EDL), en bleu, pour de fortes forces ioniques, celle –ci est fine, ce qui permet aux co-ions et aux contre-ions de passer à travers le pore. A faible force ionique, l'épaisseur de l'EDL augmente, ce qui rend le pore sélectif aux contre-ions

L'EDL est une région de longueur finie où la charge de surface est écrantée par un nuage de contre-ions diffus.⁸⁷ La longueur de Debye est généralement décrite par la théorie de Poisson-Boltzmann.⁸⁸ Elle caractérise l'épaisseur de l'EDL. Il est intéressant de noter, que cette longueur est indépendante de la charge de surface, et dépend seulement de la concentration en ions. (Figure 7) Cependant dans le cas limite d'une solution sans sel, l'épaisseur de la couche diffuse est fixée par la longueur de Gouy–Chapman. En optimisant les propriétés du fluide à l'intérieur du nanopore, l'EDL va affecter la réponse du système sous champ électrique. Ensuite, un comportement spécifique est attendu quand les couches de Debye se superposent dans le nanopore. Ce phénomène influe fortement sur le transport du flux d'ions, en particulier le phénomène d'enrichissement ou d'exclusion des ions.⁸⁹ Ils jouent un rôle sur la permselectivité,⁸⁹ les diodes nanofluidiques,^{90,91} ou le transport d'ions dominé par la charge de surface, c'est à dire à faible force ionique.⁹²

La distribution de potentiel proche d'une surface chargée doit être considérée :

$$\bar{\mu}_i = \tilde{\mu}_i + z_i F \psi = \tilde{\mu}_i^0 + RT \ln \left(\frac{\gamma_a c_i}{c^0} \right) + z_i F \psi \quad (\text{éq 1.1})$$

où $\tilde{\mu}_i$ est le potentiel chimique, F est la constante de Faraday, ψ est le potentiel électrique due à la charge de surface, $\tilde{\mu}_i^0$ est le potentiel chimique standard de l'ion i à pression et température constantes, R est la constante des gaz parfait, T est la température, γ_a est le coefficient d'activité, c_i est la concentration molaire en ion i , et c^0 est la molarité standard à 1 mol L⁻¹, z est la distance par rapport à la surface.

L'équation générale de Poisson décrit la répartition du potentiel électrique de surface dans la solution ionique :⁹³

$$\nabla^2 \psi = \frac{d^2 \psi}{dz^2} = - \frac{\rho}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (\text{éq 1.2})$$

où ρ est la densité volumique de charge de tous les ions présents au voisinage de la surface, ε_0 la permittivité diélectrique du vide et ε_r la permittivité relative du milieu, z est la direction normale à la surface.

De ces deux premières équations, l'équation de Poisson-Boltzmann complète est obtenue. Elle décrit comment le potentiel électrostatique dû à la distribution des atomes chargés varie dans l'espace :

$$\nabla^2 \psi = \frac{d^2 \psi}{dz^2} = -\frac{e}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \sum_i n_i^\infty z_i \exp\left[-\frac{z_i e \psi(z)}{k_B T}\right] \quad (\text{éq 1.3})$$

où n_i^∞ est la densité de volume en solution (bulk), k_B est la constante de Boltzmann et la conversion $e/k_B = F/R$ est appliquée.

Cette équation peut être résolue analytiquement si l'on fait l'hypothèse que le potentiel est très faible dans l'EDL ($< 25,7$ mV). La relation $e^{-\alpha} = 1 - \alpha$, si α est petit, est utilisé pour simplifier l'équation (1.3).

L'approximation de Debye-Hückel est:

$$\nabla^2 \psi = \frac{d^2 \psi}{dz^2} = \kappa^2 \psi(z) \quad (\text{éq 1.4})$$

où

$$\kappa = \left(\frac{e^2 \sum_i n_i^\infty z_i^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T} \right)^{1/2} \quad (\text{éq 1.5})$$

où κ est le paramètre de Debye-Hückel et dépend essentiellement de la densité de volume en solution n_i^∞ . Le potentiel diminue exponentiellement dans la couche diffuse avec la distance caractéristique donnée par la distance de Debye $\lambda_D = \kappa^{-1}$. Cette valeur correspond à l'épaisseur de l'EDL qui augmente avec la diminution de la concentration en sel. Pour un électrolyte symétrique z_i : z_i avec une concentration c_i à 25°C, la valeur de la longueur de Debye (m), peut être exprimée :

$$\lambda_D = \frac{3.04 \times 10^{-10}}{z_i \sqrt{c_i}} = \frac{2.15 \times 10^{-10}}{\sqrt{I_s}} \quad (\text{éq 1.6})$$

où la force ionique I_s est

$$I_s = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2 \quad (\text{éq 1.7})$$

L'influence du potentiel électrique de surface peut être considérée comme nulle au-delà de $3 \lambda_D$.

2.1.1. Perm-sélectivité

Il a été montré,⁸⁹ que les nano-canaux présentent une perméabilité sélective pour le transport d'ions diffusif. En effet, les ions de même charge que la surface (co-ions) ont une plus faible perméabilité à travers le canal.

Le transport spécifique de charge est une conséquence directe du recouvrement de la longueur de Debye.

La diffusion effective D_{eff} est définie comme :⁸⁹

$$J_{\pm} = -D_{eff} \frac{\Delta \rho}{L} \quad (\text{éq 1.8})$$

où J est le flux d'ions par unité de surface, ρ la densité des ions. D et μ sont liés par la relation d'Einstein, $D = \mu k_B T$. Pour simplifier, un seul sel composé d'ions monovalents est considéré.

2.1.2. Pré-concentration

Une autre conséquence du recouvrement de la longueur de Debye, est le phénomène de pré-concentration.^{94,95} Au lieu d'avoir une diminution de la concentration comme précédemment, c'est une diminution du voltage qui apparaît le long du pore. Comme précédemment un point majeur provient du fait que les ions de signe opposé à la charge de surface, les contre-ions, sont plus facilement transportés que les co-ions. Un enrichissement en ions d'un côté du pore et une déplétion de l'autre est alors observé.

2.1.3. Transport interfacial : flux électro-osmotique

L'EDL est à l'origine de divers phénomènes électrocinétiques, comme l'électro-osmose, et le courant d'écoulement. Ces phénomènes découlent de la dynamique des ions à l'intérieur de l'EDL.

L'électro-osmose (EO) est le phénomène lorsque le flux du liquide est induit par un champ électrique. Dans sa forme la plus simple, la vitesse du flux v_f au-delà de l'EDL dépend linéairement du champ électrique appliqué E , d'après l'équation de Smoluchowski :⁹⁶

$$v_{\infty} = - \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E \quad (\text{eq 1.9})$$

où ε est la constante diélectrique, η la viscosité et ζ le potentiel électrostatique.

2.2. Transport ionique dans les nanopores

Dans cette partie, nous allons discuter des effets de la conductivité ionique dans les nanopores. La conductivité d'une solution d'électrolyte simple dans un nanopore cylindrique, est basée sur l'analogie avec un circuit électrique, elle peut être considérée comme une résistance au courant ionique. La conductance d'un nanopore peut être mesurée grâce à un électrolyte monovalent, généralement du KCl, ou NaCl en plaçant le nanopore entre deux réservoirs isolés électriquement. La conductance, G , est par définition le courant ionique en fonction du voltage appliqué. Elle dépend du nombre des porteurs de charges libres en solutions. Dans une solution considérée comme infiniment diluée (bulk), il est donc attendu que G soit proportionnelle à la concentration en sel κ_b (conductivité ionique). Dans un nanopore, les charges apportées par la surface amène une contribution supplémentaire à la conductance. Le nombre de porteurs de charges de la solution par rapport à la surface est caractérisé par la longueur de Debye. Cette longueur décrit la compétition entre la conductance de la solution et de la surface. La conductance de surface est donc supposée dominer sur la conductance en solution pour des nanopores de rayons inférieurs à la longueur de Debye. L'amplitude de l'effet de la conductance de surface est donc amplifiée dans les petits canaux et/ ou à basse concentration en sel.

Expérimentalement, la conductance suit deux régimes. La contribution de la surface sur la conductance s'apparente à un plateau de conductance pour de très faibles concentrations en sel, lorsque la longueur de Debye est comparable au diamètre du pore. (Figure 8) Ce plateau provient des porteurs de charges apportés par la charge de surface, ce nombre étant indépendant de la concentration en sel en solution.⁹² Cet effet est expliqué par un excès de contre-ions mobiles dans le nanopore, qui équilibre la charge de surface pour maintenir l'électroneutralité.

Ce comportement est observé pour à la fois les nanopores chargés⁹⁷ mais également pour des pores qui n'ont à priori pas de charges de surfaces.⁹⁸

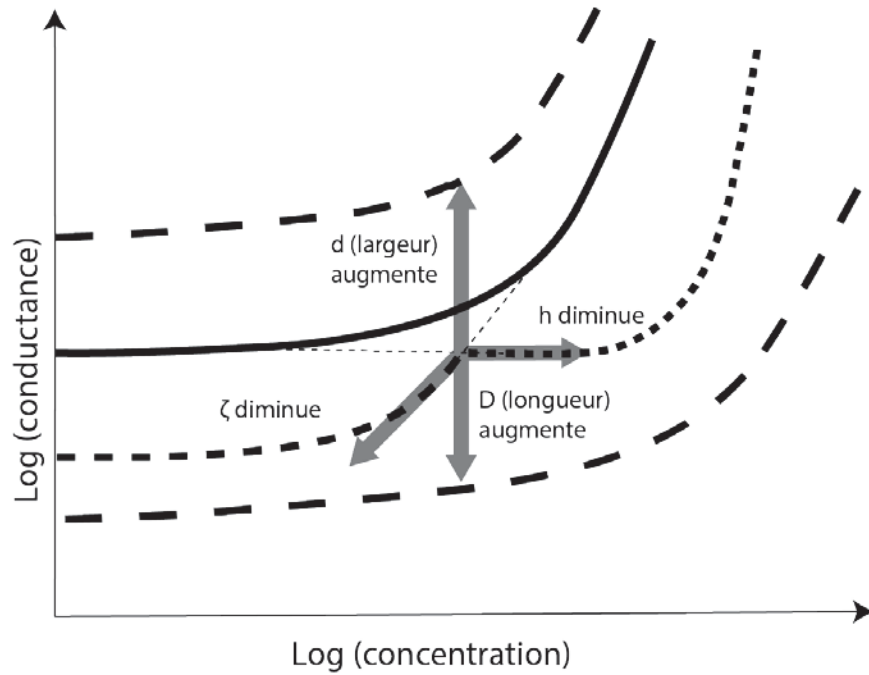


Figure 8 : Schéma du comportement de la conductance d'un nanopore en fonction de la concentration en électrolyte 1:1 (de type NaCl ou KCl). L'impact de la densité de surface de charge ζ , de la hauteur L , de largeur d et de la longueur D du nanopore sur sa conductance.

Quand la concentration est supérieur à $3 \lambda_D$, la conductance dans le nanopore est assimilée à celle de la solution « bulk » :

$$G_b = \kappa_b \frac{\pi R^2}{L} \quad (\text{éq 1.10})$$

G_b est la conductance (en S), R le rayon (en m) et L la longueur (en m) du nanopore. κ_b est la conductivité de la solution ionique (en S m^{-1}). Il convient à ce point de citer la résistance dite « d'accès ».⁹⁹ Il s'agit d'une résistance due à l'encombrement à l'entrée du nanopore, qui ne peut pas être expérimentalement négligée dans les nanopores de faible rapport d'aspect (SiN, matériaux 2D, ...) :

$$R_{acc} = \frac{1}{2\kappa_b R} \quad (\text{éq 1.11})$$

La conductance dans le cas d'un nanopore chargé peut être décrite par (éq 1.12). Elle permet de prendre en compte le courant induit par la charge de surface du nanopore à faible concentration et la réduction du diamètre du pore.

$$G = \frac{\pi R^2}{L} \kappa_b + \mu_{\pm} \frac{\pi \sigma_s R}{2L} \quad (\text{éq 1.12})$$

Shimizu *et al.* ont proposé une variante permettant de prendre en compte la réduction du diamètre du pore par les effets d'exclusion de Debye en définissant un rayon apparent $(R - \lambda_D)$.¹⁰⁰ : (éq 1.13)

$$G = \frac{\pi(R-\lambda_D)^2}{L} \kappa_b + \mu_{\pm} \frac{\pi\sigma_s R}{2L} \quad (\text{éq 1.13})$$

Récemment, une approche hybride a été développée par Balme *et al.*,⁹⁸ pour étudier les données expérimentales d'un nanopore à priori non chargé:

$$G_{hyb} = \frac{\pi R^2 \kappa_{hyb}}{L} \quad (\text{éq 1.14})$$

$$\kappa_{hyb} = e^2 c_s (\mu_+ + \mu_-) \sqrt{1 + \left(\frac{\sigma}{e R c_s}\right)^2} + \frac{e|\sigma|}{R} (\mu_+ - \mu_-) + \frac{\sigma^2}{2\eta} f(\sigma^*) \quad (\text{éq 1.15})$$

où e est la charge élémentaire, c_s est la concentration en solution (bulk), μ est la mobilité ionique, (μ_+ pour les cations monovalents, μ_- pour les anions monovalents) R le rayon du pore, σ est la densité de charge de surface, σ^* est la charge de surface sans dimension (éq. 1.16), et $f(\sigma^*)$ est une fonction monotone décroissante qui décrit les corrections pour de large σ^* pour la partie advective de l'équation homogène de l'approximation de « *Good Co-ion Exclusion* » (GCE).

$$\sigma^* = \pi l_B R \frac{\sigma}{e} \quad (\text{éq 1.16})$$

où l_B est la longueur de Bjerrum.

Dans cette approche, le premier terme de l'équation (1.15) prend en compte la longueur de Debye et l'advection, la deuxième partie correspond au GCE, et la troisième est liée à l'électro-osmose.

La longueur de glissement peut-être aussi considérée :

$$\kappa_{slip} = \kappa_{hyb} + \delta \kappa_{slip} = \kappa_{hyb} + \frac{2\sigma^2 b}{\eta R} \quad (\text{éq 1.17})$$

avec b la longueur de glissement, σ la densité de charge de surface e fonction de R , et η est la viscosité de l'eau à 25°C.

2.3. Rectification du courant ionique

Les pores précédemment décrits sont symétriques et leurs courants mesurés pour des voltages de mêmes amplitudes mais avec des polarités différentes, ont les mêmes valeurs absolues. Dans certains cas, les courbes I-V correspondant à la conductance d'un pore ne sont pas linéaire et sont similaires aux diodes ioniques. Ceci est le cas pour des pores ayant des géométries asymétriques ou des discontinuités de charges de surface. (Figure 9) Ce phénomène d'asymétrie est appelé rectification de courant.

La sélectivité ionique est définie pour évaluer les performances d'un nanopore sur le control du flux ionique.^{101,102} Les effets des rectifications de courant sont observés grâce aux courbes de courant-voltage (I-V) asymétriques. Certaines expériences ont montré que la paroi du pore pouvait causer des phénomènes de rectification mesurables.—Ce comportement de diode indique qu'il y a un sens préférentiel du flux ionique.¹⁰³ Il a été démontré que les nanopores coniques cation-sélectifs rectifient le courant de manière préférentielle depuis le petit côté vers la grande ouverture du pore.¹⁰⁴ Cette rectification ionique dans les nanopores artificiels a été décrite par plusieurs mécanismes, tels que le modèle électrostatique basé sur un «*rocking ratchet*» et un piège électrostatique^{91,103,104}, le modèle de Woermann,^{105,106} la description quantitative du courant ionique à travers un nanopore grâce aux

équations de Poisson et de Nernst-Planck,^{107,108} et un modèle électrostatique basé sur la théorie poly-électrolytique.¹⁰⁹ Tous les modèles de rectification de courant sont basés sur les interactions des ions, passant à travers des nanopores, avec les charges de surface du pore. Les modèles de Cervera *et al.* Et Woermann donnent des interprétations physiques similaires pour la rectification de courant ionique, c'est-à-dire que, les deux branches de la courbe I-V d'un nanopore conique correspondent aux différentes concentrations en sel (KCl par exemple) à l'intérieur du pore, et des sélectivités différentes du pore envers les cations. Le mécanisme de ces diodes nano-fluidiques est expliqué par le fait que quand un potentiel de polarité opposé par rapport à la région modifiée est appliqué à travers le pore, à la fois les anions et les cations sont attirés depuis la solution vers l'intérieur du pore et de forts courants ioniques en résultent. En inversant le voltage, les anions et les cations se déplacent vers la solution (« *bulk* »), ce qui crée une zone de déplétion, et donc de faibles courants ioniques.¹¹⁰ Ces propriétés de rectification sont similaires à celles observées dans des diodes semi-conductrices bipolaires ou les membranes échangeuses d'ions bipolaires.¹¹¹

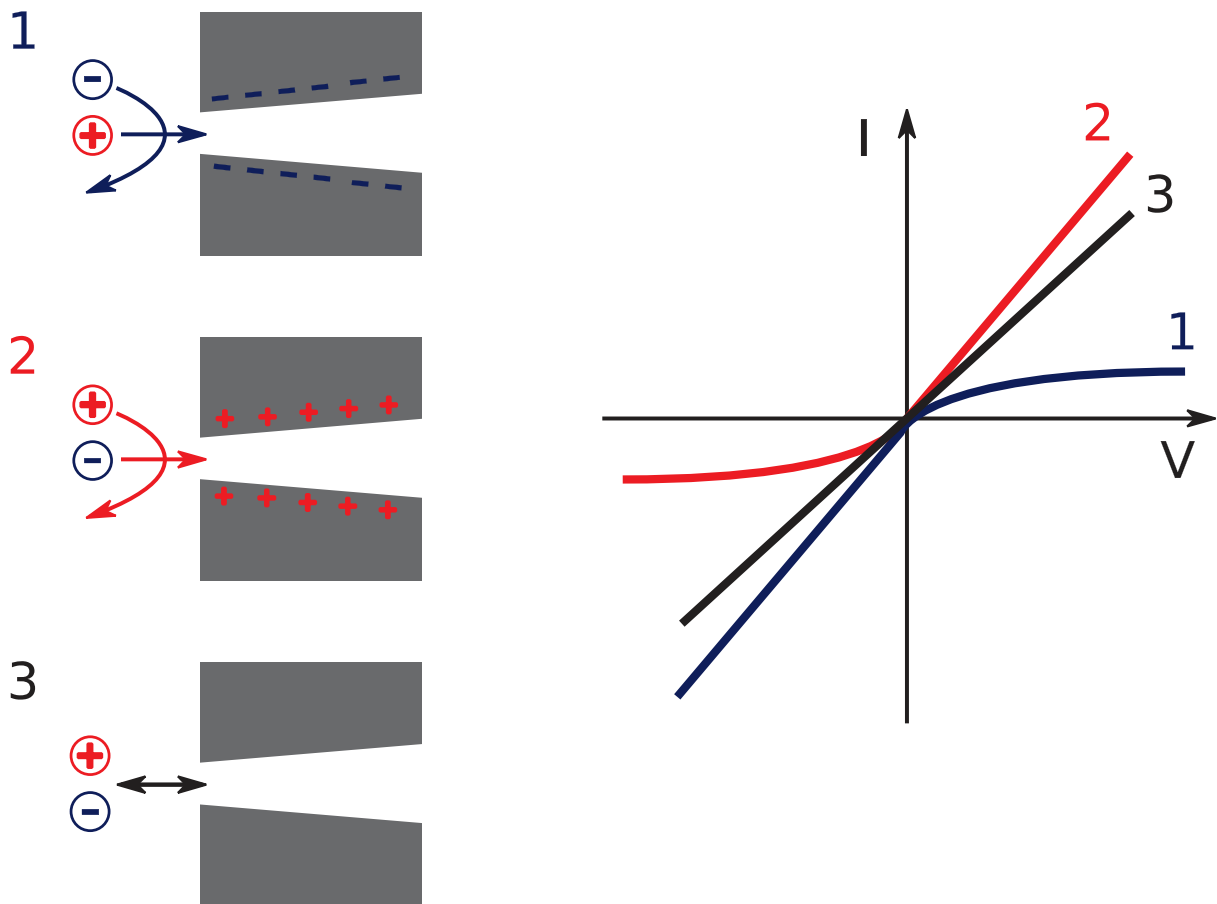


Figure 9 : Représentation schématique de pores asymétriques avec leurs charges de surface et leurs courbes I-V correspondantes

De telles rectifications de courant dans des systèmes nano-fluidiques ont été décrites pour des électrodes en nano-pipettes de quartz¹¹² et plus couramment dans les nanopores coniques obtenus par la méthode

de la trace attaquée.¹¹³ Dans le cas d'un nanopore conique en PET, un choix judicieux du pH de la solution d'électrolyte a permis de démontrer que la rectification est due à des charges de surface.¹⁰⁴ En effet, le degré de déprotonation des groupements carboxylates, et donc de la charge de surface du nanopore dépend du pH. A pH neutre, les groupements carboxylates sont dissociés et le nanopore est chargé négativement. En abaissant la valeur du pH, une protonation de la surface et la diminution des charges de surface sont obtenues. La valeur de pH, pour laquelle la charge de surface nette est 0, est 3,8 pour le PET. A ce pH la courbe I-V est linéaire.

Il a également été montré que le signe de la charge de surface détermine la direction de la rectification du courant ionique : si l'on induit une modification des charges de surface, ceci crée une inversion de la rectification du courant.

L'amplitude des rectifications peut être définie par le facteur de rectification (R_f). Il est défini comme le ratio de courant enregistré pour des voltages d'amplitude similaire, mais de polarités opposées.

$$R_f = \frac{G_{(+)}}{G_{(-)}} \quad (\text{éq 1.18})$$

où $G_{(+)}$ est la conductance pour un voltage positif, $G_{(-)}$ pour un voltage négatif.

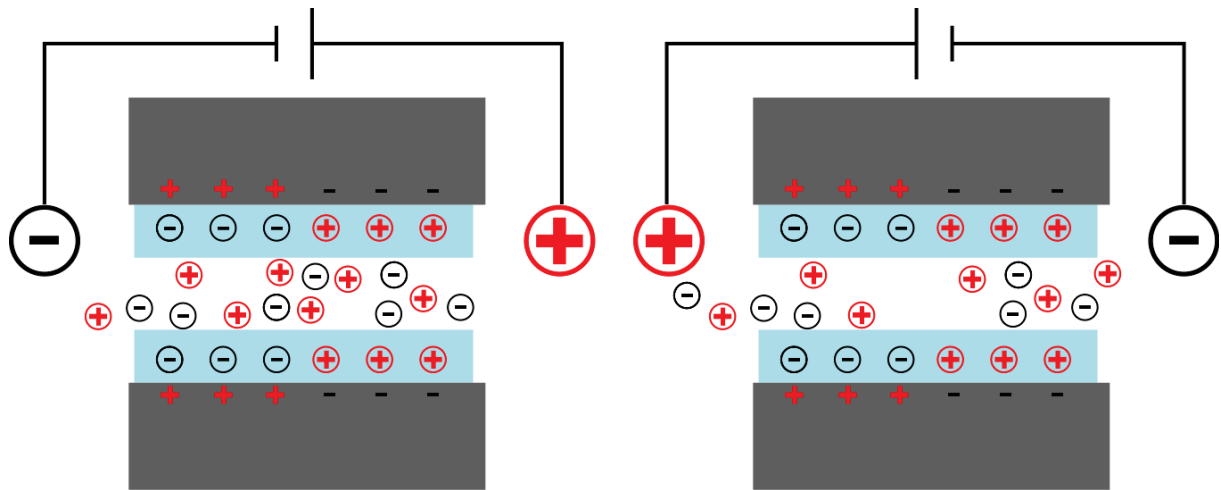


Figure 10 : Schéma expliquant le mécanisme de diodes nano-fluidiques lorsqu'un potentiel de polarité opposé par rapport à la région modifiée est appliquée à travers un nanopore long (plusieurs microns), à la fois les anions et les cations sont attirés depuis la solution vers l'intérieur du pore et de forts courants ioniques en résultent. En inversant le voltage, les anions et les cations se déplacent vers la solution (*bulk*), ce qui crée une zone de déplétion, et donc de faibles courants ioniques

Les facteurs de rectifications les plus importants sont obtenus en combinant une distribution de charges asymétrique dans un pore conique.¹¹⁴ Les rectifications de courant ne sont pas seulement induites par des pores coniques chargés uniformément. En effet, Karnik *et al.* ont montré qu'il est possible d'obtenir des rectifications de courant en utilisant des nanofentes symétriques, (120 μm long, 4 μm large, et ~ 30 nm hauteur) dont la distribution de charge à l'intérieur du pore est asymétrique.⁹⁰ La surface de la nanofente est recouverte grâce à deux traitements de surface différents (la moitié avec de l'avidine,

l'autre avec de la biotine), ce qui crée des différences de charge entre les deux moitiés de la surface. La réponse du courant en fonction du potentiel électrique présente une forme asymétrique : comme dans les diodes classiques, le courant passe seulement dans une seule direction. De tels motifs ont pu être obtenus grâce au contrôle de la fonctionnalisation de la surface avec une résolution spatiale supérieure à 1 μm .¹¹⁵

3. Principes de la détection de molécule à l'échelle unique

La détection de molécules unique par la technologie nanopore se développe pour de nombreuses applications de biocapteur, (protéines, ADN) ou détection de nanoparticules.^{11,116,117} Cette méthode est préférable à celles à grandes échelles, types membranes, lorsque les échantillons à analyser sont en quantité limitée ou quand un ensemble de mesure pourrait masquer l'hétérogénéité de l'échantillon. Les nanopores ont tout d'abord été utilisés comme des compteurs Coulter.¹¹⁸ Le compteur Coulter est utilisé en routine pour le comptage des cellules sanguines par exemple. Le principe de ce compteur est de conduire un analyte à travers un pore de dimensions semblables, qui connecte deux demi-cellules contenant la même solution électrolytique. Quand l'analyte (objet) passe d'une chambre à l'autre, à travers le pore, la résistance du pore change, et il peut être détecté par une modification du courant ionique : un blocage si l'objet diminue le nombre de charges mobiles à l'intérieur du pore ou, si il apporte une densité de charge plus importante que celle de la solution, une augmentation de courant.

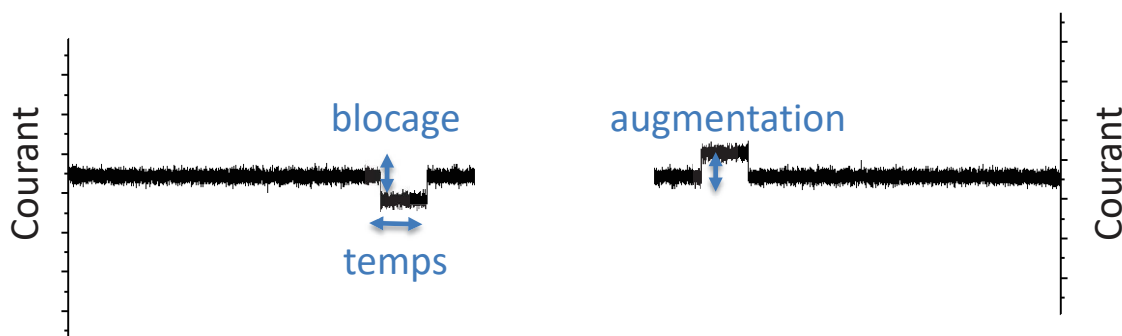


Figure 11 : Schéma représentant un blocage et une augmentation en fonction du temps

Trois paramètres sont utilisés pour caractériser chacune de ces perturbations : le temps de résidence dans le pore δt , l'amplitude de la perturbation $|\Delta I|$ et le taux de capture f . Ce dernier est le nombre d'événement par seconde. Ces paramètres dépendent à la fois des propriétés de l'objet traversant le pore (taille, charge, forme, déformabilité) mais aussi du pore (diamètre, charge et état de surface, rapport d'aspect).

Il est possible de prédire les perturbations de courant en utilisant différents modèles. Pour le passage d'ADN dans des nanopores de faible rapport d'aspect, il a été montré que le courant augmente ou diminue en fonction de la concentration en sel.¹¹⁹ En effet, dans un nanopore de 4 nm de diamètre, à 0,1 M KCl, une augmentation de courant est observée lors du passage de l'ADN, ce qui a été expliquée par le courant de surface à l'intérieur du pore. L'augmentation de courant a été attribuée à l'introduction de contre-ions dans le pore due à la charge de l'ADN. Ceci a été confirmé par l'équipe de Dekker.¹²⁰ Ils ont étudié le passage de l'ADN à travers un nanopore en SiN de 12 nm de diamètre. Ils ont estimé que deux effets compétitifs sont à prendre en compte. D'une part, la conductance diminue du fait du volume occupé par la molécule d'ADN, ce qui diminue le nombre de porteurs de charges pour le transport

ionique. D'autre part, les contre-ions qui masquent la charge de l'ADN ajoutent une contribution positive au courant. En prenant ces deux effets en compte, le changement de conductance (G) due au passage de l'ADN peut être décrite par l'équation 1.19¹²⁰ :

$$\Delta G = \frac{n_{DNA}}{d} \left(-\frac{\pi}{4} d_{DNA}^2 (\mu_+ + \mu_-) n_{KCl} e + \mu_+^* q_{DNA}^* \right) \quad (\text{éq 1.19})$$

où n_{DNA} est le nombre de molécule d'ADN dans le pore, d_{DNA} est le diamètre du brin d'ADN, μ^* est la mobilité électrophorétique effective des ions potassium se déplaçant le long du brin d'ADN, et q^* est la charge effective de l'ADN par unité de longueur, qui est supposé constante.

A partir de cette équation, il a été montré que le passage de l'ADN peut induire soit une augmentation (basse force ionique, $[KCl] < 0,4 \text{ M}$) ou une diminution (forte force ionique, $[KCl] > 0,4 \text{ M}$) de courant. Ces dernières seraient engendrées par le blocage partiel du pore et les augmentations sont attribuées au mouvement des contre-ions qui cache la charge de l'ADN.

Dans le cas des protéines traversant un nanopore de faible rapport d'aspect, les blocages de courant vont dépendre de leur volume hydrodynamique et de leur facteur de forme. Ils peuvent être prédits par une dérivation de l'équation de Maxwell :^{48,49}

$$\frac{\Delta I}{I_0} = \frac{4\gamma\Lambda}{\pi d_p^2 (l_p + 0.8d_p)} S \frac{r_p}{d_M} \quad (\text{éq 1.20})$$

où Λ est le volume de la protéine (m^3) qui est estimé grâce au coefficient de diffusion de la protéine obtenue par FCS, et γ est le facteur de forme. Celui-ci est de 1,5 pour les géométries sphériques. Dans le cas des prolates sphéroïdes γ peut prendre deux valeurs $\gamma_{\parallel}$ et $\gamma_{\perp}$ (éq 1.20) qui dépendent de l'orientation de la protéine.

$$\gamma_{\parallel} = \frac{1}{1-n_{\parallel}} \text{ et } \gamma_{\perp} = \frac{1}{1-n_{\perp}} \quad (\text{éq 1.21})$$

où $n_{\parallel}$ et $n_{\perp}$ pour des prolates sphéroïdes avec $m = a / b$ donné par (éq 1.21)

$$n_{\parallel} = \frac{1}{m^2-1} \left[\frac{m}{\sqrt{m^2-1}} \ln(m + \sqrt{m^2-1}) - 1 \right] \text{ et } n_{\perp} = \frac{(1-n_{\parallel})}{2} \quad (\text{éq 1.22})$$

$S \frac{r_p}{d_M}$ est le facteur de correction donné par (éq 1.23)

$$S \frac{r_p}{d_M} = \frac{1}{1-0.8 \left(d_M / d_p \right)^3} \quad (\text{éq 1.23})$$

Dans le cas de sphères chargées toujours dans un nanopore de faible rapport d'aspect, l'intensité des blocages est dépendante du volume de la particule et de la géométrie du pore. La hauteur relative du courant est dans ce cas prédite par l'équation:¹²¹

$$\frac{R_{particule}-R_{vide}}{R_{vide}} = \frac{I_{vide}-I_{particule}}{I_{particule}} = \frac{D}{L} \left[\frac{\sin^{-1}\left(\frac{d}{D}\right)}{\sqrt{1-\left(\frac{d}{D}\right)^2}} - \frac{d}{D} \right] \quad (\text{éq 1.24})$$

où d est le diamètre de la particule, D est le diamètre du pore, L est la longueur du pore, $R_{particule}$ et R_{vide} sont les résistances électriques avec et sans la particule, $I_{particule}$ et I_{vide} sont les courants équivalents.

- Si le temps de résidence est considéré comme dépendant uniquement du champ électrostatique.

$$\Delta T = \frac{6\pi\eta L}{qE} \quad (\text{éq 1.25})$$

- Si la vitesse de passage des bio-molécules prend en compte les états de charge de l'objet et du pore.¹²² Elle dépendrait à la fois des potentiels zêta de l'objet (ζ_{Px}) et du nanopore (ζ_{NP}).

$$v_{eff} = \frac{\varepsilon E}{\eta} (\zeta_{Px} - \zeta_{NP}) \quad (\text{éq 1.26})$$

où E est le champ électrique, ε est la permittivité diélectrique ($\varepsilon = \varepsilon_0$; $\varepsilon_r = 78$) et η est la viscosité du fluide (10^{-3} Pa s).

La fréquence à laquelle la molécule entre dans le nanopore est désigné par le taux de capture et dépend des propriétés de l'objet (charge, taille,...), de la solution d'électrolyte (pH, concentration,...) et des dimensions du nanopore (diamètre et épaisseur du film), ainsi que du voltage appliqué à travers le pore.¹²³ Si seulement la diffusion est prise en compte, le taux de capture serait de :

$$f_d = 2\pi c_b D r_p \quad (\text{éq 1.27})$$

Dans le cas de molécules chargées il faudrait prendre en compte le champ, qui n'est pas négligeable, proche du pore, dans ce cas le rayon de capture serait défini par :¹²⁴

$$r_{c^*} = R_c / (2\pi D_0 C_0) \quad (\text{éq 1.28})$$

Ces modèles ne prennent pas en compte la barrière d'énergie que les objets doivent franchir pour entrer dans le pore. Dans ce cas, la dépendance entre le taux de capture et la barrière d'énergie d'entrée (U) suivrait une loi de Van't Hoff Arrhénius.¹²⁵

$$f = \kappa \nu \frac{C \mu_{Px(bulk)} A V}{L} \cdot \exp - \frac{U}{k_B T} \quad (\text{éq 1.29})$$

où κ est le facteur de probabilité, ν est le taux de fréquence, k_B est la constante de Boltzmann, T est la température, A est l'aire en coupe transversale du nanopore, L est la longueur du nanopore, $\mu_{Px(bulk)}$ est la mobilité du polynucléotide, V est le voltage appliqué et C est la concentration en polynucléotide.

La barrière d'énergie globale peut être décomposée en trois composantes :

$$U = U^* + U_{ES} - ze|V| \quad (\text{éq 1.30})$$

Le terme zeV est l'énergie apportée par l'électrode de travail sur l'objet, z est le nombre de charge apparente, et e est la charge élémentaire. U^* est une composante entropique liée à la diminution des degrés de liberté et au changement de conformation de l'objet. U_{ES} est la composante électrostatique induite par la différence de charge entre la surface interne du pore et l'objet ¹²⁶.

4. Modification de la surface et fonctionnalisation

Les canaux biologiques, où les composants sont distribués de part et d'autre de la membrane cellulaire, servent d'inspiration pour la fabrication de nanopores biomimétiques. Nous avons évoqué précédemment les différents matériaux utilisés pour la fabrication de nanopores uniques. Après le choix : du matériel, des formes et des structures obtenues grâce à l'utilisation de différentes technologies de fabrication, le nanopore peut ensuite être modifié chimiquement. Ces modifications chimiques de la surface du nanopore, permettent de modifier leurs propriétés physico-chimiques, et constituent une approche intéressante pour la fabrication de nanopores stimuli-répondants ou pour la détection de biomolécules par exemple, l'ADN ou les protéines. La surface du pore peut être modifiée pour s'adapter à des besoins spécifiques concernant l'hydrophobicité, la sélectivité, les charges de surface et la reconnaissance de molécule spécifique. Les fonctions chimiques présentes sur la paroi d'un nanopore, peuvent servir de points d'ancrage pour modifier le pore. La modification peut être effectuée de façon symétrique ou asymétrique.

Les principales méthodes de fonctionnalisation symétrique sont les suivantes : le dépôt sans électrode, le dépôt par couche atomique, la modification chimique par des molécules fonctionnelles en solution, et l'auto-assemblage de molécules.

Les méthodes de modification asymétrique sont également utilisables pour des modifications symétriques. Elles apportent de nombreuses méthodes pour la fabrication de systèmes nanopores multifonctionnels, par exemple : la pulvérisation cathodique d'ions, l'évaporation physique ou chimique, la modification par plasma, et la modification fonctionnelle grâce à des molécules en solution. La méthode de fonctionnalisation va être choisie en fonction du nanopore et des propriétés visées. Nous allons décrire plus en détail des approches classiques pour la fonctionnalisation de nanopores.

4.1. Dépôt sans électrodes («*Electroless plating*»)

Cette technique est un type de recouvrement non-galvanique, qui implique plusieurs réactions simultanées en solution aqueuse. Elle se produit sans l'utilisation d'un potentiel électrique extérieur.¹²⁷ Grâce à l'utilisation de forts agents réducteurs, des ions métalliques en solution sont réduits en atomes métalliques. Ces derniers se déposent sur la surface et forment une couche dense. De nombreux métaux peuvent être déposés, tels que l'or, le nickel, l'argent, le cuivre, le palladium et le platine. Le processus de modification par dépôt sans électrode est divisé en deux parties : ¹²⁸ (Figure 12)

1. prétraitement du nanopore par recouvrement de sa surface par un catalyseur.
2. immersion du nanopore dans la solution de plaquage. Dans ce cas, les ions métalliques réagissent avec l'agent réducteur à la surface du film.

En s'appuyant sur cette technique, le groupe de Martin, a obtenu des nanotubes d'or (*Au*) à l'intérieur du pore formé par la technique de la trace attaquée.^{101,129,130} Cette couche d'or d'épaisseur contrôlable procure une bonne base pour continuer à fonctionnaliser la surface du pore par auto-assemblage de

thiols.¹³¹ Cette méthode peut également être utilisée pour imager la forme des nanopores. De l'or est déposé dans une membrane multipore, qui est ensuite dissoute. Les nano-filaments obtenus peuvent être observés par microscopie électronique à balayage.¹³²

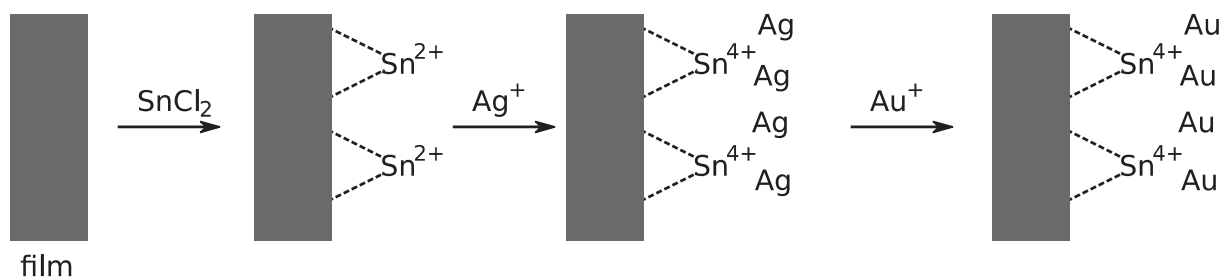


Figure 12: Schéma de la procédure de dépôt d'or sans électrode sur un film polymère (adapté de ¹²⁸)

4.2. Dépôt par couche atomique (« *Atomic Layer Deposition* » ALD)

Le dépôt par couche atomique, est une technique en phase vapeur qui permet de produire des films minces avec de nombreux matériaux. Basée sur des séquences, et des réactions auto-limitantes, l'ALD offre une exceptionnelle conformité sur les structures de fort rapport d'aspect, un contrôle de l'épaisseur de l'ordre de l' *ångström*, et une composition du film ajustable.^{133,134}

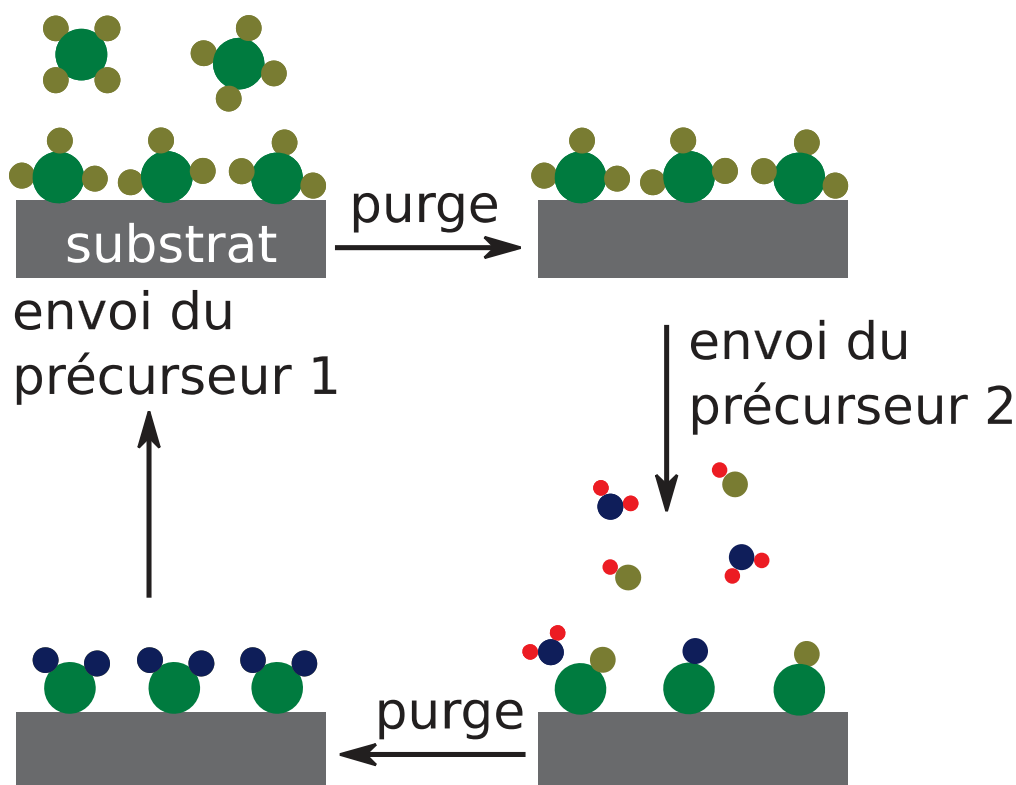


Figure 13 : Schéma du principe de l'ALD

La conformation et le taux de croissance des dépôts sont influencés par les réactions de surface, par les réactions limitées par la diffusion à l'intérieur du nanopore, et la température.^{67,135} Il est possible de

déposer par ALD : de l' Al_2O_3 ,⁶⁸ de l' $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$,¹³⁶ du TiO_2 ,^{67,137} sur des pores en SiN , du HfO_2 ,¹³⁸ de l' $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$,¹³⁹ sur des pores en alumine, du TiO_2 , sur des pores en graphène pour réduire le bruit,¹⁴⁰ de l' Al_2O_3 ,⁷¹ de l' $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$,^{45,69} sur des pores en PET. Le dépôt d'alumine par ALD permet d'améliorer les capacités de détection du pore en ajustant précisément ses propriétés de surface⁶⁷, en réduisant le bruit⁶⁸, en neutralisant les charges de surfaces pour favoriser la capture de brins d'ADN³⁰, ou d'autres poly-électrolytes négatifs. L'utilisation de bicouches alternées d' $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$, sur des pores en PET engendre une faible rugosité des couches déposées. En effet, il a été montré que l'utilisation de bicouche permet d'obtenir des structures amorphes, alors qu'elles sont nanocristallines dans le cas de dépôt des monocouches en ZnO .¹³⁵

4.3. Modification chimique sur les fonctions en surface des nanopores

La fonctionnalisation chimique sur la surface du pore est l'une des plus connues. Dans le cas de nanopores en polymère, la modification chimique s'effectue sur leurs groupements fonctionnels (par exemple pour le PET, $-\text{COOH}$) qui réagissent pour former des liaisons covalentes (par exemple C(O)-NH-). Après l'attaque chimique, la surface interne du nanopore en poly-(éthylène téréphtalate) (PET) est couverte de groupements carboxylates.⁵⁷ Ces derniers sont utilisés pour fonctionnaliser uniquement la paroi interne du pore. Ils permettent d'effectuer un greffage chimique grâce à des carbodiimides (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) (EDC) (Figure 14a).

Les carbodiimides sont les composés les plus répandus et versatiles pour marquer ou réticuler des acides carboxyliques. Les conjuguations carbodiimides activent les groupements carboxyles pour une réaction directe avec des amines primaires via la formation d'une liaison amide. L'EDC réagit avec les groupements acides carboxyliques pour former un intermédiaire actif l'O-acylisourea qui est facilement remplacé grâce à une attaque nucléophile des groupements amines primaires dans le mélange réactionnel. L'acide primaire forme une liaison amide avec le groupement carboxyle originel, et un sous-produit de l'EDC est relargué sous la forme d'un dérivé d'urée soluble. L'intermédiaire O-acylisourea est instable en solution aqueuse, s'il ne réagit pas avec une amine, il en résulte l'hydrolyse de cet intermédiaire, ce qui régénère les carboxyles (Figure 14b).

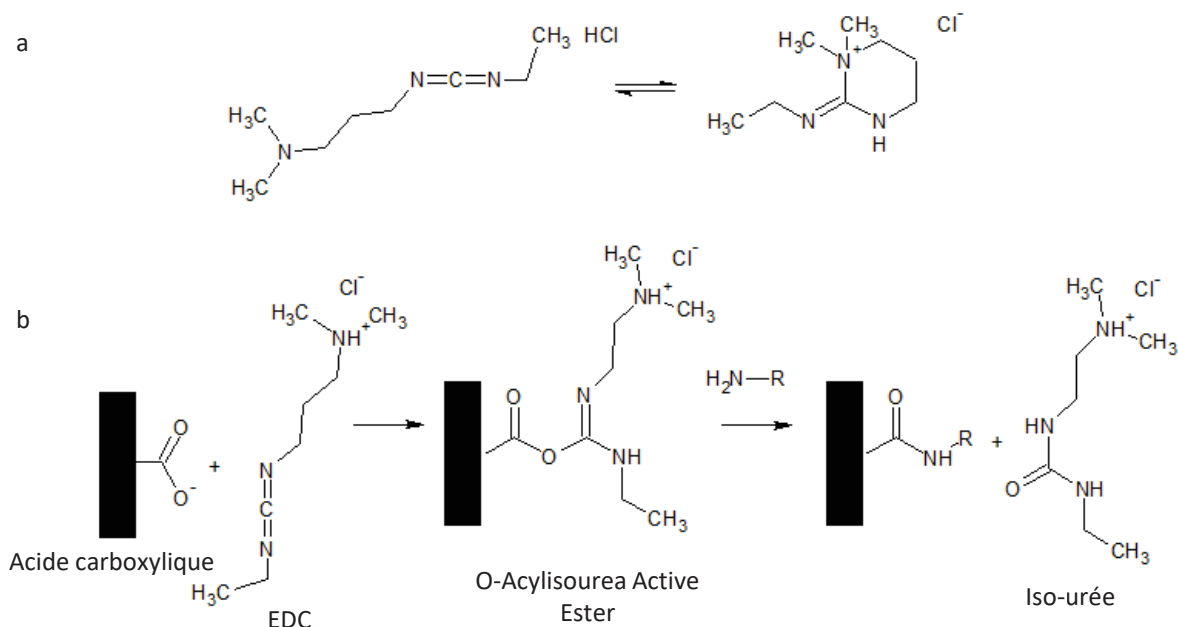


Figure 14 : a. (N-(3-diméthylaminopropyl)-N' -éthylcarbodiimide) (EDC), b. Schéma de la réaction de couplage grâce à l'EDC (carbodiimide). La surface du pore en PET qui possède les groupements carboxylates peut réagir avec les amines primaires par l'intermédiaire de l'EDC pour former les carboxylamines par réticulation

Les composés activés NHS esters réagissent avec des amines primaires en conditions physiologiques ou légèrement alcalines (pH 7,2-9) pour obtenir des liaisons amides stables. En fin de réaction, des N-hydroxysuccinimide (NHS) sont produits. L'hydrolyse des NHS ester concurrence la réaction des amines primaires. Le taux d'hydrolyse augmente avec le pH et contribue à rendre la réaction moins efficace. Les réactions de réticulation sont généralement effectuées de 0,5 à 4 h à température ambiante ou à 4°C. Les sulfo-NHS esters sont également utilisés. Ils sont identiques aux NHS esters à part qu'ils contiennent un groupement sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) sur le cycle. Ce groupement n'a aucun effet sur la réaction chimique, mais il a tendance à améliorer la solubilité du composé.

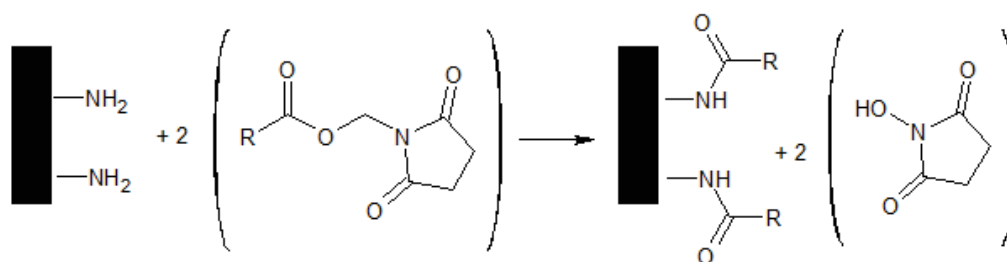


Figure 15 : Schéma de la réaction de réticulation grâce aux N-Hydroxysuccinimide Esters (NHS esters). La surface du pore qui a été préalablement fonctionnalisée par des groupements amines peut réagir avec les esters (NHS esters) par l'intermédiaire de l'EDC pour former les carboxyl-amines par réticulation

En utilisant ces réactions chimiques, Vlasiouk et Siwy ont développé une méthode pour modifier de façon asymétrique un nanopore, pour fabriquer une diode nanofluidique qui fonctionne avec un gradient de concentration. Tout d'abord des amines sont greffées sur la surface interne d'un pore en PET, en utilisant une solution aqueuse d'EDC, et d'éthylène diamine. Puis les groupements carboxyles sont attachés sur les amines en surface grâce à des anhydrides succiniques dans de l'éthanol. Les solutions d'EDC et d'éthylène diamine ou d'anhydride succinique, sont ajoutées soit du petit côté du pore pour une fonctionnalisation asymétrique, soit des deux côtés pendant 12 h pour une fonctionnalisation symétrique.¹¹⁴ Ils ont appliqué la même technique pour développer un transistor ionique bipolaire en utilisant un nanopore en forme de sablier avec des modifications asymétriques.¹⁴¹ Ils ont également décrit un biocapteur basé sur ce système de diodes nanofluidiques, avec des caractéristiques courant-voltage non-linéaire, et qui permet la détermination du point isoélectrique des protéines immobilisées à la surface, en quelques minutes.¹⁴²

De la même manière, des nanopores asymétriques sensibles au pH ont été fabriqués avec des pores uniques en greffant de l'ADN dans un nanopore en PET par une synthèse en deux étapes. Tout d'abord, un N-Hydroxysuccinimide ester est formé sur la surface interne du nanopore en incubant ce dernier dans une solution de N-Hydroxysuccinimide (NHS) et N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC) pendant 1 h. Ensuite de l'ADN modifié (amino simple brin ADN [5'-(NH₂)-(CH₂)₆-AAAAAAAAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC (Bodipy493/503)-3']) est ajouté en solution PBS-alcaline pendant 2 h pour fonctionnaliser le nanopore.¹⁴³

Une autre stratégie utilise la fonctionnalisation par éthylène diamine sur les pores en PET, grâce aux fonctions carboxyles créées sur la surface interne du nanopore après l'attaque chimique. L'équipe d'Ensinger a fonctionnalisé des nanopores coniques en PET avec des polymères terminés par des phosphates permettant de réguler le transport ionique à travers le pore grâce aux protons. Tout d'abord les nanopores sont fonctionnalisés symétriquement par EDC et pentafluorophenol, puis le nanopore est incubé dans de l'éthylène diamine. Ensuite des fonctions 4,4'-Azobis(4-cyanopentanoïque) sont greffées à la surface du pore. Enfin, les (méthacryloyl éthylène phosphate) polymérisent sur la surface fonctionnalisée.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

Une autre stratégie pour fonctionnaliser la surface du nanopore avec des groupements fonctionnels est d'utiliser la silanisation. Les organosilanes sont particulièrement intéressants dans le cas des nanopores en nitrure de silicium ou oxydes métalliques, étant donné qu'ils peuvent former des liaisons covalentes à la surface du nanopore et ont de nombreux groupements terminaux fonctionnels. Ils ont une structure générale $(\text{RO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$, basée autour d'un atome de silicium, contenant un groupement fonctionnel terminal.¹⁴⁷

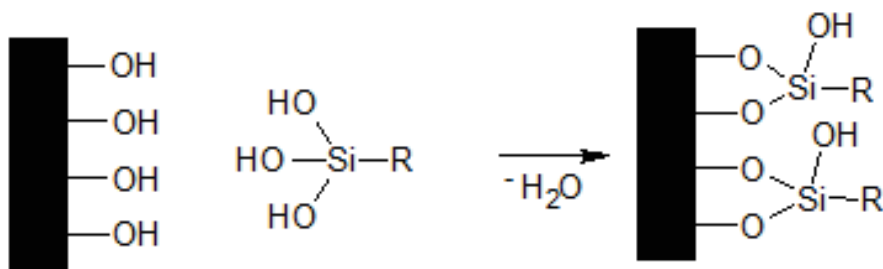


Figure 16 : Schéma de la réaction de silanisation, R représente le groupement fonctionnel

La silanisation d'une surface a lieu grâce à l'hydrolyse des têtes des organosilanes, suivi d'une réaction de condensation avec les groupements hydroxyles à la surface. Cette fonctionnalisation dépend du nombre de points d'ancrage en surface, mais ils sont généralement situés sur toute la surface du nanopore (interne et externe). En général la meilleure approche pour obtenir une haute densité de groupements hydroxyles en surface d'un nanopore en SiN est de l'incuber dans une solution piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$, 3 : 1), qui agit comme un oxydant et un acide fort. Cette solution a également l'avantage d'éliminer les contaminants organiques et augmente la mouillabilité de la surface. La silanisation des nanopores est facilement réalisable soit en phase vapeur, soit en solution en utilisant des solvants tels que le toluène ou le méthanol.¹⁴⁷ Le large choix de groupements fonctionnels terminaux permet de moduler la charge de surface, de rendre le nanopore stimuli-répondant, ou d'apporter des effets stériques qui amènent une sélectivité moléculaire ou diminuent le diamètre du pore. Wanunu et Meller ont utilisé différents organosilanes et leurs dérivés pour fonctionnaliser des nanopores en SiN. Les surfaces ont été fonctionnalisées avec des groupements amines, époxydes, PEG, ou carboxylates, puis caractérisées par spectroscopie photo-électronique de rayon X (« *X-ray photoelectron spectroscopy* » XPS). Les fonctionnalisations réalisées in-situ ont pu être suivies simultanément par des mesures de courant ioniques à travers le nanopore.³⁵

Il est également possible de silaniser des nanopores en polymères après un dépôt d'une couche de ZnO par ALD. Cette dernière présente des groupements hydroxyles en surface et peut donc être silanisée de la même manière que le SiN.^{45,69}

4.4. Auto-assemblage

Une autre stratégie pour modifier chimiquement des nanopores est basée sur l'auto-assemblage de molécules thiolées pour former des liaisons Au-S, après le dépôt d'or à la surface du pore. Chaque molécule qui constitue les blocs constitutifs de ce système peut être divisée en trois parties différentes : la « tête » (groupe liant), la chaîne principale, et un groupement terminal spécifique. Les groupements de tête guident le processus d'auto-assemblage, liant la chaîne carbonnée (de longueur variable) à la surface métallique. Les interactions entre les chaînes carbonnées (van der Waals et forces hydrophobes) permettent une organisation efficace de la monocouche et contribue à stabiliser la structure avec l'augmentation de la longueur des chaînes. Le groupement terminal amène les propriétés spécifiques à la surface, ou peut également être utilisé pour greffer différentes molécules, biomolécules ou nanostructures par interactions faibles ou liaisons covalentes. Les thiols peuvent avoir comme groupements terminaux des amines, des époxydes, des PEG, entre autres.¹⁴⁸ Cette méthode présente de nombreux avantages pour la fabrication de nano-systèmes. Le système des thiols sur l'or est particulièrement intéressant. Cela est dû à sa facilité de préparation et sa stabilité liée aux liaisons S-Au et la densité des modifications chimiques, et aux interactions de van der Waals.¹⁴⁹

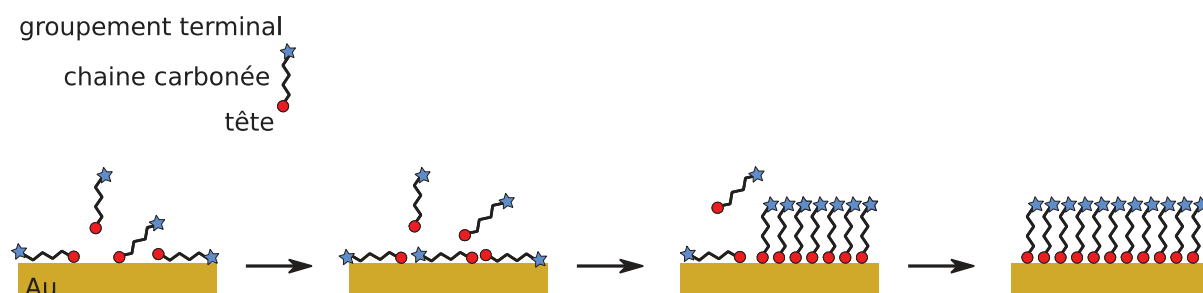


Figure 17 : Schéma des différentes étapes durant l'auto-assemblage d'alkanethiol sur Au(111): (i) physisorption, (ii) formation de la phase couchée, (iii) nucléation de la phase debout, et (iv) complétion de la phase debout

Cette méthode a largement été utilisée pour développer de nombreuses surfaces,¹⁵⁰ ou nanopores fonctionnalisés.¹⁵¹ Cependant, cette fonctionnalisation est lente, nécessitant souvent plus de 24h.

L'équipe de Martin, après avoir déposé de l'or sur un nanopore en polymère (PC) par déposition sans électrodes, a lié de façon covalente des brins d'ADN terminés par des thiols. Ce pore a permis d'imiter des canaux ioniques voltage-dépendant.¹⁵² L'équipe de Siwy a en déposant de l'or seulement à l'entrée d'un pore en PET par « *sputtering* », obtenu une porte hydrophobe grâce à l'utilisation de thiols avec différentes longueurs de chaînes carbonnées.⁴⁴ Cette technique a également été utilisée pour des pores en SiN, le métal est déposé en phase vapeur, ensuite des NTA-thiols sont utilisés pour former les auto-assemblages. Ces pores ont permis la détection de protéines.¹⁵³

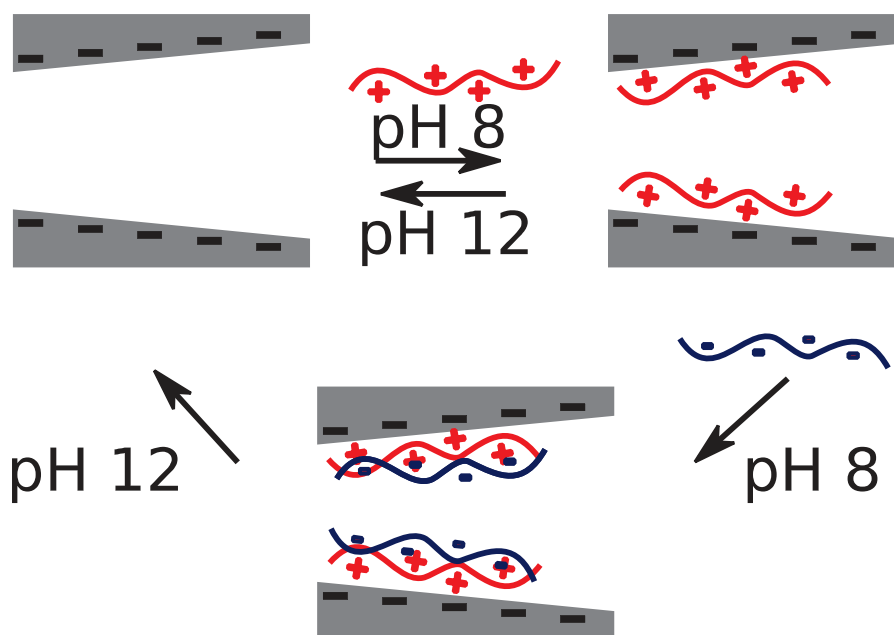


Figure 18 : Schéma du principe de fonctionnalisation en utilisant successivement des poly-cations puis des poly-anions sur une surface négativement chargée

Une seconde stratégie par auto-assemblage est basée sur des interactions électrostatiques, entre les groupements fonctionnels à la surface interne du pore et des molécules fonctionnelles, les poly-électrolytes. L'assemblage couche par couche (« *layer by layer* » LbL) est une technique polyvalente qui permet de créer des structures multicouches en alternant des couches d'espèce poly-anionique et poly-cationique. La formation de ces multicouches est gouvernée par l'auto-assemblage électrostatique et tant que les composants présentent les charges appropriées, la taille, la structure, et la nature de ces composants peuvent être modifiées.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ (Figure 18) Un désavantage de cette technique LbL est que leurs structures à l'intérieur du nanopore n'est pas facilement caractérisable.

4.5. Pulvérisation cathodique d'ions (*Ion Sputtering*) asymétrique

C'est un processus de condensation d'une vapeur métallique issue d'une source solide (cible) sur un substrat, grâce à l'accélération d'ions positifs. Cette technique a de nombreux avantages tels que la forte adhésion entre la couche déposée et le substrat, un dépôt dense et uniforme de la couche, facilement contrôlable. Ce processus de modification est asymétrique,⁴² il permet d'obtenir des nanopores en forme de sablier avec des métaux différents (or, platine, ...) sur chaque face du nanopore.¹⁵⁷ Cette technique peut être réalisé sur tous types de matériaux.

4.6. Evaporation physique ou chimique, fonctionnalisation asymétrique

Les modifications par évaporation d'un faisceau d'électron sont des techniques typiques de dépôt en phase vapeur. Elles sont largement utilisées pour des modifications de surfaces. Le principe est de bombarder une anode cible avec un faisceau d'électrons, qui sont produits par un filament de tungstène

chargé sous vide poussé. Le faisceau d'électrons permet aux atomes de la cible de passer en phase gazeuse. Ensuite ces atomes précipitent à la surface du matériau, la recouvrant ainsi d'une fine couche du matériau de l'anode. Les avantages de cette méthode, sont un dépôt rapide, et une surface propre après le dépôt. La couche déposée adhère fortement au substrat, et le choix de matériau du substrat est illimité. En utilisant le dépôt chimique par phase vapeur, les réactants sont déposés, le processus n'est pas sujet à des limitations de potentiels de surface, il est uniforme, et peut être utilisé sur presque n'importe quelle surface. Grâce à cette méthode, des nanopores en polymères (PC) fonctionnalisés par des polymères fluorés ont été développés pour des applications de séparation. Ces nanopores sont plus sélectifs s'ils sont petits, hydrophobes, et cylindriques.¹⁵⁸

En utilisant cette méthode, l'équipe de Siwy a préparé un transistor ionique.¹⁵⁹ Ils ont déposé du petit côté d'un pore conique, du titane, utilisé comme couche adhésive, de l'or et du SiO₂ comme couche isolante. La couche d'or est utilisée comme électrode, pour appliquer le potentiel choisi à la surface du nanopore. En changeant le potentiel à l'entrée du pore, le courant à travers le pore peut passer d'un comportement de diode, présentant un courant rectifiant, à un comportement quasi linéaire de nanopore symétrique.

4.7. Modification plasma

L'attaque plasma à oxygène sur des matériaux polymères permet de transformer des nanopores cylindriques en nanopores coniques. Par exemple, les pores attaqués par plasma peuvent être presque entièrement cylindrique et se terminer par un cône (forme de trompette), ou peuvent être des cônes quasiment parfaits. Le principal avantage des formes de ces pores est la réduction importante de la résistance par rapport à un pore cylindrique similaire.¹⁶⁰ Dans le cas des pores en SiN, le plasma permet d'augmenter la densité de OH, pour améliorer la silanisation. Toutefois le plasma se limite à la surface. Il peut exister une différence de densité de OH entre l'intérieur et l'extérieur du nanopore.

Il est également possible de réaliser des polymérisations par plasma. Les modifications plasma de matériaux polymères peuvent produire de façon efficace de grandes quantités de radicaux libres à la surface du substrat. Ces radicaux réagissent pour former des groupes fonctionnels. Cette méthode permet de fonctionnaliser une zone locale spécifiquement et précisément. Les désavantages de cette technique sont que les structures obtenues par modification plasma sur des nanopores sont difficilement caractérisables, et la densité des groupements fonctionnels n'est pas bien contrôlée. Le plasma a été utilisé pour modifier, de manière asymétrique par greffage de polyacrylique acide (PAA), un nanopore symétrique en PET en forme de sablier. Cette fonctionnalisation lui confère des propriétés d'ouverture-fermeture au pH.⁴³ En utilisant la même stratégie, un nanopore multi-répondant a été obtenu, en utilisant des modifications plasma asymétriques pour fonctionnaliser les deux côtés du pore avec des molécules fonctionnelles différentes. Le nanopore symétrique est en forme de sablier, et des PAA sont greffés d'un côté. De l'autre, le film en PET a été traité par plasma en phase vapeur de N-isopropylacrylamide, qui devient un polymère température répondant, poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPA), après le greffage.

Il a été possible, en modifiant le pH et la température, de contrôler les propriétés de transport ioniques à travers le nanopore.¹⁶¹

5. Nanopore biomimétique

Le flux ionique/moléculaire à travers les membranes biologiques est régulé à travers les canaux ioniques qui agissent comme des portes ioniques/moléculaires. Ils peuvent s'ouvrir ou se fermer en réponse à leur environnement extérieur, entraînant le passage ou non, d'ions ou de molécules à travers le pore en fonction de l'état induit par ces stimuli. Fabriquer des nanopores bio-inspirés apporte la capacité de manipuler et contrôler le transport des ions et molécules dans un espace confiné. Ils peuvent imiter les processus de transport ionique/moléculaire des canaux biologiques. Les stratégies de fonctionnalisation peuvent permettre le développement et l'amélioration de ces systèmes. Les membranes stimuli-répondantes ont été largement étudiées car leurs propriétés physico-chimiques peuvent être modifiées, ajustées en fonctions de leurs environnements extérieurs.¹⁶² Ces films ont la capacité de réguler la perméation ionique et moléculaire sous l'application de ces stimuli externes.²⁶ Les modifications physico-chimiques avec des molécules fonctionnelles est donc une approche fondamentale pour fabriquer des nanopores stimuli-répondants. L'utilisation de molécules fonctionnelles est extrêmement importante pour la fabrication de système nanopore biomimétique. De nombreuses molécules stimuli-répondantes ont été décrites dans la littérature, par exemple, sensible au pH,^{144,145,163,164} à la température,^{151,165}, à la lumière¹⁶⁶⁻¹⁶⁸, aux ions.^{169,170} Ces films stimuli-répondants contiennent un pore unique et ils peuvent être facilement implémentés à une série de nanopores (membranes multipores) pour des applications de filtrations par exemple. Dans cette partie, des exemples seront donnés en fonctions du type de stimuli.

5.1. Nanopore unique pH répondant

Les nanopores pH répondant sont les plus étudiés car ils jouent un rôle important dans presque toutes les réactions électrochimiques. Pour les obtenir, ces nanopores ont été fonctionnalisés avec des polymères dont les conformations ou polarités varient en fonction des conditions pH. Les molécules les plus étudiées dans le cas des nanopores incluent les polyvinyles pyridines (PVP),¹⁶⁴ les poly(methacryoyl-L-lysine) zwitterioniques,^{145,171} poly-2-(methacryloyloxy)éthyles phosphates (PMEP),¹⁴⁴ poly(méthacrylique acide) (PMMA)⁴³, et des brins de polypeptides.¹⁷² Les auto-assemblages de chaînes amphotères, de chaînes d'acides polyprotiques (qui libèrent plusieurs protons),¹⁷³ de molécules chimiques uniprotiques^{114,141,174-176} et de molécules d'ADN sont également utilisés pour obtenir des régulations du flux ionique grâce au pH.^{143,152,177} Des brins d'ADN modifiés, terminés par des amines, ont été greffés sur des nanopores coniques en PET grâce à l'EDC. Les modifications sont

effectuées de façon asymétrique. Il a été démontré que la conformation de l'ADN change en fonction du voltage, de la force ionique, et du pH.^{178,179}

Des auto-assemblages d'organosilanes terminés par des amines, permettent également de modifier la sensibilité au pH de nanopores en SiN.³⁵ Des polymères pH-répondant, (PAA) ont été greffés en surface de nanopore en forme de sablier, permettant ainsi de moduler le courant ionique en fonction du pH.^{43,161}

5.2. Nanopores thermo-répondants

Dans les organismes vivants les processus de thermo-sensations se produisent via l'activation directe de canaux ioniques thermiquement activés (ouverture-fermeture du nanopore en fonction de la température) qui sont localisés à la surface de la membrane de neurones sensorielles.¹⁸⁰ Ces canaux thermo-répondants appartiennent à la famille des canaux potentiels récepteurs transitoires (Transient receptor potential channels (TRP channels)).^{180,181} Dans le cas de nanopore synthétique, des nanopores thermosensibles ont été préparés par l'immobilisation de brins de polymère (Poly(N-isopropylacrylamide) PNIPAM) à la surface du pore. La conformation de ces polymères solubles dans l'eau change (gonflent/rétrécissent) lorsque la température du milieu varie.^{24,182-186} En dessous de la plus basse température critique de solubilité (LCST $\sim 32^{\circ}\text{C}$) les brins de PNIPAM sont dans des états gonflés, conduisant à la diminution du diamètre effectif, ce qui réduit ou bloque le flux d'ions à travers les pores, tandis qu'au-dessus du LCST, les brins sont repliés. Ce résultat produit une augmentation du diamètre, et donc du flux ionique. De plus, des nanopores répondant à la fois au pH et à la température ont également été fabriqués grâce au greffage de brins de polymère ou de copolymère (poly[2-(diméthylamino) ethyl methacrylate] (PDMAEMA), poly(acrylique acide) (PAA) combiné avec poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAA), ou poly(N-isopropyl acrylamide- co -acrylic acide) (P(NIPAAm- co -AAc))) sur la surface du nanopore.^{161,169,187}

5.3. Nanopores photosensibles

En tant que stimuli externe la lumière a également été largement étudiée.¹⁶⁷ Dans le but d'obtenir des nanopores synthétiques photo-répondant, des molécules photochromiques telles que l'azobenzène¹⁸⁸, spiropyrane,^{166,168,189} et coumarine¹⁹⁰ ont été incorporée à la surface des pores. Les molécules photo-répondantes subissent une isomérisation réversible ou irréversible sous irradiation. Cette photo-isomérisation (photochromisme) entraîne une modification de la polarité, de la charge, et de la taille des molécules immobilisées en réponse à une irradiation lumineuse qui contrôle le transport de masse à travers le nanopore. Par exemple, l'utilisation d'azobenzène permet de contrôler la taille du pore et donc son transport ionique, en modifiant sa conformation (*trans*, *cis*) en alternant des expositions à l'UV et à la lumière visible.¹⁸⁸ En greffant des spiropyranes sur le pore, quand ce dernier est dans sa forme stable, il est hydrophobe, il n'est pas possible de remplir les pores de solutions aqueuses. En exposant le pore à la lumière UV, le spiropyrane photo-isomérisé en une forme plus polaire, la merocyanine protonée, et permet le mouillage/ remplissage des pores.¹⁶⁸

Il est possible de coupler des propriétés de réponse en pH et à la lumière grâce à l'utilisation de spiropyrane. Un pore conique est fonctionnalisé en 2 étapes, premièrement par des groupements amines en utilisant une fonctionnalisation EDC, NHS, éthylène diamine. Ensuite, le pore incube en présence de spiropyrane 1'-(3-carboxypropyl)-3',3'-diméthyl-6-nitro-spiro[2H-1]benzopyran-2,2'-indoline (SP-COOH), EDC, NHS, dans une solution éthanol pendant 24 h. Ce nanopore est conique et présente des propriétés de diode nanofluidique. Le pH permet d'inverser la rectification de courant et la manipulation de la lumière permet d'ouvrir ou fermer le pore.¹⁹¹

5.4. Nanopores métal ion- sensibles

Les propriétés de transport peuvent être modulées grâce à l'introduction spécifique d'ions métalliques en solution. Pour ce faire, des ligands chélatants de métaux sont greffés sur la surface interne du pore. Les complexes métal-ligand se forment dès que le pore modifié est exposé à une faible concentration d'ions métalliques spécifiques en solution, ce qui entraîne une forte modification du flux ionique à travers la membrane. Par exemple, les groupements carboxylates à la surface de pores coniques obtenus par la technique de la trace attaquée présentent un comportement d'ouverture/fermeture au calcium, en formant des complexes avec ce dernier.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Cette sensibilité au calcium a également été observée dans des nanopores modifiés avec des chaînes d'acide phosphonique.¹⁹⁵

Un nanopore zinc-dépendant a été préparé, en fonctionnalisant un nanopore en polymère (PET) avec des peptides zinc-répondants (« zinc finger », Pro-Tyr-Ala-Cys-Pro-Val-Glu-Ser-Cys-Asp-Arg-Arg-Phe-Arg-Ser-Asp-Glu-Leu-Thr-Arg-His-Ile-Arg-Ile-His-Thr-Gly-Gln-Lys). Les peptides sont immobilisés sur la surface interne du nanopore par une méthode d'amidation directe. Les films de PET sont d'abord incubés dans une solution aqueuse d'EDC et de NHS, pendant 1 h. Puis les peptides sont ajoutés dans une solution de PBS pendant 4 h. En l'absence de zinc, les « *zinc fingers* » greffés dans le nanopore sont en conformation dépliés, après l'addition de zinc en solution, les « *zinc fingers* » sont en conformation repliés, entraînant l'augmentation du diamètre du nanopore et donc du courant.¹⁹⁶ Un principe similaire a été développé, utilisant les changements de conformations de G-quadruplexe d'ADN (*G4 DNA*) dus au K^+ . L'ADN a été immobilisé sur la surface interne du nanopore en utilisant la même technique (en deux étapes) que pour les « *zinc fingers* ». Les *G4 DNA*, sont en conformations dépliées lorsqu'il n'y a pas de potassium; et dès que K^+ est ajouté, ils se replient en structure rigide de quadruplexe et donc, ce qui entraîne une augmentation du courant.¹⁹⁷

5.5. Nanopores biomolécule-sensibles

Les biomolécules peuvent aussi agir en tant que stimuli extérieurs. Leurs présences ou absences en solution, peuvent significativement affecter les propriétés de transport à travers la membrane.^{21,25,142,177,198-206} Les nanopores sensibles aux biomolécules ont de nombreuses applications dans le domaine des biocapteurs. La détection spécifique et la bio-capture de molécules spécifiques peuvent être obtenues par des sites d'interactions (ligands) greffés à la surface interne et/ou externe du pore.

Cette méthode est connue comme approche à l'état d'équilibre, dans laquelle les éléments de reconnaissance spécifiques (ligands) sont immobilisés sur la surface du nanopore. Lorsque les ligands, confinés à l'intérieur du pore, reconnaissent les analytes, cela entraîne des exclusions de volume et/ou des effets électrostatiques (inversion de charge).^{114,142,146,177,199,204,207,208} Dans le cas des effets électrostatiques, la capture des analytes a pour effet de changer la polarité et la densité de la charge de surface ce qui influe sur les propriétés de transport ionique, c'est-à-dire sur la rectification de courant ionique et la perm-sélectivité du nanopore.^{142,177,209}

Une autre stratégie, est de développer des biocapteurs contenant un nanopore unique fonctionnalisé, en utilisant des propriétés de reconnaissance spécifiques entre un ligand (biotine) et une protéine (la streptavidine ou l'avidine).^{202,210}

Par exemple, Siwy *et al.*²⁰⁴ ont décrit l'attache de protéines (streptavidine, (BSA), protéines G (biotine marquée), IgG de chat et IgG de cheval) à un agent de reconnaissance moléculaire ((i) biotine/streptavidin, (ii) protein-G/immunoglobuline) immobilisé à l'ouverture du côté du petit diamètre d'un nanopore conique en or. Puisque la protéine et l'entrée du nanopore ont des diamètres similaires, l'attache de la protéine obstrue le pore, ce qui induit un blocage du courant. Les courbes I-V pour les nanopores contenant de la biotine sont identiques avant et après l'ajout de lysozyme, ce qui montre que la protéine ne se lie pas à la biotine. Au contraire, le courant est quasiment nul lorsque la streptavidine est utilisée comme analyte.

Une autre stratégie, en greffant des récepteurs protéiques sur un pore SiN recouvert d'or puis de SAMs a été démontré.¹⁵³ Le capteur est réalisé grâce à l'utilisation de triethylene glycol alkylthiol tris-nitrilo acetic acid (NTA). Les NTA chélatent le nickel, qui est ensuite utilisé pour capturer les protéines marqués avec des poly-histidines. La complexation réversible des protéines marquées avec des histidines, et ensuite la reconnaissance avec des anticorps ont été observé en temps réel. Cette méthode semble suffisamment sensible pour discriminer différents sous-groupes d'anticorps dans un mélange complexe.

La détection de brin complémentaire d'ADN a été montré par Mussi *et al.*²¹¹ Pour ce faire, des nanopores en SiN, ont été fonctionnalisés avec de l'APTES. Ensuite des oligonucléotides fonctionnalisés avec des amines sont greffés. Des séquences d'ADN simples brins sont ajoutées en solution, certaines avec la séquence complémentaire et d'autres non. De cette étude, deux conclusions principales ont pu être tirées. La première, est une diminution du diamètre du nanopore, qui augmente le rapport signal sur bruit des blocages de courant. La seconde est l'observation de deux distributions du temps de passage, attribué aux deux populations d'ADN, celles ayant la séquence complémentaire et celle ne l'ayant pas.

5.6. Nanopore anti-bioadhérant

Des études se sont également intéressées à fabriquer des nanopores anti-bioadhérant. Yusko *et al.*⁴⁸ se sont inspirés du système olfactif des mites de la soie. Ils ont fonctionnalisé un nanopore en SiN par éclatement de liposomes, et obtenu une bicouche lipidique sur la surface d'un nanopore en SiN traité au

piranha. En modifiant la composition des lipides, ils ont joué sur le diamètre du nanopore, la fluidité de la surface et sur l'introduction d'élément de reconnaissance telle que la biotine. La capture d'analyte par la membrane lipidique grâce à la reconnaissance d'élément permet d'augmenter le temps de passage de la protéine. Cette fonctionnalisation grâce aux bicouches lipidiques fluides a également permis à des entités qui généralement obstruent les pores, tels que les β -amyloïdes, d'être détectées.²¹² Les fonctionnalisations grâce aux bicouches lipidiques fluides ont également été utilisées pour la fabrication de larges réseaux de pores avec des géométries contrôlées.²¹³

L'équipe de Martin a fabriqué des pores en polymères (PC et PET), recouvert d'or par « *electroless plating* » puis fonctionnalisés par auto-assemblages de PEG-thiolés. Cette stratégie permet d'éviter l'adsorption des protéines étudiées à l'entrée du pore.^{214,215}

5.7. Nanopore nucléaire biomimétique

Les pores nucléaires (« *Nuclear Pore Complex* » NPC) sont de grands complexes protéiques traversant l'enveloppe nucléaire. Les pores nucléaires permettent les échanges entre le noyau et le cytoplasme dans les deux sens (importation et exportation). Il existe deux types de transport dans les NPC.

Transport passif : ions, acides aminés, oses, protéines légères, etc. Les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 40 à 50 kDa peuvent passer dans le noyau en utilisant la même voie que les ions. Le transport actif peut se faire dans les deux sens grâce à des molécules d'importations. En effet, l'intérieur du pore est pratiquement entièrement obstrué par des fibrilles constituées de nucléoporines contenant des motifs répétés phénylalanine-glycine (FG), (*FG-Nups*). Par conséquent les molécules de taille supérieure à 44 kDa ne peuvent pas franchir cette barrière à moins qu'elles ne soient prises en charge par des protéines transporteurs appelées karyophérines (importines ou exportines).

Dans le but de mimer les NPC, Jovanovic-Talisman *et al.* ont greffés des *FG-Nups*, sur des nanopores en PC obtenus par la technique de la trace attaquée sur lesquels de l'or a été préalablement déposé. Cette membrane agit comme un filtre sélectif qui laisse passer les transporteurs qui se lient aux FG, et qui ne laissent pas passer les protéines.²¹⁶

Kowalczyk *et al.*²¹⁷ ont conçu un pore nucléaire biomimétique, qui est sélectif au transport de protéines individuelles.²¹⁸ Ce pore a été fabriqué en silanisant un nanopore en SiN avec une solution d'(3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) dans du méthanol. Il en résulte un nanopore fonctionnalisé avec des amines. Ces dernières réagissent ensuite avec du sulfo-SMCC, un agent réticulant qui contient à la fois un maleimide ($\text{H}_2\text{C}_2(\text{CO})_2\text{NH}$) et un NHS-ester (qui réagit avec les amines) de chaque côté, pour former un groupement maleimide réactif à la surface. Le pore est ensuite incubé avec les protéines nucléo-porines Nup98 et Nup193, qui sont immobilisées à la surface interne du pore. Le nanopore modifié présente un fort taux de sélectivité moléculaire en permettant le passage de protéines Impb et empêchant celui de protéines non-spécifiques tels que le sérum d'albumine bovin, un peu comme le pore nucléaire biologique.

Maintenant que les notions fondamentales ont été présentées, nous allons décrire les différents outils et méthodes que nous avons utilisés au cours de cette thèse.

Chapitre 2.

Partie expérimentale

Les méthodes de fabrication et la caractérisation des nanopores ont été brièvement décrites dans le chapitre précédant. Celles utilisées pour réaliser et caractériser des nanopores uniques seront développées dans ce chapitre. Nous allons décrire le matériel, puis les techniques de mesures électriques et enfin les méthodes de fabrication de nanopores uniques utilisés.

1. Matériel

1.1. Cellule de conductimétrie

Pour mesurer un courant ionique au travers d'une membrane isolante ou semi-conductrice contenant un nanopore unique, il faut s'assurer que les deux compartiments soient parfaitement isolés l'un de l'autre. Les cellules utilisées pour les nanopores fait dans des films en PET (Figure 19a), ont été conçues de façon à avoir un volume de travail, d'environ 1,8 mL. Elles ont été fabriquées en Téflon, pour ses propriétés diélectriques, limitant ainsi le bruit. Un joint torique est positionné d'un côté de la membrane pour obtenir une bonne étanchéité et éviter les fuites. De plus, le film polymère est protégé par du *Parafilm M*[®], dans lequel une ouverture de 0,5 cm de diamètre est percé au centre pour laisser accès au pore.

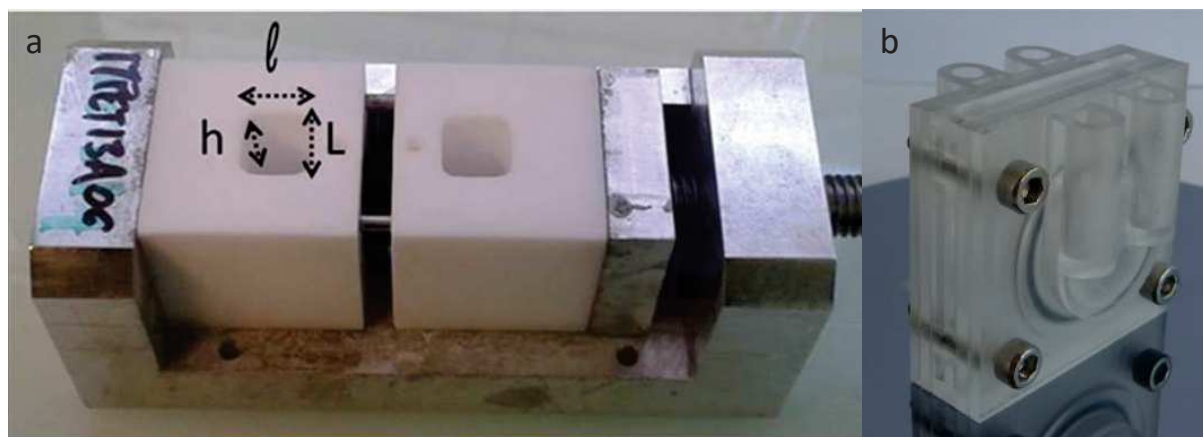


Figure 19 : a. Cellule utilisée pour les mesures de courant pour des films en PET, b. Cellule Tetraflow[™], utilisée pour les pores en SiN

Les cellules utilisées pour les pores en SiN, Tetraflow[™] (Figure 19b), ont été achetées chez Nanopore solution. Elles sont optimisées pour des supports de 3 mm de diamètre. La cellule possède un réservoir de chaque côté du nanopore. La cellule est conçue pour être fermement scellée autour de la membrane. Le nanopore, positionné au centre, est la seule connexion entre les deux demi- cellules. Les réservoirs de chaque côté peuvent être remplis à l'aide d'une micropipette et servent également d'accès aux électrodes. Le problème de ces cellules réside dans la difficulté de remplissage du pore. Un pré-remplissage à l'éthanol peut être utilisé, mais le risque de créer des fuites augmente. Une autre solution est la sonication pendant une minute, pour chasser les bulles, mais celle-ci peut casser la couche mince de SiN. Enfin un autre désavantage de cette cellule est qu'au cours des expérimentations, des bulles se créent, ce qui entraîne une diminution du courant, et ajoute des complications pour l'analyse et le traitement des résultats.

1.2. Amplificateur patch-clamp

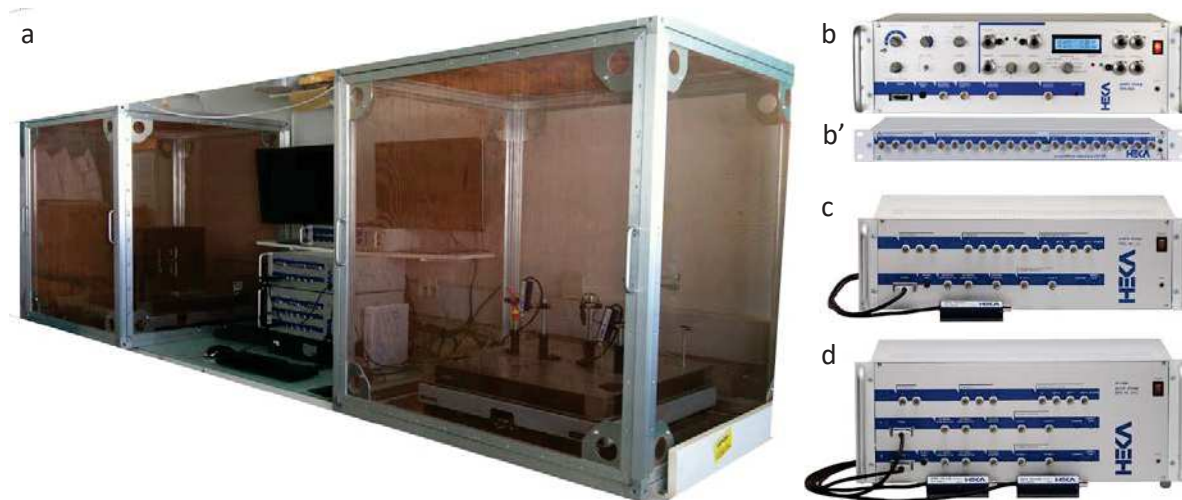


Figure 20 : a. Dispositif expérimental, amplificateur patch clamp, b. Amplificateur EPC 800, b'. Carte d'acquisition LIH 8+8, c. Amplificateur EPC 10, d. Amplificateur EPC 10 double

Les amplificateurs de « patch-clamp » (Figure 20) peuvent fonctionner en mode voltage ou courant imposé. Dans notre cas, nous avons travaillé en mode voltage imposé. Ce mode permet, en utilisant deux électrodes et un circuit de rétroaction, de maintenir le voltage constant et de mesurer le courant en fonction du temps. Les caractéristiques d'un amplificateur sont (i) la gamme de voltage imposée, (ii) le bruit interne, et (iii) la fréquence d'échantillonnage.

Trois amplificateurs ont été utilisés (Figure 20). Le premier amplificateur (EPC 800 HEKA) est interfacé à un ordinateur avec une carte d'acquisition séparée (LIH 8+8 de HEKA). Le deuxième amplificateur de patch-clamp utilisé est l'EPC 10 de HEKA et le troisième est l'EPC 10 double. Les caractéristiques principales des amplificateurs sont décrites dans la table ci-dessous (Table 1).

Table 1 : Caractéristiques des amplificateurs

	EPC 800	EPC 10	EPC 10 DOUBLE
Carte acquisition	Externe LIH 8+8	Intégrée	Intégrée
Fréquence maximale d'échantillonnage	200 kHz	200 kHz	200 kHz
Gamme de voltage appliquée	- 600 mV + 600 mV	- 5 V + 5V	- 5 V + 5V

Les différents éléments utilisés pour les mesures sont les suivants :

1. La **cellule de mesure** : elle est composée de demi-cellules reliées par le nanopore. Chaque compartiment de la cellule est rempli de façon symétrique d'une solution électrolytique
2. Les **électrodes** : elles sont plongées dans la cellule. Elles sont reliées à l'amplificateur. Elles sont en Ag/AgCl, 1 M KCl connectées à la solution électrolytique par un pont salin en agar-agar. Ces électrodes sont obtenues par l'immersion préalable pendant plusieurs heures de fils d'argent dans de l'eau de Javel. Une électrode est reliée au côté positif de l'amplificateur (compartiment *trans*), et l'autre électrode est reliée à la terre (compartiment *cis*).
3. Le tout est inséré dans une **cage de Faraday**. Cette dernière sert à éliminer les perturbations électriques extérieures, dont la majeure partie correspond au 50 Hz du secteur. La cellule est placée sur une **table anti-vibration**.
4. Les données sont enregistrées en utilisant le logiciel Patchmaster (HEKA elektronik). Les courants enregistrés sont analysés grâce à Fitmaster (HEKA elektronik).

2. Mesures électriques

2.1. Mesure courant-voltage (I-V)

Les courbes courant-voltage (I-V) sont réalisées en remplissant les deux compartiments avec la même solution électrolytique. Le voltage imposé est balayé entre -1 et 1 V. En étudiant les réponses du courant dans le temps pour des voltages appliqués positifs et négatifs, l'évolution des conductances du pore est obtenue. Ces mesures peuvent être effectuées de deux manières. La première est une mesure continue, où l'on enregistre le courant en faisant croître ou décroître le voltage au cours du temps. L'avantage de cette méthode est qu'elle est rapide, la gamme de voltage (-1 à 1 V) est généralement balayée pendant 30 secondes. Cette méthode permet également de déterminer rapidement les rectifications de courant et donc si le pore présente une asymétrie. Lorsque le courant est stable, chaque enregistrement est répété trois fois, pour obtenir une valeur moyenne la plus homogène possible. La conductance est facilement extraite en calculant la pente de cette courbe. La seconde technique consiste à enregistrer le courant en fonction du temps, en appliquant un potentiel constant. Le courant est ainsi enregistré pendant environ 20 secondes pour différents potentiels par pas choisis (10 à 200 mV). La conductance est extraite à partir de la moyenne de chaque courant en fonction des voltages appliqués. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'observer si le courant est stable pour un voltage donné. Toutefois les temps de mesures sont plus longs.

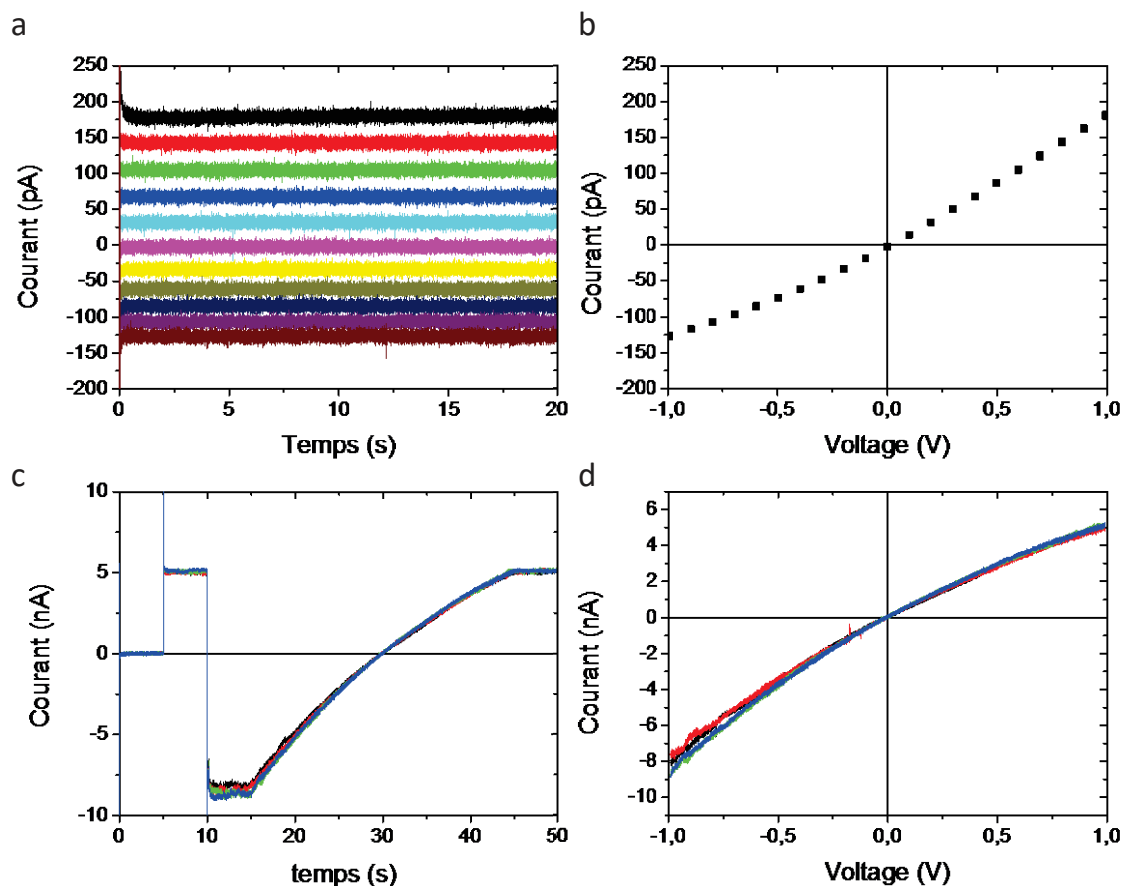


Figure 21 : a. Courant enregistré en fonction du temps à 500 mM de NaCl, pour des voltages de -1 à 1 V par pas de 200 mV, pour un pore de diamètre $22 \pm 0,4$ nm, de longueur 13 μm . b. Les valeurs de courant sont extraites à partir des valeurs moyennes de (a). c. Le courant est enregistré en fonction du temps, à 1 M KCl, pour un pore conique de $d_{\text{tip}} = 20,7 \pm 0,8$ nm, $D_{\text{base}} = 425$ nm. 0 V sont appliqués, puis 1 V, puis -1 V pendant 5 s pour chaque voltage. Ensuite un voltage croissant en fonction du temps est appliqué de -1 à 1 V pendant 30 s. et enfin 1 V est appliqué pendant 5 s, d. Représente le courant en fonction du potentiel pour le même pore

2.2. Pulsation résistive

La technique de pulsation résistive repose sur la modification de courant induite par une molécule lorsqu'elle traverse le nanopore. L'électrode de travail est placée du côté *trans* de la membrane, et l'électrode connectée à la masse du côté *cis*. Les molécules sont ajoutées du côté *cis*. Un voltage de valeur opposé à la charge globale de la molécule est appliqué du côté *trans*. Le courant ionique est enregistré à une fréquence désirée en fonction du temps de passage des molécules, qui sont généralement de l'ordre de la microseconde à la centaine de millisecondes. Les données sont analysées afin d'extraire le temps de passage (Δt) et la différence d'intensité de courant (ΔI). Le taux de capture (fréquence des évènements) est obtenu à partir du nombre d'évènements par seconde au cours de l'expérience.

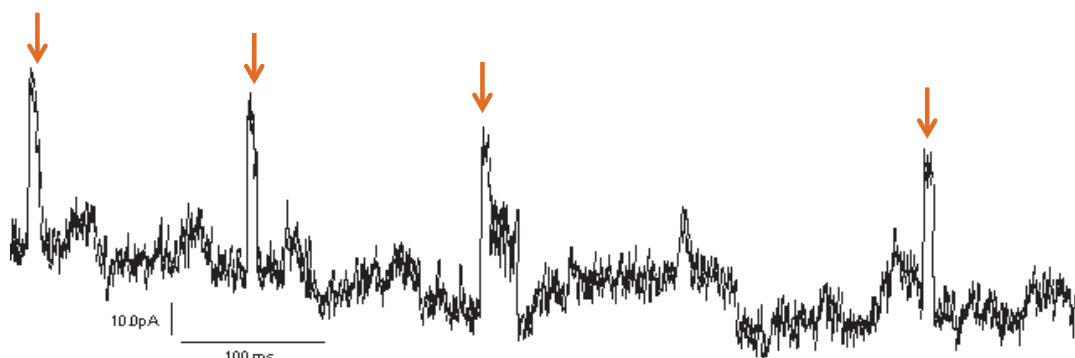


Figure 22 : Exemple d'une trace de courant en fonction du temps lors du passage de polynucléotides (polyC) à travers un nanopore natif, sous 1 V, à 150 mM NaCl, pH 8

3. Fabrication de nanopores uniques

3.1. Nanopores obtenus par la méthode de traces attaquées

Pour fabriquer des nanopores adaptés à la détection de bio-macromolécules, nous avons principalement utilisé la méthode de la trace attaquée dans des films en Poly(Ethylène Téréphtalate) (PET). (Figure 23)

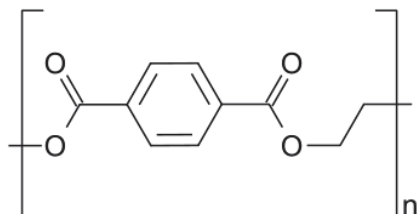


Figure 23 : Formule développée du polyéthylène téréphtalate

Ces films d'épaisseur 13 (ES301130), ou 6 microns (ES301061), et d'orientation bi-axiale, ont été acheté chez *Goodfellow*. L'avantage de ces films est qu'ils sont robustes et flexibles. Une fois que les nanopores sont obtenus, les films sont réutilisables pendant plusieurs semaines s'ils sont conservés à l'abri des poussières, dans un bain d'eau ultra pure.

Le processus de fabrication se déroule en deux étapes :

1. L'irradiation par un ion lourd
2. L'attaque chimique par une solution alcaline

3.1.1. Obtention des traces latentes, irradiation aux ions lourds

Les traces latentes dans les films de PET sont effectuées au Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL) à Caen. Les ions (^{86}Kr ou ^{132}Xe dans notre cas) sont accélérés dans l'accélérateur linéaire SPIRAL2 (Système de Production d'Ions RADioactifs en Ligne de 2^{ème} génération). La ligne SME (Sortie Moyenne Energie) a été utilisée. Un faisceau d'ions de faible fluence et d'énergie élevée (plusieurs MeV uma^{-1}) est utilisé pour irradier les films polymères. L'ion lourd incident produit des ionisations et des excitations électriques. Dans les polymères, ceci conduit à la destruction de liaisons covalentes. Il est possible de choisir entre une irradiation avec un ion unique, pour obtenir un pore unique, ou bien une irradiation avec plusieurs ions, pour obtenir une membrane multipore.

Pour obtenir un pore unique, l'étape d'irradiation nécessite un faisceau d'ions lourds de très faible fluence. Le faisceau d'ions lourds est tout d'abord balayé, grâce à un champ magnétique intense et oscillant. Il est également défocalisé par des lentilles magnétiques. Un diaphragme permet de réduire le flux d'ions à moins d'un ion par seconde. Cette méthode a été brevetée par R. Spohr²¹⁹ en 1983. (Figure 24)

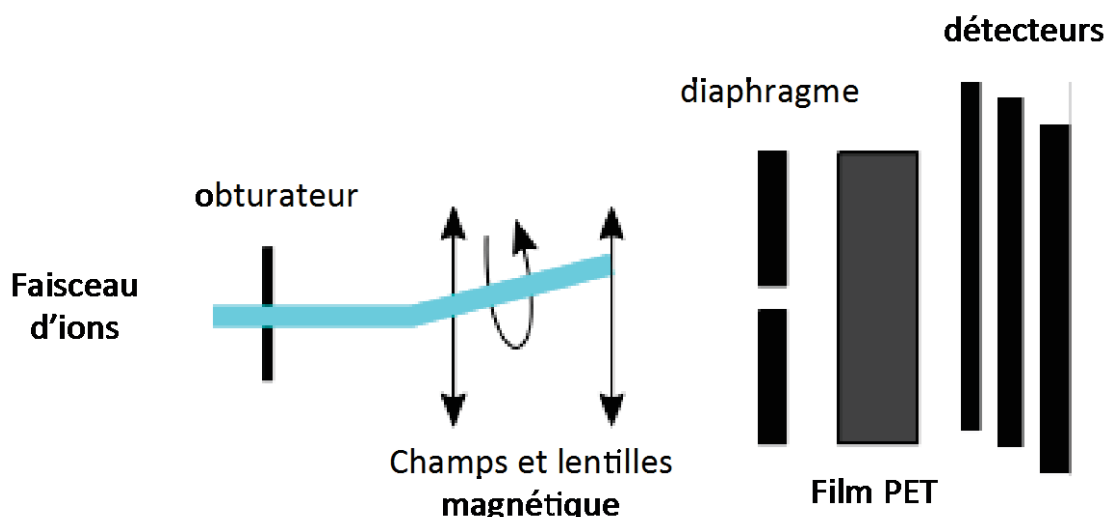


Figure 24 : Méthodes pour produire une trace latente unique à partir d'un seul ion

Trois détecteurs sont placés en aval du film polymère. Ils permettent de détecter chaque passage d'ion, chacun est relié à un compteur. Lorsqu'au moins un détecteur compte un ion, l'obturateur est actionné pour arrêter le faisceau. Grâce à ces trois détecteurs nous pouvons évaluer la qualité de nos traces. Lorsque les trois détectent l'ion, le pore est noté « +++ ». Nous obtenons un taux d'ouverture proche de 100 % pour ces pores. Si seulement deux détecteurs fonctionnent, le pore est noté « ++ », et le taux d'ouverture est d'environ 90 %, et pour un seul des détecteurs le taux est d'environ 70 %.

Les échantillons réalisés au GANIL, sont obtenus avec un faisceau d'ions Xénon d'une énergie de 9,5 MeV uma^{-1} . Des empilements de 3 films de 13 μm d'épaisseur et 2 films de 6 μm ont été irradiés. En effet, les énergies utilisées permettent d'irradier une telle épaisseur de film polymère. Les pertes d'énergie nucléaire sont négligeables, tant que l'ion n'est pas stoppé dans le film.²²⁰

Des films polymères ont été irradiés avec la même énergie, avec une fluence de 6×10^6 traces cm^{-2} pour effectuer des caractérisations telles que de l'imagerie, qui sont impossibles à réaliser sur un nanopore unique. Cette possibilité de choisir entre un film avec des pores uniques ou multiples est un avantage majeur de la technique de trace attaquée, puisqu'ils sont obtenus dans les mêmes conditions (mêmes films, énergie et nature des ions,...). Une fois les traces obtenues, les films sont stockés à l'abri de la lumière et scellés.

3.1.2. Révélation des traces par attaque chimique

L'irradiation et l'attaque sont les deux étapes de synthèse des nanopores, mais seule l'étape de l'attaque en détermine la géométrie. La révélation des traces permet de transformer par voie chimique la trace faite par l'ion lourd, en un pore. Le film possédant une ou plusieurs traces latentes est placé dans une solution alcaline qui peut être chauffée. L'attaque peut être symétrique, ou asymétrique si une solution de neutralisation acide est placée d'un côté du film.

Pour fabriquer des nanopores, les traces sont activées en plaçant les films de PET sous lumière ultraviolette (Fisher bioblock; VL215.MC, $\lambda = 312$ nm) pendant 24 heures par face. Il a été montré que l'exposition à l'UV permet d'augmenter la vitesse de l'attaque.⁵⁷

3.1.2.1. Nanopores cylindriques

Une attaque symétrique de la trace, permet d'obtenir un nanopore cylindrique. Pour ce faire, les films sont plongés dans une solution de soude (NaOH) de concentration 3 mol L^{-1} chauffée entre 35 et 60°C pendant quelques minutes.

Un nanopore unique permet théoriquement de réaliser des expériences de détection et de translocation. Avant cela, il est nécessaire de caractériser son diamètre et sa géométrie. Il est difficile d'observer précisément un nanopore du fait même de sa très petite taille. Toutefois, la principale difficulté d'observation d'un pore unique, reste sa localisation. En effet, l'irradiation permet d'obtenir une trace latente unique par placement d'un diaphragme devant le film polymère, mais la précision sur l'endroit exact est de l'ordre du millimètre carré. Les nanopores uniques sont caractérisés par conductimétrie, en émettant deux hypothèses : une géométrie parfaitement cylindrique et un transport ionique « *bulk* » dans le nanopore, la résistance d'accès est négligeable. La conductance mesurée est attribuée uniquement à la conductance des ions dans le nanopore. Les courbes intensité-voltage sont réalisées pour des concentrations en NaCl de 10 à 750 mM. Un voltage est imposé entre les électrodes, une fois que le courant est stable, les traces de courants sont enregistrées en fonction du temps en appliquant un voltage de -1 à 1 V par intervalle de 200 mV. Chaque mesure est répétée trois fois. Les données sont enregistrées à 2 kHz. Une moyenne du courant est déterminée pour chaque voltage. Ces courants moyens sont ensuite tracés en fonctions des voltages, la pente de la courbe permettant de déterminer la conductance du pore (G). Nous faisons de même avec des solutions électrolytiques de différentes concentrations en sel, permettant ainsi de faire varier la conductivité (Table 2). La conductance du pore suit une relation linéaire avec la conductivité, et la longueur du pore étant connue, nous pouvons calculer son diamètre. (cf chapitre 1 et équations 1.10 à 1.14). Un exemple est donné (Figure 25).

Table 2 : Conductivités des solutions électrolytiques de NaCl en fonction de leurs concentrations, utilisées pour la caractérisation des pores cylindriques

Concentration NaCl (M)	κ_b (S m ⁻¹)
5	17,43
4	16,2
3	13,9
2	10,51
1,5	8,46
1	6,24
0,75	4,85
0,5	2,96
0,25	1,29

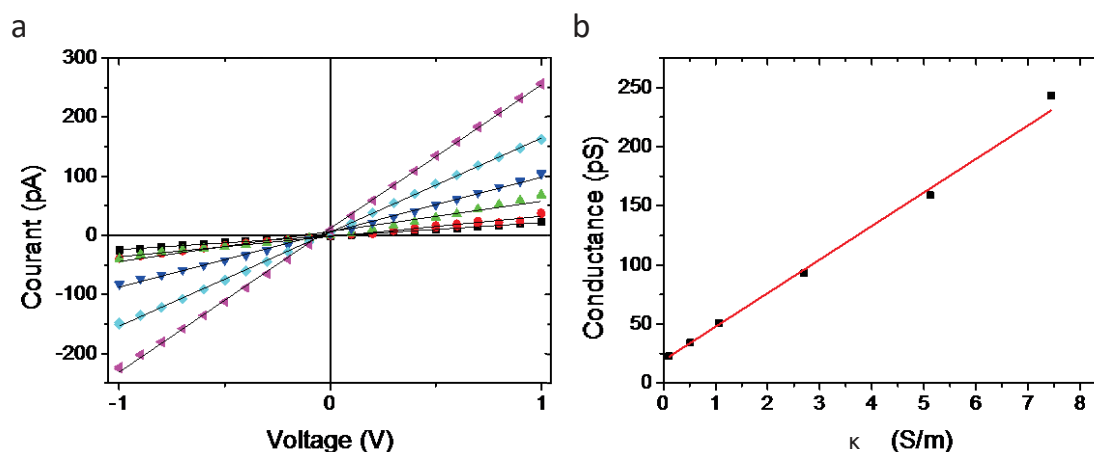


Figure 25 : Caractérisation du diamètre d'un nanopore unique par conductimétrie. a. Courant moyen en fonction du voltage moyen, pour différentes concentrations (noir : 10 mM, rouge : 50 mM, vert : 100 mM, bleu : 250 mM, cyan : 500 mM, rose : 750 mM). Les lignes noires correspondent à l'ajustement linéaire. b. Conductance du nanopore en fonction de la conductivité de la solution. La régression linéaire donne une valeur qui permet de calculer le diamètre du nanopore. La valeur obtenue pour le diamètre est $22 \pm 0,1$ nm

Le diamètre du pore augmente avec le temps et la température pour une concentration en soude donnée. Afin d'évaluer ces paramètres, des nanopores uniques de longueur de 13 μm ont été étudiés, le diamètre moyen a été reporté en fonction du temps d'attaque, pour une température de 45°C, et une concentration NaOH de 3 M (Figure 26).

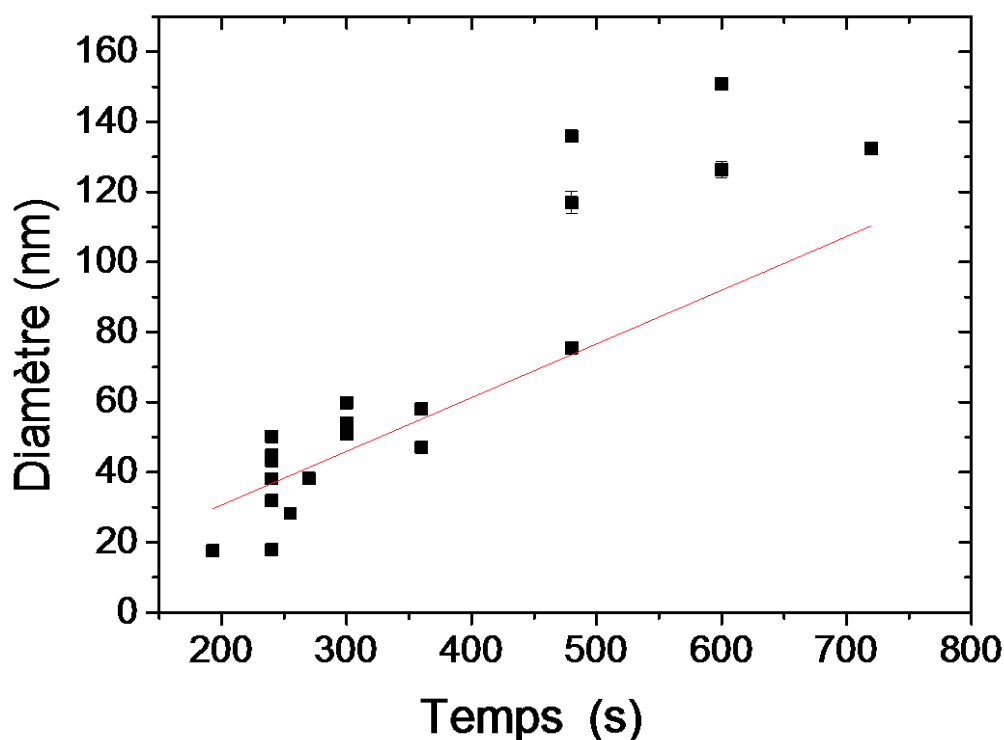


Figure 26 : Diamètres de nanopores uniques déterminés par conductimétrie en fonction du temps d'attaque à 45°C. La vitesse est estimée à $v = 9,18 \pm 0,75 \text{ nm. min}^{-1}$

L'évolution du diamètre peut être approximée par une relation linéaire (éq 2.1)

$$v = \frac{dD}{dt} = 9,18 \pm 0,75 \text{ nm. min}^{-1} \quad (\text{éq 2. 1})$$

avec v la vitesse d'attaque, dD le diamètre moyen et dt le temps moyen.

Cette valeur est correcte pour les 10 premières minutes d'attaque. Ensuite v diminue légèrement, car au fur et à mesure que le diamètre augmente, l'attaque se fait de plus en plus loin des dommages causés par la trace. La vitesse v dépend ainsi légèrement de la distance à la trace et n'est donc pas constante dans tout le volume. Dans la suite, elle sera tout de même considérée comme constante, la plupart des attaques durant moins de 10 minutes. Il faut noter également que le diamètre du pore augmente avec la température du bain de soude pour un temps donné.

3.1.2.2. Nanopore conique

Les pores coniques sont plus adaptés pour l'étude de la translocation de macromolécules, car il est possible d'obtenir des diamètres inférieurs à 20 nm, contrairement aux pores symétriques. Les nanopores uniques coniques ont été obtenus par une attaque chimique, qui est réalisée dans des conditions asymétriques. Le film est placé dans une cellule contenant d'un côté du film la solution d'attaque (NaOH, 9 M) et de l'autre, une solution neutralisante (CH₃COOH, 1 M et KCl, 1 M).

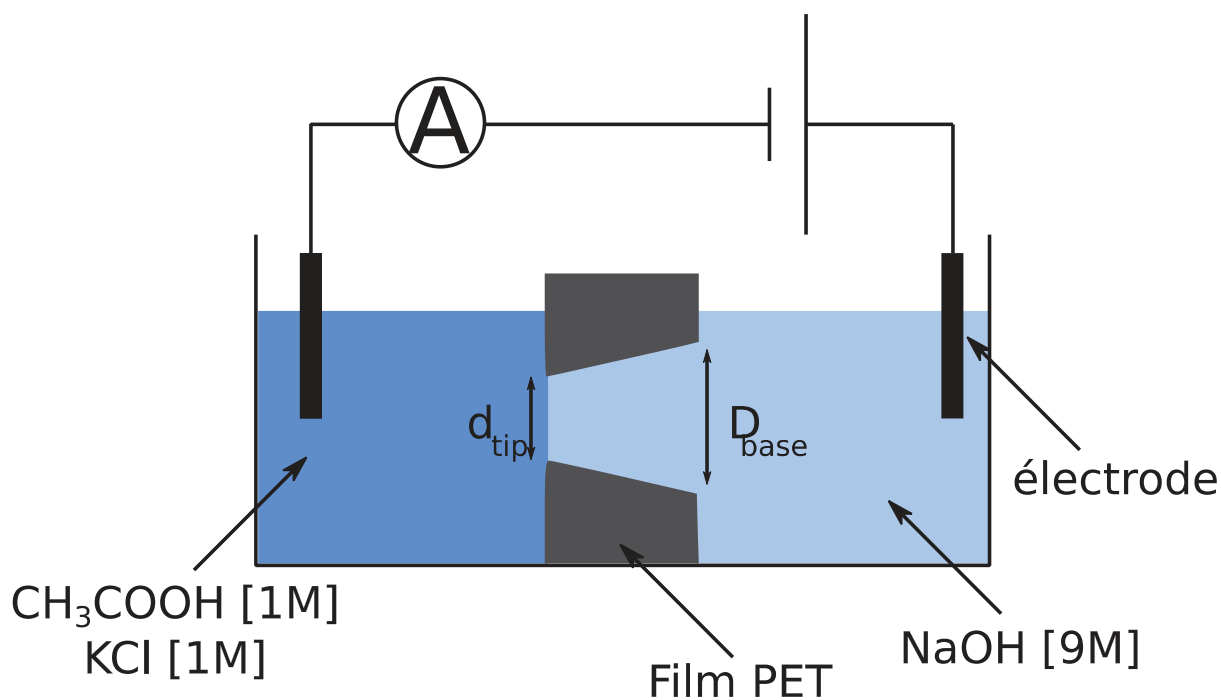


Figure 27 : Schéma de fabrication d'un nanopore unique conique

Un voltage constant (1 V) est appliqué entre les deux compartiments de la cellule de conductimétrie, grâce à des électrodes en Pt. L'intensité du courant électrique est suivie au cours de l'attaque chimique par amplificateur Keithley (35617 EBS). Dans un premier temps, même si les solutions d'attaque et de neutralisation sont conductrices, le film polymère est isolant et aucun courant électrique mesurable n'est observé. Lorsque le pore est ouvert, et que les solutions des deux compartiments entrent en contact, les ions qu'elles contiennent sont libres de passer à travers le pore, et un courant électrique est observé. Immédiatement, l'acide acétique neutralise les ions OH^- , responsables de l'attaque, et crée une compétition avec la réaction pour agrandir le pore. L'attaque se poursuit et le diamètre du pore augmente. Le courant électrique augmente alors avec le temps. Une attaque asymétrique donne une forme générale conique au pore, qui est directement liée au rapport entre les vitesses d'attaque dans la trace et dans le volume, c'est-à-dire dans le polymère non irradié. Ensuite, lorsque le courant atteint une valeur correspondant à une taille de pore souhaitée, l'attaque est stoppée en rinçant les compartiments avec la solution de neutralisation puis de l'eau pure.

Comme dans le cas précédent, la caractérisation du diamètre du nanopore ne peut se faire que par une observation directe au MEB. Il est néanmoins possible d'obtenir la valeur du petit diamètre par conductimétrie, si celle du grand rayon est connue (éq. 2.2) :

$$2R = \alpha t \quad (\text{éq. 2. 2})$$

où R est le grand rayon du pore (nm), α le facteur obtenu par MEB, et t , le temps de l'attaque (min).

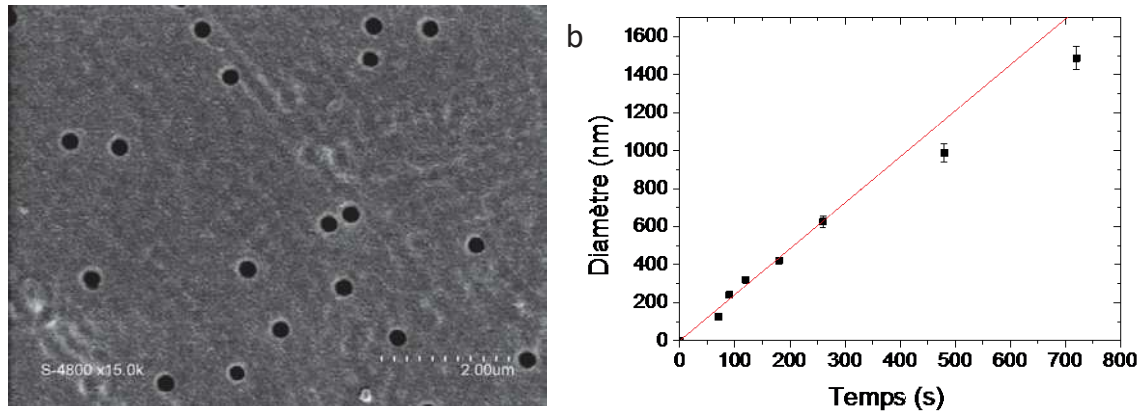


Figure 28 : Diamètre du nanopore déterminé par MEB en fonction du temps d'attaque de membranes à haute densité de pores (6×10^6 pores cm^{-2}). a. Image MEB après une attaque de 2h, $d = 319 \pm 6$ nm. b. Le coefficient directeur de la droite vaut 2,5

Le facteur α de l'équation (éq. 2.2) est donné dans la littérature à 2,13,⁵⁸ ce dernier dépendant de la nature du film polymère, de l'énergie et de la nature des ions. Nous avons réévalué la valeur de α . Pour ce faire, plusieurs membranes multi-pores (6×10^6 traces cm^{-2}) ont été attaquées, en condition asymétrique avec des temps différents. Les diamètres ont été mesurés par MEB (Figure 28a). Nous observons que les diamètres des pores augmentent de façon linéaire avec le temps d'attaque. Pour des temps inférieurs à 300 min, le coefficient α obtenu est de 2,5 (Figure 28b). Il a ensuite été utilisé pour calculer le grand diamètre des nanopores uniques en fonction du temps d'attaque.

Il est ensuite possible de déterminer le petit rayon r grâce à l'équation (éq. 2.3), en faisant l'hypothèse d'un pore parfaitement conique :

$$G = \frac{\pi r R}{L} \kappa_b + G_r \quad (\text{éq. 2. 3})$$

où G est la conductance électrique du pore (S), κ_b est la conductivité molaire de la solution ionique « bulk » (S.m^{-1}), peut se calculer d'après les tables, $\kappa_{KCl(1M)} = 11.2 \text{ S.m}^{-1}$. r est le rayon de la petite extrémité du pore (m), R celui de la grande extrémité (m), L , l'épaisseur du film (m) et G_r est la conductance résiduelle qui est de zéro si l'on admet une conductivité purement « bulk ».

Désormais, tous les paramètres de l'équation sont connus. La conductimétrie permet de déterminer le rayon de la petite ouverture du nanopore, grâce à l'observation préalable de la grande ouverture par microscopie, et en faisant l'hypothèse d'une géométrie conique parfaite. Les interactions des ions de la solution avec la paroi du pore ont également été négligées (composantes $G_r = 0$).

3.2. Fabrication de nanopores en SiN

Des membranes en nitrure de silicium (SiN), d'épaisseur 30 nm, déposée sur des grilles de TEM, possédant une fenêtre de 50 x 50 μm ont été achetée chez Nycu. Les nanopores sont percés en utilisant un faisceau d'électron d'un Microscope à Transmission Electronique (TEM) JEOL 2010F au Laboratoire des Solides Irradiés (LSI, Palaiseau). En fonction du temps d'exposition et de la taille de la sonde à électron (définie par l'angle de convergence), des nanopores de 2 à 20 nm peuvent être obtenus.

4. Modification et fonctionnalisation

4.1. Dépôt de couches atomiques (ALD)

Pour ajuster le diamètre des nanopores, et modifier leurs propriétés de surface, la technique de dépôt de couches atomiques (ALD) a été utilisée. (Figure 29)

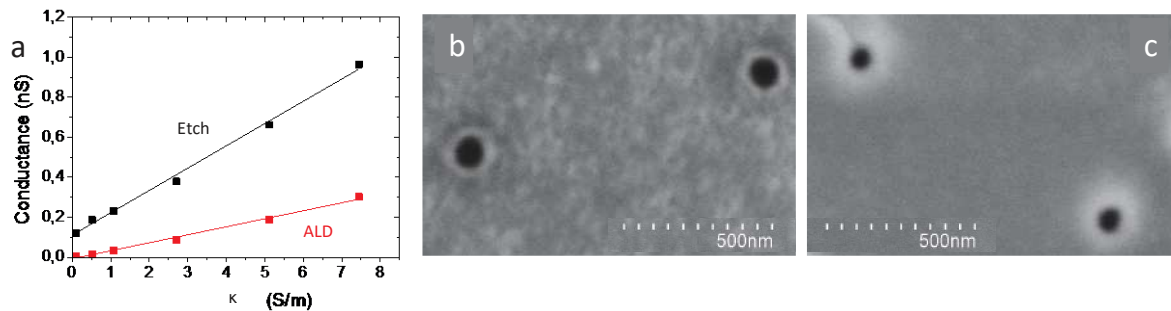


Figure 29 : a. Conductance en fonction de la conductivité, pour un pore avant et après sa réduction par ALD. Image du pore b. Avant, et c. Après dépôts de couches atomiques

L'ALD est une technique de dépôt en phase vapeur de films minces. L'introduction de chaque précurseur est séparée par une phase de purge. Elle permet le dépôt en théorie, d'une mono-couche atomique permettant de contrôler son épaisseur à l'échelle de l'angström. Le principe de dépôt est le suivant :

- Dépôt de couches d' Al_2O_3 . Tout d'abord une impulsion de 0,2 s de triméthylaluminium est envoyée dans la chambre, le nanopore est ensuite exposé pendant 40 s au précurseur, ensuite une purge de 60 s est réalisée pour enlever l'excès de précurseur et les sous-produits de la réaction. Ensuite de l'eau est envoyée dans la chambre pour une exposition de 30 s suivi d'une purge de 60 s.
- Dépôt de bicouches d' $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$. La première couche déposée est celle d' Al_2O_3 . La méthode est la même que précédemment décrite. Ensuite pour le dépôt de ZnO, une impulsion de 0,2 s de diéthylzinc suivi d'une exposition pendant 40 s au précurseur, puis d'une purge de 60 s est réalisée. Les temps pour l'eau sont les mêmes que dans le cas de la couche d' Al_2O_3 .

Les dépôts sont effectués à 60°C pour les films en PET, et à 100°C pour les SiN. La dernière couche de ZnO permet la fonctionnalisation des OH libres, en phase gazeuse. Une exposition à

l'hexamethyldisilazane (HMDS) en phase vapeur permet le greffage de fonctions triméthylsilane (TMS, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) qui rend la surface hydrophobe. Une exposition au (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (104884)) permet d'obtenir des groupements amines. (Figure 30)

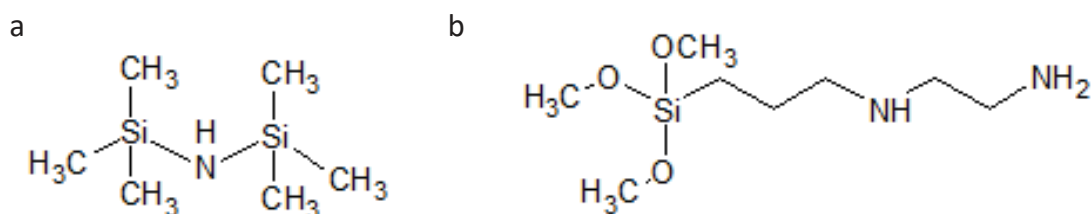


Figure 30 : a. Hexamethyldisilazane, b. (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine

Des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles (« *Small-angle X-ray scattering* » SAXS) ont été réalisées sur des films de PET de 13 μm afin de déterminer l'épaisseur des couches déposées. Un premier natif, un deuxième recouvert de 4 couches d' Al_2O_3 suivi de 4 couches de ZnO , alternées 20 fois, un troisième 5 couches d' Al_2O_3 suivi de 5 couches de ZnO , alternées 20 fois, et un dernier recouvert de 6 couches d' Al_2O_3 suivi de 6 couches de ZnO , alternées 20 fois. (Figure 31)

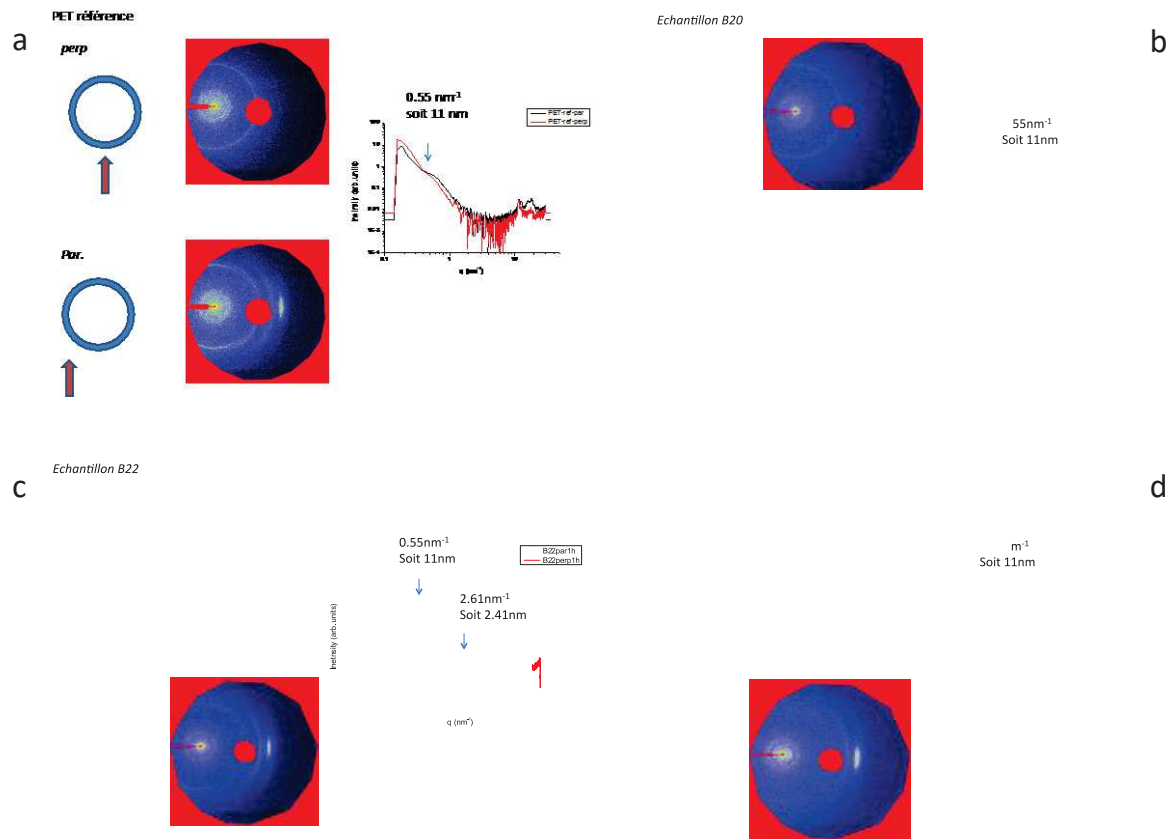


Figure 31 : Analyse par SAXS de membranes multipores a. Echantillon de PET, b. Echantillon de PET recouvert de bicouche 4x4, c'est-à-dire 4 couches d' Al_2O_3 suivi de 4 couches de ZnO, alternées 20 fois. c. Echantillon de PET recouvert de bicouche 5x5, c'est-à-dire 5 couches d' Al_2O_3 suivi de 5 couches de ZnO, alternées 20 fois. d. Echantillon de PET recouvert de bicouche 6x6, c'est-à-dire 6 couches d' Al_2O_3 suivi de 6 couches de ZnO, alternées 20 fois

Pour les trois échantillons, il y a un signal aux petits angles associé à une distance caractéristique de 11 nm. Il est associé à la membrane puisqu'il apparaît dans la membrane PET de référence. La distance caractéristique obtenue pour le dépôt dALD de 4 couches d' Al_2O_3 suivi de 4 couches de ZnO est de 1,9 nm, celle pour les 5 couches d' Al_2O_3 suivi de 5 couches de ZnO est de 2,4 nm et 6 couches d' Al_2O_3 suivi de 6 couches de ZnO est de 3,0 nm. Ces observations sont en accord avec les valeurs obtenues précédemment.⁴⁵

Le dépôt de couches successives d' Al_2O_3 et de ZnO (Figure 32) a été choisi car il présente de meilleures propriétés mécaniques qu'un dépôt d'une seule de ces espèces.^{45,69} Ceci est dû à une transition de phase, de nanocristallin à amorphe lorsque les couches sont de plus en plus fines.¹³⁵ Pour ce faire, trois échantillons ont été préparés sur des substrats de Si, un premier sur lequel ont été déposés 20 couches

de d'Al₂O₃ (2 Å/cycle), le deuxième 20 couches de ZnO (2,1 Å/cycle), et le troisième, 2 répétitions de 5 cycles Al₂O₃/ 5 cycles ZnO. Les mesures par AFM montrent que le fait d'alterner les couches rend la surface moins rugueuse que lorsqu'il n'y a qu'un seul composé. (Table 3)

Table 3 : Mesures de rugosité obtenues par AFM

Film mince	Rugosité (nm)
20 cycles de ZnO	0,34
20 cycles d'Al ₂ O ₃	0,32
2 répétitions de 5 cycles Al ₂ O ₃ / 5 cycles ZnO	0,25



Figure 32 : Images MEB de multi-couches de Al₂O₃ / ZnO, coupe en tranche. L'épaisseur de deux répétitions de cinq cycles Al₂O₃ et cinq cycles ZnO est de 24,8 nm

Chapitre 3.

Nanopore fonctionnalisé stimuli-répondant

Les nanopores uniques artificiels peuvent permettre de mimer les processus de transport ionique des canaux ioniques pour le développement de nano-machines bio-inspirées en vue d'applications telles que les biocapteurs, la filtration moléculaire ou les dispositifs nanofluidiques. Un des enjeux principaux est de développer des nanopores avec plusieurs fonctions tout comme les organismes vivants. En s'inspirant de ce système naturellement asymétrique, nous allons introduire dans ce chapitre des systèmes nanopores asymétriques biomimétiques répondant à plusieurs stimuli, le pH et un ligand.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de trois publications : (Annexe 1)

- Lepoitevin, M., G. Nguyen, et al. (2015). "Combining a sensor and a pH-gated nanopore based on an avidin-biotin system." *Chemical Communications* 51(27): 5994-5997.
- Lepoitevin, M., M. Bechelany, et al. (2016). "Non-Fluorescence label protein sensing with track-etched nanopore decorated by avidin/biotin system." *Electrochimica Acta* 211: 611-618.
- Lepoitevin, M., B. Jamilloux, et al. (2016). "Fast and reversible functionalization of a single nanopore based on layer-by-layer polyelectrolyte self-assembly for tuning current rectification and designing sensors." *Rsc Advances* 6(38): 32228-32233.

1. Fonctionnalisation irréversible

Des nanopores en PET (Poly-Éthylène-Téréphtalate), ont été fabriqués par la méthode de la trace latente. Le but est ici de les fonctionnaliser afin de permettre la détection de biomolécules, en utilisant un système (strept)avidine/biotine. Le complexe avidine-biotine (ou streptavidine-biotine) est une des plus fortes interactions non-covalentes ($K_d = 10^{-15}$ M) entre une protéine et un ligand.²²¹ La première étape est le greffage des biotines, nous avons utilisés deux approches qui consistent à fonctionnaliser le nanopore:

1. **directement après son ouverture.** Cette méthode permet une fonctionnalisation spécifique de la surface du nanopore
2. après avoir réduit son diamètre par **dépôt de couche atomique** (« *Atomic Layer Deposition* » ALD) et greffés des **groupements amines** sur sa surface. Cette méthode permet une fonctionnalisation homogène de la surface interne et externe du nanopore

1.1. Fonctionnalisation de la surface interne du pore

Après l'attaque chimique, la surface interne du nanopore en poly-(éthylène téréphtalate) (PET) est couverte de groupements carboxylates (Figure 33a).⁵⁷ Ces derniers sont utilisés pour fonctionnaliser uniquement la paroi interne du pore. Ils permettent d'effectuer un greffage chimique grâce à des carbodiimides. Nous avons fonctionnalisé des nanopores uniques cylindriques, d'environ 20 nm de diamètre et 13 μ m de long. Pour ce faire, des biotines, soit O-(2-Aminoethyl)-O'-[2-(biotinylamino)ethyl]octaethylene glycol noté **biotine-NH₂** (n = 8), soit Poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether biotine (Mn 5,300), noté **biotine-PEG-NH₂**, sont utilisées pour effectuer une synthèse monotope grâce à (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) (EDC) (Figure 33).

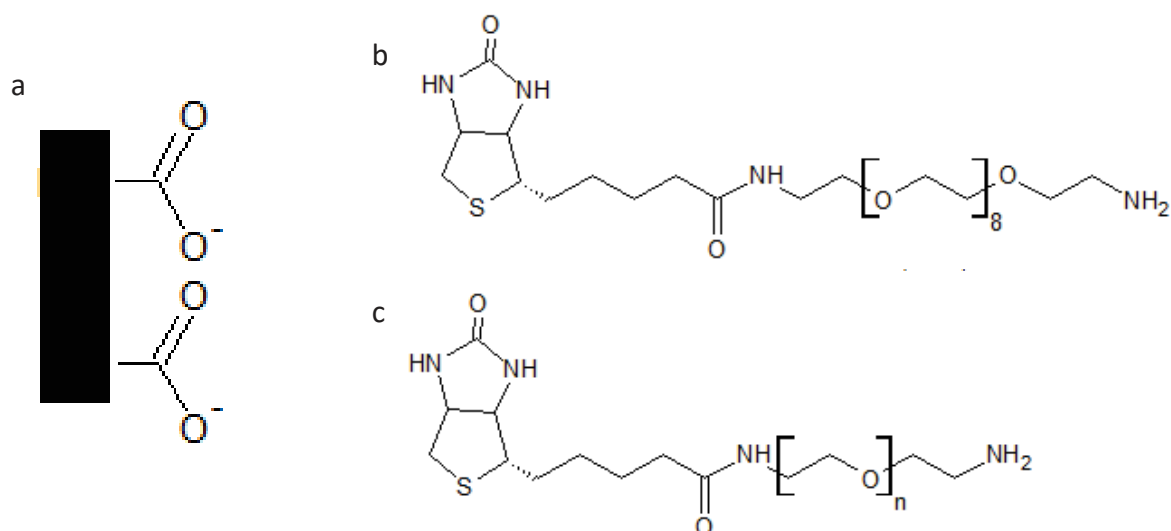


Figure 33: a. Schéma de la paroi interne d'un nanopore à trace attaquée, en milieu neutre ou basique. b. et c. Réactifs utilisés pour greffer des biotines sur la surface interne du nanopore. b. O-(2-Aminoethyl)-O' - [2-(biotinylamino)ethyl]octaethylene glycol noté biotine- NH2 (n = 8), c. Poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether biotine (Mn 5,300), noté biotine-PEG-NH2

Le schéma de la réaction de couplage grâce à l'EDC est présenté dans le chapitre 1 (Figure 14). Pour notre première étape de fonctionnalisation, des biotine-PEG-NH₂ ou biotine-NH₂ sont greffées grâce à l'EDC. Ensuite une solution d'avidine à 50 µg mL⁻¹ est ajoutée du côté *cis* du nanopore pendant 30 minutes en appliquant - 100 mV (ou 100 mV) du côté *trans* (Figure 34).

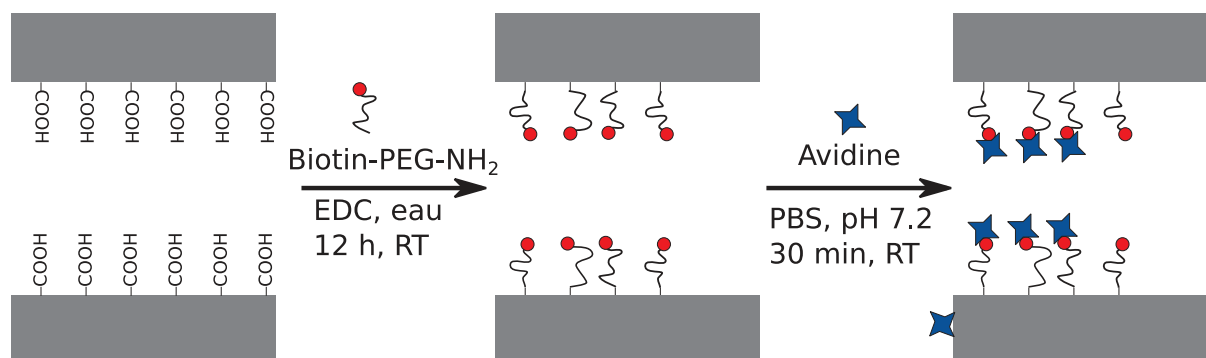


Figure 34: Schéma de la fonctionnalisation directement après l'ouverture du pore (les groupements carboxyles ne sont plus représentés lors des étapes de fonctionnalisation pour simplifier le schéma)

Après chaque étape de la fonctionnalisation, (après ouverture du pore, après le greffage de l'avidine) les courbes intensité-voltage (I-V) sont enregistrées pour différentes concentrations en NaCl de 10 à 750 mM (Figure 35).

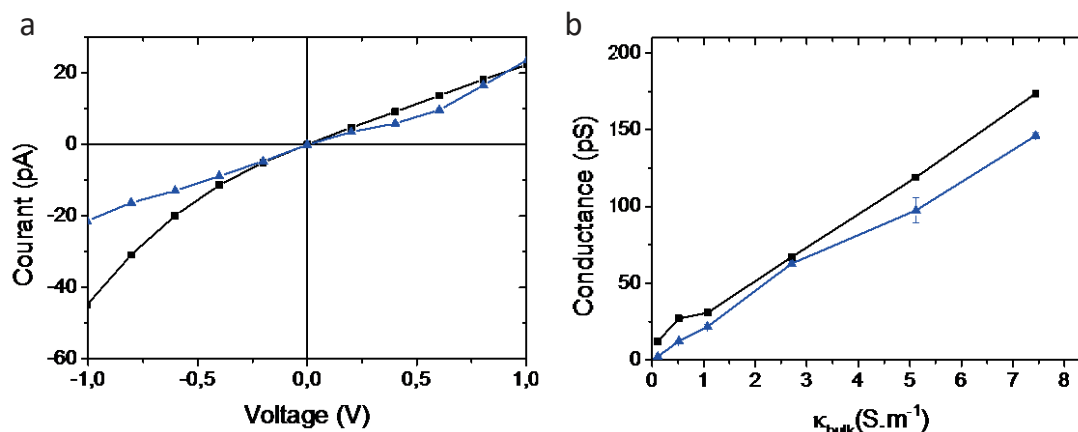


Figure 35 : a. Exemples de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl, pH 7), b. Dépendance conductance/ conductivité en sel pour un nanopore cylindrique à chaque étape. Directement après l'attaque chimique (carrés noirs), après la fonctionnalisation PEG-biotine-avidine (triangles bleus)

Après insertion d'avidine, une diminution de la conductance en fonction de la conductivité est observée, elle est due à la réduction du diamètre. Comme décrit dans la partie théorique, la conductance du pore suit une relation linéaire avec la conductivité, connaissant la longueur du pore, nous pouvons calculer son diamètre. Nous avons ainsi déterminé que le diamètre du nanopore diminue de 19 (pore natif) à 17 nm après l'insertion. Cette valeur de 2 nm ne correspond pas au diamètre hydrodynamique de l'avidine, mais peut être expliquée par la localisation de l'avidine, qui est proche de l'entrée du pore et non tout le long du pore. Ainsi le transport ionique ne peut pas être décrit simplement par l'équation phénoménologique (eq 1.13) après l'addition d'avidine.

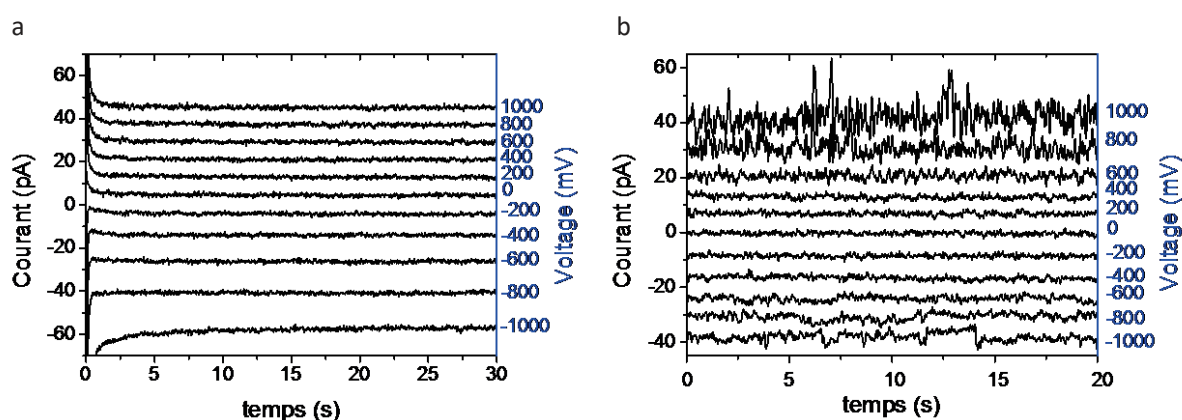


Figure 36: Trace de courant d'un pore cylindrique, 18 nm de diamètre et de longueur 13 µm, a. Après l'attaque chimique, b. Après la fonctionnalisation PEG-avidine

Nous avons observé après l'insertion d'avidine, que le courant oscille pour de forts potentiels (> 800 mV) indépendamment du sel utilisé (KCl ou NaCl) (Figure 36). Une des explications possible, en dehors de phénomènes tels que des équilibres gaz-vapeur,^{100,222} le phénomène de mouillage-démouillage,⁴⁴ ou encore la mobilité de chaînes polymères due à l'attaque chimique (« *dangling ends* »),²²³ serait

l'adsorption non-spécifique des protéines. En effet, il est bien connu que les protéines s'adsorbent non spécifiquement aux interfaces liquides solides.^{224,225} Deux populations d'avidine seraient présentes sur la surface du nanopore, une première liée aux biotines et une seconde, adsorbée sur la surface du PET. Ainsi, après le rinçage cette deuxième population peut être relarguée en solution et traverser le pore. Ceci peut ainsi expliquer pourquoi ces oscillations sont observées uniquement lorsqu'un potentiel positif est appliqué du côté *trans*. Cependant il est à noter que la charge de l'avidine est positive à pH 7,2 (IEP : 11). Une autre hypothèse serait que l'avidine s'adsorbe et se désorbe à l'entrée du pore, de façon très rapide bouchant ainsi une partie du pore, mais elles ne traversent pas ce dernier, ce qui entrainerait les oscillations de courant observées.

Grâce à cette première approche, nous avons montré qu'il est possible de fonctionnaliser la surface interne du pore en une seule étape pour former des carboxyl-amines possédant une biotine terminale. Grâce à cette dernière nous avons greffé de l'avidine, et pu la détecter grâce au suivi par conductimétrie. Cependant de nombreux points peuvent être améliorés. Tout d'abord nous avons observé des oscillations de courant, probablement dues à une adsorption non-spécifique de l'avidine à la surface du nanopore. Ensuite la prédiction du diamètre du pore est difficile après l'attaque chimique, en effet si expérimentalement nous désirons fabriquer un nanopore ayant le diamètre désiré, plusieurs pores uniques doivent être produits et caractérisés. Ainsi cette approche est difficilement implementable.

1.2. Fonctionnalisation de la surface externe et interne du pore

Pour tenter de résoudre les problèmes liés à la reproductibilité de la taille du pore et à l'adsorption non-spécifique des protéines, nous avons modifié des nanopores uniques par dépôt de couche atomique (ALD), car cette méthode permet de couvrir de manière identique et homogène l'intérieur et l'extérieur du nanopore⁶⁹ (Figure 37).

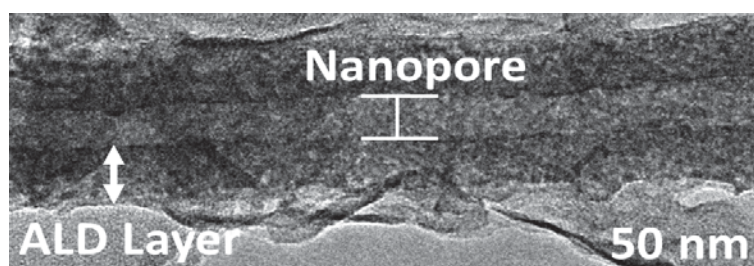


Figure 37: Image TEM d'un nanopore unique (10 nm de diamètre et 6 μm de longueur) montrant les couches déposées par ALD. L'image TEM a été obtenue sur une membrane multipore en PET (diamètre moyen des nanopores 70 nm) après 12 séquences de 5 cycles d' Al_2O_3 /5 cycles ZnO déposé par ALD et suivies par l'élimination de la membrane PET⁹⁸

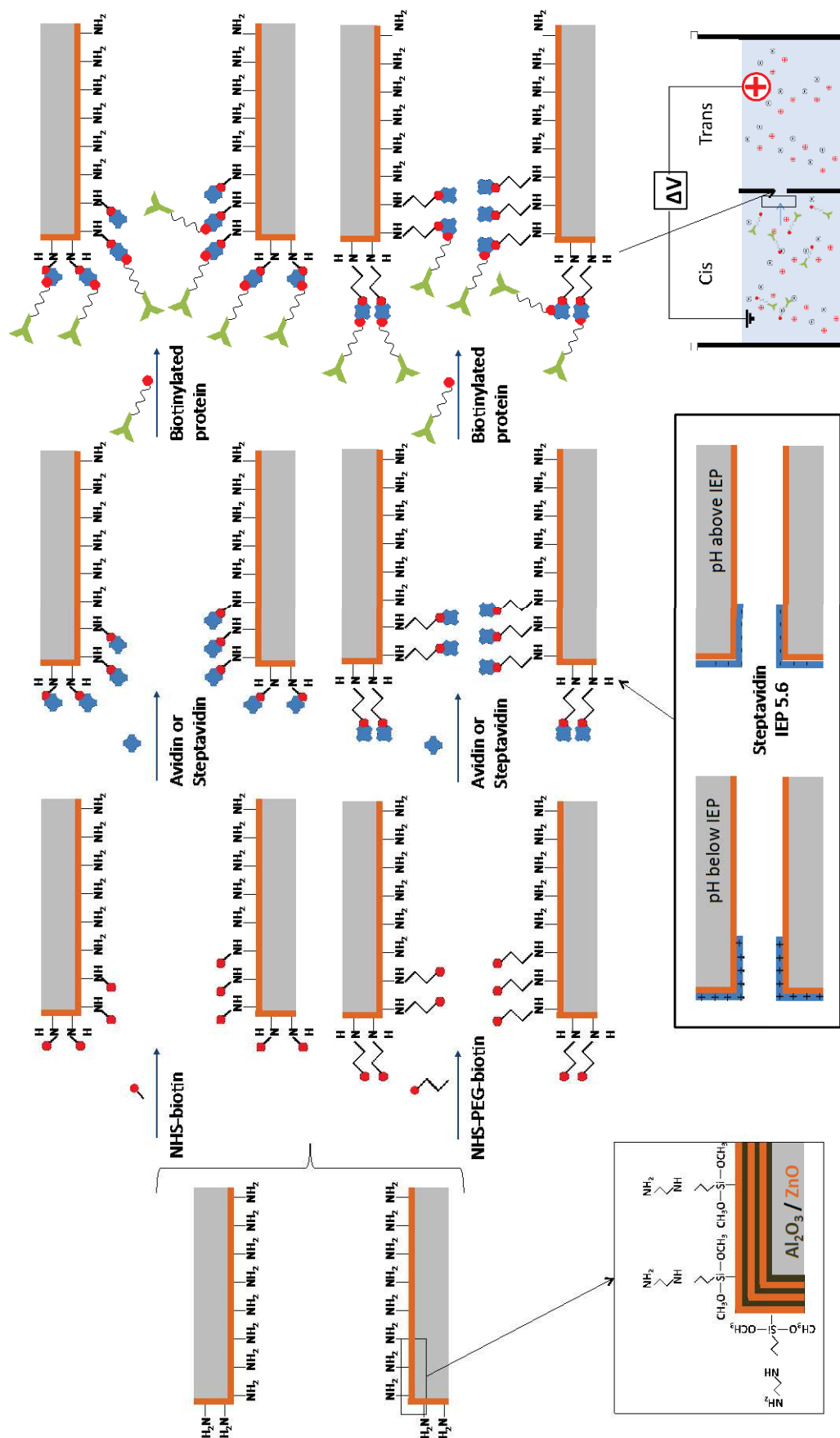


Figure 38: Schéma de la fonctionnalisation après modification du pore par dépôt de couche atomique

Cinq pores uniques cylindriques de haut rapport d'aspect de 40 à 60 nm de diamètre (longueur = 13 μm) ont été fabriqués. Les pores ont été réduits à 22 ± 4 nm de diamètre par ALD. C'est la dernière couche, de ZnO qui permet la fonctionnalisation des OH libres, en phase gazeuse, par des groupements amines (*N*-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine). L'étape suivante consiste à attacher les -biotines aux terminaisons amines. La biotinylation du nanopore est réalisée en utilisant deux réactifs différents, l'un court biotinamidohexanoyl-6-aminohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide (noté – biotine-NHS) et l'autre plus long Poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane (noté biotine-PEG-NHS) contenant une chaîne PEG (Mn 3800). Le schéma du principe de fonctionnalisation est détaillé en (Figure 38).

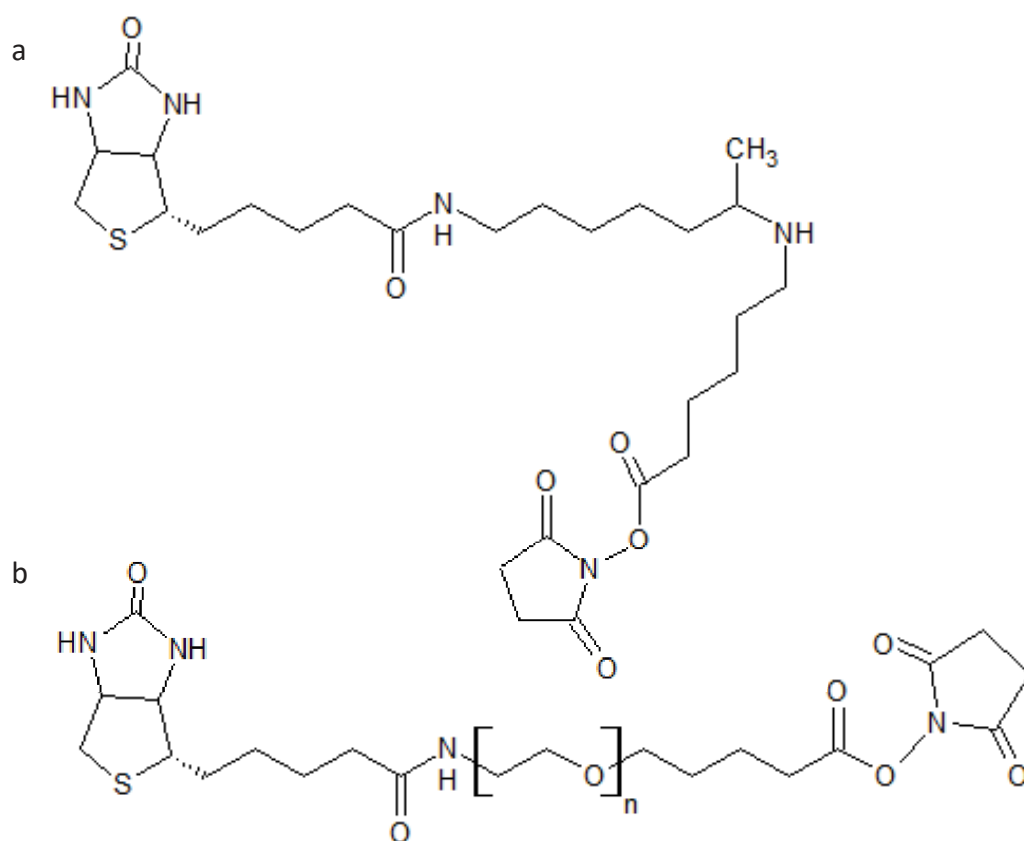


Figure 39: a. Biotinamidohexanoyl-6-aminohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide (-biotine-NHS), b. Poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane (Mn 3800) (-biotine-PEG-NHS)

Après chaque étape, l'attaque chimique, le dépôt, et le greffage de biotines, puis des protéines, les diamètres des nanopores sont déterminés (Table 4) par conductimétrie pour des solutions en NaCl de concentrations 10 à 750 mM (Figure 40).

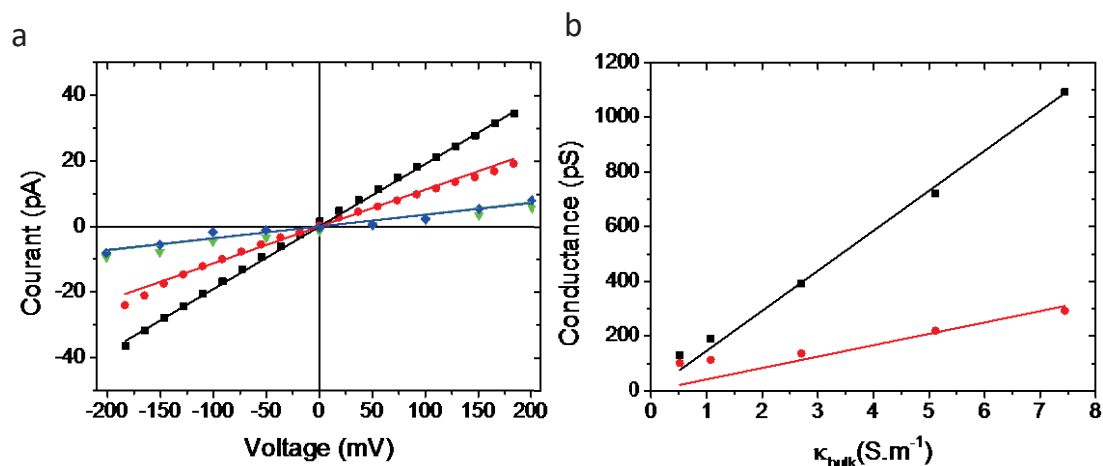


Figure 40: a. Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl, pH 7) d'un nanopore ($d = 22$ nm) à chaque étape, directement après l'attaque chimique (carrés noirs), après l'ALD (ronds rouges), après le greffage de PEG-steptavidine (triangles inversés bleus), et après l'addition de PEG- γ -globuline (triangle vert). b. Dépendance conductance/ conductivité en sel pour un pore cylindrique, directement après l'attaque chimique (carrés noirs), après l'ALD (ronds rouges).

Table 4 : Caractéristiques de fabrication et de fonctionnalisation des nanopores étudiés.

pore	Temps attaque 55°C NaOH [3M] (s)	# couches Al ₂ O ₃ / ZnO	Taille après ALD (nm)	Biotine	1ère protéine	2ème protéine	Anti-corps
NP ₂₄ Biot	304	15	24	Biotine	Strept Avidine	IgG	
NP ₂₂ Biot	324	15	22	Biotine	Strept Avidine	BSA	
NP ₁₈ Biot	300	9	18	Biotine	Avidine	BSA	Anti-BSA
NP ₂₂ PEG _{Biot}	251	7	22	PEG-Biotine	Strept Avidine	IgG	
NP ₂₆ PEG _{Biot}	244	5	26	PEG-Biotine	Avidine	BSA	Anti-BSA

Les - biotines créent une faible diminution du courant. Quand le nanopore est modifié par des - PEG - biotines, une rectification de courant est observée. Cette rectification est habituellement décrite pour les pores coniques. Elle provient d'une asymétrie, soit de taille (différents diamètres), et/ou de charge. Ici le greffage, a été effectué de façon asymétrique, les - biotines et les - PEG - biotines ont été insérées seulement du côté *cis* du film, pendant 1 h. Donc, elles ne sont pas greffées sur toute la longueur du pore.²²⁶

1.2.1. Fonctionnalisation par avidine ou streptavidine

Dans le but d'étudier la détection de protéines capturées nous avons utilisé les propriétés d'interaction de la biotine avec l'avidine ou la streptavidine. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'addition d'avidine (ou de streptavidine) sur les réponses I-V à différents pHs.

Une solution de streptavidine (ou d'avidine) est ajoutée du côté *cis*. Dans le cas présent les parois externes et internes (au moins à l'entrée) du nanopore sont recouvertes de PEG-biotine ou -biotines, rendant ainsi peu probable une adsorption non-spécifique de la protéine à l'entrée du pore. Après cette étape les courbes I-V sont enregistrées à 100 mM NaCl, en faisant varier le pH de 4 à 10. Tout d'abord il est important de noter que l'on n'observe pas de perturbations lorsque l'on enregistre le courant en fonction du temps quelque soit le voltage appliqué. Ceci confirme notre interprétation concernant la première approche et l'adsorption non-spécifique des protéines.

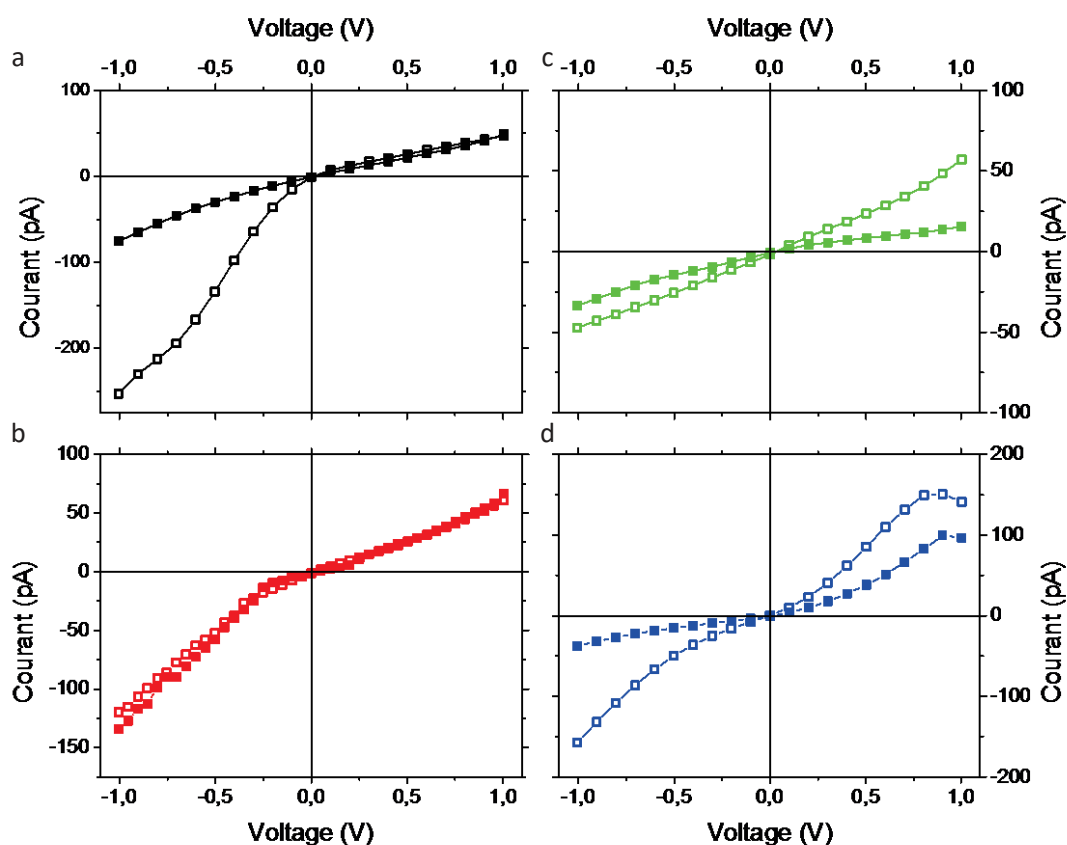


Figure 41: Courbes I-V, après le greffage des chaînes terminées par des biotines (carrés ouverts), et après greffage des protéines (carrés pleins). a. Noir : NP₂₆PEG_{Biot} pore de 26 nm de diamètre avec des chaînes -PEG-biotine et de l'avidine. b. Rouge : NP₂₂PEG_{Biot} pore de 22 nm de diamètre avec des chaînes -PEG-biotine et de la streptavidine. c. Vert : NP₁₈Biot pore de 18 nm de diamètre avec des chaînes -biotine et de

l'avidine. d. Bleu : NP_{22Biot} pore de 24 nm de diamètre avec des chaînes -biotine et des streptavidines. Toutes les expériences sont effectuées à 100 mM de NaCl.

Les réponses I-V montrent une diminution du courant après avoir inséré les protéines sur à la fois les – PEG-biotine ou les –biotines. Ceci prouve que l'attache des protéines à bien eu lieu. Le facteur de rectification du courant (Rf) est défini en chapitre 1 (eq 1.18).

Pour les longues chaînes (-PEG –biotines) le facteur de rectification est inférieur à 1, avant et après l'insertion d'avidine (ou streptavidine), et est indépendant du pH entre 6 et 10. Ceci semble montrer que la charge de la protéine n'a pas d'influence sur le courant de rectification. Dans le cas des –biotines, la charge influence le facteur de rectification. En effet après la capture des protéines, Rf est pour les différents pHs, supérieur à 1 pour la streptavidine et inférieur à 1 pour l'avidine. Le facteur de rectification, pour à la fois l'avidine et la streptavidine, tend vers 1 pour un pH supérieur à 9. Si l'on regarde de plus près nos conditions expérimentales, seulement l'entrée du nanopore a été fonctionnalisée avec des –biotines. Après la capture des protéines, la charge du nanopore est différente à son entrée (liée aux protéines) de la paroi interne (groupements amines). Donc le courant de rectification dépendrait de la charge des protéines mais aussi des groupements amines ($pK_a \approx 10,6$), pour des pH supérieurs à 9.

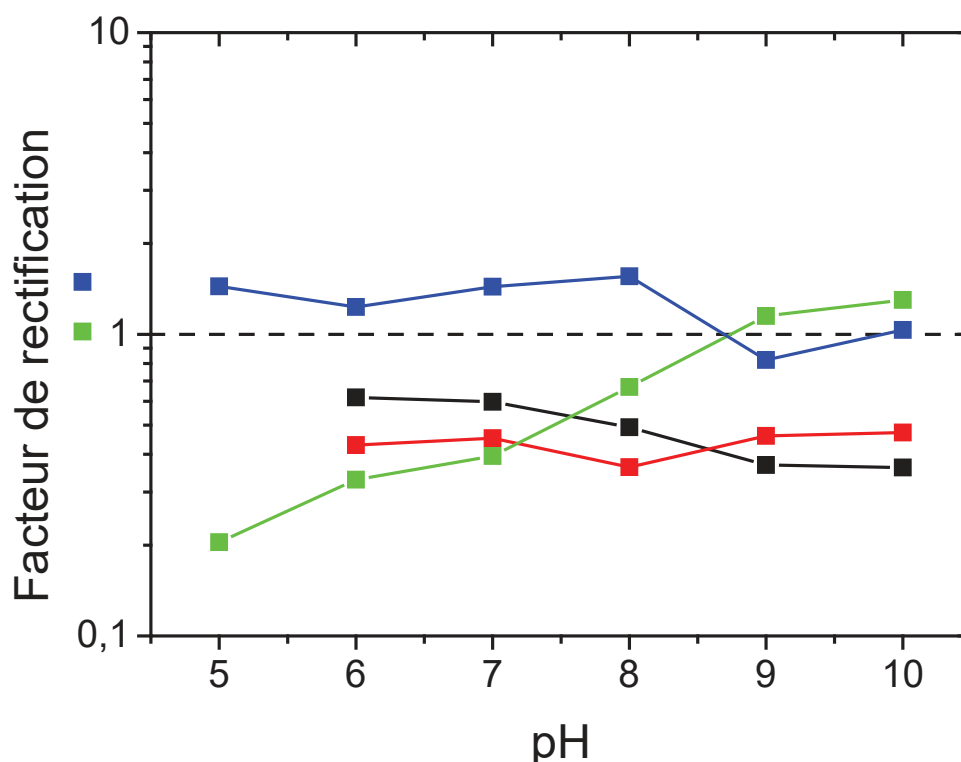


Figure 42: Facteur de rectification en fonction du pH. Noir : NP₂₆PEG_{Biot} pore de 26 nm de diamètre avec des chaînes -PEG-biotine et de l'avidine. Rouge : NP₂₂PEG_{Biot} pore de 22 nm de diamètre avec des chaînes -PEG-biotine et de la streptavidine. Vert : NP₁₈Biot pore de 18 nm de diamètre avec des chaînes -biotine et de l'avidine. Bleu : NP₂₂Biot pore de 24 nm de diamètre avec des chaînes -biotine et des streptavidines. Toutes

les expériences sont effectuées à 100 mM de NaCl. Les résultats à des pHs inférieurs à 6 ne sont pas montrés pour les longues chaînes comme il a été montré qu'il y a un phénomène d'agrégation²¹⁰

A ce stade, nos résultats montrent qu'il est possible de discriminer la capture de l'avidine de celle de la streptavidine en utilisant une liaison courte, car le courant dépend de la charge de la protéine.

1.2.2. Pore pH-dépendant et importance de la longueur de la chaîne greffée

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'influence du pH sur les propriétés de rectification du courant et de conductivité du nanopore NP₂₂PEG_{Biot} après greffage de streptavidine.

Cette dernière a un point isoélectrique proche de 5, et donc pour un pH supérieur à 6, possède une charge globale négative.

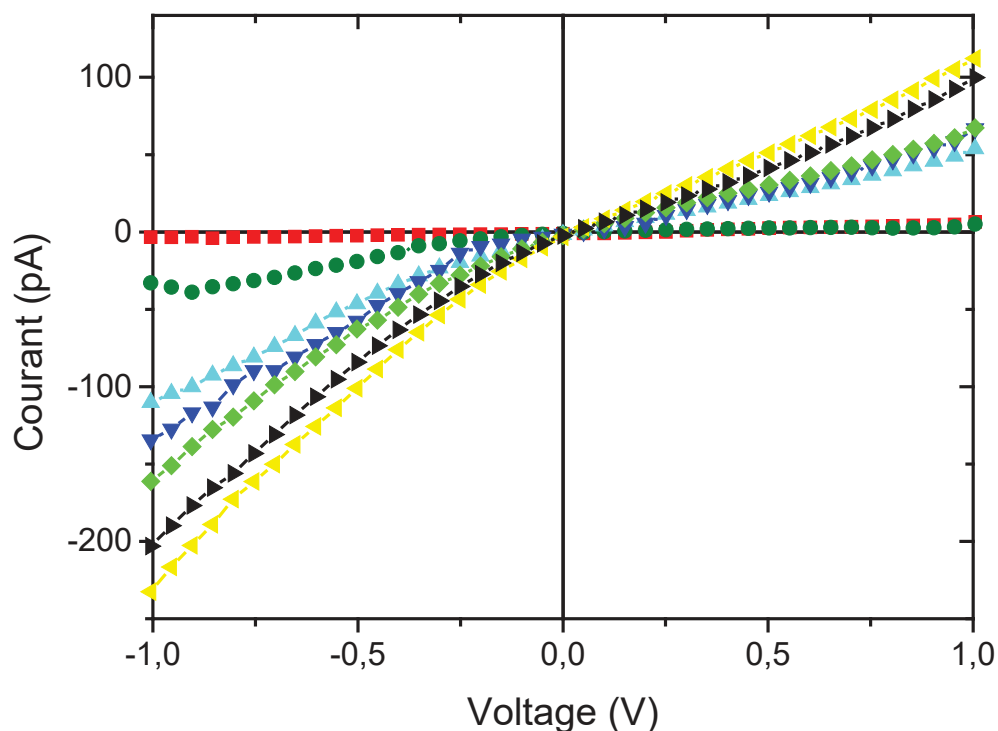


Figure 43: Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl) d'un nanopore après le greffage de PEG-Biotine-Streptavidine à différents pHs. pH 10 (noir), pH 9 (jaune), pH 8 (vert), pH 7 (bleu), pH 6 (cyan), pH 5 (olive), pH 4 (rouge).

L'étude des réponses I-V en fonction du pH montre que pour des pHs supérieurs à 5, il y a une légère rectification du courant comme pour les nanopores coniques, ceci est due à la fonctionnalisation asymétrique du nanopore. (Figure 43) La localisation des protéines du côté *cis*, induit donc une différence de charge sur la paroi interne du nanopore. Ceci entraîne un flux d'ions asymétriques.²²⁷ Quand un potentiel négatif est appliqué du côté *trans*, la streptavidine est repoussée hors du nanopore, et

inversement quand un potentiel positif est appliqué. De plus, cette rectification de courant peut être expliquée par la localisation des streptavidines (à l'intérieur ou à l'extérieur du pore, en fonction du potentiel appliqué et de la charge globale de la protéine) ce qui peut réduire le diamètre du pore du côté *cis*. Il est intéressant de noter qu'à des pHs inférieurs à 6 le courant diminue drastiquement. A pH 4, quelque soit le voltage appliqué, le courant enregistré est proche de zéro. Nos expériences montrent que cette fermeture est parfaitement réversible puisque, dès lors que l'on augmente le pH, le pore se rouvre, et les valeurs de courant sont retrouvées.

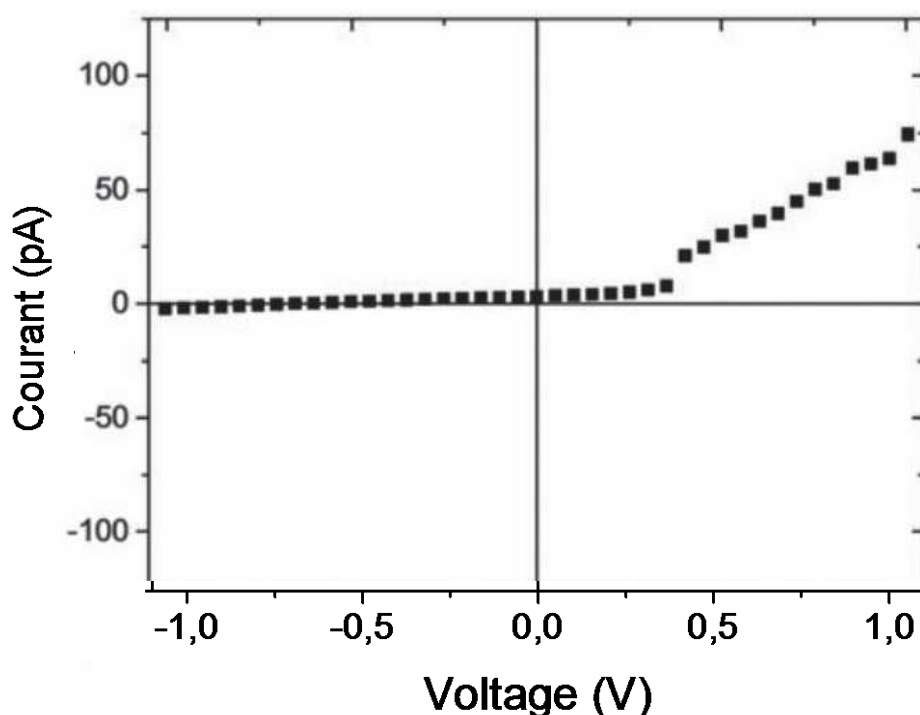


Figure 44: Réponse en pH d'un nanopore modifié par ALD, après le greffage de PEG-Biotine-Streptavidine. Courbe I-V pour un gradient de pH (pH 4 du côté *cis* et pH 8 du côté *trans*)

Afin de confirmer la réversibilité, un gradient de pH est appliqué (pH 4 du côté *cis* et pH 8 du côté *trans*), le courant est proche de zéro pour un potentiel inférieur à 400 mV, et augmente au-delà (Figure 44). Ceci confirme donc bien la dépendance au pH, et la réversibilité de cette ouverture/fermeture. Cette fermeture à pH inférieur à 6 ne peut pas être due à un effet stérique de la protéine. En effet, si tel était le cas, une inversion de la rectification du courant devrait être observée en fonction de la charge globale de la protéine.

Donc cette fermeture du pore serait due aux chaînes PEG. Pour le vérifier, un nanopore semblable à NP₂₂PEG_{Biot} a été fonctionnalisé avec une chaîne biotinylée plus courte (biotine-NHS) avant l'insertion de la streptavidine (NP₂₂Biot). Les courbes I-V ne présentent pas de blocage du courant à pH 4, (Figure

45) ce qui tend à prouver que la fermeture du pore est bien liée à l'interaction entre les longues chaînes PEG et la streptavidine(Figure 45).

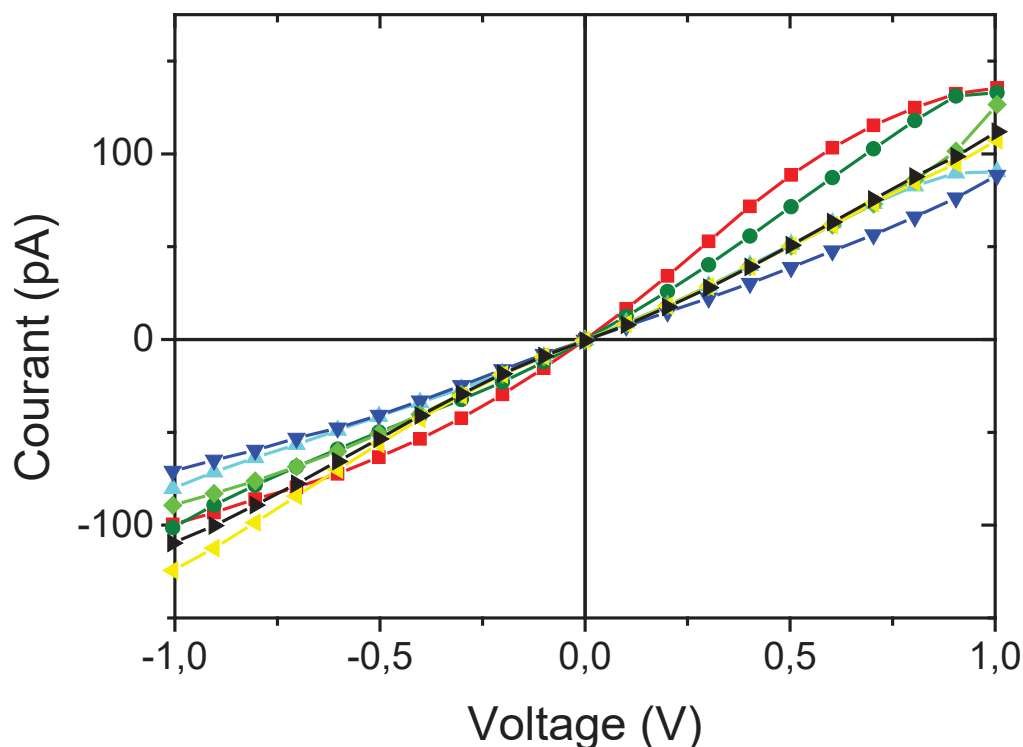


Figure 45: Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl) d'un nanopore ($d = 26$ nm) après le greffage de Biotine-Streptavidine à différents pHs : pH 10 (noir), pH 9 (jaune), pH 8 (vert), pH 7 (bleu), pH 6 (cyan), pH 5 (olive), pH 4 (rouge)

Il a été démontré que le pH joue un rôle important dans les interactions PEG/protéines. En effet à faible pH des phénomènes d'agrégation et de précipitations des protéines avec les PEG sont observés.^{228,229} Le pH joue également un rôle dans le gonflement de couches de PEG.^{230,231} Cependant lorsque le nanopore est fonctionnalisé seulement avec les PEG-biotine, le phénomène de fermeture n'est pas observé à bas pH. Donc, la fermeture du pore est bien liée aux interactions PEG-protéines, probablement une agrégation réversible. Ainsi dans le cas du gradient de pH, quand un potentiel négatif est appliqué, les protons entrent préférentiellement le nanopore et créent l'agrégation des PEG-biotine-streptavidine, provoquant la fermeture du pore. Inversement, quand un potentiel positif est appliqué, les ions hydroxydes pénètrent le pore et provoquent la désagrégation des PEG-biotine –streptavidine et la réouverture du pore. (Figure 46)

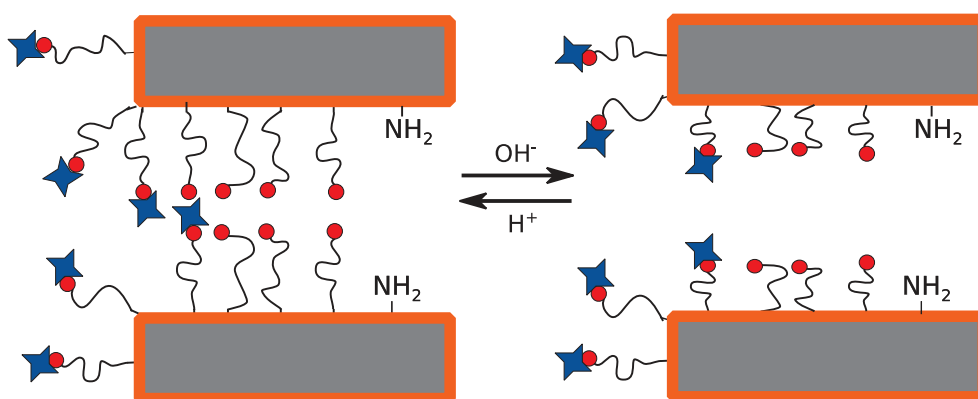


Figure 46 : Schéma représentant l'agrégation/désagrégation des protéines sous l'influence du pH

1.2.3. Détection de protéines biotinylées et d'anticorps

Ici, nous nous intéressons au potentiel du pore pour détecter une protéine biotinylée, en utilisant comme protéines modèles, la BSA et l'IgG. Pour ce faire, les protéines sont marquées avec un - PEG-biotine. 1 mL de protéines (1 mg mL^{-1}) dans du PBS ($0,01 \text{ M}$ phosphate buffer, $0,0027 \text{ M}$ potassium chloride et $0,137 \text{ M}$ sodium chloride, pH 7,4, à 25°C) est ajouté à du Poly(ethylene glycol) (N-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane pour un ratio molaire de 1:1 et est ensuite incubé pendant 0,5 h à 20°C . Ensuite les - PEG-biotines n'ayant pas réagi sont séparés par centrifugation (16000 g , 1 min) en utilisant un filtre (Biospin P6). L'ajout de biotine-PEG- γ globuline et - biotine-PEG-BSA se fait du côté *cis* du pore.

Tout d'abord nous nous intéressons à l'ajout de biotine-PEG- γ globuline sur des pores -PEG-biotine-streptavidine, $\text{NP}_{22}\text{PEG}_{\text{Biot}}$ et -biotine-streptavidine, $\text{NP}_{24}\text{Biot}$. $100 \mu\text{L}$ de biotine-PEG- γ globuline ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) sont ajouté du côté *cis* de la cellule, dans $1,8 \text{ mL}$ de NaCl (100 mM) et HEPES (1 mM) à pH 8, en appliquant un potentiel de 200 mV , pendant 1 h.

On observe une modification de la réponse I-V après ajout de biotine-PEG- γ globuline, ce qui prouve que le greffage a fonctionné. En ce qui concerne la position des protéines, elles peuvent se situer soit proches de l'entrée du pore, soit à l'entrée du pore, soit à l'intérieur du pore. Cependant la légère diminution de courant, et le volume stérique occupé par les PEG-streptavidine semblent suggérer que les protéines sont à l'extérieur du pore, proche de l'ouverture et il est très peu probable qu'elles soient à l'intérieur du pore. Mais ces résultats ne permettent pas de conclure quand à la position précise de la protéine.

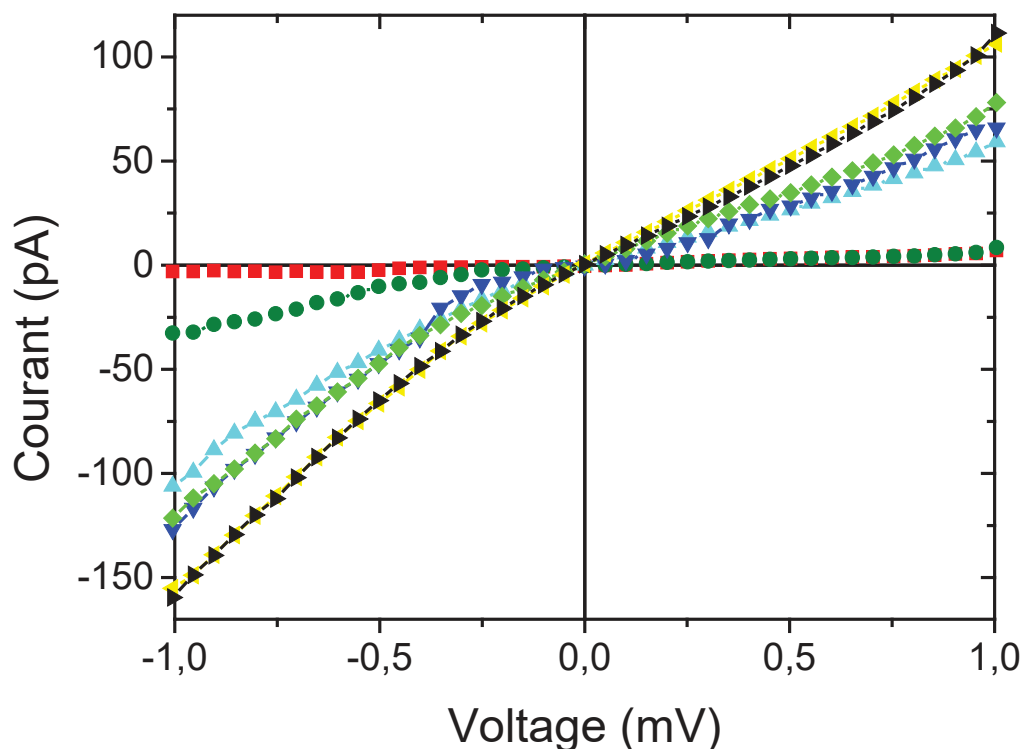


Figure 47: Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl) d'un nanopore après le greffage de biotine-PEG- γ -globuline sur des PEG-Streptavidine à différents pHs : pH 10 (noir), pH 9 (jaune), pH 8 (vert), pH 7 (bleu), pH 6 (cyan), pH 5 (olive) et pH 4 (rouge)

Pour le pore avec les longues chaines, NP₂₂PEG_{Biot}, les courbes I-V à différents pH montrent :

- des rectifications de courant pour des pHs supérieurs à 6. L'amplitude de courant diminue légèrement du fait de la diminution du diamètre lié au greffage et la rectification est un peu plus prononcée.
- des blocages de courant pour des pHs inférieurs à 6 (Figure 47). Les propriétés d'ouverture/fermeture du pore ne sont pas modifiées par l'addition de biotine-PEG- γ -globuline.

Pour illustrer ceci, le facteur de rectification en fonction du pH est reporté (Figure 48). Les résultats montrent que l'ajout de biotine-PEG- γ -globuline (IEP 6,5) induit une augmentation du facteur de rectification. La protéine biotinylée peut ainsi être facilement détectée pour des pHs supérieurs à 6. Cependant la forme des courbes I-V reste inchangée, en effet, le facteur de rectification est toujours inférieur à 1.

Pour les chaines courtes de biotines, l'insertion de biotine-PEG- γ -globuline induit une diminution du facteur de rectification indépendamment du pH. Cette diminution est plus prononcée à pH 7 et 8 quand la streptavidine et la - γ -globuline ont des charges globales opposées (globalement positive pour la streptavidine et globalement négative pour la - γ -globuline). De pH 5 à 8 et en particulier pour les pH 7-8, l'inversion de la réponse I-V permet donc une détection plus facile des biotine-PEG- γ -globuline.

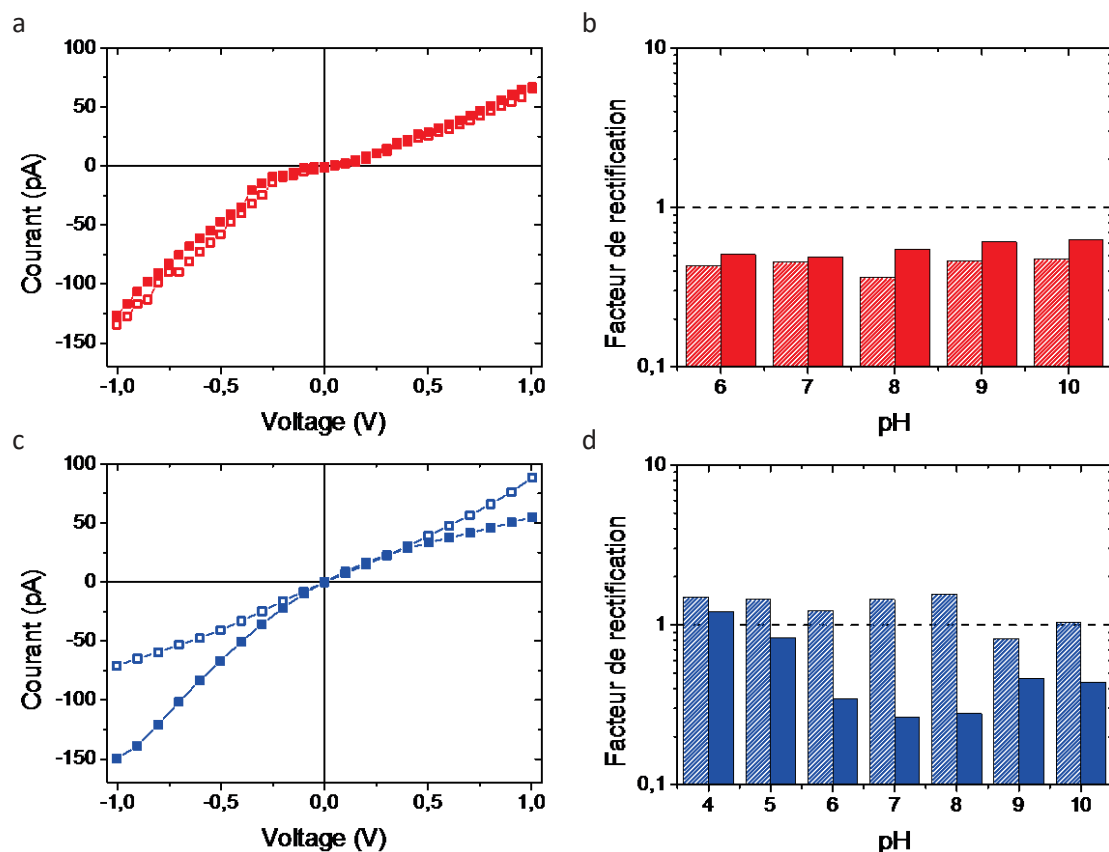


Figure 48: Insertion biotine-PEG- γ globuline: gauche : courbes I-V à pH 7 et NaCl 100mM, après l'addition de streptavidine (carrés ouverts) et après le greffage des protéines IgG (carrés pleins), droite : comparaison des facteurs de rectification en fonction du pH, avant (hachurées) et après (pleines) le greffage d'IgG à NaCl 100 mM. a. b. rouge: NP₂₂PEG_{biot}, contient les longues chaines biotine-PEG et des streptavidines, c. d. bleu: NP₂₄Biot, contient les courtes chaines de -biotines et les streptavidine

Ensuite nous nous intéressons à une autre protéine modèle, la BSA. Le principe reste le même, seul le point isoélectrique de la protéine change (IEP 4,7). Nous avons étudié la détection de la BSA biotinylée grâce à un nanopore fonctionnalisé avec de l'avidine. Ce choix est motivé par le fait que les deux protéines présentent des charges globales opposées de pH 5 à 10. Ainsi en utilisant ces conditions, nous espérons observer une inversion de la forme des courbes I-V due au greffage des BSA. Les facteurs de rectifications de la Figure 49 ne montrent pas l'inversion attendue. Dans le cas des chaines courtes, l'addition des BSA biotinylées induit une augmentation du facteur de rectification de pH 5 à 8, et une diminution pour les pH 4, 9, et 10. La BSA possède une charge globale positive à pH 4, et négative au-dessus de pH 4,7, les groupements amines sont chargés jusqu'à pH 9-10. Une explication possible peut être que le facteur de rectification augmente lorsque l'intérieur du pore présente des charges globales opposées de pH 5 à 8. Il est à noter également, qu'après l'insertion de BSA, le courant de rectification est de 1 pour les pH 9-10. Pour les longues chaines, une augmentation du facteur de rectification est également observée pour des pHs de 6 à 9.

Enfin, dans l'objectif de déterminer l'aptitude de notre approche à détecter l'addition successive de protéines, des anticorps d'anti-BSA ont été ajoutés après le greffage des BSA. Les courbes I-V après l'addition d'anti-BSA montrent une inversion du facteur de rectification dans le cas de la chaîne longue à pH 6 et 7. Au contraire, quand l'anti-BSA est ajouté sur des chaînes courtes, il n'y a aucune inversion de courant significative. Cependant, la modification du facteur de rectification à bas pH (de 4 à 6) permet tout de même de détecter l'anti-BSA. D'autre part, indépendamment de la longueur de la chaîne, à pH basique (9-10), le facteur de rectification est quasi identique avant et après l'ajout de l'anticorps.

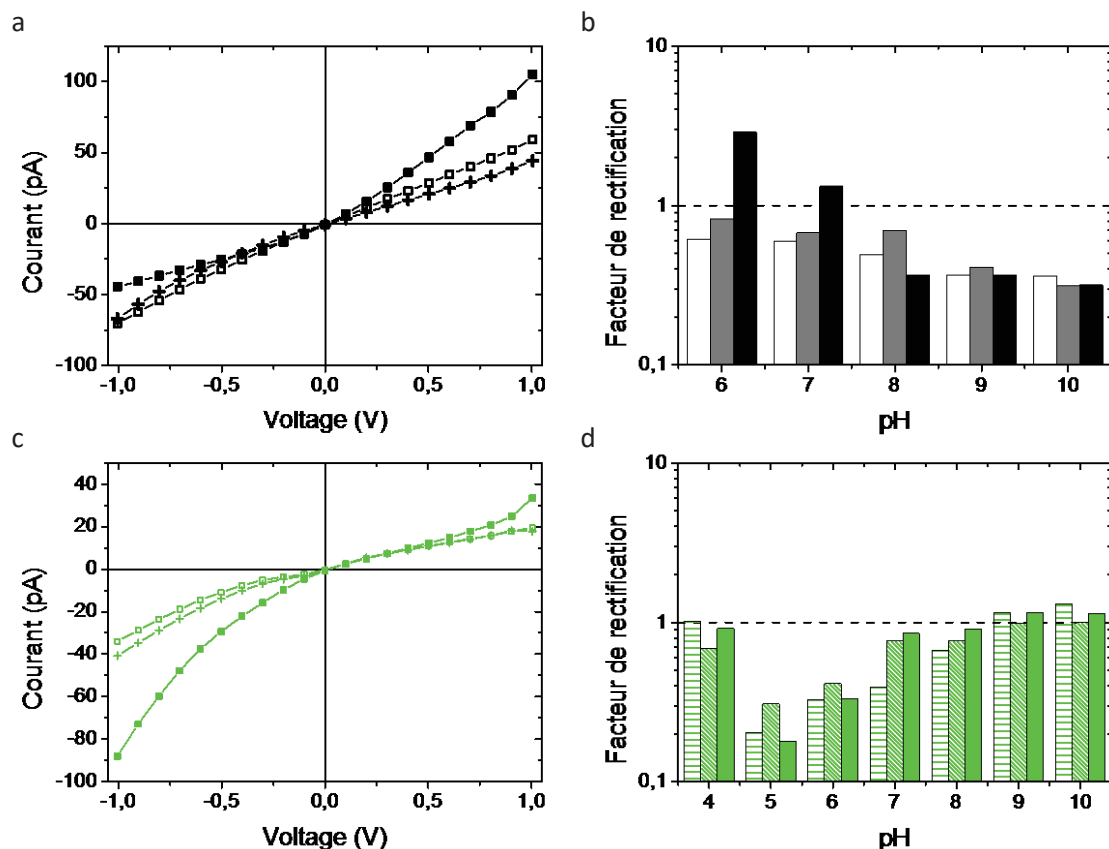


Figure 49: Insertion de biotine-PEG-BSA et anti BSA, courbes I-V à NaCl 100 mM, noir: NP₂₆PEG_{biot}, longues chaînes biotine-PEG et avidine, a. (croix) après insertion d'avidine, (carré ouvert) après insertion de biotine-BSA, (carré plein) après insertion d'anti-BSA, b. Facteur de rectification en fonction du pH (blanc) après insertion d'avidine, (gris) après insertion de biotine-BSA, (noir) après insertion d'anti-BSA, vert: NP₁₈biot, contient de courtes chaînes de -biotines et de l'avidine, c. (croix) après insertion d'avidine, (carré ouvert) après insertion de biotine-BSA, (carré plein) après insertion d'anti-BSA, d. Facteur de rectification en fonction du pH (rayé) après insertion d'avidine, (hachuré) après insertion de biotine-BSA, (plein) après insertion d'anti-BSA

2. Fonctionnalisation réversible

Le principal problème de la fonctionnalisation chimique est son irréversibilité. Le pore ne peut être utilisé qu'une seule fois et une modulation *in-situ* des propriétés de la surface, c'est à dire au cours de l'expérience, à l'intérieur du pore, ne peut pas être considérée. Ceci limite fortement l'intérêt de ces nanopores pour des applications de détections. Dans cette partie nous allons donc présenter une stratégie pour obtenir une fonctionnalisation réversible de l'intérieur du pore.

Dans le but d'obtenir une fonctionnalisation réversible, il est possible d'utiliser les interactions électrostatiques entre les groupements carboxylates, à la surface du nanopore, avec des groupements amines de poly-cations, telle que la poly(allylamine) ou la poly-L-lysine.

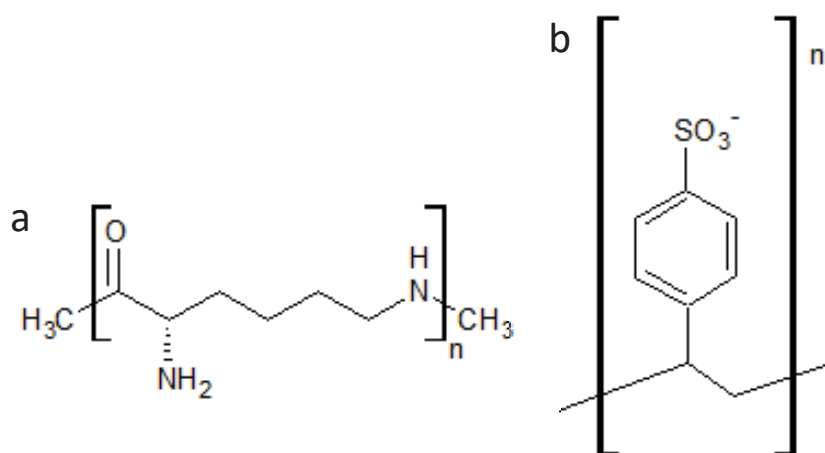


Figure 50 : a. Polycation, poly-L-lysine b. Polyanion, poly(styrène sulphonate)

Le recouvrement couche par couche (« *layer by layer* » LbL) de poly-électrolytes est couramment utilisé pour modifier les propriétés de surface des membranes.²³² Dans le cas du nanopore unique, seul le recouvrement couche par couche de poly(allylamine hydrochloride) (PAH) et poly(styrene sulfonate) (PSS) a été décrit.¹⁵⁴ Ce concept peut également être utilisé pour, premièrement moduler *in-situ* les propriétés de transport ionique, et également pour opérer une fonctionnalisation réversible du nanopore.

Dans le but de proposer une fonctionnalisation rapide et réversible d'un nanopore unique permettant de modifier sa charge de surface et de détecter des molécules biologiques, nous avons effectué la fonctionnalisation d'un nanopore conique en PET grâce à de la poly-L-lysine (PLL) et du poly(styrene sulfonate) (PSS). (Figure 50) Le choix s'est porté sur la PLL car c'est un poly-cation faible, qui est partiellement chargé à pH neutre. Le pH et la force ionique influencent les propriétés physico-chimiques de ces polymères en solution, et donc devraient modifier les propriétés de ces multicouches.²³³

Tout d'abord nous avons étudié l'influence de l'adsorption de la PLL et de l'assemblage couche par couche de la PLL/PSS sur les propriétés de transport ionique du nanopore, ainsi que la réversibilité de

la fonctionnalisation. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à l'adsorption de PLL sur lesquels des PEG-biotines ont été greffés pour évaluer les capacités de détection de cette approche.

2.1. Processus de fonctionnalisation

Les nanopores coniques ont été obtenus grâce à une attaque chimique effectuée dans des conditions asymétriques. Les nanopores utilisés pour cette étude ont des petits diamètres d'environ une dizaine de nanomètres (Table 5). Après l'attaque chimique les nanopores présentent une charge de surface négative qui est due aux groupements carboxylates (pKa 3,5). Ainsi les courbes I-V enregistrées à pH 8 présentent une rectification de courant, quantifiée par le facteur de rectification ($Rf < 1$).

Table 5: Diamètres des nanopores coniques

pore	Tip (nm)	Base (nm)
NP ₁	10.	525
NP ₂	12,3	323
NP ₃	13,5	570
NP ₄	10,2.	650

La fonctionnalisation du nanopore s'effectue en ajoutant 16 μL d'une solution de PLL (1 mg mL^{-1} et M_w 30–70 kD) du côté tip du nanopore dans 1,6 mL d'une solution NaCl 150 mM, TRIS 5 mM et EDTA 1 mM à pH 8. Un voltage de - 1 V est appliqué dans le but de favoriser l'entrée des PLL dans le pore, permettant le passage de la barrière d'énergie d'entrée et l'enregistrement du courant pendant le processus de fonctionnalisation.

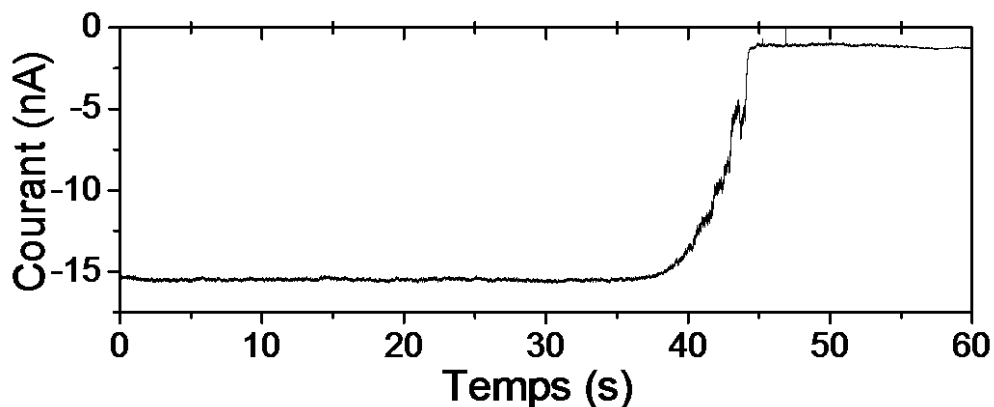


Figure 51: Trace de courant caractéristique enregistrée pendant l'insertion de PLL à pH 8, NaCl 150 mM, TRIS 5 mM, EDTA 1 mM, sous -1 V, ici pour NP₁

Pour tous les pores, une diminution du courant est observée, (Figure 51) entre 40 et 60 s après l'ajout des PLL en solution. Ce temps semble indépendant du diamètre du pore. Cette diminution permet de suivre en temps réel la fonctionnalisation. Après la stabilisation (environ 2 min), le pore est soigneusement rincé avec la solution tampon pour enlever l'excès de PLL. Ensuite des courbes I-V sont enregistrées.

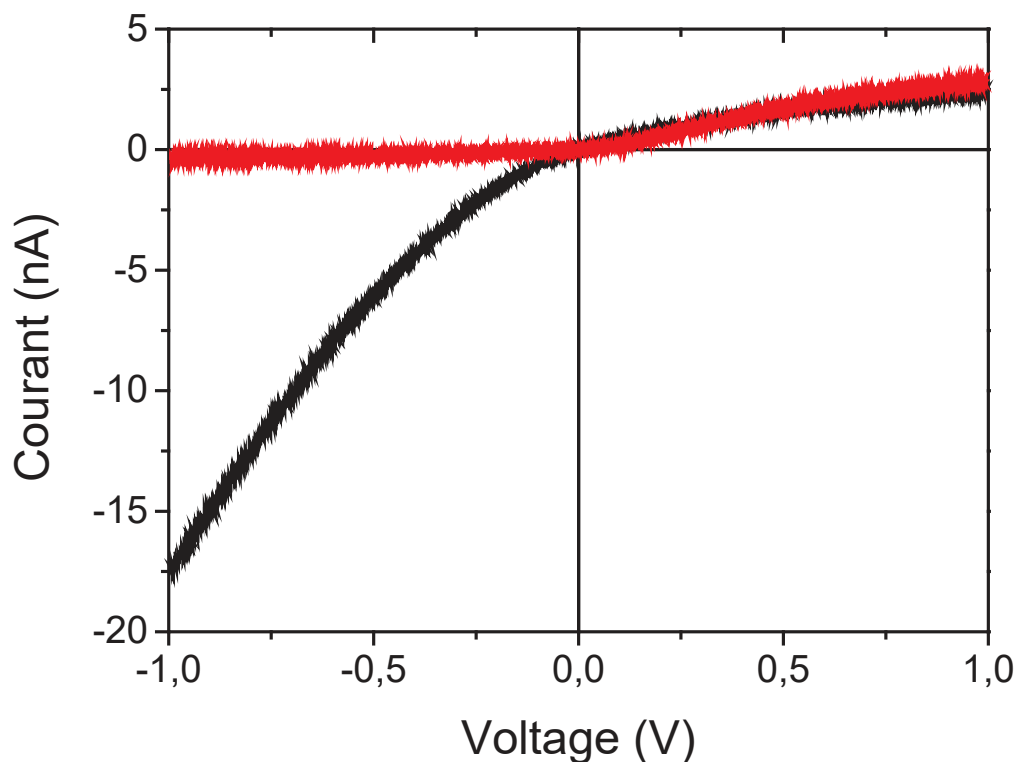


Figure 52: Courbe I-V avant (noir) et après (rouge), l'insertion de PLL

Ces courbes présentent une rectification du courant inversée pour tous les nanopores. Le facteur de rectification est supérieur à 1 ($R_{fi} = 8$). Cette rectification du courant indique une inversion de charge à

l'entrée du pore induite par l'adsorption des PLL. Elle découle d'un excès de charges positives apporté par les PLL qui bloquent le transport de cations lorsqu'un voltage négatif est appliqué. Le courant pour un voltage positif est moins affecté par l'adsorption des PLL, contrairement au voltage négatif. Ceci est probablement dû à la fonctionnalisation qui a lieu seulement à l'entrée du pore.¹⁷⁵

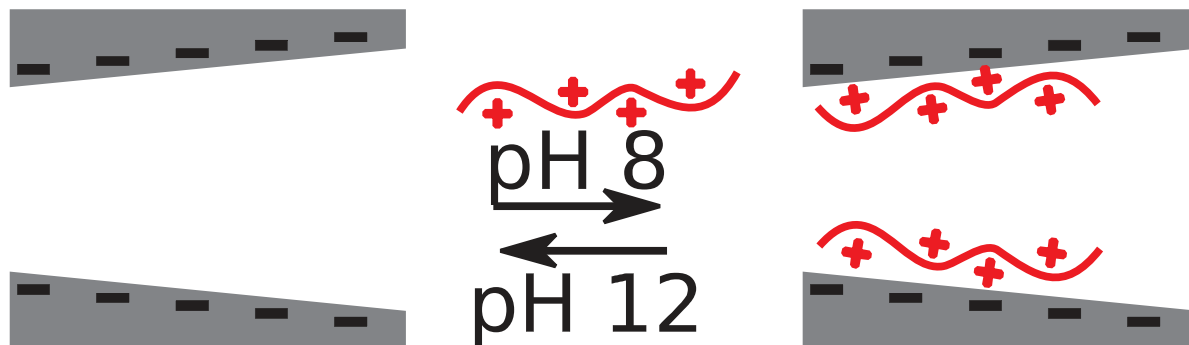


Figure 53: Schéma du protocole expérimental d'adsorption/désorption de PLL dans un nanopore conique, négativement chargé

La PLL est un poly-électrolyte faible, nous avons ainsi tenté de la retirer en cassant ses interactions électrostatiques avec le pore. Pour ce faire, la solution tampon à pH 8 a été remplacée par une solution tampon à pH 12 (KCl 100 mM, CAPS 10 mM), au-dessus du pKa de la PLL (pKa amino lysine : 8,95). Après 5 min, la cellule est rincée à nouveau avec la solution à pH 8. Les courbes de courant-voltage enregistrées après la désorption des PLL, sont semblables à celle d'avant l'adsorption de PLL. Dans le but d'évaluer la réversibilité de la fonctionnalisation avec les PLL, des cycles d'adsorption/désorption sont répétés 9 fois sur un même pore. Les courbes I-V sont enregistrées après chaque cycle, avec et sans PLL. (Figure 54)

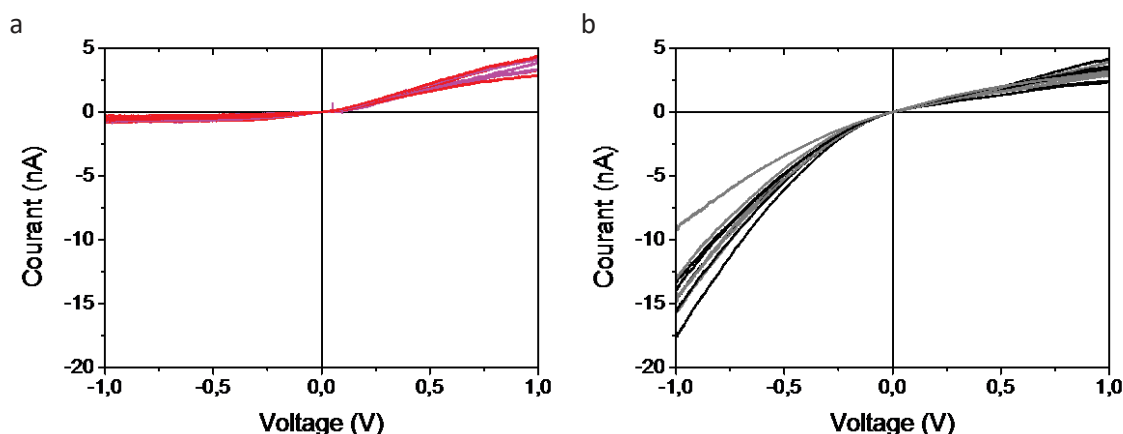


Figure 54: Réversibilité de la fonctionnalisation avec les PLL. Courbes I-V après a. Adsorption, b. Désorption des PLL

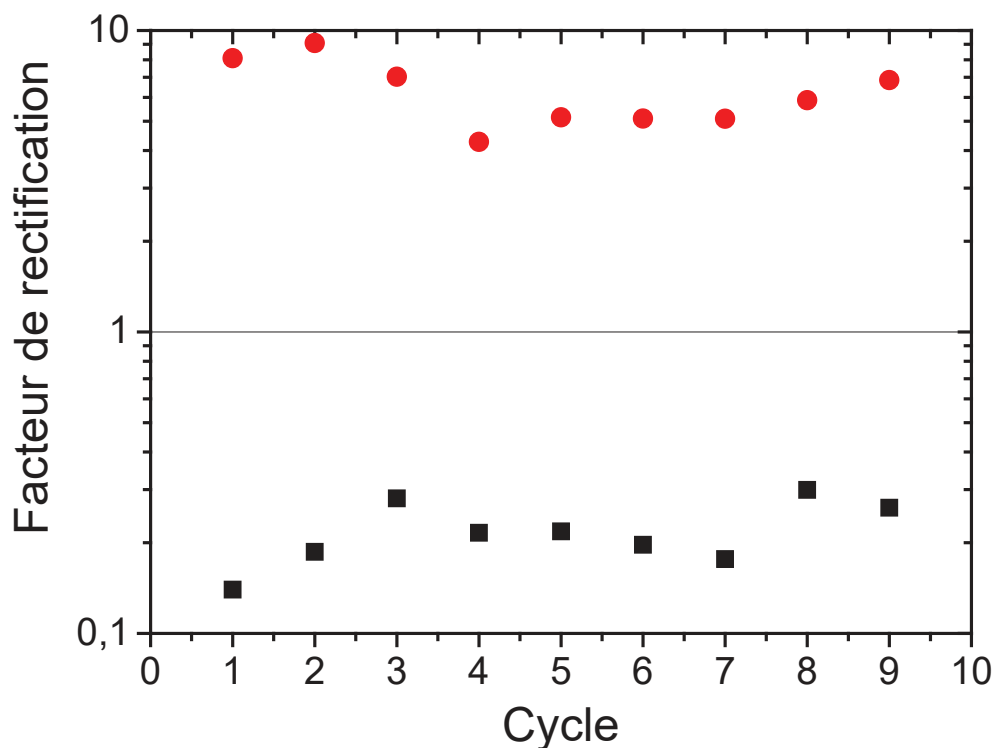


Figure 55: Evolution du facteur de rectification avec la PLL (cercles rouges) et sans (carrés noirs) pour chaque cycle d'adsorption/désorption des PLL

Les résultats montrent que le nombre de cycles a peu d'influence sur les propriétés de transport ionique. En effet, les facteurs de rectifications sont d'environ 7 après l'adsorption et 0,2 après la désorption de PLL. (Figure 55) La conductance du nanopore est également constante après la désorption des PLL. (Figure 56) Ceci indique que les PLL sont complètement désorbés après le rinçage à pH 12. Le nanopore ne se bouche pas pendant les processus d'adsorption/désorption des PLL. A ce stade, nous avons montré que l'adsorption des PLL est appropriée en tant que méthode de fonctionnalisation réversible.

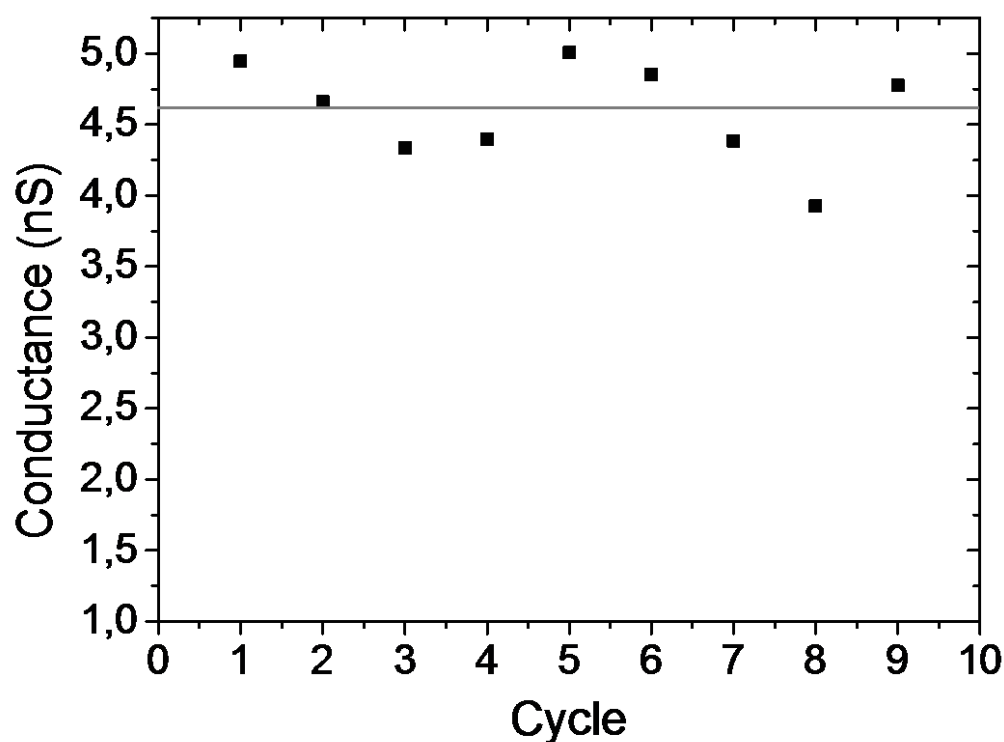


Figure 56 : Conductance du nanopore mesurée après la désorption des PLL

Une deuxième fonctionnalisation, couche par couche de PLL et de PSS a été étudiée. (Figure 57) Après insertion des PLL, et rinçage pour enlever l'excédent, une solution de PSS (1 mg mL^{-1} M_w 70 kD) est directement insérée du petit côté du pore (*tip*) en appliquant 1 V. Un potentiel est appliqué pour faciliter

l'entrée des polymères dans le nanopore. Les traces de courant montrent une diminution du courant après plusieurs secondes. (Figure 58)

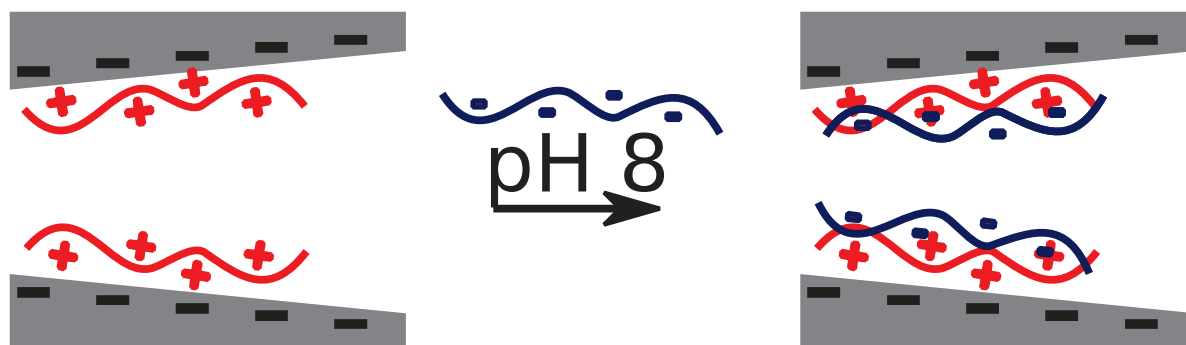


Figure 57: Schéma du protocole expérimental d'adsorption/désorption de PSS

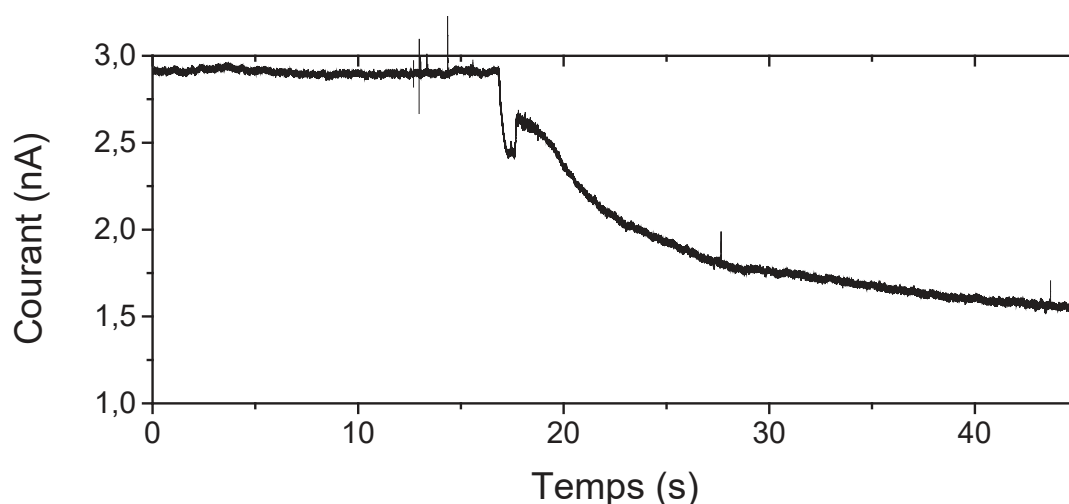


Figure 58: Trace de courant caractéristique enregistrée pendant l'insertion de PSS à pH 8, NaCl 500 mM, TRIS 5 mM, EDTA 1 mM, sous 1 V

Cette diminution suggère l'adsorption des PSS, négativement chargées, sur les PLL, positivement chargées. Après 2 minutes, quand le courant est stable, la cellule est rincée avec la solution tampon à pH 8, pour enlever l'excédent de PSS. Les courbes I-V enregistrées après l'adsorption de PSS présentent une inversion de la rectification du courant. Ces résultats confirment l'adsorption réussie des PSS sur la couche de PLL. (Figure 59) Le facteur de rectification après l'insertion de PSS est inférieur à celui du pore natif. (Figure 59d) La différence entre les facteurs de rectification peut être assignée aux différences de nombre de charges entre la couche de PSS et le PET.

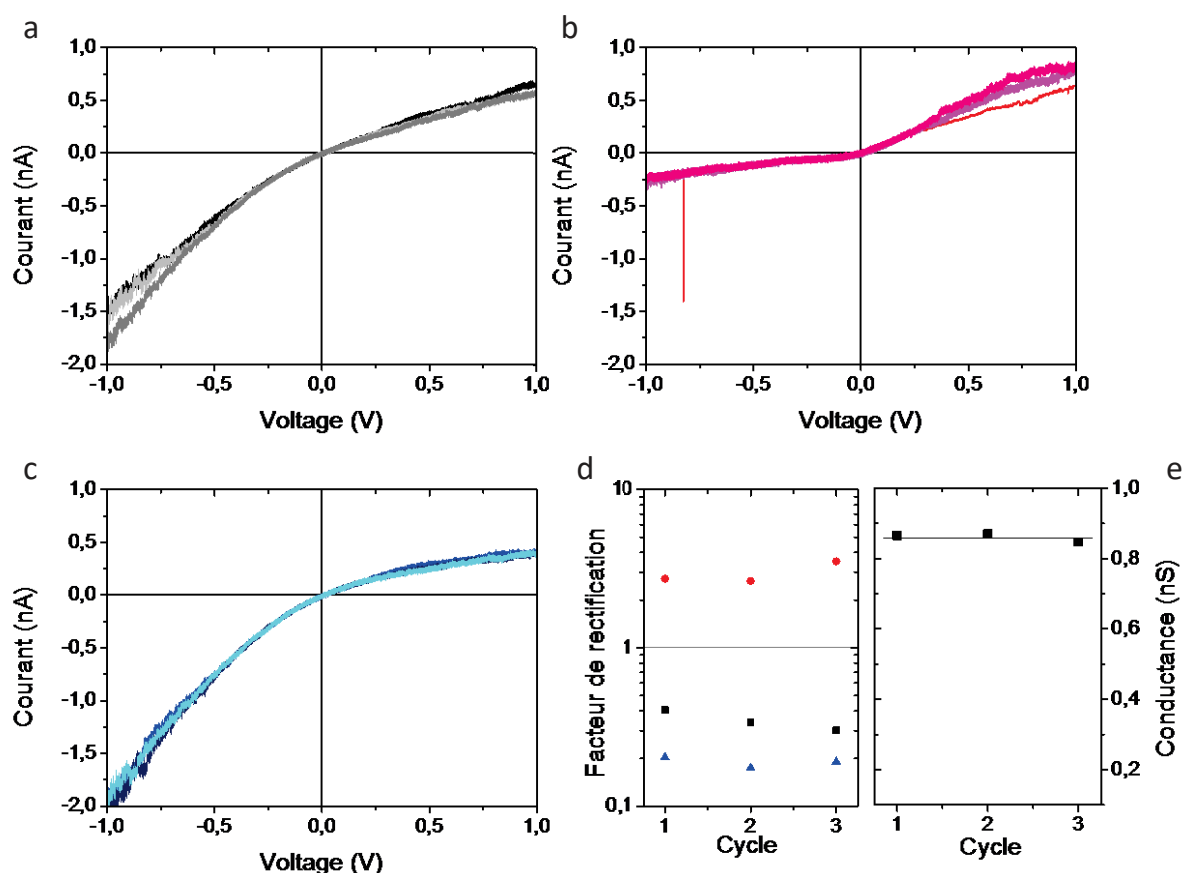


Figure 59: Adsorption des bicouches de PSS/PLL, natif (noir), PLL (rouge), PSS (bleu). Réversibilité de la fonctionnalisation PLL/PSS : courbe I-V après, a. PLL/PSS désorption après rinçage à pH 12, b. l'adsorption de PLL à pH 8, c. PSS adsorption à pH 8, d. Evolution du facteur de rectification, natif (carré noir), PLL (cercles rouges), PSS (triangles bleus). e. Conductance après rinçage à pH 12, mesurée sur la zone linéaire de la courbe I-V (entre - 75 mV et 75 mV)

Pour évaluer la réversibilité de la fonctionnalisation par bicouche de PSS/PLL, la cellule est soigneusement lavée avec une solution à pH 12, puis remplacée par la solution à pH 8. Dans l'exemple (Figure 59), 3 cycles de PLL/PSS sont reportés. Tout d'abord, l'on peut observer qu'après traitement à pH 12, (Figure 59a) la réponse I-V est semblable à celle avant l'adsorption de la bicouche de PLL/PSS. Ceci indique la réversibilité de l'adsorption.

De plus, la conductance après chaque cycle d'adsorption/désorption des bicouches de PLL/PSS est constante. (Figure 59e) Ceci montre que la taille du diamètre à l'entrée du nanopore n'est pas modifiée par les cycles successifs d'adsorption/désorption des PLL/PSS. De plus, les résultats montrent une valeur quasi constante du facteur de rectification à chaque étape. (Figure 59d) Ceci semble suggérer que les processus d'adsorption et de désorption de la PLL/PSS ne sont pas affectés par l'étape précédente, et confirmerait donc une réversibilité complète de la fonctionnalisation.

L'adsorption de PLL à l'intérieur du pore vient d'être montrée. L'objectif suivant est de tenter une fonctionnalisation multicouche de PLL/PSS. Les poly-anions et poly-cations sont introduits successivement du côté *tip* du nanopore. Après chaque insertion la cellule est rincée avec la solution tampon à pH 8, pour enlever tout excédant de polyélectrolyte, puis les courbes I-V sont enregistrées. (Figure 60).

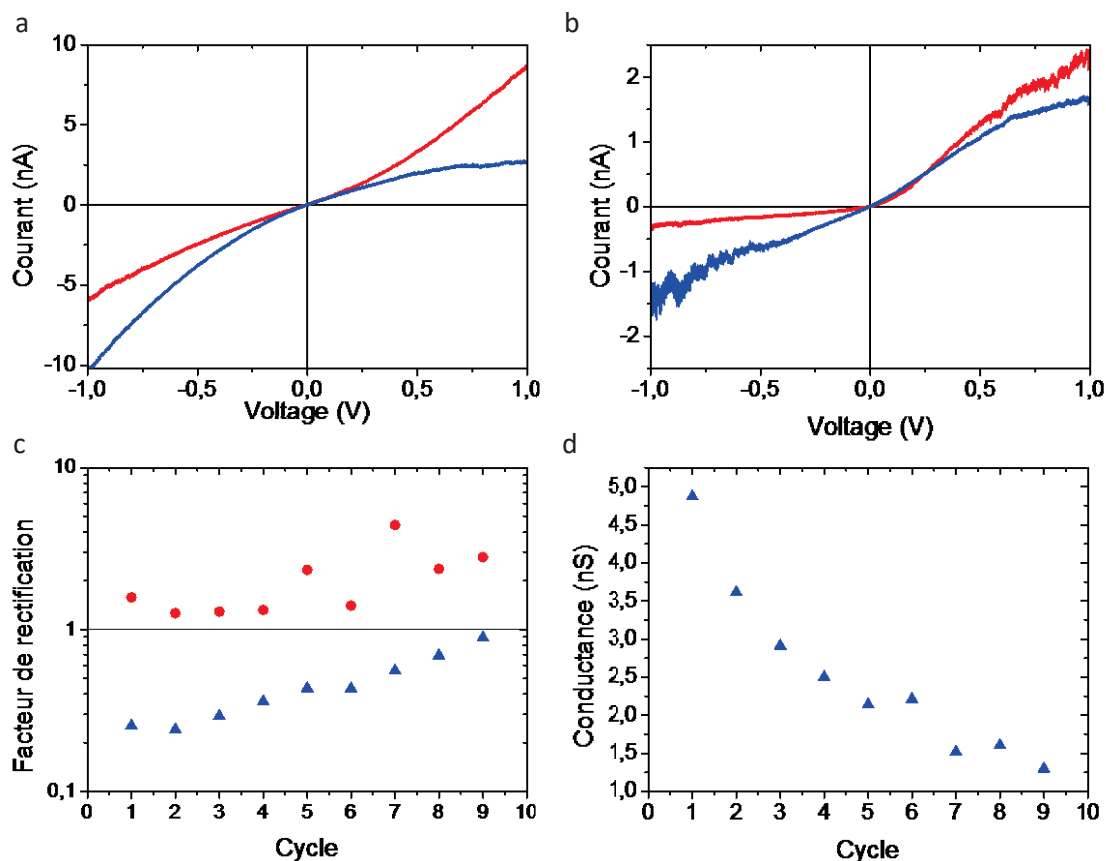


Figure 60: Dépôt couche par couche de PLL/PSS. Les courbes rouges ont été enregistrées après l'insertion de PLL, les bleues après celle de PSS. a. 1^{ère} couche de PLL/PSS, b. 8^{ème} insertion de PLL/PSS, c. Evolution du facteur de rectification (après l'ajout de PLL, cercles rouges, et de PSS, triangles bleus) en fonction du nombre de couche, d. La conductance est mesurée après l'ajout de PSS, sur la zone linéaire de la courbe I-V (entre -75 mV et 75 mV).

Comme attendu, la rectification de courant est inversée avec chaque couche adsorbée de PLL et de PSS. La diminution de la conductance, mesurée sur la partie linéaire de la courbe, indique une réduction du petit diamètre (*tip*), induite par l'adsorption successive des bicouches de PLL/PSS. (Figure 60d) Il est à noter également, l'évolution du facteur de rectification avec le nombre de couche. En effet, celui-ci diminue après les adsorptions successives de PLL et PSS. (Figure 60c) Ceci signifie que la densité de la charge de surface négative, diminue, contrairement à celle de la surface positivement chargée après l'adsorption des PLL. Donc en utilisant cette méthode, il est possible de concevoir des nanopores coniques avec un diamètre et une densité de charges de surface modifiables. Plus généralement, la

croissance de chaque couche ainsi que la charge de surface dépendent de l'organisation des polyélectrolytes (linéaires ou repliés). Ce paramètre est lié à : la force du polyélectrolyte, la concentration en sel, le pH, et la température utilisés durant l'adsorption des polyélectrolyte.²³² Cependant, la taille du diamètre après l'adsorption des couches ne peut être déduite de la conductance puisque cela requiert la connaissance des charges de surfaces ainsi que des propriétés de transport dans le nanopore. De plus, nous ne connaissons pas la longueur sur laquelle ces dernières s'insèrent ni dans quelles configurations se trouvent les polymères (linéaire, pelote,...).

2.2. Détection de macromolécules

Ensuite, nous avons voulu montrer le potentiel de cette technique de fonctionnalisation en matière de détection. Nous avons cherché à montrer s'il est possible de différencier plusieurs poly-anions, et s'il est possible de détecter de l'avidine après avoir greffé des biotines grâce aux amines sur les poly-cations. Plusieurs expériences similaires aux précédentes, ont été conduites avec différents poly-anions (PSS $M_n = 70$ kD, 1000 kD, de la chondroïtine (Figure 61) et des simples brins d'ADN) en utilisant le même nanopore après l'adsorption de PLL.

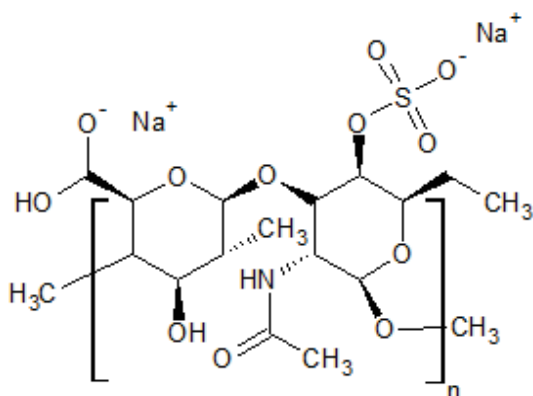


Figure 61: Sodium chondroitin sulfate

Comme attendu, quand les poly-anions sont ajoutés, les facteurs de rectification présentent une inversion de charge à l'entrée du nanopore. Il est intéressant de noter que la valeur du facteur de rectification est dépendante du poly-anion, et dans le cas de la PSS, dépendante de son poids moléculaire. (Figure 62) Donc nous pouvons penser qu'un nanopore contenant de la PLL peut être utilisé pour la détection de poly-anion. Le problème est qu'il est impossible de différencier des espèces dans un mélange de poly-anions.

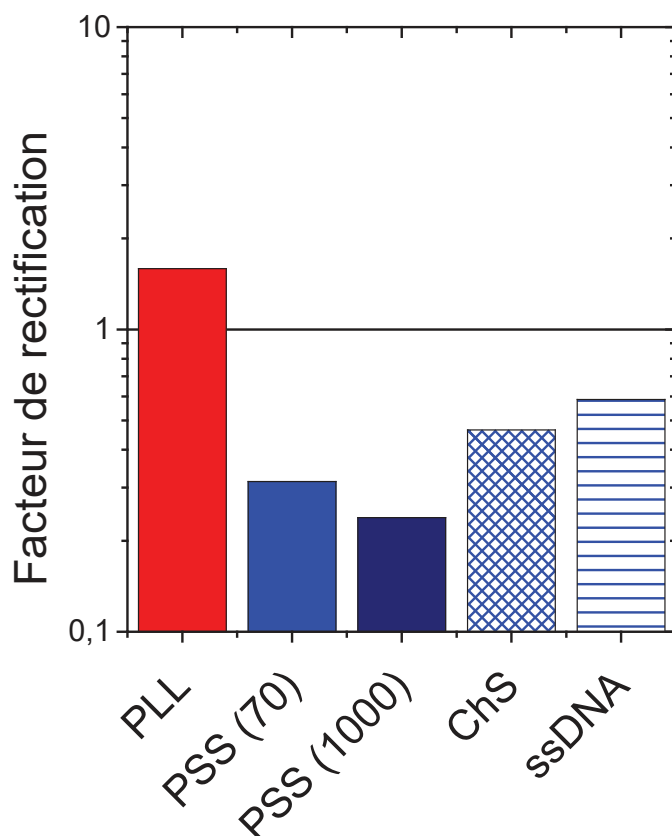


Figure 62 : Facteur de rectification en fonction du poly-cation (rouge), et différents poly-anions (bleus) adsorbés en surface, PSS $M_n = 70$ kD (bleu), PSS 1000 kD (bleu foncé), chondroïtine (quadrillage) et simples brins d'ADN (rayure)

Nous avons ensuite considéré la fonctionnalisation du nanopore en utilisant des fonctions spécifiques, des m -PEG-biotines, greffés sur des PLL, dans le but de détecter de l'avidine. Tout comme dans la partie fonctionnalisation irréversible de ce chapitre, le système biotine-avidine, a été choisi comme preuve de concept, car il est à la base du développement de nombreux biocapteurs. La fonctionnalisation du nanopore par PLL-g-[(mPEG)12x-(PEG-biotine)_x] est adaptée du protocole de synthèse décrit par Elbert and Hubbell.²³⁴ La PLL est dissoute dans une solution tamponnée de tetraborate (50 mM à pH 8,5) pour obtenir une concentration finale de 40 mg mL⁻¹. La solution est ensuite filtrée (filtre 0,45 μ m) et stérilisée. Puis, la solution est directement ajoutée sur un mélange de NHS-mPEG et NHS-PEG-biotine solides en proportion (12:1). Elle est ensuite agitée pendant 6 h à température ambiante. Enfin les polymères n'ayant pas réagi sont retirés par dialyse pendant 24 h dans une solution tamponnée de NaCl 100 mM, TRIS 5 mM, et EDTA 1 mM à pH 8. La fonctionnalisation du nanopore se fait par ajout de PLL-g-mPEG-biotine du côté *tip* du nanopore en appliquant un potentiel de 1 V pendant 10 minutes. Les courbes I-V montrent une diminution du facteur de rectification et de la conductance, comparée au pore natif. Ceci s'explique respectivement par la diminution du nombre de charges de surface due aux

PEG non chargés ainsi qu'à l'encombrement stérique des PEG. (Figure 63) De plus, la rectification de courant est moins prononcée pour les PLL-g-mPEG-biotine que pour les PLL. Ceci est probablement dû à une charge de surface plus faible pour les PLL-g-mPEG-biotines due au greffage des -mPEG-biotines. Ensuite, l'avidine est introduite dans la cellule, du côté *tip* du pore, en appliquant un potentiel de - 200 mV pendant 6 minutes. Après rinçage, les courbes I-V présentent une diminution de la conductance due à l'encombrement de l'avidine. De plus, une augmentation du facteur de rectification est observée. Elle peut être interprétée par une augmentation de la charge positive de surface à l'entrée du nanopore, étant donné la charge globalement positive de l'avidine à pH 8. Les PLL fonctionnalisés sont retirés grâce à un lavage par une solution à pH 12, et le nanopore peut être fonctionnalisé à nouveau.

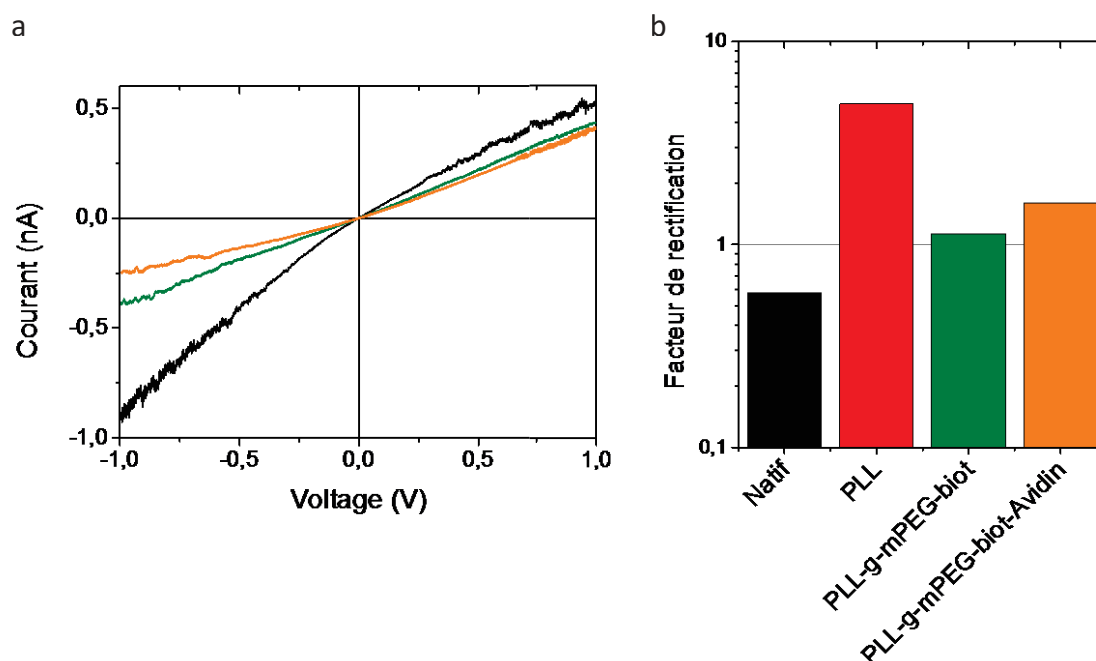


Figure 63: Fonctionnalisation d'un nanopore avec des PLL-g-mPEG-biotines et détection d'avidine. (a) courbe IV, avant (noir), après l'insertion des PLL-g-mPEG-biotines (vert), et après insertion d'avidine (orange). (b) facteur de rectification obtenu pour le nanopore natif (noir), après l'insertion de PLL (rouge), ou de PLL-g-mPEG-biotines (vert), et après insertion d'avidine (orange)

3. Discussion

Nous avons montré deux stratégies pour mimer un canal biologique grâce à la fonctionnalisation de la surface d'un nanopore, une première irréversible et la deuxième réversible. Dans les deux cas nous avons préparé des pores en polymère (PET) par la technique de la trace latente. Nous avons pu fabriquer des pores symétriques ou asymétriques grâce à l'attaque chimique. Ce procédé d'irradiation par ions lourds et d'attaque chimique crée des fonctions chimiques (-COOH) sur la surface interne du pore. Nous avons

donc utilisés ces groupes pour effectuer des liaisons chimiques ou électrostatiques avec différentes molécules, ou biomolécules. Nous avons utilisé des méthodes où chaque étape peut être caractérisée.

Dans le cas de la première fonctionnalisation irréversible, nous avons utilisé le complexe avidine biotine, pour mimer un canal biologique, pH-répondant, et ligand-détection. L'objectif est donc l'intégration d'élément de bio-reconnaissance pour concevoir un biocapteur fonctionnel, grâce aux modulations de la réponse I-V. La préparation d'un nanopore unique dans un film polymère avec une fonctionnalisation asymétrique a ainsi été montrée. Nous avons utilisé deux approches différentes pour fonctionnaliser un nanopore, tout d'abord une fonctionnalisation directe de la surface interne du pore, et une deuxième après dépôt de couche atomique permettant une fonctionnalisation homogène de toute la surface du pore (interne et externe). Nous avons tout d'abord modifié le pore directement sur les fonctions -COOH , par greffage successif de biotine (avec des chaînes plus ou moins longues), et d'avidine, par une méthode monotope. Chaque étape de la fonctionnalisation a pu être suivie puisqu'elles induisent des modifications de la courbe IV. Celle-ci a l'avantage d'être très facile et rapide, mais nous avons pu constater que nous observions des oscillations dues à des problèmes d'adsorption non spécifique.

Pour résoudre ce problème, nous avons donc eu recours à une fonctionnalisation interne et externe du nanopore, qui empêche l'adsorption non-spécifique. Nous avons ensuite pu suivre chaque étape de la fonctionnalisation. Comme pour la fonctionnalisation monotope, le greffage asymétrique provoque une rectification de courant. Celle-ci dépend des charges à la fois des protéines et des groupements amines libres à l'intérieur du pore. Nous avons également étudié l'importance de longueur de la chaîne greffée. Nos résultats montrent la possibilité de différencier l'avidine de la streptavidine. La partie la plus intéressante est probablement la fermeture réversible pour des pHs inférieurs à 6, liées aux modifications des couches de PEG et de leurs agrégations avec des protéines. Un autre intérêt de cette technique est qu'elle permet de détecter des protéines biotinylées, ainsi que des anticorps. Enfin cette stratégie est intéressante car de faibles concentrations en protéines sont nécessaires pour leurs détection (environ 1 nM), et ne nécessite pas de marqueurs, fluorescent par exemple. Toutefois le principal problème de la fonctionnalisation chimique est son irréversibilité. Le nanopore est à usage unique, après capture et détection des protéines, il est impossible de le réutiliser. C'est pour cela que nous avons étudié une seconde stratégie pour obtenir une fonctionnalisation réversible de l'intérieur du pore.

Dans le but de concevoir un pore avec des propriétés réversibles, nous avons utilisé des poly-électrolytes. Ainsi en utilisant cette seconde stratégie de fonctionnalisation réversible, notre but était de concevoir un nanopore biomolécule-répondant qui après utilisation peut retrouver sa surface d'origine, sans endommager le nanopore. Pour ce faire, nous avons utilisé une fonctionnalisation basée sur un auto-assemblage couche par couche de PLL et de PSS.

Nous avons démontré que la fonctionnalisation par polyélectrolyte est adaptée pour la modification d'un nanopore. En effet cette fonctionnalisation présente plusieurs avantages, elle:

- nécessite un simple ajout de polyélectrolyte du petit côté du pore,

- a lieu en moins d'une minute,
- peut être suivie en temps réel,
- est totalement réversible à pH 12, et n'endommage pas le nanopore

Nous avons également montré que les PLL et les bicouches PLL/PSS sont appropriées pour moduler la sélectivité ionique d'un nanopore conique. De plus, la fonctionnalisation par PLL-g-mPEG-biotines peut être utilisée pour concevoir un capteur où le nanopore serait réutilisable. Ceci peut être considéré comme un progrès réel comparé aux fonctionnalisations classiques sur les nanopores fabriqués par la technique de la trace latente. Cependant quelques problèmes restent à résoudre. Si le pore est trop petit, l'adsorption des poly-électrolytes n'est pas possible, il faut donc utiliser un diamètre optimisé. Après l'adsorption successive des poly-électrolytes, nous ne pouvons pas déterminer précisément la taille du diamètre. Nous ne pouvons pas prédire exactement la manière dont ils s'arrangent, les phénomènes de gonflement, sur quelle longueur ils se sont adsorbés. L'avantage des pores fabriqués par la technique de la trace latente, est leur facilité à transposer cette méthode à une membrane multipore. Ainsi, il est donc possible d'étendre ce processus dans le but de concevoir des membranes possédant de larges surfaces pour des applications de séparation ionique ou de capteurs.

Chapitre 4.

Détection de molécule unique : Influence de la surface du pore

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'amélioration de la résolution des nanopores en modifiant leurs interactions électrostatiques avec la macromolécule grâce à des modifications de leurs surfaces et de leurs charges. Nous avons tenté de comprendre d'un point de vue fondamental le passage des macromolécules à travers ces nanopores modifiés.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de deux publications et d'un « proceeding »

(Annexe 2) :

- Lepoitevin, M., P. E. Coulon, et al. (2015). "Influence of nanopore surface charge and magnesium ion on polyadenosine translocation." Nanotechnology 26(14) : 144001-144010.
- M. Lepoitevin, M. Bechelany, et al. (2015). "Influence of nanopore surface charge on polycytosine translocation." Physics, Chemistry and Applications of Nanostructures: 457-461
doi: 10.1142/9789814696524_0113
- Thangaraj, V., M. Lepoitevin, et al. (2016). "Detection of short ssDNA and dsDNA by current-voltage measurements using conical nanopores coated with Al₂O₃ by atomic layer deposition." Microchimica Acta 183(3): 1011-1017.

1. Influence de la charge de surface d'un nanopore sur le passage d'homo-polynucléotides

Depuis 1996, les nanopores uniques solides ont été développés pour un vaste choix d'applications biotechnologiques.^{217,235,236} Les avancées majeures attendues dans ce domaine portent sur :

- la compréhension fondamentale des processus dynamiques qui gouvernent le passage des macromolécules à travers le pore
- le développement de méthodes qui permettent une fabrication de routine de matériaux à l'échelle nanoscopique.

La compréhension du passage des molécules à travers un nanopore nécessite le développement d'un modèle exhaustif qui justifie, d'une part, de l'hydrodynamisme de la molécule et de ses interactions avec le nanopore,²³⁷ et d'autre part, l'influence du flux de petits électrolytes (typiquement le flux électroosmotique (EOF) et l'effet de la double couche électrique (EDL)).²³⁸ La question cruciale concerne la barrière d'énergie de l'entrée de la macromolécule dans le pore. Il a été empiriquement démontré que le champ électrique dans un nanopore exerce une force sur les macromolécules d'une dizaine de pN.²³⁹ Cette force semble suffisante pour surpasser la barrière d'énergie qui est associée au dépliement de la molécule, à son interaction avec la surface du nanopore et au flux électroosmotique.^{122,239-243} La vitesse de passage de la macromolécule et la barrière d'énergie d'entrée sont toutes deux fortement liées aux propriétés du nanopore (rapport d'aspect, forme et charges de surface).^{117,122,242,243} Il a été montré que la barrière d'énergie d'entrée de nanoparticule sphérique non-déformable est plus faible quand le nanopore et la macromolécule ont la même charge, et des diamètres proches.¹²⁶ Nous avons étudié l'influence de la charge de surface du nanopore sur le passage d'homo-polynucléotides à travers le pore pour vérifier si c'est également le cas pour des objets déformables. Pour ce faire, nous avons conçu deux nanopores avec des diamètres d'environ 3 nm, un négativement chargé, et l'autre de charge neutre. Ensuite nous avons étudié l'influence de l'addition d'ions Mg^{2+} sur l'entrée de macromolécules dans le nanopore. Dans une solution de polynucléotides, le magnésium est un agent chélatant, il devrait jouer un rôle sur la barrière d'énergie entropique.

1.1. Conception des nanopores et caractérisation

Deux nanopores de faible rapport d'aspect sont percés par microscopie électronique en transmission (TEM) dans une plaque de nitrure de silicium (SiN) d'épaisseur ($L = 30$ nm). Le diamètre des nanopores (D) est déterminé lors de la fabrication par TEM (Figure 64).

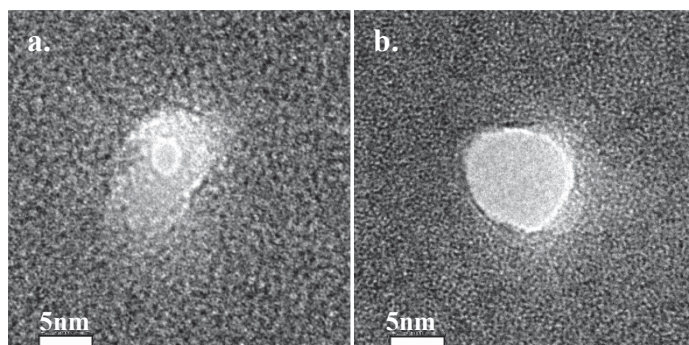


Figure 64: Images par microscopie électronique en transmission de nanopore en SiN après formation du pore a. NP - natif, b. NP- TMS avant réduction

A cause de la diffusion de chaleur due au flux d'électron, l'épaisseur de la membrane située autour du nanopore a également diminué de quelques nanomètres. Le premier nanopore (NP- natif), de diamètre 2,5 – 3,2 nm, est utilisé directement après l'ouverture du pore (2 min d'exposition au faisceau d'électrons), sans modification. Il possède un état de surface hydrophile et une charge de surface négative. Le second pore (NP- TMS) est obtenu en utilisant la même technique (5 min d'exposition). Le diamètre initial de 9,2 – 10,2 nm, est ensuite réduit par la technique de dépôt par couche atomique (ALD), en alternant des couches d' Al_2O_3 et de ZnO .⁶⁹ Ensuite le NP subit un traitement au $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (Tri Méthyl Silane (TMS)). Après modification, le diamètre du second nanopore (NP- TMS), est estimé à 4,74 - 5,74 nm. Après le greffage des fonctions Tri-Méthyl-Silane (TMS), la surface du nanopore est à la fois non-chargée et hydrophobe.¹²⁶ Nous avons choisi de concevoir NP- TMS plus large que NP- natif dans le but d'obtenir des diamètres effectifs pour les deux nanopores similaires. Dans le cas du nanopore natif, cette distance est équivalente au diamètre du nanopore, car l'eau est en contact avec la surface du nanopore. Dans le cas du pore TMS, il a été montré par simulation de dynamique moléculaire qu'il existe un espace de 0,75 nm entre la surface interne du nanopore et les premières molécules d'eau.^{98,244} Nous avons décidé de prendre cet espace en compte en supposant que le passage des polynucléotides à travers le pore a lieu uniquement en présence d'eau. Ainsi, nous considérons que le diamètre effectif est d'environ 3,25 - 4,25 nm pour le TMS-NP et de 2,5 - 3,2 nm pour le nanopore natif.

1.2. Influence de l'état de surface sur le passage de polynucléotides à travers le nanopore

La première partie de cette étude se concentre sur l'influence de l'état de surface sur la dynamique de passage de polynucléotides à travers le pore, pour de faible concentration en sels, typiquement quand la longueur de Debye ne peut pas être négligée par rapport à la taille du diamètre. Pour ce faire, deux paramètres ont été étudiés. Le premier est la vitesse de translocation des polynucléotides à travers le nanopore. Le second paramètre est la barrière d'énergie entropique (U) d'entrée de la macromolécule à l'intérieur du pore.

Le passage de deux types de polynucléotides, acide polyAdénylique sel de potassium (polyA) (P9403 Sigma) (polydispersité de 600 à 4000 bases) et acide polyCytidylique sel de potassium (polyC) (P4903 Sigma) (polydispersité de 600 à 4000 bases), à travers le pore a été étudié sous l'effet d'un champ électrique de l'ordre de 10^{-7} V m^{-1} . La concentration en polynucléotides est de $5 \cdot 10^{-12} \text{ mg mL}^{-1}$, en solution NaCl 150 mM, ou 500 mM, le pH est ajusté à 8. Ces concentrations représentent des distances de Debye de 0,85 et 0,4 nm, respectivement.

Les polynucléotides sont placés du côté *cis* de la cellule. Un voltage positif est appliqué du côté *trans* de la cellule (Figure 65). La direction du flux électroosmotique dans un nanopore en SiN natif est gouvernée par les cations, et donc dirigée vers l'électrode négative, à l'inverse du flux de polynucléotides.

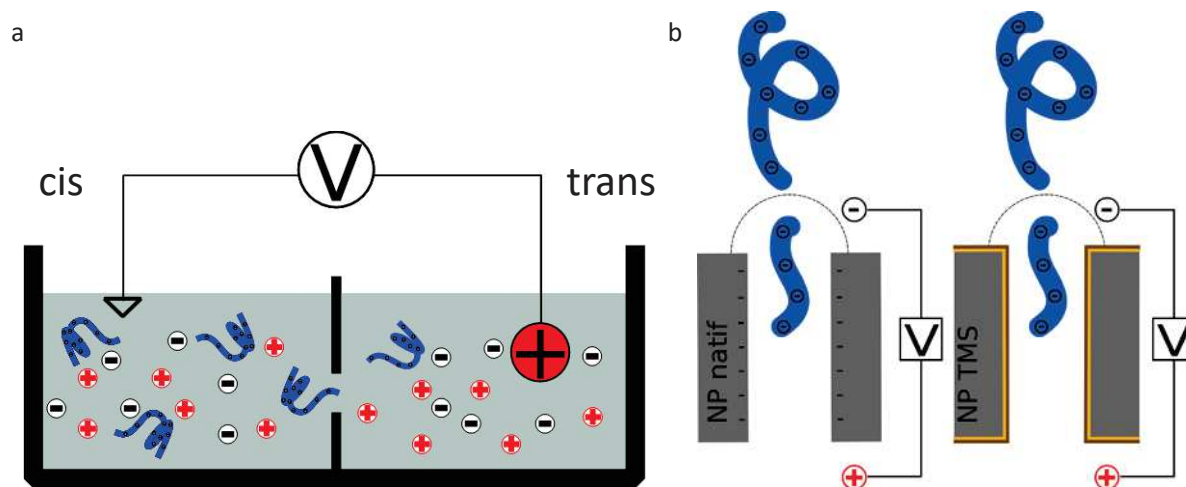


Figure 65: a. Schéma expérimental de la cellule, b. Schéma représentatif du passage des polynucléotides dans les deux nanopores

1.3. Détection de polynucléotides

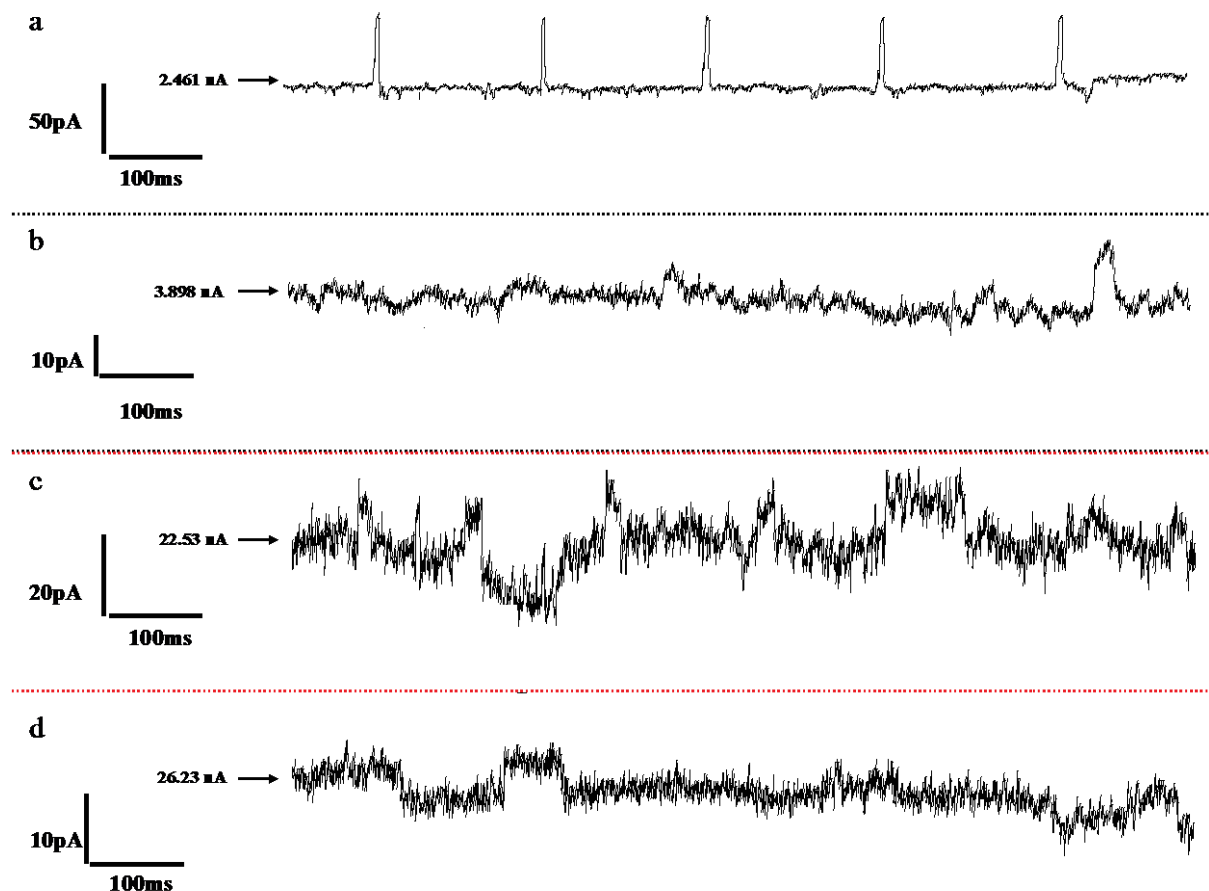


Figure 66: Exemples de traces de courant à 1 V en présence de polyA. a. SiN natif à 150 mM NaCl, b. SiN natif à 500 mM NaCl, c. SiN TMS à 150 mM NaCl et d. SiN natif à 500 mM NaCl

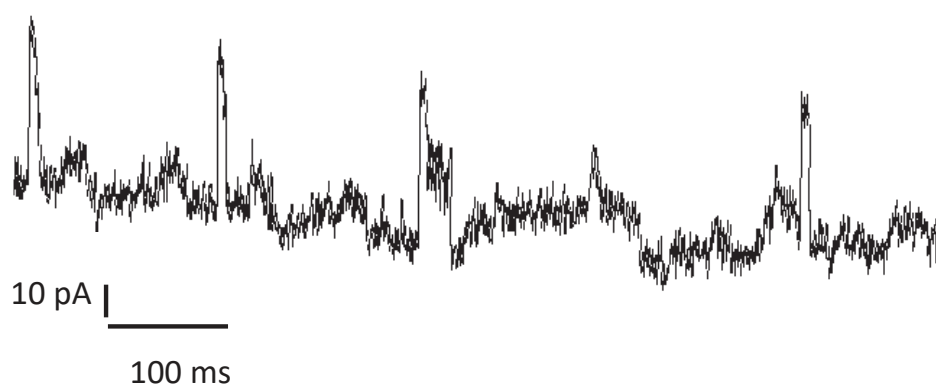


Figure 67 : Exemple d'une trace de courant lors du passage de polyC à travers le nanopore natif, sous 1 V, à 150 mM NaCl, et pH 8

Des traces de courant ont été reportées en (Figure 66 et Figure 67). Les perturbations de courant induites par les molécules ont été décrites par un modèle, où les diminutions de courant proviennent du blocage partiel du pore par la macromolécule, et les augmentations sont attribuées à une augmentation du flux

de contre-ions le long du polynucléotide pour respecter l'électroneutralité.^{120,242} Du fait du diamètre du nanopore et de la faible concentration en sel choisie, le passage des polynucléotides à travers le pore entraîne des augmentations de courant. (Figure 66 et Figure 67)

Il est avantageux de travailler avec des augmentations de courant puisque le passage de polynucléotides peut être différencié des blocages de courant induit par les événements dus :

- aux passages de polynucléotides devant le pore mais pas à travers²⁴⁵
- au mouillage-démouillage pour un pore hydrophobe²⁴⁶
- au blocage aléatoire du pore dû à des transitions entre les phases vapeur et liquide¹⁰⁰ prédit par la théorie pour des nanopores faiblement chargés.²²²

A partir de ces augmentations de courant, nous avons extrait les temps de passage du polynucléotide à travers le pore (Δt), l'intensité des augmentations de courant (ΔI) et le taux de capture (f).

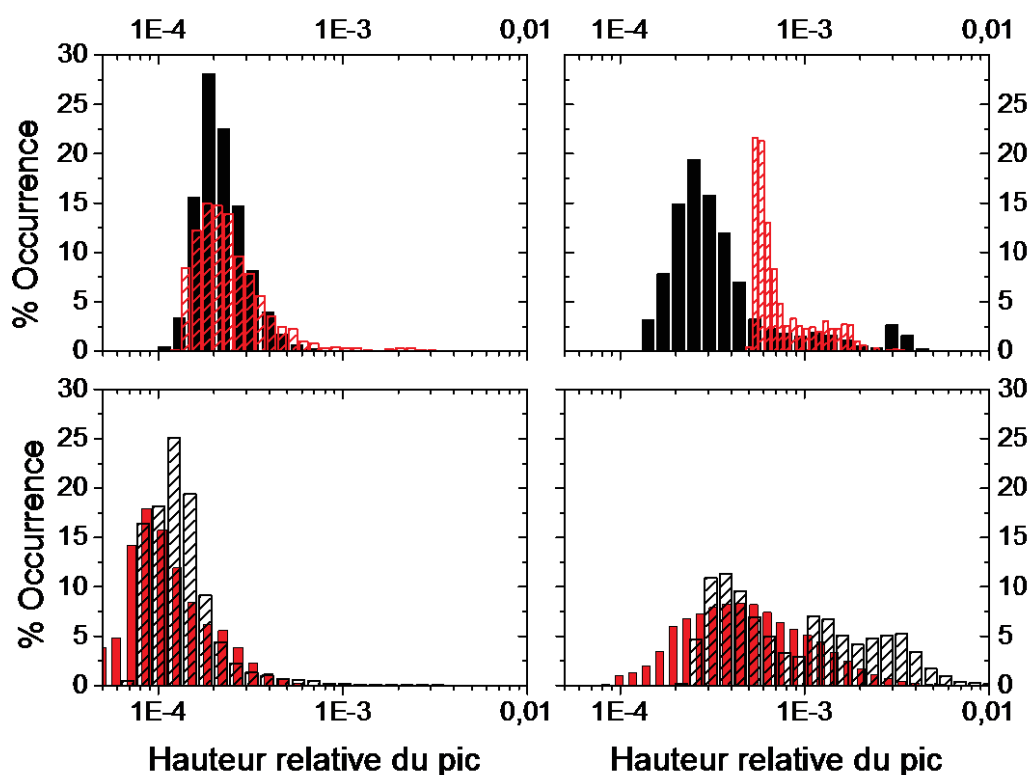


Figure 68 : Distributions des événements induits par le passage de polynucléotide à travers le pore à 1 V, colonne de gauche : à 150 mM NaCl, de droite : à 500 mM de NaCl. Pour le polyA NP-natif : histogrammes noirs, NP-TMS : histogrammes rouges hachurés. Pour le polyC NP-natif : histogrammes noirs hachurés, NP-TMS : histogrammes rouges

Nous allons nous intéresser tout d'abord au polyA. (Figure 68) A 1 V et 500 mM de NaCl, pour à la fois le pore natif et le pore TMS, les $\Delta I/I$ ont une distribution bimodale. Cependant la majorité des événements sont centrés autour de $2,5 \cdot 10^{-4}$ pour le nanopore natif et $5,38 \cdot 10^{-4}$ pour le nanopore TMS. A 1 V et 150 mM NaCl, les distributions de $\Delta I/I$ sont monomodales pour le pore natif et le pore TMS. Ceci

provient probablement du fait que les polynucléotides passent à travers le pore dans une conformation préférentiellement dépliée.^{120,247,248}

Table 6 : Détails des paramètres des augmentations de courant pour le poly A à 1 V

NP	Native-NP		TMS-NP	
Concentration NaCl (mM)	150	500	150	500
$\Delta I/I$ Hauteur relative du pic de courant	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$5,4 \cdot 10^{-4}$
Δt Temps de passage (ms)	1,24	2,61	6,75	4,38
Taux de capture (s^{-1})	31,65	6,09	4,98	3,12

En ce qui concerne les polyC, la hauteur relative des pics de courant ($\Delta I/I$) présente des distributions majoritairement monomodales à 150 mM de NaCl pour à la fois le pore natif et le TMS. (Figure 68)

Table 7 : Détails des paramètres des augmentations de courant pour les polyC

NP	Native-NP		TMS-NP	
Concentration NaCl (mM)	150	500	150	500
Hauteur relative du pic de courant	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$8,6 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$
Δt Temps de passage (ms)	1,3	4,5	3,5	10
Fréquence d'entrée (s^{-1})	15,8	6,2	13,7	11,8

Seul les polyC à 500 mM de NaCl présentent une distribution bimodale de la hauteur relative des pics de courant dans le pore natif. La distribution monomodale de la hauteur relative des pics de courant signifie que les polyA et polyC traversent le pore dans une conformation préférentiellement linéaire. Ceci peut être expliqué par la faible concentration en sel qui induit des distances de Debye assez proche du rayon du pore ($\lambda_D \sim 0,85$ nm et $\lambda_D \sim 0,4$ nm, pour 150 mM et 500 mM respectivement). De ce fait, le diamètre du pore accessible aux polynucléotides ne permettrait pas leur passage en conformation repliée.

Pour les polyA (Figure 69), à 1 V, 500 mM et 150 mM de NaCl, pour à la fois le pore natif et le pore TMS, les temps de passage (Δt) ont une distribution monomodale. A 150 mM de NaCl, le temps de passage moyen est plus long pour le pore TMS (6,76 ms) que pour le pore natif (1,24 ms). Nous pouvons faire la même observation à 500 mM de NaCl. Ceci signifie que la vitesse du polyA est plus rapide quand le nanopore a une charge négative. Pour les polyC, le temps de passage (Δt) présente des distributions majoritairement monomodales à 150 et 500 mM de NaCl pour à la fois le pore natif et le

TMS. Le temps de passage moyen est plus long dans le cas du NP- TMS, 3,5 ms à 150 mM NaCl ; 10 ms à 500 mM, que pour le pore natif, 1,3 ms à 150 mM ; 4,5 ms à 500 mM. Ceci montre que pour les polyC comme pour les polyA, leurs vitesses de passage à travers le pore est plus rapide si le pore et la molécule ont la même charge. Cette vitesse de passage peut être expliquée par la différence de mobilités à travers le pore entre les contre-ions et le polynucléotide. Un résultat semblable a été reporté dans le cas du passage de nanoparticules chargées négativement à travers un nanopore en PET ¹²⁶.

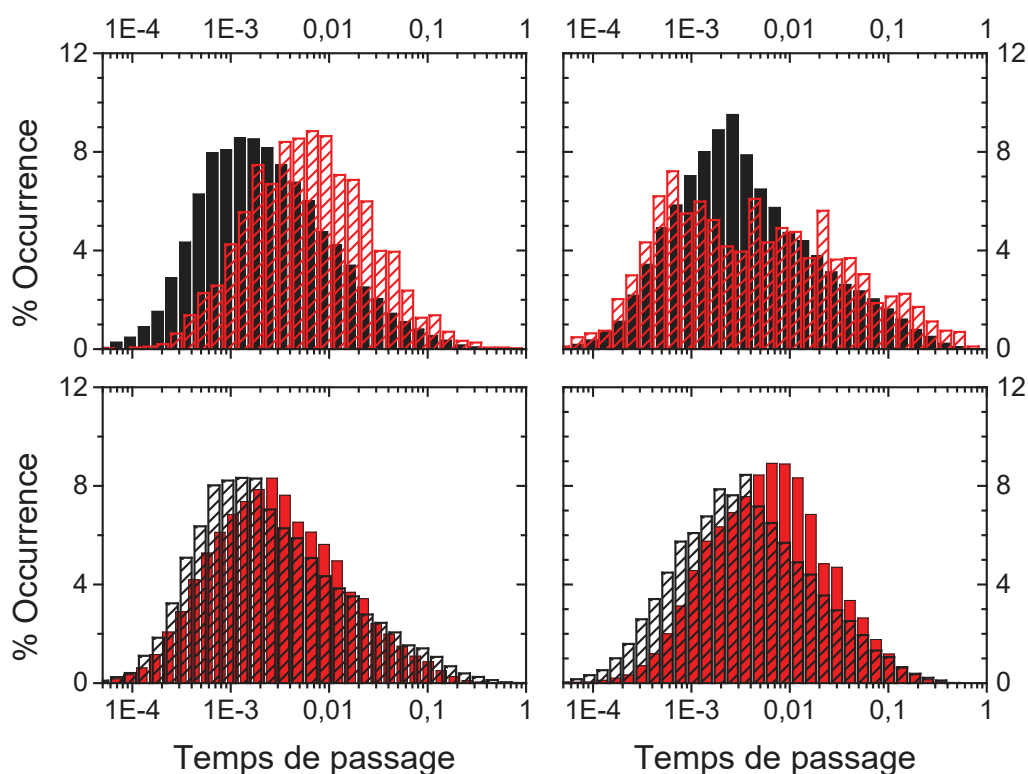


Figure 69: Distributions des évènements induits par le passage de polynucléotide à travers le pore à 1 V, colonne de gauche : à 150 mM NaCl, de droite : à 500 mM de NaCl. Pour le polyA NP-natif : histogrammes noirs, NP-TMS : histogrammes rouges hachurés. Pour le polyC NP-natif : histogrammes noirs hachurés, NP-TMS : histogrammes rouges

Nous nous intéressons maintenant à l'énergie d'entrée des polynucléotides à travers le pore. Dans nos conditions expérimentales (e.g. NaCl 150 mM, $V = 1$ V, pH 8) le terme zeV de l'éq 1.30 est le même pour toutes les expériences, pour un voltage donné puisque la charge de surface reste inchangée. De plus, les polynucléotides traversent les deux nanopores dans une configuration linéaire. Donc nous supposons que le terme entropique est le même pour les deux pores. Donc U devrait dépendre du terme électrostatique (U_{ES}), qui est fonction de la densité des charges de surface des polynucléotides et du nanopore ¹²⁶. Comme les polynucléotides sont globalement chargés négativement, nous nous attendrions à observer, dans un pore chargé négativement, une barrière d'énergie plus importante que dans le pore TMS, à cause des répulsions électrostatiques.

La (Figure 70) représente la fréquence d'entrée des polyA à l'intérieur du nanopore en fonction du voltage.

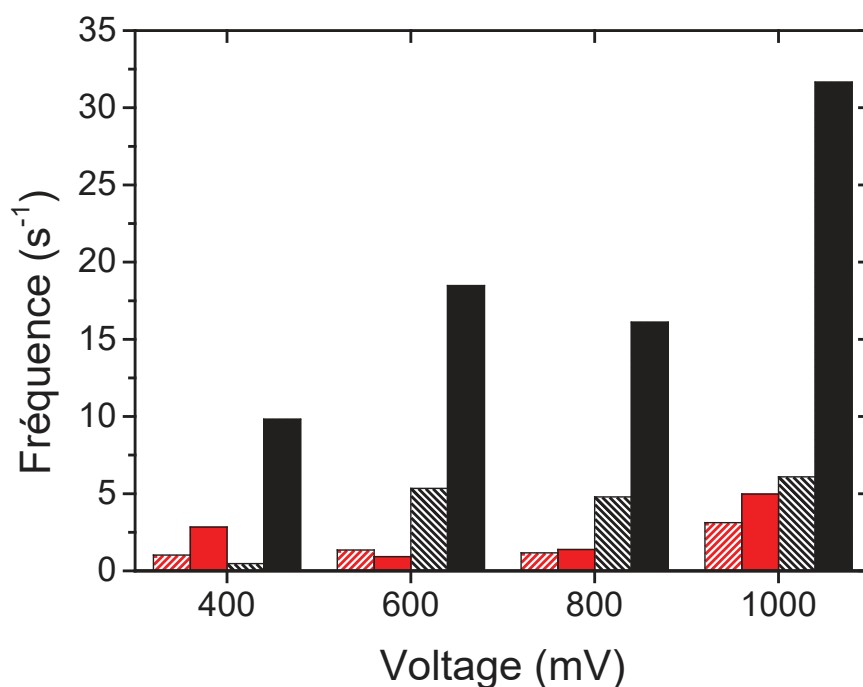


Figure 70: Fréquence d'entrée des polyA à travers le pore en fonction du voltage appliqué. SiN natif à 150 mM, colonnes noires pleines, SiN natif à 500 mM, colonnes noires hachurées, SiN TMS à 150 mM, colonnes rouges pleines, SiN TMS à 500 mM, colonnes rouges hachurées.

On peut remarquer que la fréquence augmente avec le voltage en accord avec (éq. 1.29), quelque soit les conditions de concentrations en NaCl ou de surface.²⁴⁹. A faible concentration en sel, l'énergie d'entrée est plus faible pour le pore négativement chargé que pour le nanopore non-chargé. Au contraire à 500 mM, l'énergie d'entrée des polynucléotides à travers le pore est peu influencée par la charge de surface. La fréquence d'entrée à 1 V et 150 mM NaCl pour le nanopore natif est de 30 s⁻¹, et pour le pore TMS, 5 s⁻¹.

A faible force ionique, nous observons un comportement similaire pour le polyC. La fréquence d'entrée la plus élevée des polyC est pour le nanopore natif à 150 mM, (16 s⁻¹). Dans le cas du NP- TMS, le rôle de la force ionique est moins important, (13 s⁻¹) à 150 mM et (12 s⁻¹) à 500 mM. (Figure 71)

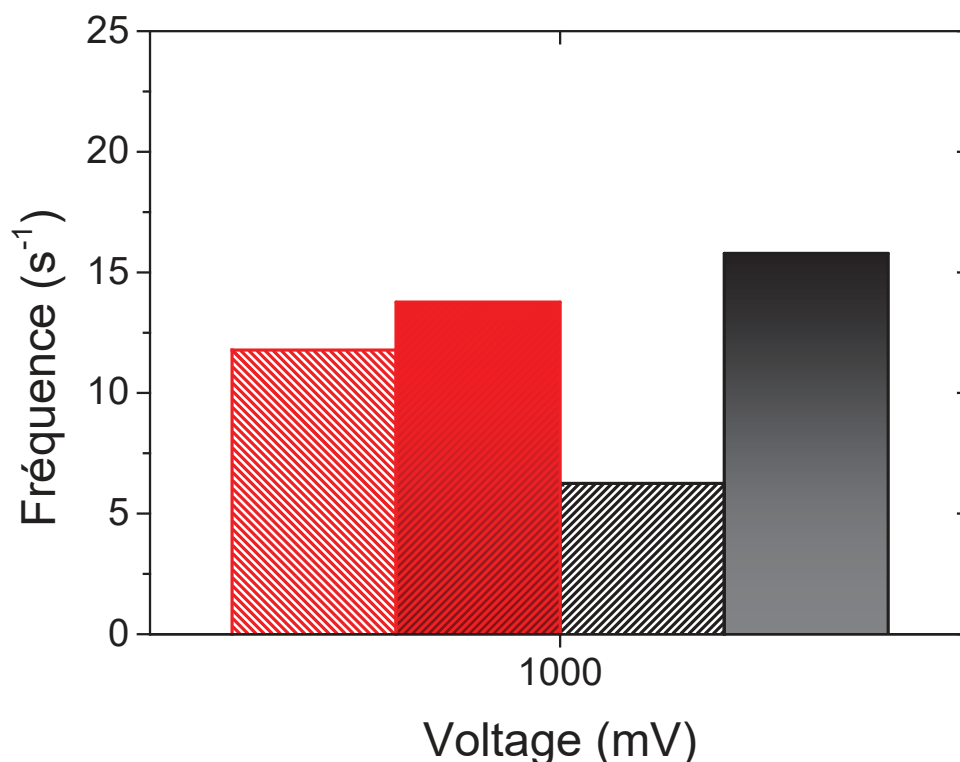


Figure 71 : Fréquence d'entrée des polyC à travers le pore en fonction du voltage appliqué. SiN natif à 150 mM, colonnes noires pleines, SiN natif à 500 mM, colonnes noires hachurées, SiN TMS à 150 mM, colonnes rouges pleines, SiN TMS à 500 mM, colonnes rouges hachurées.

Pour finir, nous avons comparé le passage à l'intérieur du pore de la poly-adénosine par rapport à la poly-cytosine. (Figure 72) Nous pouvons facilement remarquer qu'il y a une influence de la surface sur la fréquence d'entrée à faible force ionique. En effet quand la surface est chargée négativement, les polyA sont capturés plus facilement dans le pore, alors que lorsque le pore est non chargé, la barrière d'énergie est très forte. Quand nous nous intéressons au cas du polyC, ces différences sont moindres, et la macromolécule n'a qu'à passer une barrière d'énergie moyenne comparée aux polyA. Ces résultats peuvent sembler contre-intuitifs. Deux paramètres peuvent les expliquer. Le premier est la distribution de l'électrolyte, des Na⁺ et des Cl⁻ à l'intérieur du pore. Le deuxième est l'interaction entre les polynucléotides et la surface du pore.

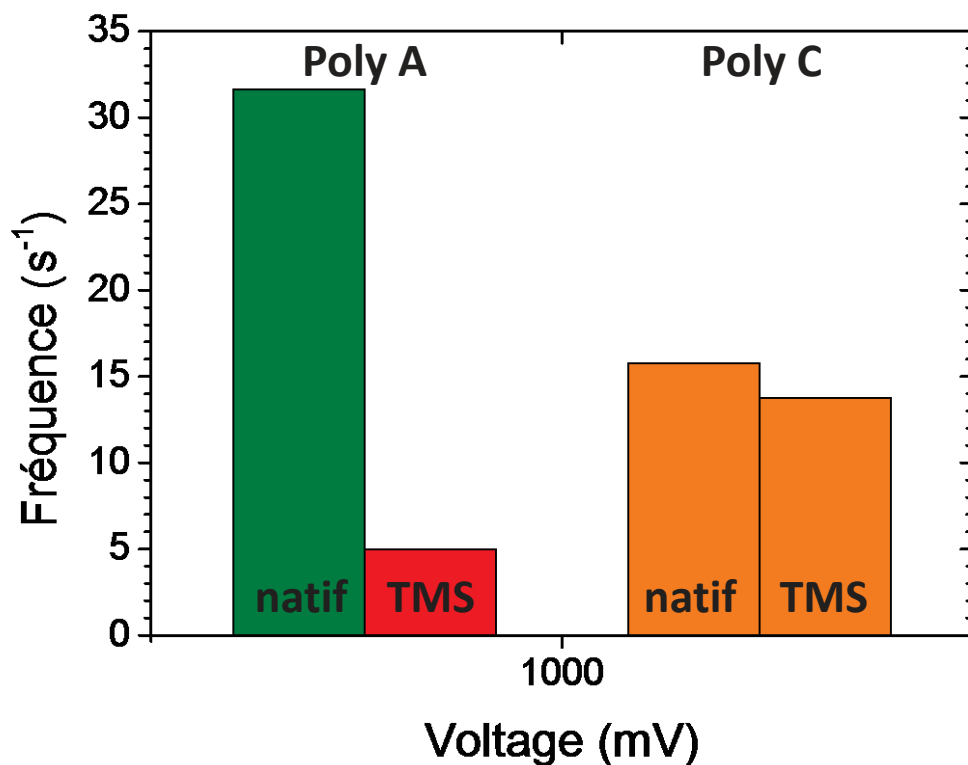


Figure 72: Comparaison de la fréquence d'entrée des polyA et polyC à l'intérieur du NP- natif et du NP-TMS à 1 V, 150 mM NaCl

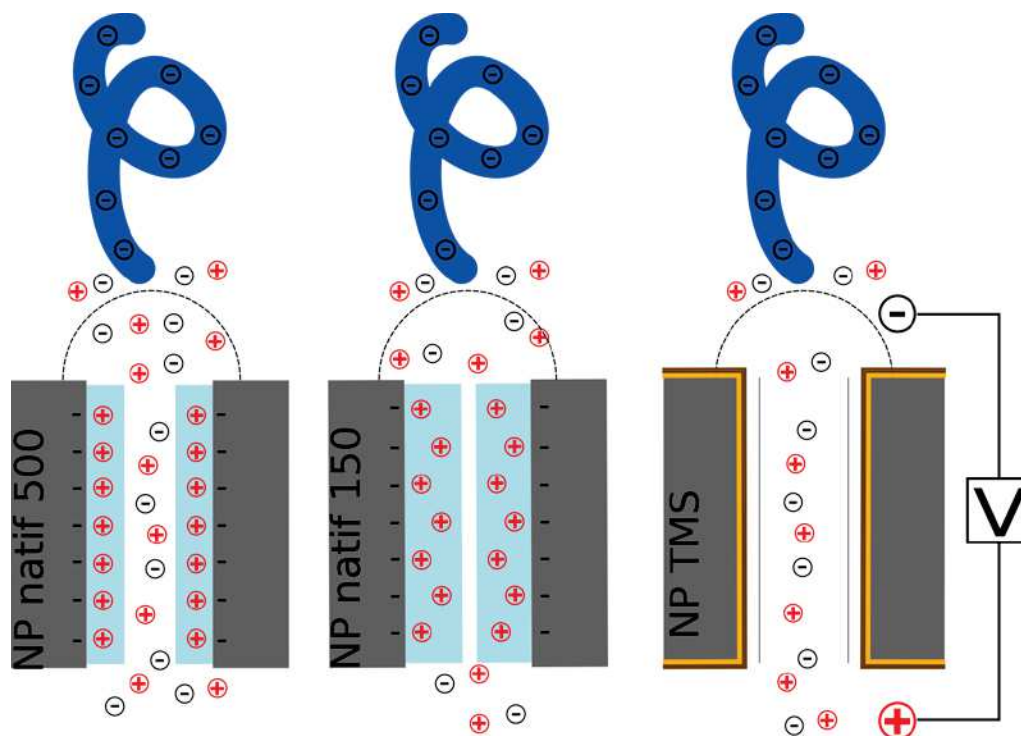


Figure 73: Schéma représentatif du passage du polynucléotide à travers les différents pores en fonction de la concentration en sel. Le polynucléotide est représenté par le polymère négativement chargé, bleu. Les cations rouges représentent les ions sodium et les charges négatives, les anions de chlore.

La première hypothèse pour interpréter les résultats est liée à une forte implication des contre-ions. (Figure 73) Il a été précédemment montré que les électrolytes qui sont à l'origine du flux électroosmotique peuvent avoir un rôle majeur dans le passage de macromolécules à travers un pore.^{122,239,241} Dans le cas d'un pore chargé négativement, pour respecter l'électroneutralité, il y a un excès de charge positive. Cet excès est d'autant plus important que la concentration est faible. Les contre-ions se déplacent en direction opposée des polynucléotides, et créent à l'entrée du nanopore une zone enrichie en charge positive. Le polynucléotide lorsqu'il arrive près du pore, serait ainsi capturé plus facilement à cause des effets attractifs.

Ensuite, le polymère lorsqu'il arrive près du pore, a besoin de se déplier, car le diamètre effectif dans lequel le polynucléotide peut traverser le pore est d'environ 1,5 nm (longueur de Debye 0,8 nm pour 150 mM NaCl). Durant cette phase, il bouche en partie le pore empêchant les anions du côté *cis* de traverser le pore, et peut créer ainsi une rupture de l'électroneutralité qui favoriserait son entrée dans le nanopore. La vitesse plus importante de passage des polynucléotides à travers le pore natif, par rapport au pore TMS, serait probablement liée à ces effets.

Il est à noter que l'interprétation précédente ne prend pas en compte la possible adsorption des polynucléotides sur la surface à l'entrée du nanopore. Le SiN a un potentiel zêta négatif pour des pHs supérieurs à 3²⁵⁰ et donc il serait peu probable que les polynucléotides s'adsorbent à la surface, à cause des répulsions électrostatiques. Pour le nanopore TMS, la possibilité d'adsorption des polynucléotides doit être prise en compte, en effet le verre silanisé est utilisé pour le peignage de l'ADN.²⁵¹ Pour évaluer l'adsorption des polynucléotides, ces derniers sont marqués avec un colorant, BOBOTM-3 Iodine (Life Technology B3586), et déposés sur des surfaces planes de SiN et de SiN-TMS. L'émission de fluorescence émise par les polynucléotides marqués, adsorbé en surface (incubation 30 min) est mesurée par spectroscopie de fluorescence confocale.²²⁵ Comme attendu, aucune adsorption de polynucléotide n'est observée pour le SiN natif, ce qui n'est pas le cas du SiN-TMS. Nous ne pouvons donc pas négliger le fait que l'adsorption des polynucléotides joue un rôle sur l'augmentation de la barrière d'énergie. Enfin la différence observée entre les polyA et les polyC pourrait être expliquée soit par la différence de conformation des deux polynucléotides lors de leurs passages, et donc une différence de la composante entropique, soit par une affinité avec la surface et donc une adsorption plus importante.

1.4. Influence sur la barrière entropique d'ions chélatants, exemple du magnésium

Dans le but de déterminer si les comportements précédemment observés sont liés à la barrière entropique et au potentiel électrostatique, nous avons étudié le passage de polyA à travers les mêmes nanopores en

présence d'un agent chélatant, le magnésium. Ce dernier devrait induire une augmentation caractéristique de la barrière entropique car le dépliement des polynucléotides sera plus difficile.^{252,253} De plus les interactions du magnésium avec la chaîne oses-phosphates entraîne une diminution de la charge effective.²⁵⁴ Donc expérimentalement, nous devrions observer une forte diminution de la fréquence d'entrée du polymère dans le nanopore.²⁵⁵ L'influence de la concentration en magnésium sur la fréquence d'entrée des polyA a été étudiée à 150 mM de NaCl sous 1 V. (Figure 74)

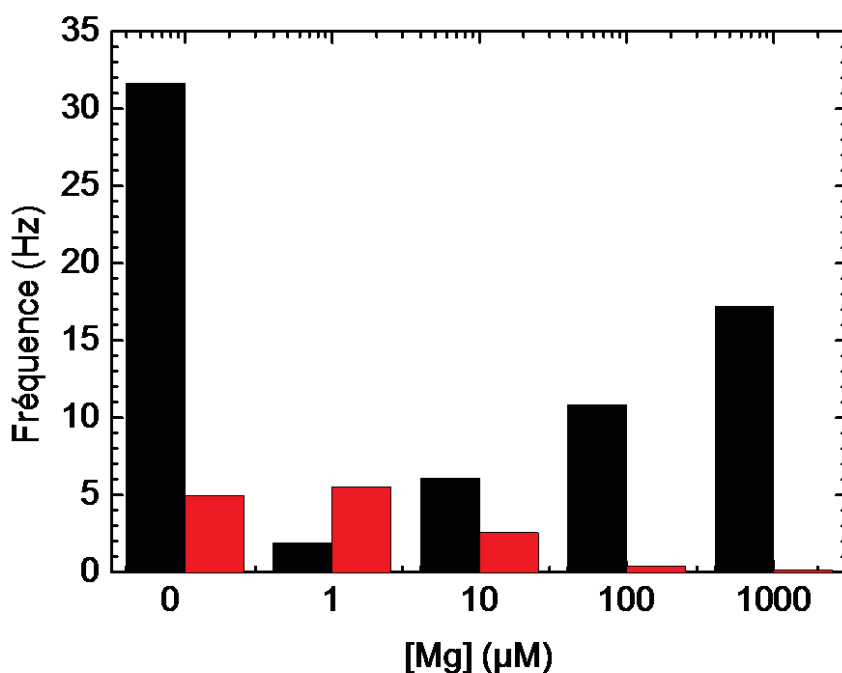


Figure 74: Evolution de la fréquence d'entrée des polyA à l'intérieur du pore natif (en noir) ou TMS (en rouge) en fonction de la concentration en Mg^{2+}

En présence de magnésium, la fréquence d'entrée des polyA diminue pour les deux nanopores. Pour le nanopore non chargé, la diminution de la fréquence d'entrée suit l'augmentation de la concentration en Mg^{2+} . Ce résultat est attendu car la chélation des polyA augmente la composante entropique de la barrière d'énergie. Pour le nanopore natif le comportement est différent. A 1 μM , la fréquence diminue drastiquement de 30 s^{-1} à 2 s^{-1} . Cependant, avec l'augmentation de la concentration de Mg^{2+} , la fréquence augmente. Ceci pourrait être expliqué par le fait, que le Mg^{2+} vont remplacer les cations monovalent de la couche de Stern.^{256,257} Les Mg^{2+} vont créer une couche positive le long de la surface, amenant une inversion de charge à la surface du pore.²⁵⁸ Le polymère est chargé négativement, même si le dépliement est plus difficile, à cause des ions Mg^{2+} , le pore est positivement chargé, et attire les polyA. Dans ce cas, l'augmentation de la barrière entropique, due au processus de chélation, serait contrebalancée par une inversion de charges à la surface du nanopore. (Figure 75)

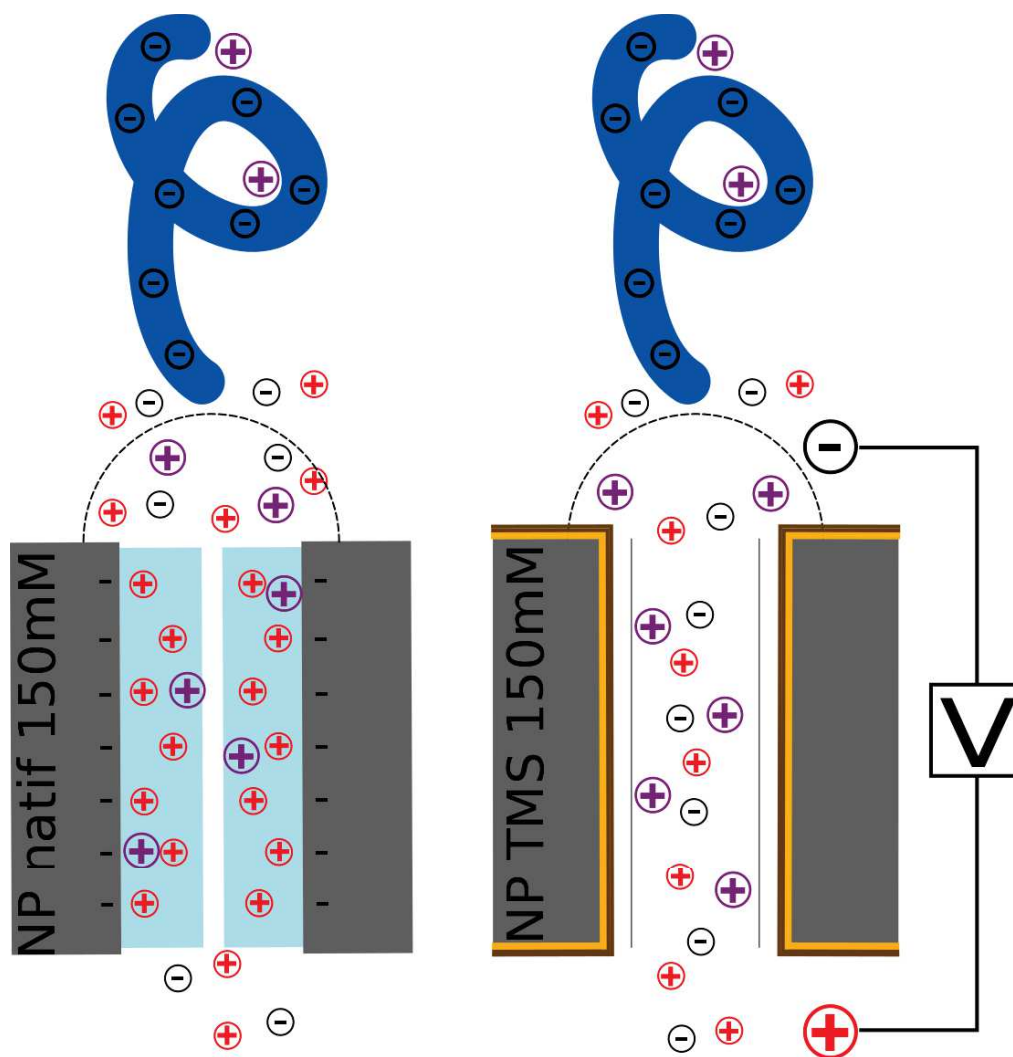


Figure 75 : Schéma représentatif du passage du polyA à travers les différents pores après addition d'un agent chélatant. Le polyA est représenté par le polymère négativement chargé, bleu. Les cations de magnésium sont représentés par les charges positives violettes, les rouges sont pour les ions sodium et les charges négatives représentent les anions de chlore.

2. Détection d'ADN simple et double brins, courts, par des mesures de courant électrique en utilisant des nanopores coniques recouvert d' Al_2O_3 par dépôt de couche atomique

Pour la détection d'ADN, les nanopores les plus utilisés sont en SiN à cause de leur faible rapport d'aspect. Cependant, une des limitations majeures provient des temps de passage très court à l'intérieur du pore. Il est donc difficile de détecter des brins de moins de 100 bases. Pour résoudre ce problème la solution envisagée a été l'utilisation d'un amplificateur rapide, il a permis de détecter des brins de 35 paires de bases.²⁵⁹ Toutefois l'augmentation de la fréquence d'échantillonnage entraîne une augmentation du bruit.

Pour augmenter le rapport signal sur bruit, une couche d'oxyde d'aluminium peut ainsi être déposée à la surface, pour la passiver.⁶⁸ Elle permet aussi de diminuer la vitesse de passage des molécules.³⁰ Une autre solution serait l'utilisation de nanopore de fort rapport d'aspect (longueur micrométrique) pour diminuer le champ électrique dans le pore. Cette solution ne permet pas de détecter facilement des petits nucléotides car la résistance qu'ils induisent dans le nanopore est négligeable par rapport à celle du nanopore. Un bon compromis serait donc d'utiliser des nanopores coniques. Ainsi en utilisant cette technique, nous pourrions détecter plus facilement les modifications de courant induites par le passage de brins d'ADN court à travers le pore.

2.1. Passivation par couche d'oxyde d'aluminium

Pour cette étude nous avons utilisé des nanopores coniques en PET, obtenus par la technique de la trace latente. Un des désavantages de ce pore est lié aux fortes fluctuations de courant, due aux mouvements des chaînes libres terminales du PET.^{60,260} Pour palier à ce problème une couche d' Al_2O_3 est déposée sur la surface du pore, ce qui permet également d'ajuster le petit diamètre du pore. Enfin l' Al_2O_3 permet d'augmenter le rapport signal sur bruit et de ralentir encore les polynucléotides.

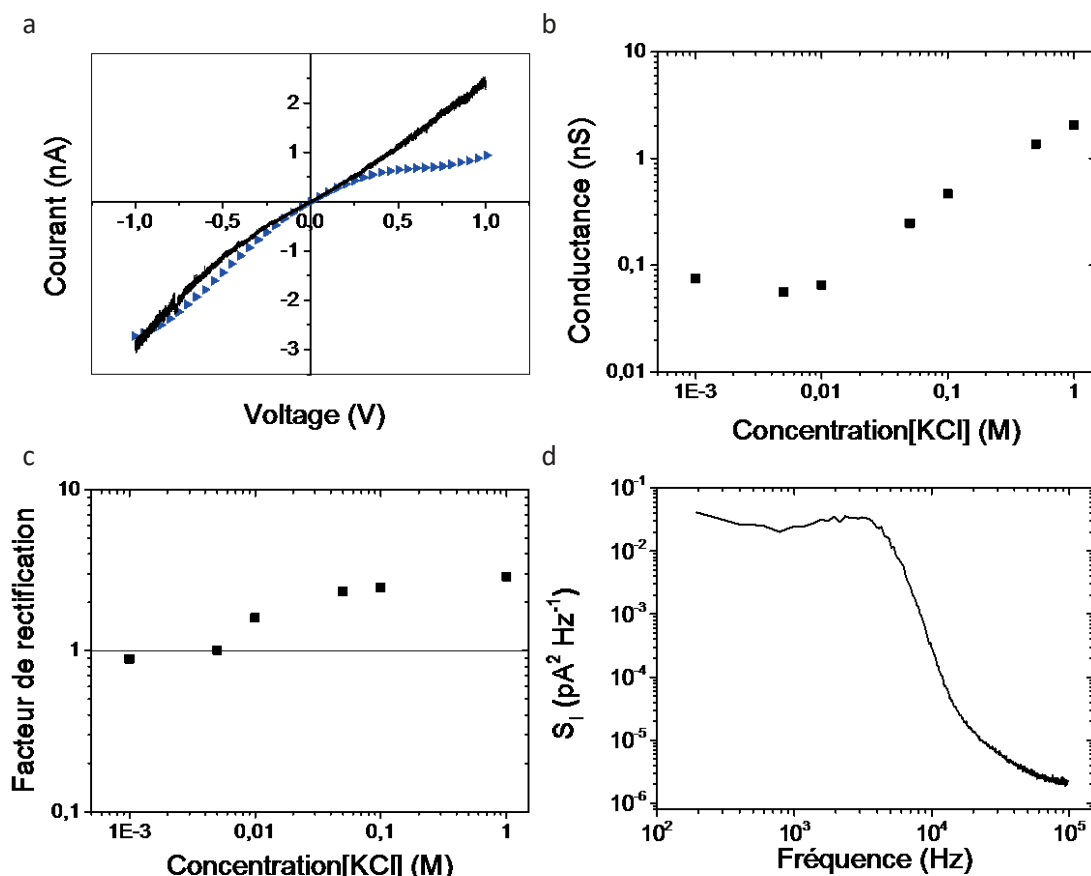


Figure 76: Transport ionique du nanopore. a. Courbe I-V avant (noir) et après (bleu) le dépôt de la couche d' Al_2O_3 par ALD, b. Conductance en fonction de la concentration en KCl à pH 8,4, c. Facteur de rectification pour le nanopore recouvert d' Al_2O_3 en fonction de la concentration en KCl à pH 8,4, d. Densité spectrale de puissance en fonction de la fréquence pour un nanopore conique à 500 mV, enregistrée à 200 kHz, filtrée à 10 kHz dans une solution de KCl 1 M, Tris 10 mM, et EDTA 1 mM, à pH 8,4

Après ouverture, le nanopore a un petit diamètre d'environ 3 nm et un large diamètre d'environ 225 nm. Après deux cycles d' Al_2O_3 d'épaisseur 0,2 nm chacun, le petit diamètre est réduit à 2,2 nm. (Figure 76a) Il a été démontré que le point isoélectrique de l' Al_2O_3 est d'environ 5.²⁶¹ Les expériences concernant le passage de l'ADN à travers un pore s'effectuent généralement à pH 8,4 à travers un pore de charge négative. En effet, un pore négatif semble augmenter le taux de capture de l'ADN comparé à un pore positif²⁶² ou hydrophobe.¹³⁶ Dans le but de confirmer la charge de surface, la conductivité ionique du pore est étudiée à pH 8,4. La conductance du KCl (G_{KCl}) suit deux régimes, le premier est constant à basse concentration, $[\text{KCl}] < 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, et un deuxième à peu près linéaire qui augmente à plus haute concentration $[\text{KCl}] > 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (Figure 76b) ce qui est typiquement observé pour des nanopores chargés. Cependant à ce stade, la présence de charge ne peut être prouvée, car un pore non chargé peut avoir le même comportement.⁹⁸ Donc, afin de pouvoir confirmer la présence de charge à la surface du nanopore, le facteur de rectification a été analysé. Les résultats obtenus, reportés dans la Figure 76c montrent clairement une augmentation du facteur de rectification avec la concentration en KCl. Ce

comportement est clairement l'opposé de ce que l'on observe dans le cas d'un pore natif en PET.²⁶⁰ Ceci confirme que, le dépôt de la couche d' Al_2O_3 a réussi. Il est à noter que la couche d' Al_2O_3 déposée sur le pore est stable jusqu'à pH 10.

Afin de compléter la caractérisation du pore, les densités spectrales de puissance sont étudiées. (Figure 76d) Contrairement aux SiN, les nanopores en PET présentent une densité spectrale plus faible et donc des signaux moins bruités. Afin d'optimiser le rapport signal sur bruit, pour pouvoir observer un maximum d'événements en présence de macromolécules, il est préférable d'observer tout d'abord le signal obtenu uniquement par la solution d'électrolyte.²⁶³ La densité spectrale de puissance (S_i) a été enregistrée dans les conditions expérimentales utilisées pour la détection d'ADN, c'est-à-dire dans une solution de KCl 1 M, Tris 10 mM et EDTA 1 mM, à pH 8,4. La faible valeur de la densité spectrale de puissance peut être assignée à la faible constante diélectrique du PET.

2.2. Détection et discrimination grâce aux blocages de courant et temps de résidence

La détection de petits brins d'ADN a été réalisée du petit vers le grand côté du nanopore en solution tampon KCl 1 M, Tris 10 mM, et EDTA 1 mM, à pH 8,4. Les brins d'ADN sont ajoutés du côté du petit diamètre et un voltage positif (500 mV) est appliqué du côté *trans* du pore. Ce voltage a été choisi en tant que bon compromis entre la stabilité du courant, et une détection possible des blocages de courant. Pour cette étude nous avons utilisé deux types de polynucléotides. Des homo-polythymidylates, constitué de 10 ou 40 bases (T_{10} et T_{40}), et des homo-polyadénosines, constitué de 10 ou 40 bases (A_{10} et A_{40}). Pour l'étude d'ADN double brin, des mélanges de polynucléotides avec leurs brins complémentaires ont été préparés par simple addition puis ajoutés dans la demi-cellule côté *cis*. Des traces de courant caractéristiques ont été enregistrées pour le contrôle et les échantillons de T_{40} , A_{40}/T_{40} , A_{10}/T_{10} .

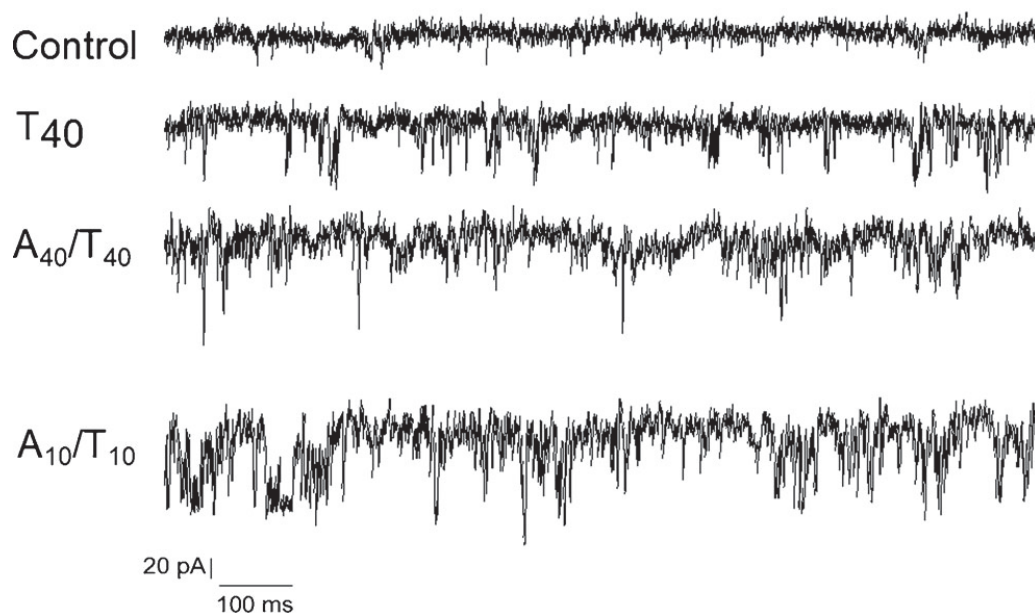


Figure 77: Exemples de traces de courant obtenues sans ADN (noté control), et avec les différents échantillons T₄₀, A₄₀/T₄₀, A₁₀/ T₁₀

Tous les échantillons ont pu être détectés en utilisant notre nanopore. Ceci a été possible car ce nanopore a un petit diamètre optimisé pour la détection. Des tests effectués sur des nanopores plus larges (petit diamètre supérieur à 6 nm) n'ont pas permis de détecter les polynucléotides simples et doubles brins. Des blocages de courant, le temps de résidence (Δt) et le blocage de courant relatif ($\Delta I/I$) ont été extraits. Les histogrammes sont représentés dans la (Figure 78).

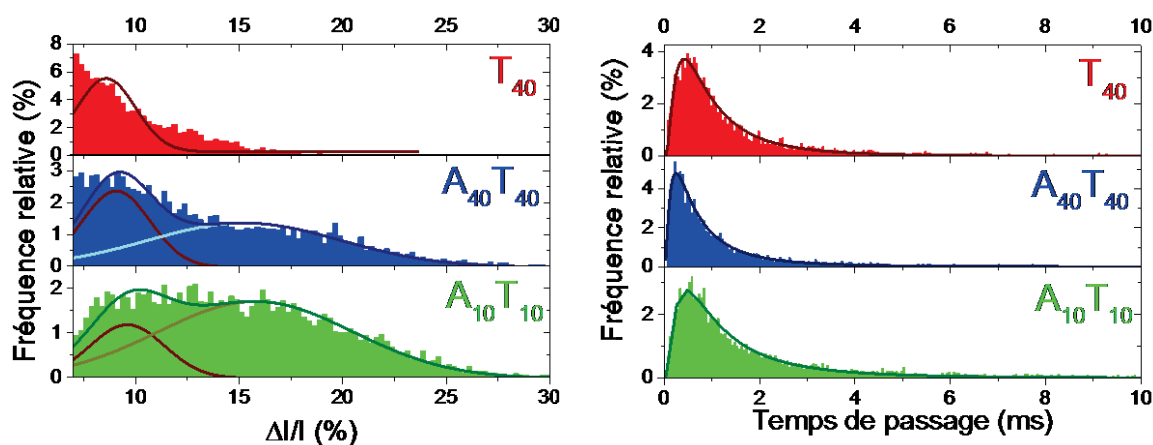


Figure 78: Histogrammes des paramètres des événements, a. Temps de résidence b. Blocages relatifs de courant

Pour déterminer la valeur moyenne de chaque distribution, le temps de résidence est ajusté en utilisant une loi normale logarithmique, et les blocages de courant relatifs sont ajustés par une fonction gaussienne. Pour les ADN simples brins T₄₀ les distributions sont monomodales pour à la fois le temps

de résidence (0,86 ms) et pour les blocages relatifs de courant (8,5 %). En ce qui concerne les ADN doubles brins les distributions pour les blocages de courant sont clairement bimodales (Figure 78a). Cette distribution bimodale peut être expliquée par la différence de géométrie (complètement déplié ou plié) de l'ADN quand il entre à l'intérieur du pore. Cependant cette hypothèse paraît peu probable, à cause du diamètre du pore, qui ne permet pas un passage de l'ADN dans une conformation repliée.

Table 8: Valeurs moyennes des histogrammes des événements

Echantillons	Temps de résidence (ms)	Blocage relatif de courant $\Delta I/I$ (%)	
T₄₀	0,86	8,5	-
A₄₀/T₄₀	0,65	9,06	15,24
A₁₀/T₁₀	1,07	9,60	15,79

Une autre explication peut être envisagée. Les doubles brins ont été obtenus par un simple mélange des simples brins complémentaires, polyA et polyT. Dans ce cas, nous obtenons donc un mélange à l'équilibre entre les doubles et les simples brins qui ne se sont pas couplés. Les valeurs faibles de blocages relatifs de courant, 9,06 % pour A₄₀/T₄₀ et 9,60 % A₁₀/T₁₀, seraient dues aux simples brins d'ADN, puisque proches de celle obtenues pour T₄₀ (8,5 %). Pour les ADN doubles brins, la valeur du $\Delta I/I$ serait plus élevée, aux alentours de 15 %, puisque le diamètre des doubles brins est supérieur à celui des simples brins, et donc occupe plus d'espace à l'intérieur du pore. Nos résultats sont cohérents avec une étude précédente sur le passage de l'ADN double brin à travers un pore conique (petit diamètre 4 nm) qui a montré des blocages relatifs de courant de 15 à 30 %.²⁶⁴

Contrairement aux $\Delta I/I$, la distribution des Δt pour les ADN doubles brins ne présente pas clairement de distribution bimodale. Cependant, les distributions sont centrées autour de 0,65 ms pour A₄₀/T₄₀ et 1,07 ms pour A₁₀/T₁₀. Pour mieux comprendre la distribution du temps de résidence, nous avons cartographié les événements, leurs temps de résidence en fonction de blocage relatif de courant.

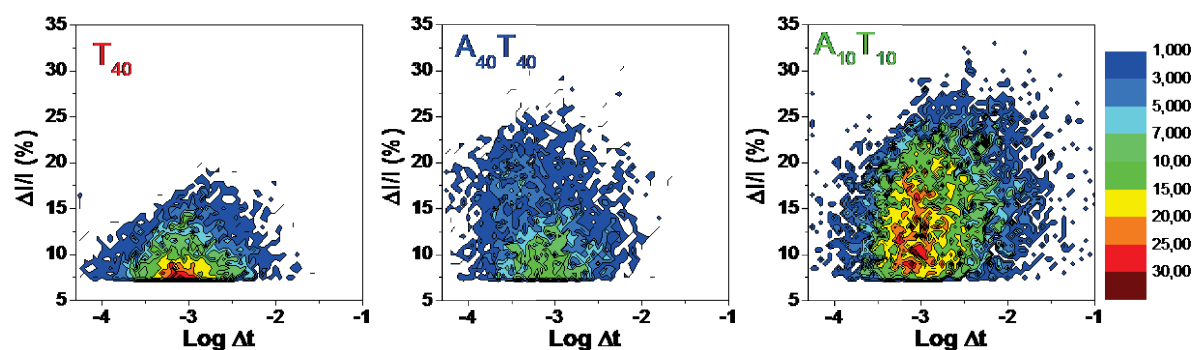


Figure 79 : Cartes des événements, temps de résidence en fonction des blocages relatifs de courant.

En accord avec nos hypothèses précédentes, les événements à faibles $\Delta I/I$ sont considérés comme étant le passage des ADN simples brins. Une valeur limite de 13 % peut être estimée grossièrement en accord avec les résultats obtenus pour T_{40} . Donc, le temps de résidence pour des $\Delta I/I > 13\%$, sont d'environ 0,3 ms pour A_{40}/T_{40} et 1,5 ms pour A_{10}/T_{10} , respectivement plus court et plus long que pour l'ADN simple brin (0,86 ms). Ce résultat semble contre-intuitif quand nous le comparons à la littérature. En effet il est couramment reporté une augmentation du temps de résidence avec l'augmentation de la longueur de chaîne de l'ADN.²⁵⁹ Toutefois la plupart des études du passage de l'ADN dans un nanopore solide se font dans du SiN, d'épaisseur environ 30 nm correspondant à une longueur d'ADN déplié d'environ 90 paires de bases. Pour de l'ADN de plus de 100 paires de bases, sa longueur est supérieure à celle du pore et donc le facteur déterminant pour le temps de résidence est la longueur de l'ADN. Dans notre cas les longueurs des ADN dépliés sont de 13,2 nm pour A_{40}/T_{40} et 3,3 nm pour A_{10}/T_{10} . La détection de l'ADN s'effectue dans la zone du nanopore où le diamètre est suffisamment petit, pour induire un blocage significatif. Si l'on fait l'hypothèse que ce diamètre doit être inférieur à 6 nm, la longueur de détection correspondante est de 158 nm, ce qui est plus de 10 à 30 fois supérieur à la longueur des brins. Donc, le paramètre qui gouverne le temps de résidence est la vitesse de l'ADN, qui dépend de son nombre de charges. Ainsi, le temps de passage de l'ADN à l'intérieur du pore diminue avec l'augmentation du nombre de charges et donc l'augmentation du nombre de nucléotides, ce qui est cohérent avec nos résultats.

L'utilisation d'un nanopore de fort rapport d'aspect conique, et un champ électrique faible permet une forte augmentation du temps de résidence qui permet la détection d'ADN de 40 et 10 paires de bases avec des temps respectifs de 0,65 ms et 1,07 ms. Cependant, ce résultat est à prendre avec précaution car les blocages relatifs de courant, sont inférieurs à 20 %, ce qui rend la détection difficile.

2.3. Rapport signal sur bruit

Due à ces faibles blocages relatifs de courant, nous nous sommes intéressés au rapport signal sur bruit (SNR : signal to noise ratio). Il peut être calculé grâce à (eq4.1):²⁶³

$$SNR = \frac{|\Delta I|}{I_{\text{bruit, moyenne quadratique}}} = \frac{|\Delta I|}{I_{\text{bruit, RMS}}} \quad (\text{eq 4.1})$$

où $I_{\text{bruit, RMS}}$ (RMS : root mean square) est calculé à partir de la moyenne quadratique de l'intégrale de la densité spectrale de puissance (Figure 76d).

Les SNR pour l'ADN double brin et simple brin sont de 4,16 et 2,3 respectivement. Ces valeurs sont plus faibles que celle obtenues pour les pores de faible rapport d'aspect en SiN. En effet pour des conditions expérimentales semblables, concentration en sel, 1 M KCl, et petit diamètre, 3 nm, le SNR attendu est supérieur à 15.²⁶³ Dans notre cas, $I_{\text{bruit, RMS}}$ est de 12 pA, ce faible SNR est due aux faibles blocages de courant induits par le passage des brins courts. C'est également à l'origine du recouplement des distributions de $\Delta I/I$, dans le cas des simples et doubles brins d'ADN.

L'utilisation de ce type de nanopore ne serait pas approprié pour de l'analyse haute résolution, c'est-à-dire pour différencier des nucléotides, sans une forte amélioration du SNR. Il existerait plusieurs pistes pour améliorer le SNR. Une des méthodes peut être de diminuer le volume de la zone de détection. Ceci pourrait être réalisé avec des nanopores en forme de cigare.

3. Discussion

En adaptant la technique du compteur Coulter et donc de pulsation résistive adaptée au nanopore unique, nous avons pu détecter différents polynucléotides. Nous avons fabriqué et modifié différents types de nanopores avec des rapports d'aspects, des formes, et des états de surfaces différents. En jouant sur leurs diamètres et en modifiant leurs surfaces et leurs charges nous avons pu étudier les différents paramètres dynamiques qui régissent l'entrée d'une biomolécule chargée à l'intérieur d'un nanopore solide. Nous avons ainsi observé l'influence du voltage, de la force ionique, d'ions chélatants, et de la charge du pore sur le temps de latence et l'amplitude des blocages de courant lors du passage d'un polynucléotide à travers le pore. En modifiant l'état de surface et la géométrie des nanopores nous avons également réussi à réduire le problème du rapport signal sur bruit, et ainsi pu détecter de très courts brins d'ADN. En effet, en utilisant des pores de haut rapport d'aspect, nous avons augmenté le temps de passage des polynucléotides à travers le pore, ce qui permet de détecter ces derniers.

Nous avons conçu des nanopores solides de faible rapport d'aspect (diamètre ~ 4 nm, épaisseur 30 nm) avec différents états de surface (négatif et non chargé). Le passage des polynucléotides à travers ces pores a été étudié à de faibles concentrations en sel. Pour résumer, à 150 mM NaCl, la mobilité et la barrière énergétique dépendent fortement de la charge de surface du pore. En effet, la barrière énergétique est plus faible pour un pore chargé négativement, que pour un pore non-chargé. Ce résultat contre-intuitif peut être expliqué par l'excès de cations mobile, qui assure l'électroneutralité du pore. Ces ions créent une zone de capture à l'entrée du nanopore. Toutefois, les phénomènes d'adsorption ne sont pas négligeables. Une différence a été observée entre les fréquences d'entrée pour les polyA et les polyC. Elles pourraient être expliquées soit par la différence de conformation des deux polynucléotides, soit par une différence d'affinité avec la surface. Une analyse plus fine en utilisant de la dynamique

moléculaire par exemple pourrait expliquer ces résultats expérimentaux. L'ajout d'un agent chélatant (Mg^{2+}) aux polyA, diminue la barrière d'énergie comme attendu, indépendamment de l'état de surface du nanopore. Ceci est dû à l'augmentation de l'énergie requise pour déplier le polynucléotide. Cependant, quand la concentration en magnésium augmente, nous pouvons observer une diminution de la barrière énergétique pour le pore chargé négativement, qui est probablement liée à une inversion de charge.

Dans un deuxième temps, nous avons fabriqué un nanopore conique, dont nous avons passivé la surface par déposition d' Al_2O_3 en utilisant la technique d'ALD. Cette méthode nous permet d'ajuster le diamètre et la charge du pore dans le but d'optimiser la détection de l'ADN. Grâce à ce pore optimisé, nous avons pu détecter avec succès des brins d'ADN courts, ceux de 40 bases en brins simples, ainsi que ceux de 10 et 40 paires de bases, dans des concentrations faibles de 10 nM. Les temps de passage sont respectivement de 0,85, 1,07 et 0,65 ms. Ceci est possible grâce à la longueur du pore, 13 μm , et à la passivation par Al_2O_3 , qui permettent de diminuer la vitesse de passage de l'ADN à travers le nanopore. En ce qui concerne les ADN doubles brins qui sont préparés *in-situ* avant la détection, nos résultats permettent de discriminer les brins d'ADN couplés ou seuls, en augmentant le SNR en modifiant la géométrie du pore. Cependant ce temps de passage long est contrebalancé par le faible ratio signal sur bruit de 4,16 pour l'ADN double brin et de 2,3 pour l'ADN simple brin.

Les nanopores en polymères ont l'avantage d'être beaucoup plus facile à manipuler que les pores biologiques. Ils ne nécessitent pas l'utilisation de bicouches phospholipidiques. De plus, ils sont beaucoup plus robustes que les pores en SiN ou graphène, étant donné qu'il n'y a pas de risque de casser la couche suspendue. Enfin le nanopore est extrêmement stable, il peut être utilisé pendant plus de 3 semaines sans dommage.

Chapitre 5.

Détection d'agrégats d'amyloïdes par nanopores fonctionnalisés

L'objectif de ce chapitre est la détection de fibrilles d'amyloïdes de lysozyme par un nanopore fonctionnalisé. Le but de la fonctionnalisation est d'éviter l'adsorption non spécifique des protéines à la surface du pore, et en particulier à son entrée, pour empêcher l'obstruction du nanopore.

Dans ce chapitre nous avons choisi de greffer des chaînes poly-(éthylène glycol) (PEG) sur des nanopores coniques en PET obtenus par la technique de la trace attaquée. Ces nanopores modifiés présentent de nouvelles propriétés, telles qu'une surface plus hydrophile, et une diminution de la densité de la charge de surface. Nous nous sommes intéressés à trois méthodes pour greffer les chaînes de PEG à la surface du pore.

1. Fonctionnalisation des nanopores

Dans ce chapitre, le but de la fonctionnalisation est d'éviter l'adsorption non spécifique des protéines à la surface du nanopore, et en particulier à son entrée, pour empêcher l'obstruction du nanopore. En effet, il a été montré que les nanopores natifs sont facilement et irréversiblement colmatés par l'adsorption de protéines. Ceci se traduit par une considérable diminution du courant.^{265,266} L'adsorption non-spécifique est l'un des problèmes récurrent empêchant une utilisation optimale des nanopores solides pour la détection de protéine.^{212,267,268} Plusieurs groupes ont étudié différentes stratégies pour limiter l'adsorption, tels que la fonctionnalisation par des lipides,^{48,49,212} des poly(éthylène glycol) (PEG),^{203,269} ou encore la modification de la surface grâce à des organosilanes pour étudier des groupements fonctionnels simples et répandus: Epoxy (1), methoxyethylene glycol ("PEG"-type) (2), amine (Glycidyloxypropyltrimethoxysilane, methoxyethoxyundecyltrichlorosilane, minopropyltrimethoxysilane).³⁵ Dans ce chapitre nous avons fonctionnalisé des pores grâce à des PEG en utilisant trois stratégies, une fonctionnalisation de la surface interne et externe, une externe, et une interne

Table 9 : Fonctionnalisation utilisée dans ce chapitre

Surface du pore fonctionnalisé	Interne et externe	Externe	Interne
Matériau	PET	PET	PET
Technique de fonctionnalisation	ALD ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$), AEAPTMS	"sputtering" (Au)	Conjugaison chimique Et-(NH_2) ₂
Greffage des PEG	PEG-NHS	PEG-SH	PEG-NHS

1.1. Fonctionnalisation interne et externe

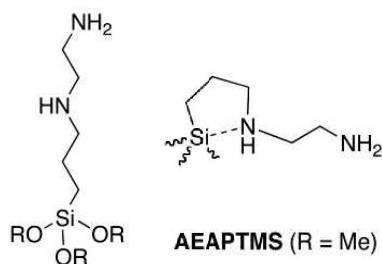


Figure 80 : Structure de N-[3-Triméthoxysilyl]propyl]éthylènediamine (AEAPTMS)

Dans cette partie la taille des pores, est réduite par ALD en déposant des couches alternées de 5 cycles d' Al_2O_3 suivi de 5 cycles de ZnO . Ensuite les nanopores sont exposés à N-[3-

Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (AEAPTMS), pendant 48 h en phase vapeur. L'AEAPTMS permet de recouvrir toute la surface (interne et externe) de terminaisons amines. Ces fonctions vont ensuite être utilisées pour greffer des PEG à la surface des pores. Des PEG-hydrosuccimidines esters sont dispersés dans 1 mL de méthanol. 50 μ L de cette solution est inséré dans 1,8 mL de tampon

phosphate (PBS) (0,01 M tampon phosphate, 0,0027 M chlorure de potassium, et 0,137 M chlorure de sodium, pH 7,4), à 25 °C pendant 24h. (Figure 81)

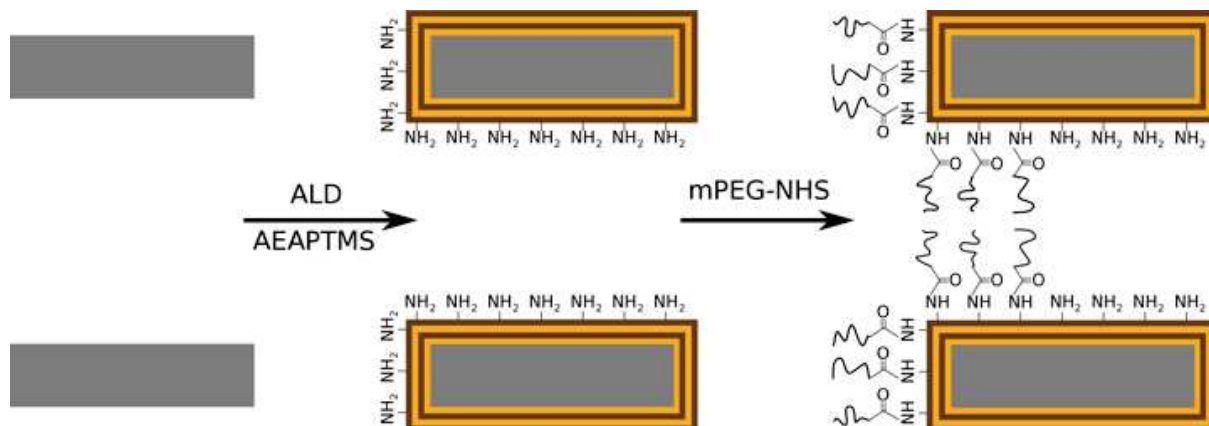


Figure 81: Schéma du pore en PET (représenté par le rectangle gris) fonctionnalisé après dépôts d'ALD (couche d' Al_2O_3 en orange, de ZnO en marron), et la fonctionnalisation par AEAPTMS pour créer les amines en surface, et enfin le greffage de mPEG-NHS

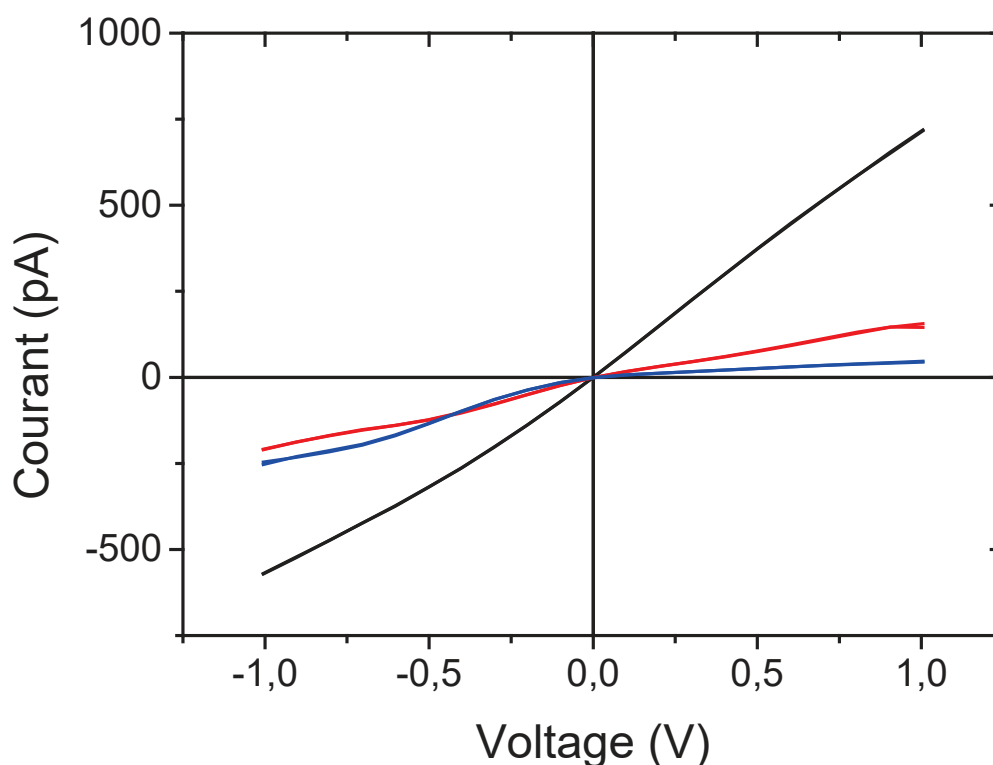


Figure 82 : Courbes I-V pour un pore en PET cylindrique, (noir) après l'attaque chimique (~ 51 nm de diamètre), (rouge) après l'ALD et la fonctionnalisation par les amines (~ 26 nm de diamètre), (bleu) après le greffage des PEG de façon asymétrique.

Le greffage des PEG est effectué de manière asymétrique, une rectification de courant est observée. (Figure 82)

1.2. Fonctionnalisation sélective de l'entrée du pore

Cette stratégie consiste en l'auto-assemblage d'une monocouche dense de PEG à l'entrée du pore. Pour ce faire une couche mince d'or est déposée par pulvérisation cathodique (« *sputtering* ») d'un côté du pore. Ensuite le film est immergé dans une solution contenant les PEG-SH pour obtenir une monocouche par auto-assemblage (« *self assembled monolayers* » SAMs). Bien que l'auto-assemblage soit rapide, une bonne procédure expérimentale est nécessaire pour produire une couche uniforme et hautement ordonnée.

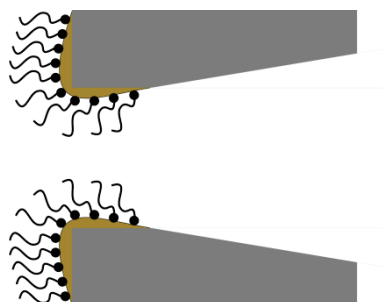


Figure 83: Schéma représentant le pore en PET conique (gris), avec l'or déposé par pulvérisation du côté tip du pore, et les PEG (traits noirs) auto assemblés sur l'or grâce à leurs têtes thiolées (points noirs)

Tout d'abord, il est à noter que toutes les manipulations doivent être faites dans un environnement propre. La verrerie doit être préalablement nettoyée grâce à une solution piranha, pour éviter toute contamination. De plus, les contenants doivent pouvoir facilement être scellés afin de travailler sous atmosphère inerte (N_2). En effet le contact de l'or avec l'oxygène doit être minime pendant l'assemblage, si l'on veut obtenir une couche homogène. Il est conseillé de déposer une couche de chrome ou titane sous la couche d'or, afin d'éviter la délamination de l'or.

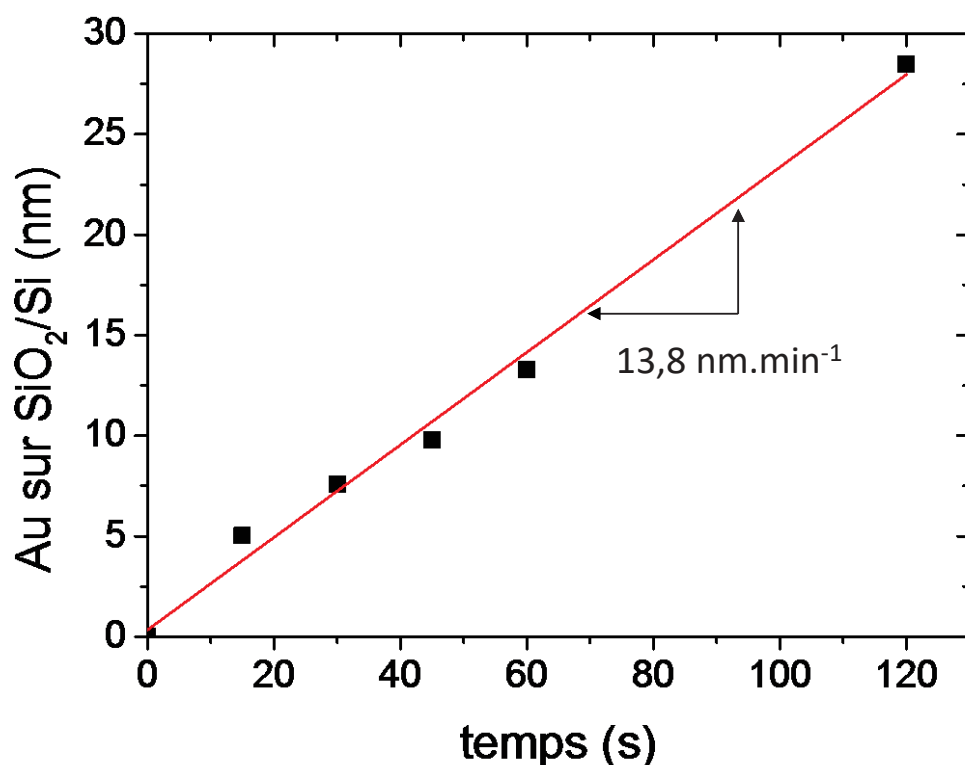


Figure 84: Taux de croissance du dépôt d'or sur substrat de SiO₂/Si calculé par ellipsométrie. Les points ont été obtenus expérimentalement, la droite rouge est l'ajustement linéaire ($\tau = 0,23023 \pm 0,01 \text{ nm s}^{-1}$)

Les solutions de PEG-SH (M_w 2 kD) à 2 mM sont préparées dans de l'éthanol ultra pur (sans additif). La solution est soniquée pendant 5 à 10 min jusqu'à complète dissolution des thiols. Ensuite les substrats recouverts d'or sont immergés dans la solution en minimisant leurs expositions à l'air. Les récipients sont ensuite remplis avec de l'azote, et scellés. Les échantillons sont ensuite stockés de 24 à 48 h, afin d'augmenter la densité de PEG en surface. Enfin les échantillons sont rincés avec du solvant propre pendant 10 à 15 s, puis séchés sous flux d'azote. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'obtenir des monocouches très denses et homogènes. Le problème est lié à la couche d'or. En effet, nous connaissons le taux de croissance de l'or en fonction du temps de dépôt (Figure 84), mais nous ne maîtrisons pas l'épaisseur de ce dépôt à l'intérieur du pore, et donc son influence sur son diamètre. Il est impossible d'obtenir précisément ce diamètre par conductimétrie, car nous ne connaissons pas exactement la longueur sur laquelle l'or a été déposé à l'intérieur du pore. Toutefois, il est possible de caractériser les différentes étapes de la fonctionnalisation par conductivité. Sur la Figure 85, la

rectification du courant ionique est beaucoup plus importante, après le dépôt et la fonctionnalisation (courbe rouge), que pour le pore natif (courbe noire).

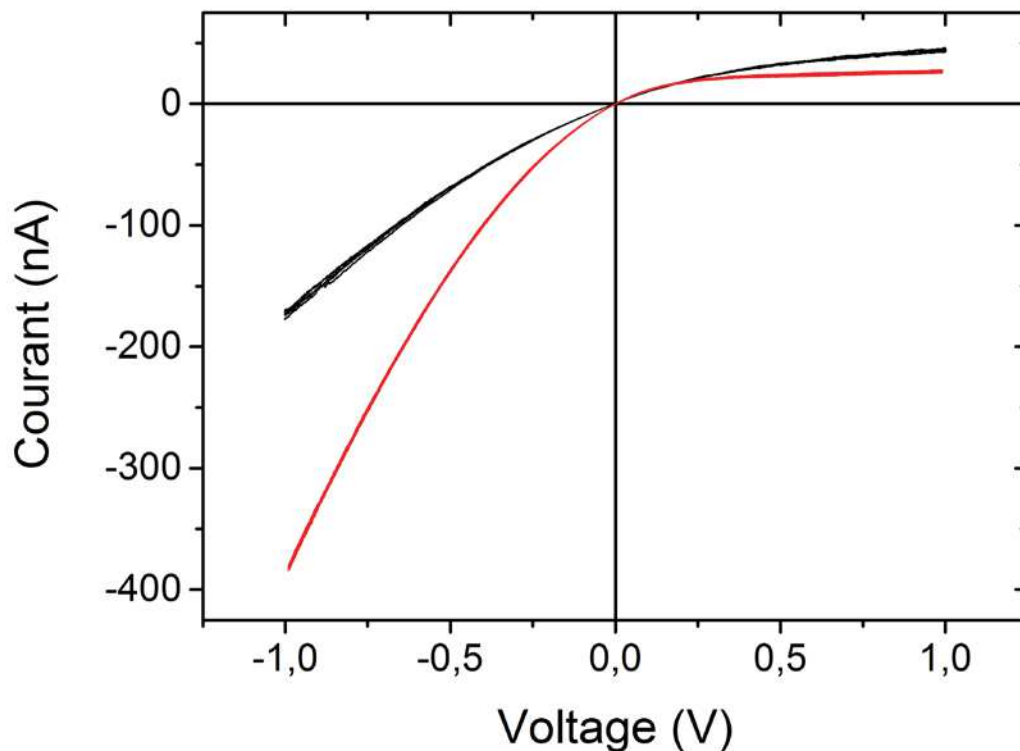


Figure 85 : Courbes I-V après l'attaque chimique, (rouge) après dépôt d'or, et fonctionnalisation par les SAMs

Nous avons tenté d'évaluer la réduction de diamètre induite par le dépôt d'or grâce à l'utilisation de membranes multi-pores observées par MEB (Figure 86). Les membranes natives après ouverture par attaque chimique ont un diamètre d'environ 900 ± 24 nm. Des dépôts d'or de temps différents ont été effectués sur cette même membrane. Le premier, un dépôt de 140 s, dont l'épaisseur théorique d'après l'ellipsométrie est 32 nm par rayon, est estimée à 40 nm par rayon. Le diamètre mesuré est d'environ 820 ± 16 nm. Ensuite, un dépôt de 228 s est effectué toujours sur la membrane native. Nous évaluons

l'épaisseur de l'or à environ 53 nm par rayon. Par MEB, le diamètre obtenu est d'environ 755 ± 18 nm, ainsi la couche d'or serait d'environ 70 nm par rayon.

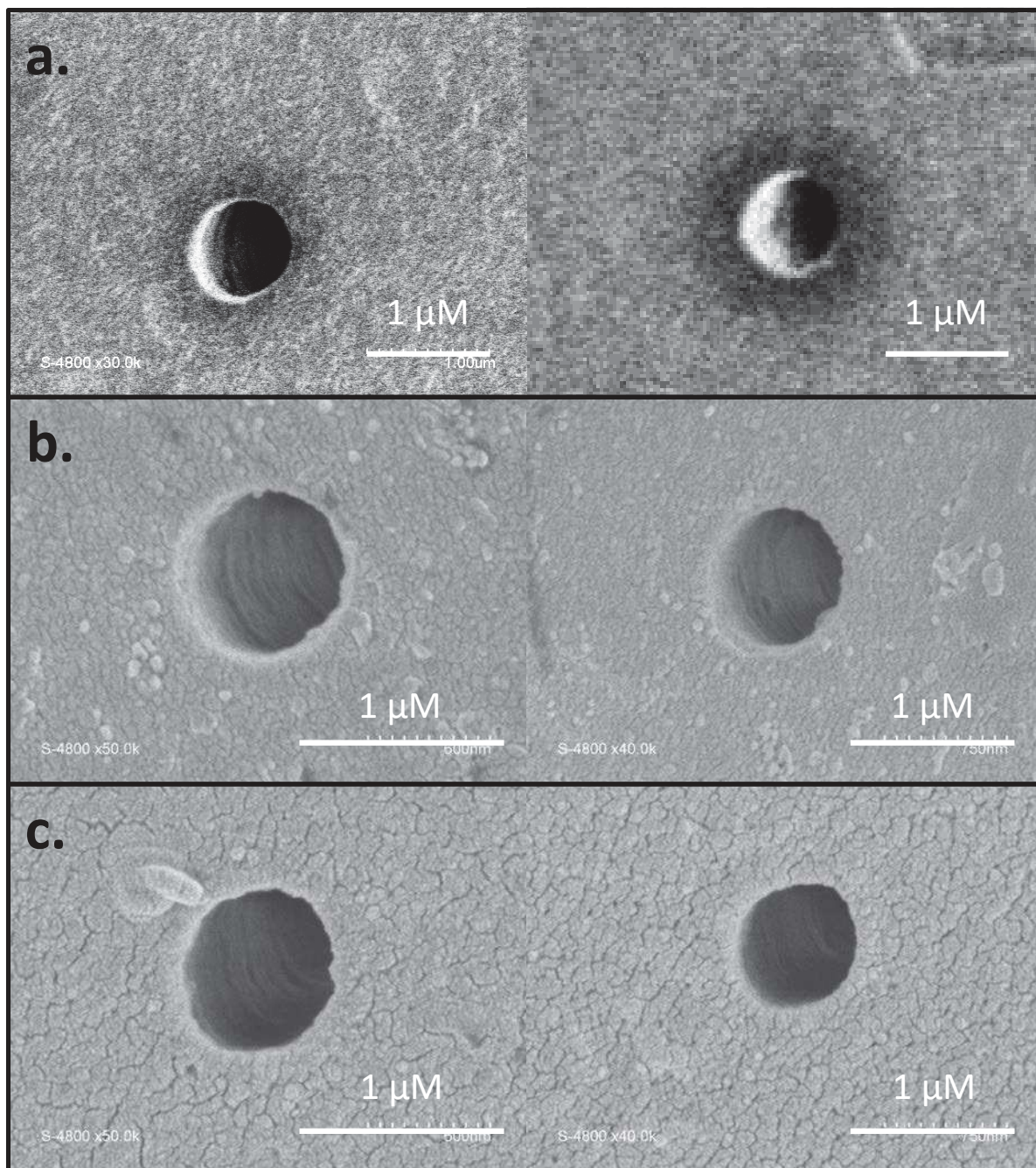


Figure 86 : a. Pore natif après ouverture par attaque chimique ($d \sim 900 \pm 24$ nm) b. Même membrane que en a, après 140 s de Au sputtering (épaisseur théorique ~ 32 nm (rayon^{-1}), $d_{\text{exp}} \sim 820 \pm 16$ nm (épaisseur expérimentale ~ 40 nm (rayon^{-1})) c. Même membrane que en a, après 228 s de Au sputtering (épaisseur théorique ~ 53 nm (rayon^{-1}), $d_{\text{exp}} \sim 755 \pm 18$ nm (épaisseur expérimentale ~ 70 nm (rayon^{-1}))

On remarque également sur les images MEB que plus la couche d'or déposée est épaisse plus la taille des grains est importante. Cela peut être une gêne pour l'homogénéité des auto-assemblages de PEG.

1.3. Fonctionnalisation sélective à l'intérieur du pore

La dernière stratégie, consiste à greffer des PEG directement sur les fonctions COOH présentes à l'intérieur du pore, pour ce faire (Figure 87):

1. le pore est immergé dans une solution de 1M d'éthylène-diamine dans une solution de KCl MES à 0.1M, pH 4.7. Ensuite de l'EDC hydro-chloride est ajouté pour obtenir une concentration finale de 50 mM. Le film est ensuite incubé pendant la nuit pour une modification homogène de la surface.
2. Enfin pour attacher les PEG aux amines à la surface du pore, le pore incube dans une solution à 2 mM de PEG-NHS dans de l'éthanol, pendant 2 h, ce qui assure une réaction quasi-totale entre les PEG et les amines.

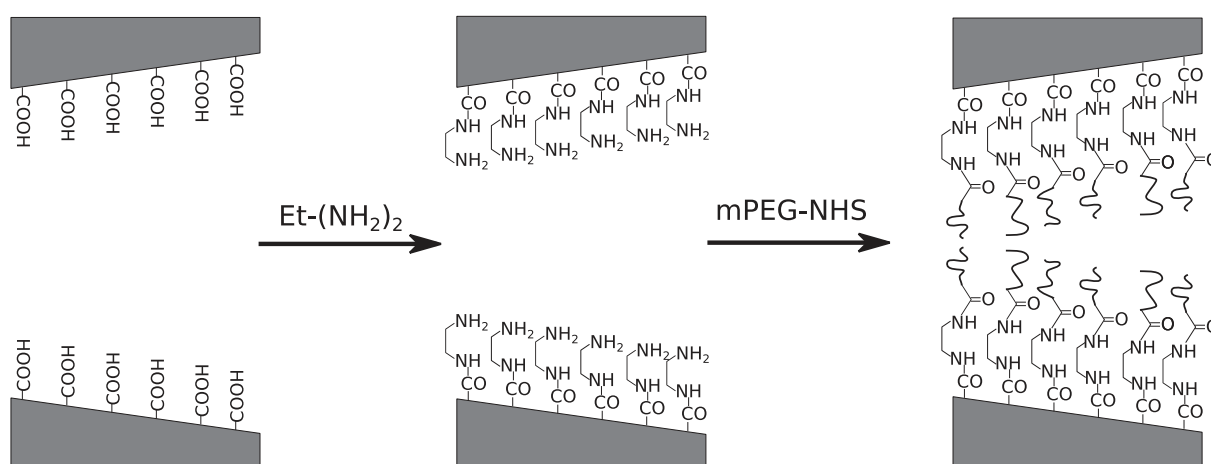


Figure 87 : Les fonctions carboxyles à l'intérieur du pore en PET, après l'attaque chimique, sont utilisées pour attacher les fonctions amines qui sont ensuite utilisées pour greffer les PEG

L'avantage de cette technique est que la fonctionnalisation peut être réalisée juste après l'étape de l'attaque, dans la cellule. Toutefois cette technique est réalisable uniquement sur des films en polymères contenant des groupements carboxyles sur la surface interne du pore.

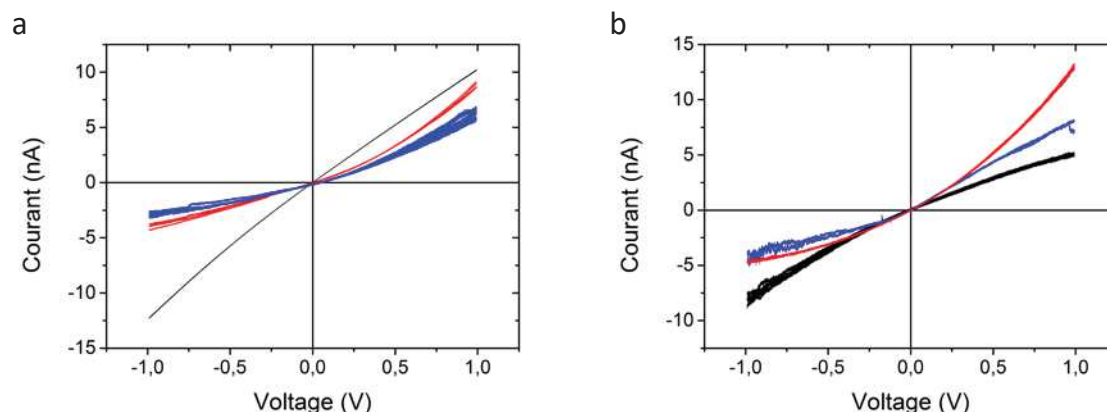


Figure 88: Courbes I-V pour un pore natif (noir), après fonctionnalisation avec Et(NH₂)₂ (rouge), et mPEG (bleu), immergé dans une solution de KCl 1M, à pH7. a. Petit diamètre du pore estimé à $d = 40 \pm 5$ nm, le grand ~ 375 nm, b. Petit diamètre du pore estimé à $d = 20 \pm 2$ nm, le grand ~ 425 nm.

Chaque étape de la fonctionnalisation est caractérisée par conductimétrie. (Figure 88) Nous observons une inversion de la rectification du courant après la fonctionnalisation par les amines, due à l'inversion de la charge de surface. Nous observons également une diminution des valeurs de courant après le greffage des PEG par rapport aux amines. Nous remarquons également, pour des voltages inférieurs à -750 mV, des oscillations de courant, après la fonctionnalisation par les chaînes polymères. Celles-ci sont probablement dues aux mouvements des chaînes à l'entrée du pore, lorsqu'une énergie suffisamment importante est appliquée.

1.4. Hydrophilicité des matériaux fonctionnalisés

Il a été montré que dans le cas des surfaces fonctionnalisées par des PEG, il existe une corrélation entre l'hydrophobicité et l'adsorption non spécifique.²⁷⁰ Typiquement plus la densité de PEG en surface est importante, plus la surface est hydrophile et moins les protéines s'adsorbent.

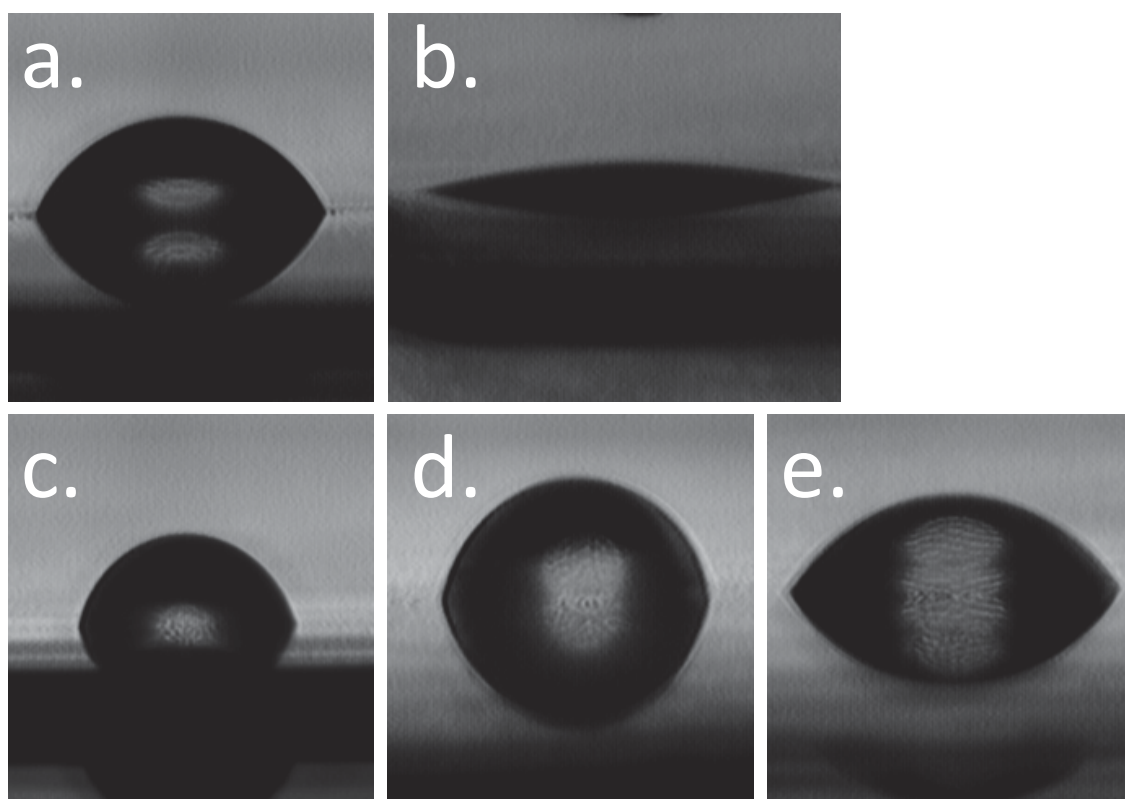


Figure 89: Angle de contact en fonction des différents traitements de surface : a. Plaque de Silicium native, b. Silicium après dépôt d'or et SAMs des PEG, c. Plaque de silicium, (Si) après dépôt de 5 bicouches d'ALD, d. Silicium après dépôt de 5 bicouches d'ALD et dépôt en phase vapeur d'AEPTMS, e. Silicium après dépôt de 5 bicouches d'ALD et dépôt en phase vapeur d'AEPTMS et PEGylation

Par mesure des angles de contact (Figure 89), nous observons que la fonctionnalisation par SAMs rend la surface extrêmement hydrophile, ceci est dû à la haute densité de PEG à la surface. Dans le cas des nanopores fonctionnalisés après ALD, la surface est également plus hydrophile que la surface native, mais elle ne l'est pas autant que pour les auto-assemblages. Le problème de cette technique est lié à la densité de OH en surface du ZnO susceptible de réagir avec l'AEPTMS. Nous ne connaissons pas et nous ne pouvons pas savoir le nombre de points d'ancrage. Les problèmes sont liés à l'homogénéité et l'uniformité de la silanisation. Les différences observées sont dues à l'arrangement des PEG en surface. Après ALD et AEPTMS les points d'ancrage sont limités. Tandis qu'avec les SAMs, plus les temps d'assemblage sont longs, dans notre cas 24h, plus la couche de PEG sera dense. Les angles de contact n'ont pas pu être faits pour les fonctionnalisations avec l'éthylène diamine, en effet, cette technique utilise les acides carboxyliques présents sur la surface interne des nanopores en PET.

2. Détection d'amyloïdes dans les nanopores fonctionnalisés

2.1. Préparation des amyloïdes

La préparation des fibrilles d'amyloïdes de lysozyme est réalisée en se basant sur la méthode reporté par Hill *et al.*²⁷¹ Une solution de lysozyme (34 mg mL⁻¹) est préparée par dissolution de lysozyme lyophilisé dans de l'eau ultra-pure. La solution est ensuite chauffée à 45°C pour enlever tous les agrégats de protéines préformés. Une solution est de 300 mM de NaCl est ajoutée en proportion 1 :1 à la solution de lysozyme. Tous les échantillons sont ensuite centrifugés à 9500 g pendant 5 min, et filtrés par des membranes de 200 nm. Le pH de la solution est ajusté à 2 par ajout de HCl. La concentration de lysozyme en solution est déterminée grâce à son absorption dans l'ultraviolet à 280 nm. Les solutions de lysozymes sont incubées pour différents temps de 30 min à plusieurs jours pour 2 températures, 55°C et 70°C.

Nous avons caractérisé par Microscopie de Force Atomique (*Atomic Force Microscopy*, AFM), les amyloïdes obtenus après 24 h à 70°C. Pour ce faire, des échantillons d'amyloïdes ont été immobilisés sur des substrats de mica fraîchement clivé, à une concentration de 2 µM en unité monomère. Un diamètre d'environ 6 nm, estimé grâce aux images est globalement homogène. (Figure 90) Les longueurs sont, en revanche, très poly-disperses et varient de quelques nanomètres jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres.

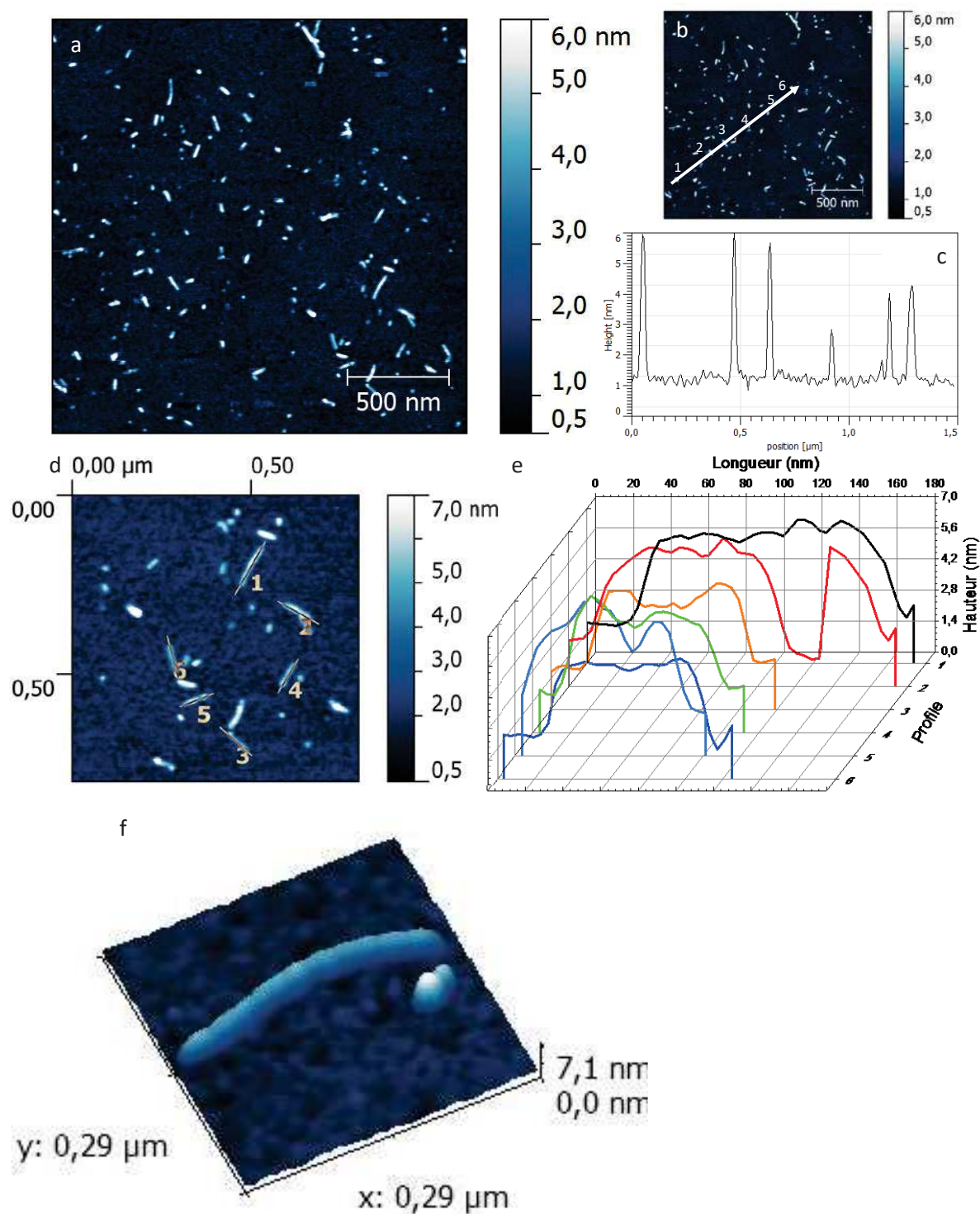


Figure 90 : a. Images AFM d'une solution d'amyloïdes à 2 μM en unité monomère déposée sur du mica. Les amyloïdes ont été fabriqués en utilisant la méthode précédemment décrite, pendant 24 h à 70°C. b. Amyloïdes sélectionnés et analysés dans le profil c. d. Image AFM d'amyloïdes, les profils de 6 d'entre eux sont reportés en e. f. Représentation 3D d'un amyloïde

Les amyloïdes en solution ont également été analysées par diffusion dynamique de la lumière (DLS), (Table 10). A partir des coefficients de diffusion obtenus, nous pouvons estimer la dimension des amyloïdes. Pour la protéine native le coefficient de diffusion est de $117,23 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, ce qui équivaut à une sphère de diamètre hydrodynamique de 4 nm. Après 24 h d'incubation à 70°C , il n'y a plus de monomères. Le problème des mesures faites par la DLS est leurs imprécisions.

Table 10 : Coefficients de diffusion obtenus par DLS, l'hypothèse faite quand à la géométrie est que les amyloïdes sont de formes cylindriques avec un diamètre de 6 nm

Echantillon	D ₁ [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	D ₂ [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	D ₃ [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
3h (70°C)		$10,42 \pm 13,1$	$116,1 \pm 3,28$
24h (70°C)	$0,378 \pm 0,87$	$2,02 \pm 0,59$	$8,95 \pm 2,29$

2.2. Détection des amyloïdes par nanopore fonctionnalisé par auto-assemblage

2.2.1. Fonctionnalisation sélective de l'entrée du pore

Nous avons tenté de détecter des fibrilles d'amyloïdes de lysozymes obtenues par incubation à 70°C pendant 24 h, grâce à un nanopore conique ($d_{\text{tip}} = 131 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$, $D_{\text{base}} = 1200 \text{ nm}$). Ensuite un dépôt d'or de 60 s a été réalisé, uniquement du côté « *tip* », ce qui réduit le diamètre à environ 100 nm. Puis le nanopore est fonctionnalisé avec les PEG-SH.

Une solution de KCl à 0,5 M est placée de chaque côté du pore. Un potentiel constant de -4 V , ou -5 V est appliqué du côté *trans* de la cellule, du côté de la grande ouverture du pore. Le courant est enregistré en fonction du temps. Avant addition des amyloïdes, pour -4 V , le courant est de $-1250 \pm 10 \text{ nA}$. A -5 V , elle est de $1520 \pm 20 \text{ nA}$.

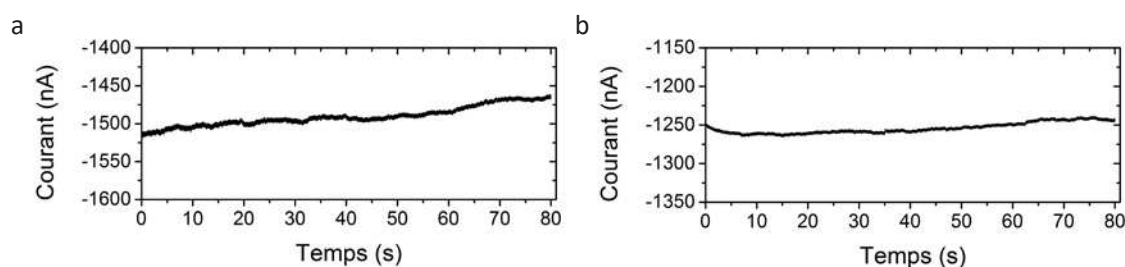


Figure 91 : Courants enregistrés pour un pore fonctionnalisé asymétriquement par auto-assemblage de PEG sur couche d'or, ayant un petit diamètre final de 100 nm, à 0,5 M de KCl pour un potentiel appliqué du côté *trans* (grande ouverture) de a.- 5 V, b. -4 V

Ensuite nous avons introduit une solution d'amyloïde de lysozyme (incubé pendant 24 h à 70°C) pour obtenir une concentration finale de $2 \mu\text{M}$, du côté *cis* de la cellule (côté *tip* du pore).

Le courant est enregistré en fonction du temps pour un potentiel appliqué de -5 V (Figure 92), -4 V (Figure 93) pendant 10 min pour chaque voltage. Puis un potentiel de 5 V est appliqué pendant 40 s (Figure 94).

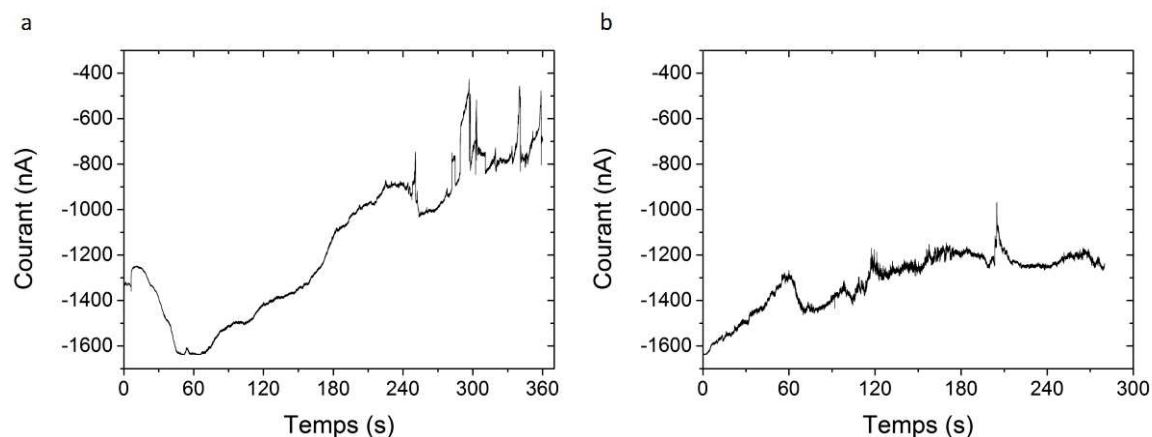


Figure 92 : Courant mesuré en fonction du temps, pour un potentiel de -5 V, avec une concentration en amyloïde de lysozyme (incubé pendant 24 h à 70°C) de 2 μ M, a. 1^{er} enregistrement, b. 2^{ème} enregistrement

Nous nous intéressons tout d'abord, aux variations du courant en fonction du temps, pour un potentiel de -5 V. Dans la Figure 92a, nous pouvons voir plusieurs diminutions de courant consécutives suivies de plateaux : Une première entre 60 et 120 s, une deuxième entre 120 et 180 s, et une troisième entre 180 et 240 s, elles pourraient être induites par l'adsorption successive de longs amyloïdes à l'entrée du pore. Ces derniers bloquent une partie du courant. Ensuite nous observons de grandes oscillations. Sur la Figure 92b, nous observons tout d'abord une diminution lente du courant, qui peut être due à l'adsorption d'un amyloïde long à l'entrée du pore. Puis des oscillations sont observées, qui peuvent être expliquées par le passage devant ou à travers le pore d'amyloïdes plus petits.

Ensuite nous nous intéressons au même pore dans les mêmes conditions, mais pour un potentiel appliqué de -4 V. Les courants de la Figure 93 ont été enregistrés immédiatement après celui de la Figure 92. Comme le pore de la Figure 92a est partiellement bouché, il en est de même pour le début de l'enregistrement suivant. Nous observons différents types de blocages de courant et d'oscillations. Ces dernières peuvent être interprétées comme le passage d'autres amyloïdes qui traversent le pore, et qui peuvent être détectés du fait que le nanopore est en partie bouché. Une autre hypothèse serait que plusieurs amyloïdes se placent à l'entrée du pore bloquant le courant, et que les oscillations soient dues aux mouvements d'autres chaînes qui arrivent à l'entrée du nanopore, sans toutefois qu'ils traversent le pore.

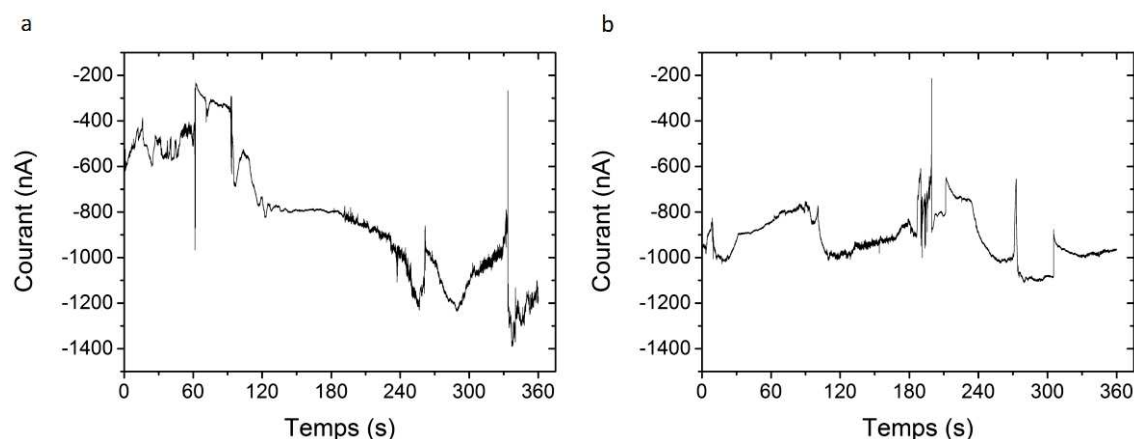


Figure 93 : Courant mesuré en fonction du temps, pour un potentiel de -4 V, avec une concentration en amyloïde de lysozyme (incubé pendant 24 h à 70°C) de $2\ \mu\text{M}$

Les amyloïdes étudiés ici, ont des diamètres de 6 nm et des longueurs pouvant varier de 6 nm (monomères de lysozymes) à quelques centaines de nm, comme le montre les AFM. Différentes hypothèses sont émises quand aux formes du courant enregistré.

La première est que les lysozymes et autres petits amyloïdes ne sont pas détectés lors de leurs passages à travers le pore à cause de leur taille. Seuls les amyloïdes ayant une longueur d'un ordre de grandeur équivalent au diamètre peuvent être détectés. Les amyloïdes de longueur supérieure à 100 nm de par leur taille et leur rigidité ne peuvent pas traverser le pore et être détectés. En effet, même s'ils arrivent à entrer dans le nanopore dans la bonne conformation, leur diamètre est trop faible pour observer les modifications de courant. Ces derniers peuvent se coller sur la surface à l'entrée du pore et bloquer une partie du courant, créant une diminution du courant sur des temps longs comme nous pouvons le voir en (Figure 92 et Figure 93). Sous l'influence du champ appliqué, ils peuvent vibrer et créer ainsi des perturbations du courant, créant des augmentations ou des diminutions de courant de l'ordre de quelques microsecondes à quelques millisecondes.

Une deuxième hypothèse, se base également sur le fait qu'un long brin d'amyloïde bouche une partie de l'entrée du pore. Ainsi le diamètre est réduit ce qui permet de détecter de plus petits filaments. Une troisième hypothèse est qu'un gel d'amyloïde se forme et bloque l'entrée du pore, et les oscillations du courant seraient dues au mouvement de ce gel à l'entrée du pore.

Il est difficile de choisir une hypothèse par rapport à une autre tant que les données sont bruitées et stochastiques.

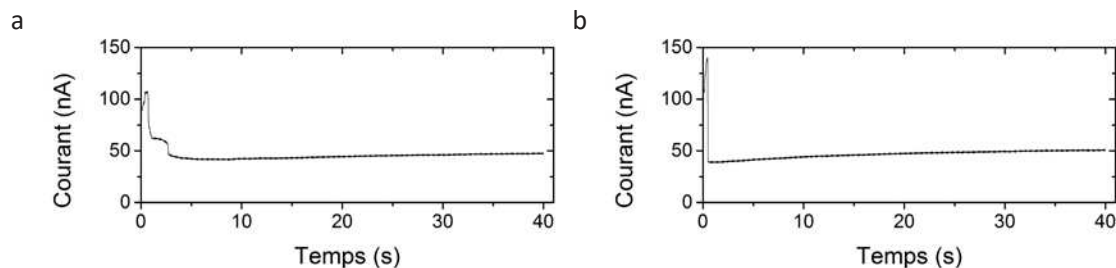


Figure 94 : Courant mesuré en fonction du temps, pour un potentiel de 5 V, à 0,5 M de KCl

Afin de prouver que les diminutions de courant sont dues à la présence de longs amyloïdes bloqués à l'entrée du pore, nous avons appliqué un voltage de 5 V. (Figure 94) Il a été remarqué, qu'en l'absence de cette étape le pore se bouche, et que nous observons une diminution du courant. Mais lorsqu'un voltage positif est appliqué, le courant ionique retrouve sa ligne de base. Ce qui laisse penser que les amyloïdes sont adsorbés de manière réversible à l'entrée du pore grâce aux PEG à la surface du pore.

2.2.2. Fonctionnalisation sélective à l'intérieur du pore

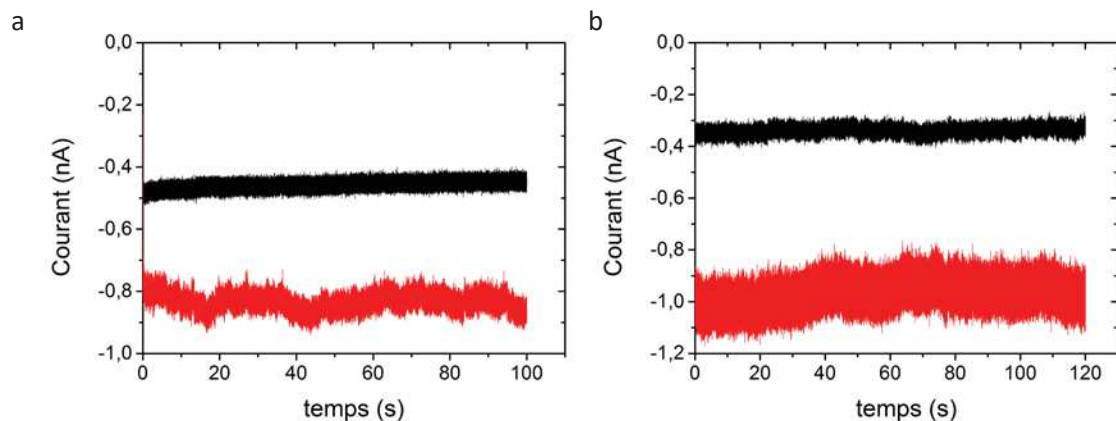


Figure 95: Courant enregistré en fonction du temps, à - 500 mV, pour un pore après fonctionnalisation avec Et(NH₂)₂ et mPEG. La courbe noire représente un pore dont le petit diamètre pore est estimé à $d = 40 \pm 5$ nm, le grand ~ 375 nm. La courbe rouge, le petit diamètre du pore est estimé à $d = 20 \pm 2$ nm, le grand ~ 425 nm. a. 0,5 M KCl, pH 7, b. 0,5 M KCl, pH 7, plus 2 μ M d'amyloïdes (3h, 70°C) ont été ajouté du côté *tip* du pore.

Deux nanopores NP_{d=40} et NP_{d=20} ($d = 40 \pm 5$ nm, $D \sim 375$ nm, et $d = 20 \pm 2$ nm, $D \sim 425$ nm) ont été préparés par attaque asymétrique dans des films en PET. Ils ont ensuite été aminés, puis des PEG ont été greffés. Leurs fonctionnalisations ont été suivies par conductimétrie (Figure 88). Le courant a ensuite

été enregistré en fonction du temps à 0,5 M KCl, pH 7, à - 500 mV. Les amyloïdes sont insérés du petit côté du pore.

Pour NP_{d=40} nous n'observons aucune oscillation du courant lorsque les amyloïdes sont insérés en solution. Le courant décroît légèrement, mais les amyloïdes ne sont pas détectés. Il est probable que le diamètre du pore soit trop grand, ou le potentiel appliqué n'est pas suffisant pour permettre aux amyloïdes de passer la barrière d'énergie de l'entrée du pore.

Pour NP_{d=20}, le courant n'est pas extrêmement stable, nous remarquons de légères oscillations, qui peuvent être dues au mouvement des chaînes polymères à l'entrée du pore. Les mesures électriques reflètent leur présence, par rapport à l'autre pore, probablement à cause de son diamètre plus faible et du courant plus élevé.

On remarque sur la Figure 95b, après l'insertion d'amyloïdes ayant incubé pendant 3h, une forte augmentation du bruit. Aucune oscillation significative ne peut en être extraite. Une hypothèse pourrait être que les temps sont trop courts pour détecter les amyloïdes. Une autre pourrait être que les amyloïdes ont été adsorbés de manière non-spécifique et irréversible sur la surface externe à l'entrée du pore entraînant une augmentation du bruit. Une analyse du bruit devrait être réalisée et permettrait probablement d'obtenir plus d'information.

3. Discussion

Nous n'avons pas réussi à obtenir les conditions optimales pour observer le passage de fibrilles d'amyloïdes à travers un pore, nous avons cependant réussi à obtenir un pore fonctionnel qui empêche l'adsorption des protéines. Pour améliorer notre système, il faut tout d'abord éliminer le problème de la poly-dispersité des amyloïdes. En effet il faudrait tout d'abord pouvoir calibrer les échantillons, et pouvoir estimer les temps de passage en fonctions du diamètre. Ce qui permettrait également d'optimiser le diamètre du pore pour la détection d'amyloïdes de lysozyme de tailles supérieures à 20 monomères, qui est la taille à partir de laquelle les amyloïdes présentent une cytotoxicité.^{272,273} En effet les pores que nous avons présenté dans ce chapitre sont très grands, longueurs d'environ 100 nm, les pores plus petits ne permettant pas d'obtenir un rapport signal sur bruit assez bon pour pouvoir observer le passage des amyloïdes.

Nous n'avons pas effectué d'étude du passage des amyloïdes sur les pores fonctionnalisés par ALD, par manque de temps, mais nous avons pu observer sur des pores en SiN modifiés utilisant cette technique, une diminution du courant probablement due à l'adsorption non spécifique de molécules biologiques (les résultats ne sont pas présentés ici, car ils sont insuffisants).

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de thèse a été de concevoir un nanopore unique et fonctionnalisé dans le but d'obtenir des propriétés biomimétiques. Nos objectifs étaient triples (i) obtenir des nanopores ayant des propriétés stimuli répondantes, (ii) étudier l'influence de l'état de surface des pores sur les propriétés de transport d'objets et enfin, (iii) empêcher l'adsorption non spécifique pour la détection de fibrilles d'amyloïde et d'étudier leurs propriétés de transport.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux nanopores fabriqués par la technique de la trace attaquée en PET et dans une moindre mesure, à ceux en SiN percé par TEM. En effet les premiers sont facilement modifiables chimiquement grâce à leurs groupements fonctionnels sur la surface interne du pore. Toutefois, des techniques de dépôts comme l'ALD ont également été utilisées pour avoir une surface homogène à l'intérieur et à l'extérieur du nanopore.

Nous avons utilisé différentes stratégies de fonctionnalisation pour mimer des canaux biologiques stimuli répondants en particulier pH et ligands. Pour ce faire, la première stratégie réalisée sur un nanopore en PET cylindrique, sur lequel un dépôt par ALD de couches d'oxyde, suivi par un dépôt en phase vapeur des groupement amines ont permis de recouvrir la surface et enfin des chaines terminées par des biotines ont été greffées. En utilisant un système biotine-avidine, nous avons démontré qu'il est possible de moduler l'ouverture du nanopore avec le pH et que ce processus est réversible. De plus, il est possible de détecter des protéines biotinylées et des anticorps par une mesure simple courant/voltage. Toutefois, le principal défaut de cette stratégie est que la modification du pore est irréversible, le nanopore est utilisable une seule fois. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé les groupements carboxylates de la surface interne, pour fonctionnaliser le pore grâce à des interactions électrostatiques avec des poly-électrolytes (Poly-L-Lysine et Poly Styrene Sulfonate). Grâce à l'utilisation de nanopores coniques, cette fonctionnalisation permet de moduler la sélectivité ionique du pore. Et en utilisant à nouveau un système des Poly-L-Lysine sur lesquelles sont greffées des PEG-biotine, il est possible de détecter l'avidine et de réutiliser le pore.

Ensuite, la maîtrise de méthodes de fonctionnalisation homogène nous a permis de nous intéresser aux questions fondamentales liées à l'influence de l'état de surface du nanopore (hydrophobicité, charge) sur la translocation de polynucléotide dans les conditions, où la distance de Debye n'est plus négligeable. Nous avons démontré que si le nanopore présente la même charge que la PolyAdenosine et la PolyCytosine, la vitesse de passage de la molécule augmente et la barrière globale d'énergie d'entrée du nanopore diminue par rapport au nanopore non-chargé hydrophobe. Ceci pourrait être dû à un enrichissement en contre-ions de la zone à l'entrée du nanopore. Ensuite nous avons montré qu'il est possible de détecter des brins simples et doubles d'ADN très courts (10 à 40 bases) en utilisant un nanopore conique de fort rapport d'aspect couvert d' Al_2O_3 avec des amplificateurs classiques. Enfin nous avons tenté la détection de fibrilles d'amyloïde de lysozyme par des nanopores traités pour limiter l'adsorption non spécifique. Cet objectif n'a pas été complètement atteint compte tenu des résultats obtenus qui ne permettent pas d'affirmer si les molécules traversent le pore ou non.

Dans la suite logique de nos recherches un premier projet serait de concevoir des nanopores multifonctionnels, présentant à la fois un ou des dispositifs de captures spécifiques, et d'étudier ces molécules capturées, par translocation. L'idée est de pouvoir à terme séparer et détecter des bio-marqueurs spécifiques dans un mélange complexe. Il serait donc possible d'utiliser une stratégie alliant une couche supportée de phospholipide et un nanopore solide. Dans ce système hybride, le nanopore solide servira de support hydrophobe pour auto-assembler une simple couche de phospholipide. La couche lipidique aura pour objectif de fournir un support fluide présentant une ou plusieurs fonctions spécifiques. Ce support fluide permettra, après capture des molécules cibles, de faire migrer le complexe vers le nanopore sous l'effet du champ électrique et de procéder à leur détection par pulsation résistive. Un autre avantage des phospholipides est leur propriété d'anti-adhésion, ce qui évitera les phénomènes de colmatage du nanopore par l'adsorption non-spécifique de protéines, par exemple. Pour ce qui est de la fonction capture, il est possible de greffer à la surface du nanopore différents éléments permettant la reconnaissance spécifique, tel que les acides nitrilotriacétiques (NTA) qui complexent les protéines histidylées en présence de nickel, ou bien un système avidine/biotine déjà largement utilisé, ou encore un système antigène/anticorps.

Dans la continuité de nos travaux de thèse un deuxième projet serait de mimer les canaux biologiques qui ont des propriétés et sélectivités différentes dues à leurs formes, tailles et fonctions spécifiques. En effet, certains possèdent des rétrécissements à l'intérieur de leurs canaux, et grâce à leurs structures tridimensionnelles, ils peuvent être sélectifs à un seul type d'ions comme les canaux sodiques ou potassiques. Il a été montré que l'organisation électronique du canal, influe sur l'organisation des ions/molécules et donc sur leur passage, par exemple des pores ayant des diamètres inférieurs à ceux des ions hydratés. L'objectif serait donc de reproduire des environnements similaires grâce aux interactions à l'intérieur du nanopore. Pour ce faire, il faudrait créer des géométries adéquates et greffer les fonctions voulues sur des points d'ancrage spécifiques. Une solution peut être l'utilisation de canaux en origami d'ADN.

Pour résumer, le domaine des nanopores comme outil de détection pour des biomacromolécules est en plein développement. Cette méthode de détection à l'échelle de la molécule unique est très prometteuse, pour des applications dans le diagnostic ou le développement de nouvelles générations de séquenceurs d'ADN. Ils seront utilisés pour la détection de bio-marqueurs, ce qui permet le diagnostic précoce, essentiel pour une meilleure prise en charge de maladies dégénératives ou la résorption de certains cancers. Nous espérons de grandes avancées et contributions dans un futur proche pour la réalisation de détecteurs nanopores dans des applications cliniques. De plus, le travail sur un nanopore unique permet de concevoir de nouvelles membranes stimulables et d'en comprendre les propriétés de transport.

Index et références

Index des figures

Figure 1: Synoptiques des objectifs attendus au cours de cette thèse	10
Figure 2: Exemples de différents canaux ioniques: a. α -hémolysine, b. aérolysine, c. OmpG, d. MspA, e. gramicidine A.....	16
Figure 3 : Principe de la technique de la trace attaquée	19
Figure 4 : Schéma d'une coupe transversale du film polymère lors de l'attaque	19
Figure 5: Processus de fabrication pour un nanopore en SiN, dépôt chimique en phase vapeur (CVD), puis gravure ionique réactive (RIE), puis formation du nanopore par faisceau d'ions ou d'électrons (FIB ou TEM)	20
Figure 6: Modèle de Gouy-Chapman-Stern d'une interface solide-électrolyte, avec le potentiel de distribution correspondant, avec z la distance à la paroi. Le solide est une surface chargée négativement (Ψ_s) avec un potentiel de surface négatif. Le plan interne d'Helmholtz (Ψ_i) est constitué de co-ions et de contre-ions non hydratés. Le plan externe d'Helmholtz (Ψ_d) est constitué uniquement de contre-ions hydratés. La couche diffuse est définie après les plans d'Helmholtz. Au niveau du plan de glissement, le potentiel ζ peut être étudié expérimentalement, et comme la distance entre plan externe d'Helmholtz et le plan de glissement est négligeable dans la plupart des cas, le potentiel ζ est habituellement égal à Ψ_d . Adapté de Schoch, <i>et al.</i> ⁸⁶	23
Figure 7 : Double couche électrique (EDL), en bleu, pour de fortes forces ioniques, celle -ci est fine, ce qui permet aux co-ions et aux contre-ions de passer à travers le pore. A faible force ionique, l'épaisseur de l'EDL augmente, ce qui rend le pore sélectif aux contre-ions	24
Figure 8 : Schéma du comportement de la conductance d'un nanopore en fonction de la concentration en électrolyte 1:1 (de type NaCl ou KCl). L'impact de la densité de surface de charge ζ , de la hauteur L , de largeur d et de la longueur D du nanopore sur sa conductance.....	27
Figure 9 : Représentation schématique de pores asymétriques avec leurs charges de surface et leurs courbes I-V correspondantes.....	29
Figure 10 : Schéma expliquant le mécanisme de diodes nano-fluidiques lorsqu'un potentiel de polarité opposé par rapport à la région modifiée est appliquée à travers un nanopore long (plusieurs microns), à la fois les anions et les cations sont attirés depuis la solution vers l'intérieur du pore et de forts courants ioniques en résultent. En inversant le voltage, les anions et les cations se déplacent vers la solution (<i>bulk</i>), ce qui crée une zone de déplétion, et donc de faibles courants ioniques	30
Figure 11 : Schéma représentant un blocage et une augmentation en fonction du temps.....	32
Figure 12: Schéma de la procédure de dépôt d'or sans électrode sur un film polymère (adapté de ¹²⁸).....	36
Figure 13 : Schéma du principe de l'ALD	36
Figure 14 : a. (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) (EDC), b. Schéma de la réaction de couplage grâce à l'EDC (carbodiimide). La surface du pore en PET qui possède les groupements carboxylates peut réagir avec les amines primaires par l'intermédiaire de l'EDC pour former les carboxyl-amines par réticulation	38

Figure 15 : Schéma de la réaction de réticulation grâce aux N-Hydroxysuccinimide Esters (NHS esters). La surface du pore qui a été préalablement fonctionnalisée par des groupements amines peut réagir avec les esters (NHS esters) par l'intermédiaire de l'EDC pour former les carboxyl-amines par réticulation ..	39
Figure 16 : Schéma de la réaction de silanisation, R représente le groupement fonctionnel	40
Figure 17 : Schéma des différentes étapes durant l'auto-assemblage d'alkanethiol sur Au(111): (i) physisorption, (ii) formation de la phase couchée, (iii) nucléation de la phase debout, et (iv) complétion de la phase debout	41
Figure 18 : Schéma du principe de fonctionnalisation en utilisant successivement des poly-cations puis des poly-anions sur une surface négativement chargée	42
Figure 19 : a. Cellule utilisée pour les mesures de courant pour des films en PET, b. Cellule Tetraflow™, utilisée pour les pores en SiN	53
Figure 20 : a. Dispositif expérimental, amplificateur patch clamp, b. Amplificateur EPC 800, b'. Carte d'acquisition LIH 8+8, c. Amplificateur EPC 10, d. Amplificateur EPC 10 double	54
Figure 21 : a. Courant enregistré en fonction du temps à 500 mM de NaCl, pour des voltages de -1 à 1 V par pas de 200 mV, pour un pore de diamètre $22 \pm 0,4$ nm, de longueur 13 μ m. b. Les valeurs de courant sont extraites à partir des valeurs moyennes de (a). c. Le courant est enregistré en fonction du temps, à 1 M KCl, pour un pore conique de $d_{tip} = 20,7 \pm 0,8$ nm, $D_{base} = 425$ nm. 0 V sont appliqués, puis 1 V, puis -1 V pendant 5 s pour chaque voltage. Ensuite un voltage croissant en fonction du temps est appliqué de -1 à 1 V pendant 30 s. et enfin 1 V est appliqué pendant 5 s, d. Représente le courant en fonction du potentiel pour le même pore	56
Figure 22 : Exemple d'une trace de courant en fonction du temps lors du passage de polynucléotides (polyC) à travers un nanopore natif, sous 1 V, à 150 mM NaCl, pH 8	57
Figure 23 : Formule développée du polyéthylène téréphtalate	58
Figure 24 : Méthodes pour produire une trace latente unique à partir d'un seul ion	59
Figure 25 : Caractérisation du diamètre d'un nanopore unique par conductimétrie. a. Courant moyen en fonction du voltage moyen, pour différentes concentrations (noir : 10 mM, rouge : 50 mM, vert : 100 mM, bleu : 250 mM, cyan : 500 mM, rose : 750 mM). Les lignes noires correspondent à l'ajustement linéaire. b. Conductance du nanopore en fonction de la conductivité de la solution. La régression linéaire donne une valeur qui permet de calculer le diamètre du nanopore. La valeur obtenue pour le diamètre est $22 \pm 0,1$ nm	61
Figure 26 : Diamètres de nanopores uniques déterminés par conductimétrie en fonction du temps d'attaque à 45°C. La vitesse est estimée à $v = 9,18 \pm 0,75$ nm. min ⁻¹	62
Figure 27 : Schéma de fabrication d'un nanopore unique conique	63
Figure 28 : Diamètre du nanopore déterminé par MEB en fonction du temps d'attaque de membranes à haute densité de pores (6×10^6 pores cm ⁻²). a. Image MEB après une attaque de 2h, $d = 319 \pm 6$ nm. b. Le coefficient directeur de la droite vaut 2,5.....	64
Figure 29 : a. Conductance en fonction de la conductivité, pour un pore avant et après sa réduction par ALD. Image du pore b. Avant, et c. Après dépôts de couches atomiques.....	65

Figure 30 : a. Hexamethyldisilazane, b. (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine	66
Figure 31 : Analyse par SAXS de membranes multipores a. Echantillon de PET, b. Echantillon de PET recouvert de bicouche 4x4, c'est-à-dire 4 couches d'Al ₂ O ₃ suivi de 4 couches de ZnO, alternées 20 fois. c. Echantillon de PET recouvert de bicouche 5x5, c'est-à-dire 5 couches d'Al ₂ O ₃ suivi de 5 couches de ZnO, alternées 20 fois. d. Echantillon de PET recouvert de bicouche 6x6, c'est-à-dire 6 couches d'Al ₂ O ₃ suivi de 6 couches de ZnO, alternées 20 fois	67
Figure 32 : Images MEB de multi-couches de Al ₂ O ₃ / ZnO, coupe en tranche. L'épaisseur de deux répétitions de cinq cycles Al ₂ O ₃ et cinq cycles ZnO est de 24,8 nm.....	68
Figure 33: a. Schéma de la paroi interne d'un nanopore à trace attaquée, en milieu neutre ou basique. b. et c. Réactifs utilisés pour greffer des biotines sur la surface interne du nanopore. b. O-(2-Aminoethyl)-O'-(2-(biotinylamino)ethyl)octaethylene glycol noté biotine- NH ₂ (n = 8), c. Poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether biotine (Mn 5,300), noté biotine-PEG-NH ₂	72
Figure 34: Schéma de la fonctionnalisation directement après l'ouverture du pore (les groupements carboxyles ne sont plus représentés lors des étapes de fonctionnalisation pour simplifier le schéma)..	72
Figure 35 : a. Exemples de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl, pH 7), b. Dépendance conductance/ conductivité en sel pour un nanopore cylindrique à chaque étape. Directement après l'attaque chimique (carrés noirs), après la fonctionnalisation PEG-biotine-avidine (triangles bleus).....	73
Figure 36: Trace de courant d'un pore cylindrique, 18 nm de diamètre et de longueur 13 μ m, a. Après l'attaque chimique, b. Après la fonctionnalisation PEG-avidine	73
Figure 37: Image TEM d'un nanopore unique (10 nm de diamètre et 6 μ m de longueur) montrant les couches déposées par ALD. L'image TEM a été obtenue sur une membrane multipore en PET (diamètre moyen des nanopores 70 nm) après 12 séquences de 5 cycles d'Al ₂ O ₃ /5 cycles ZnO déposé par ALD et suivies par l'élimination de la membrane PET ⁹⁸	74
Figure 38: Schéma de la fonctionnalisation après modification du pore par dépôt de couche atomique.....	75
Figure 39: a. Biotinamidohexanoyl-6-aminohexanoic acid N-hydroxysuccinimide (-biotine-NHS), b. Poly(ethylene glycol) (N-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane (Mn 3800) (-biotine-PEG-NHS)	76
Figure 40: a. Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl, pH 7) d'un nanopore (d = 22 nm) à chaque étape, directement après l'attaque chimique (carrés noirs), après l'ALD (ronds rouges), après le greffage de PEG-steptavidine (triangles inversés bleus), et après l'addition de PEG- γ -globuline (triangle vert). b. Dépendance conductance/ conductivité en sel pour un pore cylindrique, directement après l'attaque chimique (carrés noirs), après l'ALD (ronds rouges).	77
Figure 41: Courbes I-V, après le greffage des chaines terminées par des biotines (carrés ouverts), et après greffage des protéines (carrés pleins). a. Noir : NP ₂₆ PEG _{Biot} pore de 26 nm de diamètre avec des chaines -PEG-biotine et de l'avidine. b. Rouge : NP ₂₂ PEG _{Biot} pore de 22 nm de diamètre avec des chaines -PEG-biotine et de la streptavidine. c. Vert : NP ₁₈ Biot pore de 18 nm de diamètre avec des chaines -biotine et de l'avidine. d. Bleu : NP ₂₂ Biot pore de 24 nm de diamètre avec des chaines -biotine et des streptavidines. Toutes les expériences sont effectuées à 100 mM de NaCl.	78

Figure 42: Facteur de rectification en fonction du pH. Noir : NP ₂₆ PEG _{biot} pore de 26 nm de diamètre avec des chaînes -PEG-biotine et de l'avidine. Rouge : NP ₂₂ PEG _{biot} pore de 22 nm de diamètre avec des chaînes -PEG-biotine et de la streptavidine. Vert : NP ₁₈ biot pore de 18 nm de diamètre avec des chaînes -biotine et de l'avidine. Bleu : NP ₂₂ biot pore de 24 nm de diamètre avec des chaînes -biotine et des streptavidines. Toutes les expériences sont effectuées à 100 mM de NaCl. Les résultats à des pHs inférieurs à 6 ne sont pas montrés pour les longues chaînes comme il a été montré qu'il y a un phénomène d'agrégation ²¹⁰	79
Figure 43: Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl) d'un nanopore après le greffage de PEG-Biotine-Streptavidine à différents pHs. pH 10 (noir), pH 9 (jaune), pH 8 (vert), pH 7 (bleu), pH 6 (cyan), pH 5 (olive), pH 4 (rouge).	80
Figure 44: Réponse en pH d'un nanopore modifié par ALD, après le greffage de PEG-Biotine-Streptavidine. Courbe I-V pour un gradient de pH (pH 4 du côté <i>cis</i> et pH 8 du côté <i>trans</i>).....	81
Figure 45: Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl) d'un nanopore (d = 26 nm) après le greffage de Biotine-Streptavidine à différents pHs : pH 10 (noir), pH 9 (jaune), pH 8 (vert), pH 7 (bleu), pH 6 (cyan), pH 5 (olive), pH 4 (rouge)	82
Figure 46 : Schéma représentant l'agrégation/désagrégation des protéines sous l'influence du pH.....	83
Figure 47: Exemple de courbes I-V (ici à 100 mM NaCl) d'un nanopore après le greffage de biotine-PEG- γ -globuline sur des PEG-Streptavidine à différents pHs : pH 10 (noir), pH 9 (jaune), pH 8 (vert), pH 7 (bleu), pH 6 (cyan), pH 5 (olive) et pH 4 (rouge)	84
Figure 48: Insertion biotine-PEG- γ globuline: gauche : courbes I-V à pH 7 et NaCl 100mM, après l'addition de streptavidine (carrés ouverts) et après le greffage des protéines IgG (carrés pleins), droite : comparaison des facteurs de rectification en fonction du pH, avant (hachurées) et après (pleines) le greffage d'IgG à NaCl 100 mM. a. b. rouge: NP ₂₂ PEG _{biot} , contient les longues chaînes biotine-PEG et des streptavidines, c. d. bleu: NP ₂₄ biot, contient les courtes chaînes de -biotines et les streptavidine.....	85
Figure 49: Insertion de biotine-PEG-BSA et anti BSA, courbes I-V à NaCl 100 mM, noir: NP ₂₆ PEG _{biot} , longues chaînes biotine-PEG et avidine, a. (croix) après insertion d'avidine, (carré ouvert) après insertion de biotine-BSA, (carré plein) après insertion d'anti-BSA, b. Facteur de rectification en fonction du pH (blanc) après insertion d'avidine, (gris) après insertion de biotine-BSA, (noir) après insertion d'anti-BSA, vert: NP ₁₈ biot, contient de courtes chaînes de -biotines et de l'avidine, c. (croix) après insertion d'avidine, (carré ouvert) après insertion de biotine-BSA, (carré plein) après insertion d'anti-BSA, d. Facteur de rectification en fonction du pH (rayé) après insertion d'avidine, (hachuré) après insertion de biotine-BSA, (plein) après insertion d'anti-BSA	86
Figure 50 : a. Polycation, poly-L-lysine b. Polyanion, poly(styrène sulphonate).....	87
Figure 51: Trace de courant caractéristique enregistrée pendant l'insertion de PLL à pH 8, NaCl 150 mM, TRIS 5 mM, EDTA 1 mM, sous -1 V, ici pour NP ₁	89
Figure 52: Courbe I-V avant (noir) et après (rouge), l'insertion de PLL.....	89
Figure 53: Schéma du protocole expérimental d'adsorption/désorption de PLL dans un nanopore conique, négativement chargé	90

Figure 54: Réversibilité de la fonctionnalisation avec les PLL. Courbes I-V après a. Adsorption, b. Désorption des PLL	90
Figure 55: Evolution du facteur de rectification avec la PLL (cercles rouges) et sans (carrés noirs) pour chaque cycle d'adsorption/désorption des PLL	91
Figure 56 : Conductance du nanopore mesurée après la désorption des PLL	92
Figure 57: Schéma du protocole expérimental d'adsorption/désorption de PSS	93
Figure 58: Trace de courant caractéristique enregistrée pendant l'insertion de PSS à pH 8, NaCl 500 mM, TRIS 5 mM, EDTA 1 mM, sous 1 V	93
Figure 59: Adsorption des bicouches de PSS/PLL, natif (noir), PLL (rouge), PSS (bleu). Réversibilité de la fonctionnalisation PLL/PSS : courbe I-V après, a. PLL/PSS désorption après rinçage à pH 12, b. l'adsorption de PLL à pH 8, c. PSS adsorption à pH 8, d. Evolution du facteur de rectification, natif (carré noir), PLL (cercles rouges), PSS (triangles bleus). e. Conductance après rinçage à pH 12, mesurée sur la zone linéaire de la courbe I-V (entre - 75 mV et 75 mV)	94
Figure 60: Dépôt couche par couche de PLL/PSS. Les courbes rouges ont été enregistrées après l'insertion de PLL, les bleues après celle de PSS. a. 1 ^{ère} couche de PLL/PSS, b. 8 ^{ème} insertion de PLL/PSS, c. Evolution du facteur de rectification (après l'ajout de PLL, cercles rouges, et de PSS, triangles bleus) en fonction du nombre de couche, d. La conductance est mesurée après l'ajout de PSS, sur la zone linéaire de la courbe I-V (entre -75 mV et 75 mV).	95
Figure 61: Sodium chondroïtine sulfate	96
Figure 62 : Facteur de rectification en fonction du poly-cation (rouge), et différents poly-anions (bleus) adsorbés en surface, PSS M _n = 70 kD (bleu), PSS 1000 kD (bleu foncé), chondroïtine (quadrillage) et simples brins d'ADN (rayure)	97
Figure 63: Fonctionnalisation d'un nanopore avec des PLL-g-mPEG-biotines et détection d'avidine. (a) courbe IV, avant (noir), après l'insertion des PLL-g-mPEG-biotines (vert), et après insertion d'avidine (orange). (b) facteur de rectification obtenu pour le nanopore natif (noir), après l'insertion de PLL (rouge), ou de PLL-g-mPEG-biotines (vert), et après insertion d'avidine (orange)	98
Figure 64: Images par microscopie électronique en transmission de nanopore en SiN après formation du pore a. NP - natif, b. NP- TMS avant réduction	105
Figure 65: a. Schéma expérimental de la cellule, b. Schéma représentatif du passage des polynucléotides dans les deux nanopores	106
Figure 66: Exemples de traces de courant à 1 V en présence de polyA. a. SiN natif à 150 mM NaCl, b. SiN natif à 500 mM NaCl, c. SiN TMS à 150 mM NaCl et d. SiN natif à 500 mM NaCl	107
Figure 67 : Exemple d'une trace de courant lors du passage de polyC à travers le nanopore natif, sous 1 V, à 150 mM NaCl, et pH 8	107
Figure 68 : Distributions des événements induits par le passage de polynucléotide à travers le pore à 1 V, colonne de gauche : à 150 mM NaCl, de droite : à 500 mM de NaCl. Pour le polyA NP-natif : histogrammes noirs, NP-TMS : histogrammes rouges hachurés. Pour le polyC NP-natif : histogrammes noirs hachurés, NP-TMS : histogrammes rouges	108

Figure 69: Distributions des événements induits par le passage de polynucléotide à travers le pore à 1 V, colonne de gauche : à 150 mM NaCl, de droite : à 500 mM de NaCl. Pour le polyA NP-natif : histogrammes noirs, NP-TMS : histogrammes rouges hachurés. Pour le polyC NP-natif : histogrammes noirs hachurés, NP-TMS : histogrammes rouges	110
Figure 70: Fréquence d'entrée des polyA à travers le pore en fonction du voltage appliqué. SiN natif à 150 mM, colonnes noires pleines, SiN natif à 500 mM, colonnes noires hachurées, SiN TMS à 150 mM, colonnes rouges pleines, SiN TMS à 500 mM, colonnes rouges hachurées.....	111
Figure 71 : Fréquence d'entrée des polyC à travers le pore en fonction du voltage appliqué. SiN natif à 150 mM, colonnes noires pleines, SiN natif à 500 mM, colonnes noires hachurées, SiN TMS à 150 mM, colonnes rouges pleines, SiN TMS à 500 mM, colonnes rouges hachurées.....	112
Figure 72: Comparaison de la fréquence d'entrée des polyA et polyC à l'intérieur du NP- natif et du NP- TMS à 1 V, 150 mM NaCl	113
Figure 73: Schéma représentatif du passage du polynucléotide à travers les différents pores en fonction de la concentration en sel. Le polynucléotide est représenté par le polymère négativement chargé, bleu. Les cations rouges représentent les ions sodium et les charges négatives, les anions de chlore.	113
Figure 74: Evolution de la fréquence d'entrée des polyA à l'intérieur du pore natif (en noir) ou TMS (en rouge) en fonction de la concentration en Mg^{2+}	115
Figure 75 : Schéma représentatif du passage du polyA à travers les différents pores après addition d'un agent chélatant. Le polyA est représenté par le polymère négativement chargé, bleu. Les cations de magnésium sont représentés par les charges positives violettes, les rouges sont pour les ions sodium et les charges négatives représentent les anions de chlore.....	116
Figure 76:Transport ionique du nanopore. a. Courbe I-V avant (noir) et après (bleu) le dépôt de la couche d' Al_2O_3 par ALD, b. Conductance en fonction de la concentration en KCl à pH 8,4, c. Facteur de rectification pour le nanopore recouvert d' Al_2O_3 en fonction de la concentration en KCl à pH 8,4, d. Densité spectrale de puissance en fonction de la fréquence pour un nanopore conique à 500 mV, enregistrée à 200 kHz, filtrée à 10 kHz dans une solution de KCl 1 M, Tris 10 mM, et EDTA 1 mM, à pH 8,4.....	118
Figure 77: Exemples de traces de courant obtenues sans ADN (noté control), et avec les différents échantillons T_{40} , A_{40}/T_{40} , A_{10}/T_{10}	120
Figure 78: Histogrammes des paramètres des événements, a. Temps de résidence b. Blocages relatifs de courant	120
Figure 79 : Cartes des événements, temps de résidence en fonction des blocages relatifs de courant.	122
Figure 80 : Structure de N-[3-Trimethoxysilyl]propyl]ethylenediamine (AEAPTMS)	128
Figure 81: Schéma du pore en PET (représenté par le rectangle gris) fonctionnalisé après dépôts d'ALD (couche d' Al_2O_3 en orange, de ZnO en marron), et la fonctionnalisation par AEAPTMS pour créer les amines en surface, et enfin le greffage de mPEG-NHS.....	130

Figure 82 : Courbes I-V pour un pore en PET cylindrique, (noir) après l'attaque chimique (~ 51 nm de diamètre), (rouge) après l'ALD et la fonctionnalisation par les amines (~ 26 nm de diamètre), (bleu) après le greffage des PEG de façon asymétrique.....	130
Figure 83: Schéma représentant le pore en PET conique (gris), avec l'or déposé par pulvérisation du côté tip du pore, et les PEG (traits noirs) auto assemblés sur l'or grâce à leurs têtes thiolés (points noirs).....	131
Figure 84: Taux de croissance du dépôt d'or sur substrat de SiO ₂ /Si calculé par ellipsométrie. Les points ont été obtenus expérimentalement, la droite rouge est l'ajustement linéaire ($\tau = 0,23023 \pm 0,01 \text{ nm s}^{-1}$)	132
Figure 85 : Courbes I-V après l'attaque chimique, (rouge) après dépôt d'or, et fonctionnalisation par les SAMs	133
Figure 86 : a. Pore natif après ouverture par attaque chimique ($d \sim 900 \pm 24 \text{ nm}$) b. Même membrane que en a, après 140 s de Au sputtering (épaisseur théorique $\sim 32 \text{ nm (rayon)}^{-1}$), $d_{\text{exp}} \sim 820 \pm 16 \text{ nm}$ (épaisseur expérimentale $\sim 40 \text{ nm (rayon)}^{-1}$) c. Même membrane que en a, après 228 s de Au sputtering (épaisseur théorique $\sim 53 \text{ nm (rayon)}^{-1}$), $d_{\text{exp}} \sim 755 \pm 18 \text{ nm}$ (épaisseur expérimentale $\sim 70 \text{ nm (rayon)}^{-1}$)	134
Figure 87 : Les fonctions carboxyles à l'intérieur du pore en PET, après l'attaque chimique, sont utilisées pour attacher les fonctions amines qui sont ensuite utilisées pour greffer les PEG	135
Figure 88: Courbes I-V pour un pore natif (noir), après fonctionnalisation avec Et(NH ₂) ₂ (rouge), et mPEG (bleu), immergé dans une solution de KCl 1M, à pH7. a. Petit diamètre du pore estimé à $d = 40 \pm 5 \text{ nm}$, le grand $\sim 375 \text{ nm}$, b. Petit diamètre du pore estimé à $d = 20 \pm 2 \text{ nm}$, le grand $\sim 425 \text{ nm}$	136
Figure 89: Angle de contact en fonction des différents traitements de surface : a. Plaque de Silicium native, b. Silicium après dépôt d'or et SAMs des PEG, c. Plaque de silicium, (Si) après dépôt de 5 bicouches d'ALD, d. Silicium après dépôt de 5 bicouches d'ALD et dépôt en phase vapeur d'AEPTMS, e. Silicium après dépôt de 5 bicouches d'ALD et dépôt en phase vapeur d'AEPTMS et PEGylation.....	137
Figure 90 : a. Images AFM d'une solution d'amyloïdes à 2 μM en unité monomère déposée sur du mica. Les amyloïdes ont été fabriqués en utilisant la méthode précédemment décrite, pendant 24 h à 70°C. b. Amyloïdes sélectionnés et analysés dans le profil c. d. Image AFM d'amyloïdes, les profils de 6 d'entre eux sont reportés en e. f. Représentation 3D d'un amyloïde	139
Figure 91 : Courants enregistrés pour un pore fonctionnalisé asymétriquement par auto-assemblage de PEG sur couche d'or, ayant un petit diamètre final de 100 nm, à 0,5 M de KCl pour un potentiel appliqué du côté <i>trans</i> (grande ouverture) de a.- 5 V, b. -4 V	140
Figure 92 : Courant mesuré en fonction du temps, pour un potentiel de - 5 V, avec une concentration en amyloïde de lysozyme (incubé pendant 24 h à 70°C) de 2 μM , a. 1 ^{er} enregistrement, b. 2 ^{ème} enregistrement	141
Figure 93 : Courant mesuré en fonction du temps, pour un potentiel de - 4 V, avec une concentration en amyloïde de lysozyme (incubé pendant 24 h à 70°C) de 2 μM	142
Figure 94 : Courant mesuré en fonction du temps, pour un potentiel de 5 V, à 0,5 M de KCl	143
Figure 95: Courant enregistré en fonction du temps, à - 500 mV, pour un pore après fonctionnalisation avec Et(NH ₂) ₂ et mPEG. La courbe noire représente un pore dont le petit diamètre pore est estimé à $d = 40 \pm$	

5 nm, le grand ~ 375 nm. La courbe rouge, le petit diamètre du pore est estimé à $d = 20 \pm 2$ nm, le grand ~ 425 nm. a. 0,5 M KCl, pH 7, b. 0,5 M KCl, pH 7, plus 2 μ M d'amyloïdes (3h, 70°C) ont été ajouté du côté *tip* du pore. 143

Index des tables

Table 1 : Caractéristiques des amplificateurs	54
Table 2 : Conductivités des solutions électrolytiques de NaCl en fonction de leurs concentrations, utilisées pour la caractérisation des pores cylindriques	61
Table 3 : Mesures de rugosité obtenues par AFM.....	68
Table 4 : Caractéristiques de fabrication et de fonctionnalisation des nanopores étudiés.....	77
Table 5: Diamètres des nanopores coniques	88
Table 6 : Détails des paramètres des augmentations de courant pour le poly A à 1 V	109
Table 7 : Détails des paramètres des augmentations de courant pour les polyC	109
Table 8: Valeurs moyennes des histogrammes des évènements	121
Table 9 : Fonctionnalisation utilisée dans ce chapitre.....	128
Table 10 : Coefficients de diffusion obtenus par DLS, l'hypothèse faite quand à la géométrie est que les amyloïdes sont de formes cylindriques avec un diamètre de 6 nm	140

Références bibliographique

- (1) Hille, B. Ionic Channels - Molecular Pores of Excitable-Membranes. *Harvey Lect* **1988**, 82, 47-69.
- (2) Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *J Physiol-London* **1952**, 117, 500-544.
- (3) Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A. L.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **1998**, 280, 69-77.
- (4) Doupnik, C. A.; Davidson, N.; Lester, H. A. The Inward Rectifier Potassium Channel Family. *Curr Opin Neurobiol* **1995**, 5, 268-277.
- (5) Lev, S.; Moreno, H.; Martinez, R.; Canoll, P.; Peles, E.; Musacchio, J. M.; Plowman, G. D.; Rudy, B.; Schlessinger, J. Protein-Tyrosine Kinase Pyk2 Involved in Ca²⁺-Induced Regulation of Ion-Channel and Map Kinase Functions. *Nature* **1995**, 376, 737-745.
- (6) Gouaux, E.; MacKinnon, R. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **2005**, 310, 1461-1465.
- (7) Menestrina, G.; Dalla Sera, M.: *Pore-forming peptides and protein toxins*; CRC Press, 2005; Vol. 5.
- (8) Balme, S.; Janot, J. M.; Berardo, L.; Henn, F.; Bonhenry, D.; Kraszewski, S.; Picaud, F.; Ramseyer, C. New Bioinspired Membrane Made of a Biological Ion Channel Confined into the Cylindrical Nanopore of a Solid-State Polymer. *Nano Lett* **2011**, 11, 712-716.
- (9) Song, L. Z.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **1996**, 274, 1859-1866.
- (10) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *P Natl Acad Sci USA* **1996**, 93, 13770-13773.
- (11) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. Characterization of individual nucleic acid polymers with an ion channel. *Biophys J* **1996**, 70, Mpo26-Mpo26.
- (12) Parker, M. W.; Buckley, J. T.; Postma, J. P. M.; Tucker, A. D.; Leonard, K.; Pattus, F.; Tsernoglou, D. Structure of the Aeromonas Toxin Proaerolysin in Its Water-Soluble and Membrane-Channel States. *Nature* **1994**, 367, 292-295.
- (13) Pastoriza-Gallego, M.; Rabah, L.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; Goot, F. G.; Auvray, L.; Betton, J. M.; Pelta, J. Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore. *J Am Chem Soc* **2011**, 133, 2923-2931.
- (14) Merstorf, C.; Cressiot, B.; Pastoriza-Gallego, M.; Oukhaled, A.; Betton, J. M.; Auvray, L.; Pelta, J. Wild Type, Mutant Protein Unfolding and Phase Transition Detected by Single-Nanopore Recording. *Acs Chem Biol* **2012**, 7, 652-658.
- (15) Stefureac, R.; Long, Y. T.; Kraatz, H. B.; Howard, P.; Lee, J. S. Transport of alpha-helical peptides through alpha-hemolysin and aerolysin pores. *Biochemistry-Us* **2006**, 45, 9172-9179.
- (16) Danelon, C.; Winterhalter, M.: Reconstitution of General Diffusion Pores from Bacterial Outer Membranes. In *Bacterial and Eukaryotic Porins*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005; pp 99-117.
- (17) Butler, T. Z.; Pavlenok, M.; Derrington, I. M.; Niederweis, M.; Gundlach, J. H. Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *P Natl Acad Sci USA* **2008**, 105, 20647-20652.
- (18) Manrao, E. A.; Derrington, I. M.; Laszlo, A. H.; Langford, K. W.; Hopper, M. K.; Gillgren, N.; Pavlenok, M.; Niederweis, M.; Gundlach, J. H. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nat Biotechnol* **2012**, 30, 349-U174.
- (19) Derrington, I. M.; Butler, T. Z.; Collins, M. D.; Manrao, E.; Pavlenok, M.; Niederweis, M.; Gundlach, J. H. Nanopore DNA sequencing with MspA. *P Natl Acad Sci USA* **2010**, 107, 16060-16065.

- (20) Dekker, C. Solid-state nanopores. *Nat Nano* **2007**, *2*, 209-215.
- (21) Gyurcsanyi, R. E. Chemically-modified nanopores for sensing. *Trac-Trend Anal Chem* **2008**, *27*, 627-639.
- (22) Healy, K.; Schiedt, B.; Morrison, A. P. Solid-state nanopore technologies for nanopore-based DNA analysis. *Nanomedicine-Uk* **2007**, *2*, 875-897.
- (23) de la Escosura-Muniz, A.; Merkoci, A. Nanochannels Preparation and Application in Biosensing. *Acs Nano* **2012**, *6*, 7556-7583.
- (24) Hou, X.; Guo, W.; Jiang, L. Biomimetic smart nanopores and nanochannels. *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 2385-2401.
- (25) Howorka, S.; Siwy, Z. Nanopore analytics: sensing of single molecules. *Chem Soc Rev* **2009**, *38*, 2360-2384.
- (26) Jeon, G.; Yang, S. Y.; Kim, J. K. Functional nanoporous membranes for drug delivery. *J Mater Chem* **2012**, *22*, 14814-14834.
- (27) Stroeve, P.; Ileri, N. Biotechnical and other applications of nanoporous membranes. *Trends Biotechnol* **2011**, *29*, 259-266.
- (28) Li, J.; Stein, D.; McMullan, C.; Branton, D.; Aziz, M. J.; Golovchenko, J. A. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature* **2001**, *412*, 166-169.
- (29) Storm, A. J.; Chen, J. H.; Ling, X. S.; Zandbergen, H. W.; Dekker, C. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision. *Nat Mater* **2003**, *2*, 537-540.
- (30) Venkatesan, B. M.; Shah, A. B.; Zuo, J. M.; Bashir, R. DNA Sensing Using Nanocrystalline Surface-Enhanced Al₂O₃ Nanopore Sensors. *Adv Funct Mater* **2010**, *20*, 1266-1275.
- (31) Liu, S.; Lu, B.; Zhao, Q.; Li, J.; Gao, T.; Chen, Y. B.; Zhang, Y. F.; Liu, Z. F.; Fan, Z. C.; Yang, F. H.; You, L. P.; Yu, D. P. Boron Nitride Nanopores: Highly Sensitive DNA Single-Molecule Detectors. *Adv Mater* **2013**, *25*, 4549-4554.
- (32) Garaj, S.; Hubbard, W.; Reina, A.; Kong, J.; Branton, D.; Golovchenko, J. A. Graphene as a subnanometre trans-electrode membrane. *Nature* **2010**, *467*, 190-193.
- (33) Jain, T.; Rasera, B. C.; Guerrero, R. J. S.; Boutilier, M. S. H.; O'Hern, S. C.; Idrobo, J. C.; Karnik, R. Heterogeneous sub-continuum ionic transport in statistically isolated graphene nanopores. *Nat Nanotechnol* **2015**, *10*, 1053-1057.
- (34) Apel, P. Track etching technique in membrane technology. *Radiat Meas* **2001**, *34*, 559-566.
- (35) Wanunu, M.; Meller, A. Chemically modified solid-state nanopores. *Nano Lett* **2007**, *7*, 1580-1585.
- (36) Harrell, C. C.; Choi, Y.; Horne, L. P.; Baker, L. A.; Siwy, Z. S.; Martin, C. R. Resistive-pulse DNA detection with a conical nanopore sensor. *Langmuir* **2006**, *22*, 10837-10843.
- (37) Oganessian, V. R.; Orelovich, O. L.; Yanina, I. V.; Apel, P. Y. Study of retention ability of nucleopore membranes. *Colloid J+* **2001**, *63*, 755-761.
- (38) Apel, P. Y.; Blonskaya, I. V.; Didyk, A. Y.; Dmitriev, S. N.; Orelovitch, O. L.; Root, D.; Samoilova, L. I.; Vutsadakis, V. A. Surfactant-enhanced control of track-etch pore morphology. *Nucl Instrum Meth B* **2001**, *179*, 55-62.
- (39) Apel, P. Y.; Blonskaya, I. V.; Dmitriev, S. N.; Orelovitch, O. L.; Sartowska, B. Structure of polycarbonate track-etch membranes: Origin of the "paradoxical" pore shape. *J Membrane Sci* **2006**, *282*, 393-400.
- (40) Man, L. C. T.; Apel, P.; Cheung, T.; Westerberg, L.; Yu, K. N.; Zet, C.; Spohr, R. Influence of a surfactant on single ion track etching: Preparing and manipulating cylindrical micro wires. *Nucl Instrum Meth B* **2007**, *265*, 621-625.
- (41) Apel, P. Y.; Blonskaya, I. V.; Dmitriev, S. N.; Mamonova, T. I.; Orelovitch, O. L.; Sartowska, B.; Yamauchi, Y. Surfactant-controlled etching of ion track nanopores and its practical applications in membrane technology. *Radiat Meas* **2008**, *43*, S552-S559.
- (42) Hou, X.; Dong, H.; Zhu, D. B.; Jiang, L. Fabrication of Stable Single Nanochannels with Controllable Ionic Rectification. *Small* **2010**, *6*, 361-365.
- (43) Hou, X.; Liu, Y. J.; Dong, H.; Yang, F.; Li, L.; Jiang, L. A pH-Gating Ionic Transport Nanodevice: Asymmetric Chemical Modification of Single Nanochannels. *Adv Mater* **2010**, *22*, 2440-2443.

- (44) Pevarnik, M.; Healy, K.; Davenport, M.; Yen, J.; Siwy, Z. S. A hydrophobic entrance enhances ion current rectification and induces dewetting in asymmetric nanopores. *Analyst* **2012**, *137*, 2944-2950.
- (45) Cabello-Aguilar, S.; Balme, S.; Abou Chaaya, A.; Bechelany, M.; Balanzat, E.; Janot, J. M.; Pochat-Bohatier, C.; Miele, P.; Dejardin, P. Slow translocation of polynucleotides and their discrimination by alpha-hemolysin inside a single track-etched nanopore designed by atomic layer deposition. *Nanoscale* **2013**, *5*, 9582-9586.
- (46) Hall, A. R.; Scott, A.; Rotem, D.; Mehta, K. K.; Bayley, H.; Dekker, C. Hybrid pore formation by directed insertion of alpha-haemolysin into solid-state nanopores. *Nat Nanotechnol* **2010**, *5*, 874-877.
- (47) White, R. J.; Ervin, E. N.; Yang, T.; Chen, X.; Daniel, S.; Cremer, P. S.; White, H. S. Single ion-channel recordings using glass nanopore membranes. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 11766-11775.
- (48) Yusko, E. C.; Johnson, J. M.; Majd, S.; Prangkio, P.; Rollings, R. C.; Li, J. L.; Yang, J.; Mayer, M. Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls. *Nat Nanotechnol* **2011**, *6*, 253-260.
- (49) Yusko, E. C.; Bruhn, B. R.; Eggenberger, O.; Houghtaling, J.; Rollings, R. C.; Walsh, N. C.; Nandivada, S.; Pindrus, M.; Hall, A. R.; Sept, D.; Li, J. L.; Kalonia, D. S.; Mayer, M. Real-time shape approximation and 5-D fingerprinting of single proteins. *arXiv:1510.01935* **2015**.
- (50) Venkatesan, B. M.; Polans, J.; Comer, J.; Sridhar, S.; Wendell, D.; Aksimentiev, A.; Bashir, R. Lipid bilayer coated Al₂O₃ nanopore sensors: towards a hybrid biological solid-state nanopore. *Biomed Microdevices* **2011**, *13*, 671-682.
- (51) Balme, S.; Picaud, F.; Kraszewski, S.; Dejardin, P.; Janot, J. M.; Lepoitevin, M.; Capomanes, J.; Ramseyer, C.; Henn, F. Controlling potassium selectivity and proton blocking in a hybrid biological/solid-state polymer nanoporous membrane. *Nanoscale* **2013**, *5*, 3961-3968.
- (52) White, H. S.; Bund, A. Ion current rectification at nanopores in glass membranes. *Langmuir* **2008**, *24*, 2212-2218.
- (53) Kim, M. J.; McNally, B.; Murata, K.; Meller, A. Characteristics of solid-state nanometre pores fabricated using a transmission electron microscope. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 205302.
- (54) Marshall, M. M.; Yang, J. J.; Hall, A. R. Direct and Transmission Milling of Suspended Silicon Nitride Membranes With a Focused Helium Ion Beam. *Scanning* **2012**, *34*, 101-106.
- (55) Kwok, H.; Briggs, K.; Tabard-Cossa, V. Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown. *Plos One* **2014**, *9*, e92880.
- (56) Briggs, K.; Charron, M.; Kwok, H.; Le, T.; Chahal, S.; Bustamante, J.; Waugh, M.; Tabard-Cossa, V. Kinetics of nanopore fabrication during controlled breakdown of dielectric membranes in solution. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 084004.
- (57) Apel, P. Y. Heavy-Particle Tracks in Polymers and Polymeric Track Membranes. *Radiat Meas* **1995**, *25*, 667-674.
- (58) Apel, P. Y.; Korchev, Y. E.; Siwy, Z.; Spohr, R.; Yoshida, M. Diode-like single-ion track membrane prepared by electro-stopping. *Nucl Instrum Meth B* **2001**, *184*, 337-346.
- (59) Spohr, R. Status of ion track technology - Prospects of single tracks. *Radiat Meas* **2005**, *40*, 191-202.
- (60) Siwy, Z.; Apel, P.; Dobrev, D.; Neumann, R.; Spohr, R.; Trautmann, C.; Voss, K. Ion transport through asymmetric nanopores prepared by ion track etching. *Nucl Instrum Meth B* **2003**, *208*, 143-148.
- (61) Hou, X.; Zhang, H. C.; Jiang, L. Building Bio-Inspired Artificial Functional Nanochannels: From Symmetric to Asymmetric Modification. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51*, 5296-5307.
- (62) Apel, P. Y.; Blonskaya, I. V.; Orelovitch, O. L.; Root, D.; Vutsadakis, V.; Dmitriev, S. N. Effect of nanosized surfactant molecules on the etching of ion tracks: New degrees of freedom in design of pore shape. *Nucl Instrum Meth B* **2003**, *209*, 329-334.
- (63) Kim, M. J.; Wanunu, M.; Bell, D. C.; Meller, A. Rapid fabrication of uniformly sized nanopores and nanopore arrays for parallel DNA analysis. *Adv Mater* **2006**, *18*, 3149-3153.

- (64) Kwok, W. H.; Tabard-Cossa, V.; Briggs, K. A. Z.: Fabrication of nanopores using high electric fields. Patent WO2013167955A1, 2015.
- (65) Larkin, J.; Henley, R.; Bell, D. C.; Cohen-Karni, T.; Rosenstein, J. K.; Wanunu, M. Slow DNA Transport through Nanopores in Hafnium Oxide Membranes. *Acs Nano* **2013**, *7*, 10121-10128.
- (66) Knez, M.; Niesch, K.; Niinisto, L. Synthesis and surface engineering of complex nanostructures by atomic layer deposition. *Adv Mater* **2007**, *19*, 3425-3438.
- (67) dela Torre, R.; Larkin, J.; Singer, A.; Meller, A. Fabrication and characterization of solid-state nanopore arrays for high-throughput DNA sequencing. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 385308.
- (68) Chen, P.; Mitsui, T.; Farmer, D. B.; Golovchenko, J.; Gordon, R. G.; Branton, D. Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores. *Nano Lett* **2004**, *4*, 1333-1337.
- (69) Abou Chaaya, A.; Le Poitevin, M.; Cabello-Aguilar, S.; Balme, S.; Bechelany, M.; Kraszewski, S.; Picaud, F.; Cambedouzou, J.; Balanzat, E.; Janot, J. M.; Thami, T.; Miele, P.; Dejardin, P. Enhanced Ionic Transport Mechanism by Gramicidin A Confined Inside Nanopores Tuned by Atomic Layer Deposition. *J Phys Chem C* **2013**, *117*, 15306-15315.
- (70) Venkatesan, B. M.; Dorvel, B.; Yemenicioglu, S.; Watkins, N.; Petrov, I.; Bashir, R. Highly Sensitive, Mechanically Stable Nanopore Sensors for DNA Analysis. *Adv Mater* **2009**, *21*, 2771-2776.
- (71) Thangaraj, V.; Lepoitevin, M.; Smietana, M.; Balanzat, E.; Bechelany, M.; Janot, J. M.; Vasseur, J. J.; Subramanian, S.; Balme, S. Detection of short ssDNA and dsDNA by current-voltage measurements using conical nanopores coated with Al₂O₃ by atomic layer deposition. *Microchim Acta* **2016**, *183*, 1011-1017.
- (72) Banerjee, S.; Wilson, J.; Shim, J.; Shankla, M.; Corbin, E. A.; Aksimentiev, A.; Bashir, R. Slowing DNA Transport Using Graphene-DNA Interactions. *Adv Funct Mater* **2015**, *25*, 936-946.
- (73) Russo, C. J.; Golovchenko, J. A. Atom-by-atom nucleation and growth of graphene nanopores. *P Natl Acad Sci USA* **2012**, *109*, 5953-5957.
- (74) O'Hern, S. C.; Boutilier, M. S. H.; Idrobo, J. C.; Song, Y.; Kong, J.; Laoui, T.; Atieh, M.; Karnik, R. Selective Ionic Transport through Tunable Subnanometer Pores in Single-Layer Graphene Membranes. *Nano Lett* **2014**, *14*, 1234-1241.
- (75) Park, K. B.; Kim, H. J.; Kim, H. M.; Han, S. A.; Lee, K. H.; Kim, S. W.; Kim, K. B. Noise and sensitivity characteristics of solid-state nanopores with a boron nitride 2-D membrane on a pyrex substrate. *Nanoscale* **2016**, *8*, 5755-5763.
- (76) Gu, Z. L.; Zhang, Y. Z.; Luan, B. Q.; Zhou, R. H. DNA translocation through single-layer boron nitride nanopores. *Soft Matter* **2016**, *12*, 817-823.
- (77) Feng, J. D.; Liu, K.; Bulushev, R. D.; Khlybov, S.; Dumcenco, D.; Kis, A.; Radenovic, A. Identification of single nucleotides in MoS₂ nanopores. *Nat Nanotechnol* **2015**, *10*, 1070-1076.
- (78) Feng, J.; Liu, K.; Graf, M.; Lihter, M.; Bulushev, R. D.; Dumcenco, D.; Alexander, D. T. L.; Krasnozhon, D.; Vuletic, T.; Kis, A.; Radenovic, A. Electrochemical Reaction in Single Layer MoS₂: Nanopores Opened Atom by Atom. *Nano Lett* **2015**, *15*, 3431-3438.
- (79) Liu, S.; Zhao, Q.; Xu, J.; Yan, K.; Peng, H. L.; Yang, F. H.; You, L. P.; Yu, D. P. Fast and controllable fabrication of suspended graphene nanopore devices. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 085301.
- (80) Traversi, F.; Raillon, C.; Benameur, S. M.; Liu, K.; Khlybov, S.; Tosun, M.; Krasnozhon, D.; Kis, A.; Radenovic, A. Detecting the translocation of DNA through a nanopore using graphene nanoribbons. *Nat Nanotechnol* **2013**, *8*, 939-945.
- (81) Branton, D.; Deamer, D. W.; Marziali, A.; Bayley, H.; Benner, S. A.; Butler, T.; Di Ventra, M.; Garaj, S.; Hibbs, A.; Huang, X. H.; Jovanovich, S. B.; Krstic, P. S.; Lindsay, S.; Ling, X. S. S.; Mastrangelo, C. H.; Meller, A.; Oliver, J. S.; Pershin, Y. V.; Ramsey, J. M.; Riehn, R.; Soni, G. V.; Tabard-Cossa, V.; Wanunu, M.; Wiggin, M.; Schloss, J. A. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1146-1153.
- (82) Bayley, H.; Jayasinghe, L. Functional engineered channels and pores - (Review). *Mol Membr Biol* **2004**, *21*, 209-220.

- (83) Bell, N. A. W.; Engst, C. R.; Ablay, M.; Divitini, G.; Ducati, C.; Liedl, T.; Keyser, U. F. DNA Origami Nanopores. *Nano Lett* **2012**, *12*, 512-517.
- (84) Wei, R. S.; Martin, T. G.; Rant, U.; Dietz, H. DNA Origami Gatekeepers for Solid-State Nanopores. *Angew Chem Int Edit* **2012**, *51*, 4864-4867.
- (85) Picaud, F.; Boukari, K.; Balme, S.; Janot, J. M.; Henn, F. Selectivity against proton in cation permeable hybrid solid state membrane. *Comp Mater Sci* **2016**, *111*, 380-386.
- (86) Schoch, R. B.; van Lintel, H.; Renaud, P. Effect of the surface charge on ion transport through nanoslits. *Phys Fluids* **2005**, *17*, 100604.
- (87) Anderson, J. L. Colloid Transport by Interfacial Forces. *Annu Rev Fluid Mech* **1989**, *21*, 61-99.
- (88) Andelman, D.: Handbook of Biological Physics, edited by Lipowsky R. and Sackmann E., Vol. 1. Elsevier Science BV, Amsterdam, 1995.
- (89) Plecis, A.; Schoch, R. B.; Renaud, P. Ionic transport phenomena in nanofluidics: Experimental and theoretical study of the exclusion-enrichment effect on a chip. *Nano Lett* **2005**, *5*, 1147-1155.
- (90) Karnik, R.; Duan, C. H.; Castelino, K.; Daiguji, H.; Majumdar, A. Rectification of ionic current in a nanofluidic diode. *Nano Lett* **2007**, *7*, 547-551.
- (91) Siwy, Z.; Fulinski, A. Fabrication of a synthetic nanopore ion pump. *Phys Rev Lett* **2002**, *89*, 198103.
- (92) Stein, D.; Kruithof, M.; Dekker, C. Surface-charge-governed ion transport in nanofluidic channels. *Phys Rev Lett* **2004**, *93*, 035901
- (93) Israelachvili, J.: Intermolecular and surface forces second edition. Academic Press, London, UK, 1992.
- (94) Pu, Q. S.; Yun, J. S.; Temkin, H.; Liu, S. R. Ion-enrichment and ion-depletion effect of nanochannel structures. *Nano Lett* **2004**, *4*, 1099-1103.
- (95) Wang, Y. C.; Stevens, A. L.; Han, J. Y. Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter. *Anal Chem* **2005**, *77*, 4293-4299.
- (96) Hunter, R. J.: *Foundations of colloid science*; Oxford University Press, 2001.
- (97) Schoch, R. B.; Han, J.; Renaud, P. Transport phenomena in nanofluidics. *Rev Mod Phys* **2008**, *80*, 839-883.
- (98) Balme, S.; Picaud, F.; Manghi, M.; Palmeri, J.; Bechelany, M.; Cabello-Aguilar, S.; Abou-Chaaya, A.; Miele, P.; Balanzat, E.; Janot, J. M. Ionic transport through sub-10 nm diameter hydrophobic high-aspect ratio nanopores: experiment, theory and simulation. *Sci Rep-Uk* **2015**, *5*, 10135.
- (99) Hall, J. E. Access Resistance of a Small Circular Pore. *J Gen Physiol* **1975**, *66*, 531-532.
- (100) Shimizu, S.; Ellison, M.; Aziz, K.; Wang, Q. H.; Ulissi, Z.; Gunther, Z.; Bellisario, D.; Strano, M. S. Stochastic Pore Blocking and Gating in PDMS-Glass Nanopores from Vapor-Liquid Phase Transitions. *J Phys Chem C* **2013**, *117*, 9641-9651.
- (101) Martin, C. R.; Nishizawa, M.; Jirage, K.; Kang, M. S.; Lee, S. B. Controlling ion-transport selectivity in gold nanotubule membranes. *Adv Mater* **2001**, *13*, 1351-1362.
- (102) Vlassioux, I.; Smirnov, S.; Siwy, Z. Ionic selectivity of single nanochannels. *Nano Lett* **2008**, *8*, 1978-1985.
- (103) Siwy, Z. S. Ion-current rectification in nanopores and nanotubes with broken symmetry. *Adv Funct Mater* **2006**, *16*, 735-746.
- (104) Siwy, Z.; Fulinski, A. A nanodevice for rectification and pumping ions. *Am J Phys* **2004**, *72*, 567-574.
- (105) Woermann, D. Electrochemical transport properties of a cone-shaped nanopore: revisited. *Phys Chem Chem Phys* **2004**, *6*, 3130-3132.
- (106) Woermann, D. Electrochemical transport properties of a cone-shaped nanopore: high and low electrical conductivity states depending on the sign of an applied electrical potential difference. *Phys Chem Chem Phys* **2003**, *5*, 1853-1858.
- (107) Cervera, J.; Schiedt, B.; Neumann, R.; Mafe, S.; Ramirez, P. Ionic conduction, rectification, and selectivity in single conical nanopores. *J Chem Phys* **2006**, *124*, 104706.

- (108) Cervera, J.; Schiedt, B.; Ramirez, P. A Poisson/Nernst-Planck model for ionic transport through synthetic conical nanopores. *Europhys Lett* **2005**, *71*, 35-41.
- (109) Tagliazucchi, M.; Azzaroni, O.; Szleifer, I. Responsive Polymers End-Tethered in Solid-State Nanochannels: When Nanoconfinement Really Matters. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 12404-12411.
- (110) Daiguji, H.; Oka, Y.; Shirono, K. Nanofluidic diode and bipolar transistor. *Nano Lett* **2005**, *5*, 2274-2280.
- (111) Mafe, S.; Ramirez, P. Electrochemical characterization of polymer ion-exchange bipolar membranes. *Acta Polym* **1997**, *48*, 234-250.
- (112) Wei, C.; Bard, A. J.; Feldberg, S. W. Current rectification at quartz nanopipet electrodes. *Anal Chem* **1997**, *69*, 4627-4633.
- (113) Siwy, Z.; Gu, Y.; Spohr, H. A.; Baur, D.; Wolf-Reber, A.; Spohr, R.; Apel, P.; Korchev, Y. E. Rectification and voltage gating of ion currents in a nanofabricated pore. *Europhys Lett* **2002**, *60*, 349-355.
- (114) Vlassioul, I.; Siwy, Z. S. Nanofluidic diode. *Nano Lett* **2007**, *7*, 552-556.
- (115) Karnik, R.; Castelino, K.; Duan, C. H.; Majumdar, A. Diffusion-limited patterning of molecules in nanofluidic channels. *Nano Lett* **2006**, *6*, 1735-1740.
- (116) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. The detection of individual nucleic acid polymers traversing a protein ion channel. *Prog Biophys Mol Bio* **1996**, *65*, Pb127-Pb127.
- (117) Bacri, L.; Oukhaled, A. G.; Schiedt, B.; Patriarche, G.; Bourhis, E.; Gierak, J.; Pelta, J.; Auvray, L. Dynamics of Colloids in Single Solid-State Nanopores. *J Phys Chem B* **2011**, *115*, 2890-2898.
- (118) Coulter, W. H.: Means for counting particles suspended in a fluid. US2656508 A, 1953.
- (119) Chang, H.; Kosari, F.; Andreadakis, G.; Alam, M. A.; Vasmatazis, G.; Bashir, R. DNA-mediated fluctuations in ionic current through silicon oxide nanopore channels. *Nano Lett* **2004**, *4*, 1551-1556.
- (120) Smeets, R. M. M.; Keyser, U. F.; Krapf, D.; Wu, M. Y.; Dekker, N. H.; Dekker, C. Salt dependence of ion transport and DNA translocation through solid-state nanopores. *Nano Lett* **2006**, *6*, 89-95.
- (121) Pevarnik, M.; Healy, K.; Toimil-Molares, M. E.; Morrison, A.; Letant, S. E.; Siwy, Z. S. Polystyrene Particles Reveal Pore Substructure As They Translocate. *Acs Nano* **2012**, *6*, 7295-7302.
- (122) Firnkes, M.; Pedone, D.; Knezevic, J.; Dobliger, M.; Rant, U. Electrically Facilitated Translocations of Proteins through Silicon Nitride Nanopores: Conjoint and Competitive Action of Diffusion, Electrophoresis, and Electroosmosis. *Nano Lett* **2010**, *10*, 2162-2167.
- (123) Wanunu, M.; Morrison, W.; Rabin, Y.; Grosberg, A. Y.; Meller, A. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. *Nat Nanotechnol* **2010**, *5*, 160-165.
- (124) Larkin, J.; Henley, R. Y.; Muthukumar, M.; Rosenstein, J. K.; Wanunu, M. High-Bandwidth Protein Analysis Using Solid-State Nanopores. *Biophys J* **2014**, *106*, 696-704.
- (125) Henrickson, S. E.; Misakian, M.; Robertson, B.; Kasianowicz, J. J. Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Phys Rev Lett* **2000**, *85*, 3057-3060.
- (126) Cabello-Aguilar, S.; Abou Chaaya, A.; Bechelany, M.; Pochat-Bohatier, C.; Balanzat, E.; Janot, J. M.; Miele, P.; Balme, S. Dynamics of polymer nanoparticles through a single artificial nanopore with a high-aspect-ratio. *Soft Matter* **2014**, *10*, 8413-8419.
- (127) Harrell, C. C.; Lee, S. B.; Martin, C. R. Synthetic single-nanopore and nanotube membranes. *Anal Chem* **2003**, *75*, 6861-6867.
- (128) Menon, V. P.; Martin, C. R. Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles. *Anal Chem* **1995**, *67*, 1920-1928.
- (129) Jirage, K. B.; Hulteen, J. C.; Martin, C. R. Nanotubule-based molecular-filtration membranes. *Science* **1997**, *278*, 655-658.
- (130) Lee, S. B.; Martin, C. R. pH-switchable, ion-permselective gold nanotubule membrane based on chemisorbed cysteine. *Anal Chem* **2001**, *73*, 768-775.
- (131) Nishizawa, M.; Menon, V. P.; Martin, C. R. Metal Nanotubule Membranes with Electrochemically Switchable Ion-Transport Selectivity. *Science* **1995**, *268*, 700-702.

- (132) Scopece, P.; Baker, L. A.; Ugo, P.; Martin, C. R. Conical nanopore membranes: solvent shaping of nanopores. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3951-3956.
- (133) George, S. M. Atomic Layer Deposition: An Overview. *Chem Rev* **2010**, *110*, 111-131.
- (134) Marichy, C.; Bechelany, M.; Pinna, N. Atomic Layer Deposition of Nanostructured Materials for Energy and Environmental Applications. *Adv Mater* **2012**, *24*, 1017-1032.
- (135) Raghavan, R.; Bechelany, M.; Parlinska, M.; Frey, D.; Mook, W. M.; Beyer, A.; Michler, J.; Utke, I. Nanocrystalline-to-amorphous transition in nanolaminates grown by low temperature atomic layer deposition and related mechanical properties. *Appl Phys Lett* **2012**, *100*, 191912.
- (136) Lepoitevin, M.; Coulon, P. E.; Bechelany, M.; Cambedouzou, J.; Janot, J. M.; Balme, S. Influence of nanopore surface charge and magnesium ion on polyadenosine translocation. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 144001.
- (137) Chen, Z.; Jiang, Y. B.; Dunphy, D. R.; Adams, D. P.; Hodges, C.; Liu, N. G.; Zhang, N.; Xomeritakis, G.; Jin, X. Z.; Aluru, N. R.; Gaik, S. J.; Hillhouse, H. W.; Brinker, C. J. DNA translocation through an array of kinked nanopores. *Nat Mater* **2010**, *9*, 667-675.
- (138) Perez, I.; Robertson, E.; Banerjee, P.; Henn-Lecordier, L.; Son, S. J.; Lee, S. B.; Rubloff, G. W. TEM-based metrology for HfO₂ layers and nanotubes formed in anodic aluminum oxide nanopore structures. *Small* **2008**, *4*, 1223-1232.
- (139) Elam, J. W.; Routkevitch, D.; Mardilovich, P. P.; George, S. M. Conformal coating on ultrahigh-aspect-ratio nanopores of anodic alumina by atomic layer deposition. *Chem Mater* **2003**, *15*, 3507-3517.
- (140) Merchant, C. A.; Healy, K.; Wanunu, M.; Ray, V.; Peterman, N.; Bartel, J.; Fischbein, M. D.; Venta, K.; Luo, Z. T.; Johnson, A. T. C.; Drndic, M. DNA Translocation through Graphene Nanopores. *Nano Lett* **2010**, *10*, 2915-2921.
- (141) Kalman, E. B.; Vlassiuk, I.; Siwy, Z. S. Nanofluidic bipolar transistors. *Adv Mater* **2008**, *20*, 293-297.
- (142) Vlassiuk, I.; Kozel, T. R.; Siwy, Z. S. Biosensing with Nanofluidic Diodes. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 8211-8220.
- (143) Xia, F.; Guo, W.; Mao, Y. D.; Hou, X.; Xue, J. M.; Xia, H. W.; Wang, L.; Song, Y. L.; Ji, H.; Qi, O. Y.; Wang, Y. G.; Jiang, L. Gating of single synthetic nanopores by proton-driven DNA molecular motors. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 8345-8350.
- (144) Yameen, B.; Ali, M.; Neumann, R.; Ensinger, W.; Knoll, W.; Azzaroni, O. Proton-regulated rectified ionic transport through solid-state conical nanopores modified with phosphate-bearing polymer brushes. *Chem Commun* **2010**, *46*, 1908-1910.
- (145) Yameen, B.; Ali, M.; Neumann, R.; Ensinger, W.; Knoll, W.; Azzaroni, O. Single Conical Nanopores Displaying pH-Tunable Rectifying Characteristics. Manipulating Ionic Transport With Zwitterionic Polymer Brushes. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 2070-2071.
- (146) Ali, M.; Ramirez, P.; Mafe, S.; Neumann, R.; Ensinger, W. A pH-Tunable Nanofluidic Diode with a Broad Range of Rectifying Properties. *ACS Nano* **2009**, *3*, 603-608.
- (147) Jonkheijm, P.; Weinrich, D.; Schroder, H.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew Chem Int Edit* **2008**, *47*, 9618-9647.
- (148) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev* **2005**, *105*, 1103-1169.
- (149) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 1805-1834.
- (150) Wang, S. T.; Liu, H. J.; Liu, D. S.; Ma, X. Y.; Fang, X. H.; Jiang, L. Enthalpy-driven three-state switching of a superhydrophilic/superhydrophobic surface. *Angew Chem Int Edit* **2007**, *46*, 3915-3917.
- (151) Guo, W.; Xia, H. W.; Xia, F.; Hou, X.; Cao, L. X.; Wang, L.; Xue, J. M.; Zhang, G. Z.; Song, Y. L.; Zhu, D. B.; Wang, Y. G.; Jiang, L. Current Rectification in Temperature-Responsive Single Nanopores. *Chemphyschem* **2010**, *11*, 859-864.

- (152) Harrell, C. C.; Kohli, P.; Siwy, Z.; Martin, C. R. DNA - Nanotube artificial ion channels. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 15646-15647.
- (153) Wei, R. S.; Gatterdam, V.; Wieneke, R.; Tampe, R.; Rant, U. Stochastic sensing of proteins with receptor-modified solid-state nanopores. *Nat Nanotechnol* **2012**, *7*, 257-263.
- (154) Ali, M.; Yameen, B.; Cervera, J.; Ramirez, P.; Neumann, R.; Ensinger, W.; Knoll, W.; Azzaroni, O. Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolytes into Ionic Current Rectifying Solid-State Nanopores: Insights from Theory and Experiment. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 8338-8348.
- (155) Alem, H.; Blondeau, F.; Glinel, K.; Demoustier-Champagne, S.; Jonas, A. M. Layer-by-layer assembly of polyelectrolytes in nanopores. *Macromolecules* **2007**, *40*, 3366-3372.
- (156) Lepoitevin, M.; Jamilloux, B.; Bechelany, M.; Balanzat, E.; Janot, J. M.; Balme, S. Fast and reversible functionalization of a single nanopore based on layer-by-layer polyelectrolyte self-assembly for tuning current rectification and designing sensors. *Rsc Adv* **2016**, *6*, 32228-32233.
- (157) Tian, Y.; Hou, X.; Jiang, L. Biomimetic ionic rectifier systems: Asymmetric modification of single nanochannels by ion sputtering technology. *J Electroanal Chem* **2011**, *656*, 231-236.
- (158) Asatekin, A.; Gleason, K. K. Polymeric Nanopore Membranes for Hydrophobicity-Based Separations by Conformal Initiated Chemical Vapor Deposition. *Nano Lett* **2011**, *11*, 677-686.
- (159) Kalman, E. B.; Sudre, O.; Vlassiounk, I.; Siwy, Z. S. Control of ionic transport through gated single conical nanopores. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *394*, 413-419.
- (160) Li, N. C.; Yu, S. F.; Harrell, C. C.; Martin, C. R. Conical nanopore membranes. Preparation and transport properties. *Anal Chem* **2004**, *76*, 2025-2030.
- (161) Hou, X.; Yang, F.; Li, L.; Song, Y. L.; Jiang, L.; Zhu, D. B. A Biomimetic Asymmetric Responsive Single Nanochannel. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 11736-11742.
- (162) Wandera, D.; Wickramasinghe, S. R.; Husson, S. M. Stimuli-responsive membranes. *J Membrane Sci* **2010**, *357*, 6-35.
- (163) Xia, F.; Jiang, L. Bio-inspired, smart, multiscale interfacial materials. *Adv Mater* **2008**, *20*, 2842-2858.
- (164) Yameen, B.; Ali, M.; Neumann, R.; Ensinger, W.; Knoll, W.; Azzaroni, O. Synthetic Proton-Gated Ion Channels via Single Solid-State Nanochannels Modified with Responsive Polymer Brushes. *Nano Lett* **2009**, *9*, 2788-2793.
- (165) Jung, Y.; Bayley, H.; Movileanu, L. Temperature-responsive protein pores. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 15332-15340.
- (166) Kocer, A.; Walko, M.; Meijberg, W.; Feringa, B. L. A light-actuated nanovalve derived from a channel protein. *Science* **2005**, *309*, 755-758.
- (167) Nicoletta, F. P.; Cupelli, D.; Formoso, P.; De Filpo, G.; Colella, V.; Gugliuzza, A. Light Responsive Polymer Membranes: A Review. *Membranes* **2012**, *2*, 134.
- (168) Vlassiounk, I.; Park, C. D.; Vail, S. A.; Gust, D.; Smirnov, S. Control of nanopore wetting by a photochromic spiropyran: A light-controlled valve and electrical switch. *Nano Lett* **2006**, *6*, 1013-1017.
- (169) Zhang, L. X.; Cai, S. L.; Zheng, Y. B.; Cao, X. H.; Li, Y. Q. Smart Homopolymer Modification to Single Glass Conical Nanopore Channels: Dual-Stimuli-Actuated Highly Efficient Ion Gating. *Adv Funct Mater* **2011**, *21*, 2103-2107.
- (170) Yamaguchi, T.; Ito, T.; Sato, T.; Shinbo, T.; Nakao, S. Development of a fast response molecular recognition ion gating membrane. *J Am Chem Soc* **1999**, *121*, 4078-4079.
- (171) Umehara, S.; Pourmand, N.; Webb, C. D.; Davis, R. W.; Yasuda, K.; Karhanek, M. Current rectification with poly-L-lysine-coated quartz nanopipettes. *Nano Lett* **2006**, *6*, 2486-2492.
- (172) Ito, Y.; Ochiai, Y.; Park, Y. S.; Imanishi, Y. pH-sensitive gating by conformational change of a polypeptide brush grafted onto a porous polymer membrane. *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 1619-1623.
- (173) Ali, M.; Mafe, S.; Ramirez, P.; Neumann, R.; Ensinger, W. Logic Gates Using Nanofluidic Diodes Based on Conical Nanopores Functionalized with Polyprotic Acid Chains. *Langmuir* **2009**, *25*, 11993-11997.

- (174) Ali, M.; Bayer, V.; Schiedt, B.; Neumann, R.; Ensinger, W. Fabrication and functionalization of single asymmetric nanochannels for electrostatic/hydrophobic association of protein molecules. *Nanotechnology* **2008**, *19*.
- (175) Ali, M.; Schiedt, B.; Healy, K.; Neumann, R.; Ensinger, A. Modifying the surface charge of single track-etched conical nanopores in polyimide. *Nanotechnology* **2008**, *19*.
- (176) Siwy, Z.; Heins, E.; Harrell, C. C.; Kohli, P.; Martin, C. R. Conical-nanotube ion-current rectifiers: The role of surface charge. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 10850-10851.
- (177) Ali, M.; Neumann, R.; Ensinger, W. Sequence-Specific Recognition of DNA Oligomer Using Peptide Nucleic Acid (PNA)-Modified Synthetic Ion Channels: PNA/DNA Hybridization in Nanoconfined Environment. *Acs Nano* **2010**, *4*, 7267-7274.
- (178) Nguyen, G.; Howorka, S.; Siwy, Z. S. DNA Strands Attached Inside Single Conical Nanopores: Ionic Pore Characteristics and Insight into DNA Biophysics. *J Membrane Biol* **2011**, *239*, 105-113.
- (179) Buchsbaum, S. F.; Nguyen, G.; Howorka, S.; Siwy, Z. S. DNA-Modified Polymer Pores Allow pH- and Voltage-Gated Control of Channel Flux. *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 9902-9905.
- (180) Huang, J. J.; Zhang, X. M.; McNaughton, P. A. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin Cell Dev Biol* **2006**, *17*, 638-645.
- (181) Latorre, R.; Brauchi, S.; Orta, G.; Zaelzer, C.; Vargas, G. Thermo TRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **2007**, *42*, 427-438.
- (182) Pan, K.; Ren, R. M.; Dan, Y.; Cao, B. Synthesis of Controlled Thermoresponsive PET Track-Etched Membranes by ATRP Method. *J Appl Polym Sci* **2011**, *122*, 2047-2053.
- (183) Yameen, B.; Ali, M.; Neumann, R.; Ensinger, W.; Knoll, W.; Azzaroni, O. Ionic Transport Through Single Solid-State Nanopores Controlled with Thermally Nanoactuated Macromolecular Gates. *Small* **2009**, *5*, 1287-1291.
- (184) Nasir, S.; Ali, M.; Ensinger, W. Thermally controlled permeation of ionic molecules through synthetic nanopores functionalized with amine-terminated polymer brushes. *Nanotechnology* **2012**, *23*.
- (185) Chu, L. Y.; Niitsuma, T.; Yamaguchi, T.; Nakao, S. Thermoresponsive transport through porous membranes with grafted PNIPAM gates. *Aiche J* **2003**, *49*, 896-909.
- (186) Spohr, R.; Reber, N.; Wolf, A.; Alder, G. M.; Ang, V.; Bashford, C. L.; Pasternak, C. A.; Omichi, H.; Yoshida, M. Thermal control of drug release by a responsive ion track membrane observed by radio tracer flow dialysis. *J Control Release* **1998**, *50*, 1-11.
- (187) Guo, W.; Xia, H. W.; Cao, L. X.; Xia, F.; Wang, S. T.; Zhang, G. Z.; Song, Y. L.; Wang, Y. G.; Jiang, L.; Zhu, D. B. Integrating Ionic Gate and Rectifier Within One Solid-State Nanopore via Modification with Dual-Responsive Copolymer Brushes. *Adv Funct Mater* **2010**, *20*, 3561-3567.
- (188) Liu, N. G.; Dunphy, D. R.; Atanassov, P.; Bunge, S. D.; Chen, Z.; Lopez, G. P.; Boyle, T. J.; Brinker, C. J. Photoregulation of mass transport through a photoresponsive azobenzene-modified nanoporous membrane. *Nano Lett* **2004**, *4*, 551-554.
- (189) Wang, G. L.; Bohaty, A. K.; Zharov, I.; White, H. S. Photon gated transport at the glass nanopore electrode. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 13553-13558.
- (190) Mal, N. K.; Fujiwara, M.; Tanaka, Y. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. *Nature* **2003**, *421*, 350-353.
- (191) Zhang, M. H.; Hou, X.; Wang, J. T.; Tian, Y.; Fan, X.; Zhai, J.; Jiang, L. Light and pH Cooperative Nanofluidic Diode Using a Spiropyran-Functionalized Single Nanochannel. *Adv Mater* **2012**, *24*, 2424-2428.
- (192) Powell, M. R.; Sullivan, M.; Vlasiouk, I.; Constantin, D.; Sudre, O.; Martens, C. C.; Eisenberg, R. S.; Siwy, Z. S. Nanoprecipitation-assisted ion current oscillations. *Nat Nanotechnol* **2008**, *3*, 51-57.
- (193) Siwy, Z. S.; Powell, M. R.; Petrov, A.; Kalman, E.; Trautmann, C.; Eisenberg, R. S. Calcium-induced voltage gating in single conical nanopores. *Nano Lett* **2006**, *6*, 1729-1734.
- (194) Siwy, Z. S.; Powell, M. R.; Kalman, E.; Astumian, R. D.; Eisenberg, R. S. Negative incremental resistance induced by calcium in asymmetric nanopores. *Nano Lett* **2006**, *6*, 473-477.

- (195) Ali, M.; Nasir, S.; Ramirez, P.; Cervera, J.; Mafe, S.; Ensinger, W. Calcium Binding and Ionic Conduction in Single Conical Nanopores with Polyacid Chains: Model and Experiments. *Acs Nano* **2012**, *6*, 9247-9257.
- (196) Tian, Y.; Hou, X.; Wen, L. P.; Guo, W.; Song, Y. L.; Sun, H. Z.; Wang, Y. G.; Jiang, L.; Zhu, D. B. A biomimetic zinc activated ion channel. *Chem Commun* **2010**, *46*, 1682-1684.
- (197) Hou, X.; Guo, W.; Xia, F.; Nie, F. Q.; Dong, H.; Tian, Y.; Wen, L. P.; Wang, L.; Cao, L. X.; Yang, Y.; Xue, J. M.; Song, Y. L.; Wang, Y. G.; Liu, D. S.; Jiang, L. A Biomimetic Potassium Responsive Nanochannel: G-Quadruplex DNA Conformational Switching in a Synthetic Nanopore. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 7800-7805.
- (198) Ali, M.; Nguyen, Q. H.; Neumann, R.; Ensinger, W. ATP-modulated ionic transport through synthetic nanochannels. *Chem Commun* **2010**, *46*, 6690-6692.
- (199) Ali, M.; Yameen, B.; Neumann, R.; Ensinger, W.; Knoll, W.; Azzaroni, O. Biosensing and Supramolecular Bioconjugation in Single Conical Polymer Nanochannels. Facile Incorporation of Biorecognition Elements into Nanoconfined Geometries. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 16351-16357.
- (200) Lee, S. B.; Mitchell, D. T.; Trofin, L.; Nevanen, T. K.; Soderlund, H.; Martin, C. R. Antibody-based bio-nanotube membranes for enantiomeric drug separations. *Science* **2002**, *296*, 2198-2200.
- (201) Ali, M.; Ramirez, P.; Tahir, M. N.; Mafe, S.; Siwy, Z.; Neumann, R.; Tremel, W.; Ensinger, W. Biomolecular conjugation inside synthetic polymer nanopores via glycoprotein-lectin interactions. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1894-1903.
- (202) Ali, M.; Schiedt, B.; Neumann, R.; Ensinger, W. Biosensing with Functionalized Single Asymmetric Polymer Nanochannels. *Macromol Biosci* **2010**, *10*, 28-32.
- (203) Sexton, L. T.; Horne, L. P.; Sherrill, S. A.; Bishop, G. W.; Baker, L. A.; Martin, C. R. Resistive-pulse studies of proteins and protein/antibody complexes using a conical nanotube sensor. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 13144-13152.
- (204) Siwy, Z.; Trofin, L.; Kohli, P.; Baker, L. A.; Trautmann, C.; Martin, C. R. Protein biosensors based on biofunctionalized conical gold nanotubes. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 5000-5001.
- (205) Tahir, M. N.; Ali, M.; Andre, R.; Muller, W. E. G.; Schroder, H. C.; Tremel, W.; Ensinger, W. Silicatein conjugation inside nanoconfined geometries through immobilized NTA-Ni(II) chelates. *Chem Commun* **2013**, *49*, 2210-2212.
- (206) Ali, M.; Nasir, S.; Ramirez, P.; Cervera, J.; Mafe, S.; Ensinger, W. Carbohydrate-Mediated Biomolecular Recognition and Gating of Synthetic Ion Channels. *J Phys Chem C* **2013**, *117*, 18234-18242.
- (207) Ali, M.; Nasir, S.; Nguyen, Q. H.; Sahoo, J. K.; Tahir, M. N.; Tremel, W.; Ensinger, W. Metal Ion Affinity-based Biomolecular Recognition and Conjugation inside Synthetic Polymer Nanopores Modified with Iron-Terpyridine Complexes. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 17307-17314.
- (208) Ali, M.; Tahir, M. N.; Siwy, Z.; Neumann, R.; Tremel, W.; Ensinger, W. Hydrogen Peroxide Sensing with Horseradish Peroxidase-Modified Polymer Single Conical Nanochannels. *Anal Chem* **2011**, *83*, 1673-1680.
- (209) Ali, M.; Nasir, S.; Ahmed, I.; Fruk, L.; Ensinger, W. Tuning nanopore surface polarity and rectification properties through enzymatic hydrolysis inside nanoconfined geometries. *Chem Commun* **2013**, *49*, 8770-8772.
- (210) Lepoitevin, M.; Nguyen, G.; Bechelany, M.; Balanzat, E.; Janot, J. M.; Balme, S. Combining a sensor and a pH-gated nanopore based on an avidin-biotin system. *Chem Commun* **2015**, *51*, 5994-5997.
- (211) Mussi, V.; Fanzio, P.; Repetto, L.; Firpo, G.; Stigliani, S.; Tonini, G. P.; Valbusa, U. "DNA-Dressed NANopore" for complementary sequence detection. *Biosens Bioelectron* **2011**, *29*, 125-131.
- (212) Yusko, E. C.; Prangkio, P.; Sept, D.; Rollings, R. C.; Li, J. L.; Mayer, M. Single-Particle Characterization of A beta Oligomers in Solution. *Acs Nano* **2012**, *6*, 5909-5919.
- (213) Kleefen, A.; Pedone, D.; Grunwald, C.; Wei, R.; Firnkes, M.; Abstreiter, G.; Rant, U.; Tampe, R. Multiplexed Parallel Single Transport Recordings on Nanopore Arrays. *Nano Lett* **2010**, *10*, 5080-5087.

- (214) Yu, S. F.; Lee, S. B.; Kang, M.; Martin, C. R. Size-based protein separations in poly(ethylene glycol)-derivatized gold nanotubule membranes. *Nano Lett* **2001**, *1*, 495-498.
- (215) Wharton, J. E.; Jin, P.; Sexton, L. T.; Horne, L. P.; Sherrill, S. A.; Mino, W. K.; Martin, C. R. A method for reproducibly preparing synthetic nanopores for resistive-pulse biosensors. *Small* **2007**, *3*, 1424-1430.
- (216) Jovanovic-Talisman, T.; Tetenbaum-Novatt, J.; McKenney, A. S.; Zilman, A.; Peters, R.; Rout, M. P.; Chait, B. T. Artificial nanopores that mimic the transport selectivity of the nuclear pore complex. *Nature* **2009**, *457*, 1023-1027.
- (217) Kowalczyk, S. W.; Blosser, T. R.; Dekker, C. Biomimetic nanopores: learning from and about nature. *Trends Biotechnol* **2011**, *29*, 607-614.
- (218) Kowalczyk, S. W.; Kapinos, L.; Blosser, T. R.; Magalhaes, T.; van Nies, P.; Lim, R. Y. H.; Dekker, C. Single-molecule transport across an individual biomimetic nuclear pore complex. *Nat Nanotechnol* **2011**, *6*, 433-438.
- (219) Spohr, R.: Method for producing nuclear traces or microholes originating from nuclear traces of an individual ion. Patents US4369370, 1983.
- (220) Trautmann, C.; Bouffard, S.; Spohr, R. Etching threshold for ion tracks in polyimide. *Nucl Instrum Meth B* **1996**, *116*, 429-433.
- (221) Green, N. Avidin. 1. The Use Of [14C]Biotin For Kinetic Studies And For Assay. *Biochemical Journal* **1963**, *89*, 585-591.
- (222) Buyukdagli, S.; Manghi, M.; Palmeri, J. Ionic Capillary Evaporation in Weakly Charged Nanopores. *Phys Rev Lett* **2010**, *105*, 158103.
- (223) Siwy, Z.; Apel, P.; Baur, D.; Dobrev, D. D.; Korchev, Y. E.; Neumann, R.; Spohr, R.; Trautmann, C.; Voss, K. O. Preparation of synthetic nanopores with transport properties analogous to biological channels. *Surf Sci* **2003**, *532*, 1061-1066.
- (224) Andrade, J. D.; Hlady, V. Protein Adsorption and Materials Biocompatibility - a Tutorial Review and Suggested Hypotheses. *Adv Polym Sci* **1986**, *79*, 1-63.
- (225) Balme, S.; Janot, J. M.; Dejardin, P.; Vasina, E. N.; Seta, P. Potentialities of confocal fluorescence for investigating protein adsorption on mica and in ultrafiltration membranes. *J Membrane Sci* **2006**, *284*, 198-204.
- (226) Nguyen, G.; Vlassiuk, I.; Siwy, Z. S. Comparison of bipolar and unipolar ionic diodes. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 265301.
- (227) Ali, M.; Nasir, S.; Ensinger, W. Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical nanopores. *Chem Commun* **2015**, *51*, 3454-3457.
- (228) Atha, D. H.; Ingham, K. C. Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols - Analysis in Terms of Excluded Volume. *J Biol Chem* **1981**, *256*, 2108-2117.
- (229) Miekka, S. I.; Ingham, K. C. Influence of Self-Association of Proteins on Their Precipitation by Poly(Ethylene Glycol). *Arch Biochem Biophys* **1978**, *191*, 525-536.
- (230) Mouawia, R.; Mehdi, A.; Reye, C.; Corriu, R. J. P. Bifunctional ordered mesoporous materials: direct synthesis and study of the distribution of two distinct functional groups in the pore channels. *J Mater Chem* **2008**, *18*, 4193-4203.
- (231) Corriu, R. J. P.; Mehdi, A.; Reye, C.; Thieuleux, C. Mesoporous hybrid materials containing two transition metal ions, one in the framework, the other in the channel pores. *Chem Commun* **2003**, 1564-1565.
- (232) Seantier, B.; Deratani, A.: Polyelectrolytes at Interfaces: Applications and Transport Properties of Polyelectrolyte Multilayers in Membranes. In *Ionic Interactions in Natural and Synthetic Macromolecules*; John Wiley & Sons, Inc., 2012; pp 683-726.
- (233) Burke, S. E.; Barrett, C. J. pH-responsive properties of multilayered poly(L-lysine)/hyaluronic acid surfaces. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1773-1783.
- (234) Elbert, D. L.; Hubbell, J. A. Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using adsorbing block copolymers. *Chem Biol* **1998**, *5*, 177-183.
- (235) Deamer, D. W.; Branton, D. Characterization of nucleic acids by nanopore analysis. *Accounts Chem Res* **2002**, *35*, 817-825.
- (236) Schneider, G. F.; Dekker, C. DNA sequencing with nanopores. *Nat Biotechnol* **2012**, *30*, 326-328.

- (237) Muthukumar, M. Mechanism of DNA transport through pores. *Annu Rev Bioph Biom* **2007**, *36*, 435-450.
- (238) Wong, C. T. A.; Muthukumar, M. Polymer capture by electro-osmotic flow of oppositely charged nanopores. *J Chem Phys* **2007**, *126*, 164903.
- (239) Luan, B. Q.; Aksimentiev, A. Electro-osmotic screening of the DNA charge in a nanopore. *Phys Rev E* **2008**, *78*, 021912.
- (240) Fologea, D.; Uplinger, J.; Thomas, B.; McNabb, D. S.; Li, J. L. Slowing DNA translocation in a solid-state nanopore. *Nano Lett* **2005**, *5*, 1734-1737.
- (241) Di Fiori, N.; Squires, A.; Bar, D.; Gilboa, T.; Moustakas, T. D.; Meller, A. Optoelectronic control of surface charge and translocation dynamics in solid-state nanopores. *Nat Nanotechnol* **2013**, *8*, 946-951.
- (242) Galla, L.; Meyer, A. J.; Spiering, A.; Sischka, A.; Mayer, M.; Hall, A. R.; Reimann, P.; Anselmetti, D. Hydrodynamic Slip on DNA Observed by Optical Tweezers-Controlled Translocation Experiments with Solid-State and Lipid-Coated Nanopores. *Nano Lett* **2014**, *14*, 4176-4182.
- (243) Long, D.; Viovy, J. L.; Ajdari, A. Simultaneous action of electric fields and nonelectric forces on a polyelectrolyte: Motion and deformation. *Phys Rev Lett* **1996**, *76*, 3858-3861.
- (244) Cabello-Aguilar, S.; Abou Chaaya, A.; Picaud, F.; Bechelany, M.; Pochat-Bohatier, C.; Yesylevskyy, S.; Kraszewski, S.; Bechelany, M. C.; Rossignol, F.; Balanzat, E.; Janot, J. M.; Miele, P.; Dejardin, P.; Balme, S. Experimental and simulation studies of unusual current blockade induced by translocation of small oxidized PEG through a single nanopore. *Phys Chem Chem Phys* **2014**, *16*, 17883-17892.
- (245) Carlsen, A. T.; Zahid, O. K.; Ruzicka, J.; Taylor, E. W.; Hall, A. R. Interpreting the Conductance Blockades of DNA Translocations through Solid-State Nanopores. *Acs Nano* **2014**, *8*, 4754-4760.
- (246) Powell, M. R.; Cleary, L.; Davenport, M.; Shea, K. J.; Siwy, Z. S. Electric-field-induced wetting and dewetting in single hydrophobic nanopores. *Nat Nanotechnol* **2011**, *6*, 798-802.
- (247) Kowalczyk, S. W.; Dekker, C. Measurement of the Docking Time of a DNA Molecule onto a Solid-State Nanopore. *Nano Lett* **2012**, *12*, 4159-4163.
- (248) Kowalczyk, S. W.; Hall, A. R.; Dekker, C. Detection of Local Protein Structures along DNA Using Solid-State Nanopores. *Nano Lett* **2010**, *10*, 324-328.
- (249) Meller, A.; Nivon, L.; Branton, D. Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. *Phys Rev Lett* **2001**, *86*, 3435-3438.
- (250) Bousse, L.; Mostarshed, S. The Zeta-Potential of Silicon-Nitride Thin-Films. *J Electroanal Chem* **1991**, *302*, 269-274.
- (251) Chan, V.; McKenzie, S. E.; Surrey, S.; Fortina, P.; Graves, D. J. Effect of hydrophobicity and electrostatics on adsorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid interfaces. *J Colloid Interf Sci* **1998**, *203*, 197-207.
- (252) Misra, V. K.; Draper, D. E. On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers* **1998**, *48*, 113-135.
- (253) Owczarzy, R.; Moreira, B. G.; You, Y.; Behlke, M. A.; Walder, J. A. Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry-Us* **2008**, *47*, 5336-5353.
- (254) Butler, J. C.; Angelini, T.; Tang, J. X.; Wong, G. C. L. Ion multivalence and like-charge polyelectrolyte attraction. *Phys Rev Lett* **2003**, *91*, 028301.
- (255) Zhang, Y.; Liu, L.; Sha, J. J.; Ni, Z. H.; Yi, H.; Chen, Y. F. Nanopore detection of DNA molecules in magnesium chloride solutions. *Nanoscale Res Lett* **2013**, *8*, 245.
- (256) van der Heyden, F. H. J.; Stein, D.; Besteman, K.; Lemay, S. G.; Dekker, C. Charge inversion at high ionic strength studied by streaming currents. *Phys Rev Lett* **2006**, *96*, 224502.
- (257) Grosberg, A. Y.; Nguyen, T. T.; Shklovskii, B. I. Colloquium: The physics of charge inversion in chemical and biological systems. *Rev Mod Phys* **2002**, *74*, 329-345.
- (258) Barrios-Contreras, E. A.; Gonzalez-Tovar, E.; Guerrero-Garcia, G. I. The dominance of small ions in the electric double layer of size- and charge-asymmetric electrolytes: a mean-field study on the charge reversal and surface charge amplification. *Mol Phys* **2015**, *113*, 1190-1205.

- (259) Carson, S.; Wilson, J.; Aksimentiev, A.; Wanunu, M. Smooth DNA Transport through a Narrowed Pore Geometry. *Biophys J* **2014**, *107*, 2381-2393.
- (260) Ramirez, P.; Gomez, V.; Cervera, J.; Nasir, S.; Ali, M.; Ensinger, W.; Mafe, S. Energy conversion from external fluctuating signals based on asymmetric nanopores. *Nano Energy* **2015**, *16*, 375-382.
- (261) Lichty, P.; Kreider, P.; Kilbury, O.; King, D.; Weimer, A. W.; Wirz, M.; Steinfeld, A.; Dinair, D. Surface Modification of Graphite Particles Coated by Atomic Layer Deposition and Advances in Ceramic Composites. *Int J Appl Ceram Tec* **2013**, *10*, 257-265.
- (262) Kim, Y. R.; Min, J.; Lee, I. H.; Kim, S.; Kim, A. G.; Kim, K.; Namkoong, K.; Ko, C. Nanopore sensor for fast label-free detection of short double-stranded DNAs. *Biosens Bioelectron* **2007**, *22*, 2926-2931.
- (263) Smeets, R. M. M.; Keyser, U. F.; Dekker, N. H.; Dekker, C. Noise in solid-state nanopores. *P Natl Acad Sci USA* **2008**, *105*, 417-421.
- (264) Mara, A.; Siwy, Z.; Trautmann, C.; Wan, J.; Kamme, F. An asymmetric polymer nanopore for single molecule detection. *Nano Lett* **2004**, *4*, 497-501.
- (265) Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 8168-8173.
- (266) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interfac* **2011**, *162*, 87-106.
- (267) Niedzwiecki, D. J.; Grazul, J.; Movileanu, L. Single-molecule observation of protein adsorption onto an inorganic surface. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 10816-10822.
- (268) Martyushenko, N.; Bell, N. A.; Lamboll, R. D.; Keyser, U. F. Nanopore analysis of amyloid fibrils formed by lysozyme aggregation. *Analyst* **2015**, *140*, 4882-4886.
- (269) Tang, Z.; Lu, B.; Zhao, Q.; Wang, J.; Luo, K.; Yu, D. Surface Modification of Solid - State Nanopores for Sticky - Free Translocation of Single - Stranded DNA. *Small* **2014**, *10*, 4332-4339.
- (270) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interfac* **2011**, *162*, 87-106.
- (271) Hill, S. E.; Robinson, J.; Matthews, G.; Muschol, M. Amyloid Protofibrils of Lysozyme Nucleate and Grow Via Oligomer Fusion. *Biophys J* **2009**, *96*, 3781-3790.
- (272) Malisauskas, M.; Ostman, J.; Darinskas, A.; Zamotin, V.; Liutkevicius, E.; Lundgren, E.; Morozova-Roche, L. A. Does the cytotoxic effect of transient amyloid oligomers from common equine lysozyme in vitro imply innate amyloid toxicity? *J Biol Chem* **2005**, *280*, 6269-6275.
- (273) Gharibyan, A. L.; Zamotin, V.; Yanamandra, K.; Moskaleva, O. S.; Margulis, B. A.; Kostanyan, I. A.; Morozova-Roche, L. A. Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways. *J Mol Biol* **2007**, *365*, 1337-1349.

Annexes

Annexe 1



Cite this: *Chem. Commun.*, 2015, 51, 5994

Received 17th December 2014,
Accepted 27th February 2015

DOI: 10.1039/c4cc10087e

www.rsc.org/chemcomm

Combining a sensor and a pH-gated nanopore based on an avidin–biotin system†

Mathilde Lepoitevin,‡^a Gael Nguyen,‡^a Mikhael Bechelany,^a Emmanuel Balanzat,^b Jean-Marc Janot^a and Sebastien Balme*^a

Here we propose a new approach to tailor nanopores, which combines both pH gating and sensing properties. This strategy is based on PEG like-avidin grafting in nanopores designed by atomic layer deposition (ALD). Below pH 5 the nanopore is blocked. We show that the PEG chains are at the origin of these properties.

Biological channels are involved in many tasks in biology such as cellular communication, osmotic pressure control and defence against external micro-organisms.¹ For the past two decades, biological channels² have served as an inspiration to building nanodevices such as ionic diodes³ and sensors⁴ which can precisely detect differences between ions,⁵ small molecules or complex macromolecules such as DNA.⁶ However the limitations of “raw” artificial nanopores are the lack of selectivity and unresponsiveness against biological stimuli such as pH, ionic strength, inhibitors or antibodies. However, this limitation can be broken by functionalization of nanopores.⁷ Among artificial nanopores, the ones obtained by the track-etching methods on polymer films are particularly interesting. Indeed, their geometry can be controlled (cylindrical, conical)⁸ and the chemical functions on the nanopore surface induced by the chemical etching process enable surface modification, such as functionalization by polymers⁹ or DNA strands,^{7b} or their size reduction by atomic layer deposition.¹⁰ Several applications of these nanopores were demonstrated as ionic diodes,^{3,11} or voltage responsive nanopores.¹² More recently an elegant pH response nanopore by grafting DNA inside a conical nanopore was reported.^{7b} In this communication, authors used the isoelectric point of nucleotides to create a

mesh which blocked current at low pH. However, these nanopore modifications were limited on a unique functionalization, which limited their applications to unique functions. In order to build nanopores with different functions a strategy should be designed to use an avidin–biotin system.¹³ Briefly, avidin is a glycoprotein which presents strong interaction with biotin ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$), which is a base for developing many kinds of biosensors.¹³ This system allows us to build nanopores by multistep approaches after the functionalization of the nanopore surface with biotin.

Here we report the feasibility of a new type of nanopore, which combines pH-gating and sensing properties. These single nanopores were obtained by using the track-etched method on PET film (13 μm). The first step consisted of grafting a PEG–biotin molecule to the surface of the nanopore by following two approaches: (i) directly after chemical etching of the nanopore and (ii) after reducing the diameter of the nanopore by atomic layer deposition (ALD) and the surface was functionalized by amine groups (Fig. S1, ESI†). Then, avidin (IP 10.6) or streptavidin (IP 5.6) was linked to the biotin. The obtained nanopores were tested for pH gating properties and detecting the presence of biotinylated γ -globulin.

The first approach of the nanopore modification was performed on both conical and cylindrical shaped nanopores. Cylindrical nanopores ($\sim 19 \text{ nm}$ diameter) were directly functionalized after chemical etching. Since the surface of the nanopore is covered with carboxyl groups, the latter can be modified by chemical grafting. This involves using biotin with an amine end for a one-step *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) modification process.^{7b} In the first step, we attached poly(ethylene glycol) 2-aminoethyl ether biotin ($M_n 5300 \text{ g mol}^{-1}$) (biotin–PEG–NH₂). The latter compound and EDC are placed in the *cis* reservoir of the electrochemical cell for 12 hours (Fig. S1, ESI†). Then, a solution of avidin ($c = 2.44 \text{ }\mu\text{M}$, PBS 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2) is placed in the *cis* reservoir for 30 min under a 100 mV voltage potential to help the protein enter the nanopore. After this step, the current–voltage dependence was recorded (Fig. 1a) at different NaCl concentrations (Fig. 1a and Fig. S2, ESI†) and

^a Institut Européen des Membranes, UMR5635 ENSM UM2 CNRS, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France.
E-mail: sebastien.balme@univ-montp2.fr

^b Centre de recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique, UMR6252 CEA-CNRS-ENSICAEN, 6 Boulevard du Maréchal Juin, 14050 Caen Cedex 4, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Materials and methods section, example of current traces, confocal fluorescence spectra, additional *I*–*V* curves and XPS. See DOI: 10.1039/c4cc10087e

‡ These authors contributed equally to this work.

Communication

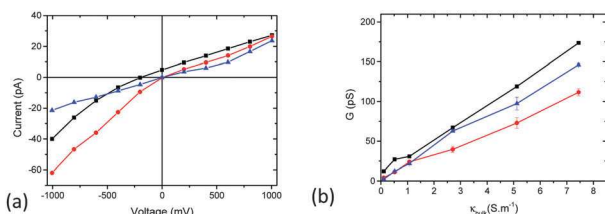


Fig. 1 (a) Example of the I - V curve (here under 100 mM NaCl pH 7) and (b) conductance/salt conductivity dependence of the cylindrical nanopore at each step, directly after chemical etching (black), after PEG-avidin functionalization (blue) and after PEG- γ -globulin addition (red).

compared to the nanopore before functionalization. Avidin induces a weak decrease of current as expected due to a reduction of the nanopore diameter. The nanopore conductance is a function of the salt concentration (recorded at pH 7) allowing us to estimate the nanopore diameter (~ 17 nm) after avidin linkage (Fig. 1b). Regarding the initial diameter (~ 19 nm), the reduction of the nanopore diameter is ~ 2 nm. The latter value does not correspond to the hydrodynamic diameter of avidin.¹⁴ This is explained by the location of avidin close to the nanopore entrance and not along the nanopore length.^{7c} We also observed that after the avidin linkage, current oscillates at high positive voltage (typically from 800 mV to 1 V) regardless the salt used, KCl or NaCl (Fig. S2, ESI[†]). The observation of such oscillations was reported in nanopores.^{11b,15} They result from different phenomena such as (i) vapor-gas equilibrium,^{15,16} (ii) wetting-dewetting,^{11b} and (iii) the mobility of free polymer chains after chemical etching. However another explanation could be given. Indeed, proteins are well known to adsorb non-specifically at a liquid/solid interface.¹⁷ It can be assumed that two populations of avidin are present in the nanopore, one linked to biotin and one adsorbed on the PET surface (particularly on the *cis* side, where PET is exposed to the protein). After rinsing, the adsorbed avidin can be released into the solution and translocate through the nanopore. This can also explain that oscillations are only observed when a positive voltage is applied on the *trans* chamber since avidin exhibits a negative charge at pH 7.

In order to estimate the localization of avidin inside the nanopore and the non-specific adsorption on PET film, further investigations were performed using a high resolution fluorescence confocal spectrometer.^{17b} The latter technique allows measurement of the fluorescence intensity through the thickness of the membrane by steps of 0.1 μm . For these experiments, we used avidin labeled by alexa-fluor 594 to allow its detection. Three different samples of PET film were used (i) a membrane with a nanopore previously functionalized by PEG-biotin, (ii) one with a native nanopore and (iii) and one without the nanopore. The spectra reported in Fig. S3 (ESI[†]) indicate the presence of avidin on the PET surface due to nonspecific adsorption. We can also observe avidin inside the nanopore in both functionalized and native nanopores. However a higher fluorescence response located at the *cis* side of the membrane confirms a higher density of avidin where PEG-biotin is present. Regarding the non-specific adsorption, the previous assumption of avidin translocation to interpret current oscillation should be taken into account.

The first approach for nanopore modification was also performed on conical shaped nanopores (tip diameter 40 nm). Fig. 2 shows

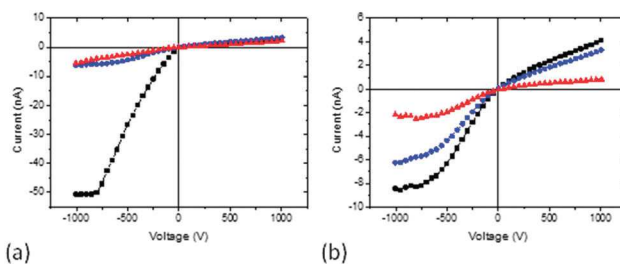


Fig. 2 Conductance characterization of the conical nanopore: (a) I - V curve (under 100 mM NaCl pH 7) of the conical nanopore at each step, directly after chemical etching (black), after PEG-avidin functionalization (blue), and after PEG- γ -globulin (red). (b) Influence of pH on the nanopore conductivity after PEG- γ -globulin addition at 100 mM NaCl pH 8 (black), pH 7 (blue) and pH 5 (red).

examples of current-voltage dependence before and after avidin linkage. As previously described in the literature, I - V curves exhibit current rectification.¹⁸ After avidin linkage, the rectification is less important at negative voltage which proves the success of the functionalization. As previously mentioned the biotin-avidin allows considering multistep functionalization by addition of other biotinylated protein. We have tested if our nanopore (after PEG avidin functionalization) allows us to detect the γ -globulin modified by poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane (biotin-PEG-NHS, M_n 5400 g mol⁻¹). To do this, the latter was added to the *cis* chamber of the electrochemical cell for one hour. We have chosen γ -globulin for its isoelectric point (6.5) close to neutral pH. Fig. 2a shows an example of an I - V curve recorded at NaCl 100 mM pH 7. The PEG- γ -globulin induces a modification of current response under a negative electric field. This proves the ability of this kind of nanopore to detect a biotin-PEG-protein. The I - V response at pH from 5 to 8 (Fig. 2b) is the most interesting part, since with the decrease of pH the current decreases.

From this first approach, we have shown the possibility to obtain both a pH dependent and sensing nanopore by successive functionalization. However, several points can be improved. First, we have shown non-specific adsorption of avidin onto the nanopore surface. These adsorbed proteins should play a role since they could connect with biotin-PEG- γ -globulin and likely at the origin of the electrical oscillations. Then, the chemical conical etching allows predicting with difficulty the nanopore diameter.¹⁹ Experimentally, if we want to tailor a nanopore with a precise diameter, several nanopores must be produced and individually characterized. Thus, this approach cannot be easily scaled up.

In order to break these limitations, we investigated the second approach. In order to control the diameter and be able to reproduce it easily, cylindrical nanopores were designed by atomic layer deposition. As previously reported this method allows us to control the size of the nanopore and to obtain a homogenous coating along the nanopore length.²⁰ We show here a typical result obtained with a nanopore with an initial diameter of ~ 48 nm determined using the nanopore conductance as a function of the salt concentration (Fig. S4, ESI[†]). The nanopore was reduced by successive deposition of Al₂O₃/ZnO bilayers by ALD. The last layer (ZnO) enables the functionalization of the free OH

group when gaseous *N*-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine was added in order to graft amine groups on both wall and external nanopore surfaces as confirmed by XPS characterization (Table S7, ESI†). A final diameter of ~ 22 nm is obtained from the conductance as a function of the salt concentration. The second step consists of linking biotin-PEG at the amine end (Fig. S1b, ESI†). To do this a solution of poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane (M_n 5400 g mol $^{-1}$) is added to the *cis* reservoir of the electrochemical cell. After one hour, the nanopore is rinsed and a streptavidin (chosen for its $I_P \sim 5$) solution is added into the same reservoir. Here both external and internal surfaces of the nanopore are covered by PEG-biotin making unlikely the unspecific adsorption of streptavidin. After this step, the *I*-*V* curves are recorded at pH from 10 to 4 and NaCl 100 mM. At first, it can be noticed that the current traces recorded regardless of the voltage do not exhibit oscillations. This should confirm our previous interpretation related to the translocation of released avidin in solution when nanopores were functionalized using the first approach.

The study of *I*-*V* response as a function of pH shows that for pH higher than 5 there is a weak current rectification as usually reported for a conical nanopore. This current rectification is due to the dissymmetric nanopore functionalization.^{7c,21} Indeed, streptavidin has an isoelectric point close to 5, thus at pH ≥ 6 it exhibits a global negative charge. The localization of protein on the *cis* side induces a difference of charge on the nanopore surface wall. This induces an asymmetric flow of ions.²¹ In addition, when a negative charge is applied on the *trans* side, streptavidin is repelled from the nanopore, conversely when a positive voltage is applied. In this case the current rectification could also be explained by the location of avidin (outside or inside the nanopore, regarding the applied voltage and global protein) which could reduce the diameter of the nanopore *cis* entrance. Interestingly, at pH values lower than 6 the current decreases dramatically. At pH 4 the nanopore is totally closed since the current is below -5 pA at -1 V and 5 pA at 1 V (Fig. 3a and Fig. S5a, ESI†). Our measurements show that the nanopore enclosure is reversible since after the increase of pH buffer, the current values and the rectification are recovered. In addition, we have tested our nanopore at a pH gradient (pH 4 in the *cis* chamber and 8 in the *trans* chamber). The current voltage dependence (Fig. 3b) with a voltage range from -1 V to 0.4 V shows that the current is close to zero and increases above voltages higher than 0.4 V. In addition, the current trace reveals a current gap at 0.35 V.

This test confirms the pH dependence of the nanopore and the reversibility of the nanopore enclosure. The pH-gate observed at pH lower than 6 cannot be basically interpreted by a steric effect due to the avidin location inside or outside the nanopore *cis* entrance as previously mentioned. Indeed if this is the case one can expect an inversion of current rectification with the streptavidin global charge.

Thus, the nanopore enclosures at pH lower than 6 could come from the PEG chain. In order to investigate this assumption, a similar nanopore functionalized with biotinamidohexanoyl-6-aminoheptanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester before streptavidin

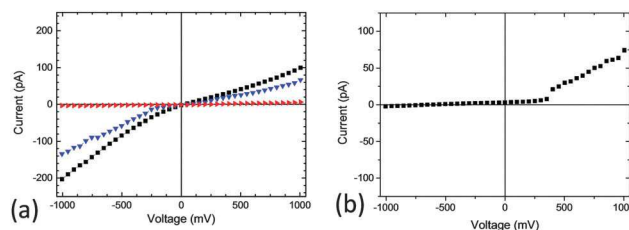


Fig. 3 pH response of the nanopore tailored by ALD after biotin-avidin functionalization (a) example of the *I*-*V* curve after PEG-avidin grafting at pH 10 (black), pH 7 (blue) and pH 4 (red). (b) *I*-*V* curve at a pH gradient (black – pH 4 in the *cis* chamber and pH 8 in the *trans* chamber).

addition was tailored. The *I*-*V* curves at different pH values do not exhibit a current blockage at pH 4 (Fig. S5b, ESI†) which confirms that PEG is at the origin of current blockage.

It has been demonstrated that pH plays an important role in the PEG-protein interactions. This phenomenon is at the origin of protein aggregation and precipitation at low pH.²² pH is also involved in swelling and deswelling of the PEG layer, on modified mesoporous material.²³ However, the nanopore (diameter ~ 10 nm) was functionalized with only PEG-biotin. In this case no pH influence on the nanopore enclosure is observed. Thus at pH below 6, the enclosure of our nanopore should be induced by protein-PEG interactions, likely by reversible aggregation. At a pH gradient and with respect to our experimental setup (Fig. S5a, ESI†), when a negative voltage is applied, the protons enter preferentially inside the nanopore, thus the PEG-avidin aggregation encloses the nanopore. Conversely, when a positive voltage is applied, hydroxides enter the nanopore and induce disaggregation of PEG-avidin and open the nanopore. A current gap of 0.35 V should be interpreted by the local pH at the *cis* entrance of the nanopore and/or a dead time to reverse the enclosure mechanism.

The potential to detect a biotinylated protein was evaluated by the addition of biotin-PEG- γ -globulin. The latter is added to the *cis* reservoir (the same as streptavidin before). The current voltage curves (Fig. 4a and Fig. S6, ESI†) at different pH values exhibit: (i) current rectification at pH higher than 6 and (ii) current blockage at pH lower than 6. Thus the pH-gate properties are not affected by biotin-PEG- γ -globulin addition. However at pH higher than 6, the current amplitude decreases weakly and the current rectification is more pronounced. To illustrate that, the rectification factor calculated from the ratio between conductances under positive over negative voltage is reported in Fig. 4b at different pH values. The results show that the biotin-PEG- γ -globulin addition induces an increase in the rectification factor. From these measurements, it is shown that the biotinylated protein can be easily detected at pH higher than 7. Considering the exact location of γ -globulins, these experiments cannot permit to conclude. Indeed the latter can be located either (i) at the external surface close to the nanopore entrance, or (ii) at the nanopore entrance or (iii) inside the nanopore. However the weak decrease of current and the steric volume occupied by the PEG-streptavidin suggest that the γ -globulins are outside the nanopore close to its entrance and unlikely inside the nanopore.

To sum up our results, we have shown two different approaches for biotinylated PET nanopores: (i) directly after

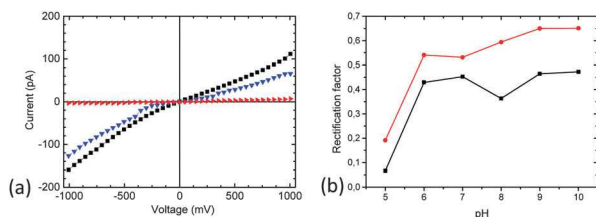


Fig. 4 pH response of the nanopore tailored by ALD after γ -globulin addition (a) example of the I - V curve after PEG-streptavidin γ -globulin grafting at pH 10 (black), pH 7 (blue) and pH 4 (red). (b) Ratio between conductance under positive over negative, before (in black) and after (in red) γ -globulin addition.

chemical etching and (ii) after nanopore modification using atomic layer deposition and surface functionalization by amine groups. After avidin linkage, the addition of PEG- γ -globulin can be detected at a pH value higher than 7 using current-voltage measurements. Even if, in this communication we have not optimized our nanopores, this result allows us to consider a large number of applications as a biosensor based on an avidin-biotin system. The most fascinating part is the reversible nanopore enclosure observed at pH lower than 6 induced by the modification of the thickness of the PEG layer. In addition this phenomenon is totally reversible. These properties open up applications such as the membrane for drug delivery as suggested by Duan *et al.*²⁴ that is able to control both the rate and the location in the body of the drug release and in electrochemical (bio)sensors for the controlled gating of ions.²⁵ With further investigation, we hope that this new concept will enable us to combine both pH gating and biosensing properties to achieve smart nanopores able to mimic biological channels.

This work was supported in part by the French Research Program ANR-BLANC, Project TRANSION (ANR-2012-BS08-0023) and by the European Institute of Membrane by health project (PS2-2014). Single tracks have been produced in GANIL (Caen, France) in the framework of an EMIR project. We acknowledge Prof. A. Medhi (Université Montpellier 2) for enlightening discussions.

Notes and references

- 1 C. Domene, S. Haider and M. S. Sansom, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 2003, **6**, 611–619.
- 2 Z. S. Siwy and S. Howorka, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1115–1132.
- 3 I. Vlasiouk and Z. S. Siwy, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 552–556.
- 4 (a) S. W. Kowalczyk, T. R. Blosser and C. Dekker, *Trends Biotechnol.*, 2011, **29**, 607–614; (b) G. F. Schneider and C. Dekker, *Nat. Biotechnol.*, 2012, **30**, 326–328.
- 5 S. Balme, F. Picaud, S. Kraszewski, P. Dejardin, J. M. Janot, M. Lepoitevin, J. Capomanes, C. Ramseyer and F. Henn, *Nanoscale*, 2013, **5**, 3961–3968.
- 6 (a) C. C. Harrell, Y. Choi, L. P. Horne, L. A. Baker, Z. S. Siwy and C. R. Martin, *Langmuir*, 2006, **22**, 10837–10843; (b) P. Chen, J. J. Gu, E. Brandin, Y. R. Kim, Q. Wang and D. Branton, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 2293–2298; (c) C. A. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, M. D. Fischbein, K. Venta, Z. T. Luo, A. T. C. Johnson and M. Drndic, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 2915–2921; (d) A. J. Storm, C. Storm, J. H. Chen, H. Zandbergen, J. F. Joanny and C. Dekker, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 1193–1197; (e) M. Wanunu, J. Sutin and A. Meller, *Nano Lett.*, 2009, **9**, 3498–3502.
- 7 (a) Y. Q. Li, Y. B. Zheng and R. N. Zare, *ACS Nano*, 2012, **6**, 993–997; (b) S. F. Buchsbaum, G. Nguyen, S. Howorka and Z. S. Siwy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 9902–9905; (c) S. Nasir, M. Ali, P. Ramirez, V. Gomez, B. Oschmann, F. Muench, M. N. Tahir, R. Zentel, S. Mafe and W. Ensinger, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 12486–12494.
- 8 P. Y. Apel, *Radiat. Meas.*, 2001, **34**, 559–566.
- 9 M. Barsbay, O. Guven, H. Bessbousse, T. L. Wade, F. Beuneu and M. C. Clochard, *J. Membr. Sci.*, 2013, **445**, 135–145.
- 10 A. Abou Chaaya, M. Le Poitevin, S. Cabello-Aguilar, S. Balme, M. Bechelany, S. Kraszewski, F. Picaud, J. Cambedouze, E. Balanzat, J. M. Janot, T. Thami, P. Miele and P. Dejardin, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 15306–15315.
- 11 (a) I. Vlasiouk, S. Smirnov and Z. Siwy, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 1978–1985; (b) M. Pevarnik, K. Healy, M. Davenport, J. Yen and Z. S. Siwy, *Analyst*, 2012, **137**, 2944–2950.
- 12 Z. Siwy, E. Heins, C. C. Harrell, P. Kohli and C. R. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10850–10851.
- 13 R. N. Orth, T. G. Clark and H. G. Craighead, *Biomed. Microdevices*, 2003, **5**, 29–34.
- 14 S. Balme, J. M. Janot, P. Dejardin and P. Seta, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2006, **184**, 204–211.
- 15 S. Shimizu, M. Ellison, K. Aziz, Q. H. Wang, Z. Ullissi, Z. Gunther, D. Bellisario and M. Strano, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 9641–9651.
- 16 S. Buyukdagli, M. Manghi and J. Palmeri, *Phys. Rev. Lett.*, 2010, **105**, 158103.
- 17 (a) J. D. Andrade and V. Hlady, *Adv. Polym. Sci.*, 1986, **79**, 1–63; (b) S. Balme, J. M. Janot, P. Dejardin, E. N. Vasina and P. Seta, *J. Membr. Sci.*, 2006, **284**, 198–204.
- 18 B. Schiedt, K. Healy, A. P. Morrison, R. Neumann and Z. Siwy, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, 2005, **236**, 109–116.
- 19 P. Y. Apel, P. Ramirez, I. V. Blonskaya, O. L. Orelovitch and B. A. Sartowska, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 15214–15223.
- 20 S. Cabello-Aguilar, A. Abou-Chaaya, F. Picaud, M. Bechelany, C. Pochat-Bohatier, S. Yesylevsky, S. Kraszewski, M. Bechelany, F. Rossignol, E. Balanzat, J. M. Janot, P. Miele, P. Dejardin and S. Balme, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 17883–17892.
- 21 M. Ali, S. Nasir and W. Ensinger, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 3454–3457.
- 22 (a) D. H. Atha and K. C. Ingham, *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 2108–2117; (b) S. I. Miekka and K. C. Ingham, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, **191**, 525–536.
- 23 (a) R. Mouawia, A. Mehdi, C. Reye and R. J. P. Corriu, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4193–4203; (b) R. J. P. Corriu, A. Mehdi, C. Reye and C. Thieuleux, *Chem. Commun.*, 2003, 1564–1565.
- 24 R. X. Duan, F. Xia and L. Jiang, *ACS Nano*, 2013, **7**, 8344–8349.
- 25 G. W. de Groot, M. G. Santonicola, K. Sugihara, T. Zambelli, E. Reimhult, J. Voros and G. J. Vancso, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, **5**, 1400–1407.



Non-Fluorescence label protein sensing with track-etched nanopore decorated by avidin/biotin system



Mathilde Lepoitevin^a, Mikhael Bechelany^a, Emmanuel Balanzat^b, Jean-Marc Janot^a,
Sebastien Balme^{a,*}

^a Institut Européen des Membranes, UMR5635, Université de Montpellier ENSM CNRS, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

^b Centre de recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique, UMR6252 CEA-CNRS-ENSICAEN, 6 Boulevard du Maréchal Juin, 14050 Caen Cedex 4, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2016

Received in revised form 10 June 2016

Accepted 15 June 2016

Available online 16 June 2016

Keywords:

Nanopore

Atomic Layer Deposition

protein sensor

current rectification

ABSTRACT

Single nanopore technology permits to design a biosensor, able to detect proteins without the use of specific probe. In this work, we have fashioned cylindrical nanopore by track-etched technique and atomic layer deposition. The nanopore was then decorated by the asymmetric tethering of biotin. From the rectification of the I–V response induced by the asymmetry of the nanopore, we demonstrate the potentiality of this strategy to detect and to discriminate avidin and streptavidin with respect to their global charge. Based on the nanopore decorated with avidin and streptavidin, we show the possible detection layer by layer of biotinylated protein (IgG and BSA) as well as antibody.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of nanopore technologies have become an important research area over the last two decades as a new way for DNA sequencing [1–4] as well as for biosensing [5,6]. Among the various approaches investigated so far, solid state nanopores are an alternative to the fragile biological ones. Indeed, they present obvious advantages like their stability, easy handling, and up-scaled production [7]. Solid state nanopores can be made of different types of materials such as: polymer [8], silicon based materials [9,10], glass [11], graphene [12,13], and MoS₂ [14]. They are defined by their compositions, aspect ratio, and surface state (typically chemical function). The polymeric nanopores obtained by track-etched methods, offer a large scale of applications regarding their shapes (*i.e.* cylindrical, conical) and the ability to decorate them with suitable functions to design for instance nanovalve pH-dependent or ionic diode [15,16].

Polymeric single nanopores have also been investigated to fashion biosensor for detection using mainly two methods. The first one is the resistive pulse method which permits the detection of a single molecule [17–21]. Basically this method consists to apply a voltage through a nanopore and record the current fluctuations induced by the translocation of macromolecules or nanoparticles. These fluctuations are linked to the macromolecule

properties such as, its size, charge, and shape. The second one is based on the modification of the current rectification induced by a charge modification at the entrance of an asymmetric nanopore. It is the case for both, conical nanopores after a modification of their surface charge [22], as well as an asymmetric functionalization of cylindrical nanopores with protein [23]. Based on this concept, biomolecular conjugations inside single synthetic nanopores have been studied extensively due to their interest to fashion a large range of biosensors. Those biomolecular conjugations can be achieved by the immobilization, on the inner wall of the nanopore, of recognition sites for biomolecules such as, aptamer [23], biotin [24–26], Nitritotriacetic acid (NTA) [27] or antibodies [28]. Multi-step functionalization using proteins have been performed with multipore membranes in order to detect, T4 Polynucleotide Kinase [29] or glucose [30] as well as to evaluate enzymatic reaction under confinement [31]. Beside these two detection methods for sensor applications, chronopotentiometry [32] and impedance [33] have also been reported.

In most previous studies, the functionalization of nanopores is performed directly after the etching process. This way seems the most suitable but it has two limitations. The first one is the difficulty to precisely predict the diameter of the nanopore before chemical etching. The second one is the location of chemically active groups (typically COOH groups for Polyethylene terephthalate (PET)), which are only inside the nanopore, on its surface walls. This permits a selective functionalization inside the nanopore. However if we consider the decoration of a nanopore with protein

* Corresponding author. Tel.: +33467149118.

E-mail address: sebastien.balme@umontpellier.fr (S. Balme).

or for the detection of proteins, the unspecific adsorption close to the nanopore entrance could induce interferences. In order to tackle these problems, the nanopore can be modified by atomic layer deposition (ALD) [34]. This method is particularly adapted to fashion nanopore since it permits (i) to coat identically and homogeneously the inside and the outside of the nanopore [35], (ii) to functionalize the surface with chemically active groups such as amine and (iii) to control precisely the nanopore diameter up to 1 nm [36].

In a previous work [37], we proved that this approach is suitable to functionalize nanopore with streptavidin using a long Polyethylene glycol (PEG)-biotin spacer. This nanopore exhibits both, pH-gating and potential sensing properties. In this paper, we have used this approach and investigated the sensing aspects more in details. Different parameters such as (i) the size of the PEG spacer, and (ii) the protein used (avidin and streptavidin) were investigated as a proof of concept for protein detection. In order to work with a well-known system we have selected biotinylated protein (bovine serum albumin (BSA) and immunoglobulin G (IgG)) and antibody (AntiBSA).

2. Materials and method

2.1. Materials

NaCl was purchased from ACROS Organics (99,5%, 207790010). Ultra-pure water was produced from a Q-grad[®]-1 MilliQ system (Millipore). Poly(Ethylene Terephthalate) (PET) film (thickness 13 μm , biaxial orientation) was purchased from Goodfellow (ES301061). Diethyl zinc (DEZ) ($\text{Zn}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 95% purity, 557-20-0), Trimethylaluminum (TMA) ($\text{Al}(\text{CH}_3)_3$, 97% purity, 75-24-1), *N*-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (104884), sodium chloride (S9888), phosphate buffered saline (P4417), MES hemisodium salt (M0164), HEPES (H4034), CAPS (C2632) Avidin from egg white (A9275), Streptavidin from *Streptomyces avidinii* (S0677), Biotinamidohexanoyl-6-aminohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (B3295) Poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane M_n 3800 (757799), γ -Globulins from bovine blood (G7516), Bovine Serum Albumin (A215), monoclonal Anti-BSA antibody produced in mouse (SAB5300158) were purchased from Sigma Aldrich. Potassium chloride was purchased from VWR (26764.298).

2.2. Buffer preparation

The buffer solutions were made as follow: pH 10 and pH 9 (NaCl 100 mM, CAPS 1 mM); pH 8 and pH 7 (NaCl 100 mM, HEPES 1 mM); pH 6 and pH 5 (NaCl 100 mM, MES 1 mM); pH 4 (NaCl 100 mM, Citrate 1 mM). The final pH of the solutions was adjusted with HCl and NaOH solutions using a pH meter (Hanna HI 221 pH meter, pH electrode HI 1131).

2.3. Current-voltage measurements

I-*V* curves were recorded using a patch-clamp amplifier (EPC10 HEKA electronics, Germany). Typically current traces were recorded as a function of time under applied voltages from 1 V to -1 V by 100 mV steps during 20 s (sampling rate 2 kHz). Each measurement was repeated three times. The single nanopore is placed between two Teflon chambers containing the same electrolyte solution. The current is measured by Ag/AgCl, 1 M KCl electrodes connected to the cell chamber by agar-agar bridges. One electrode was plugged to the positive end of the amplifier (trans chamber) and the other electrode connected to the ground (cis chamber). Recorded currents were analyzed by Fitmaster (Heka Elektronik, Germany).

2.4. Track-etching nanopore

Single nanopores were tailored by track-etched methods. The single tracks were produced by Xe irradiation ($8,98 \text{ MeV u}^{-1}$) of PET film (13 μm) (GANIL, SME line, Caen, France). The activation of track was performed by UV exposition 24 h per side, (Fisher bioblock; VL215.MC, $\lambda = 312 \text{ nm}$) before chemical etching process. The chemical etching of cylindrical nanopores was performed under NaOH solution (3 M, 4–5 min, 55 °C, see Table 1). Then the nanopore was immersed 24 h hours in ultrapure water. The diameter of cylindrical nanopores d was obtained from the dependence of the conductance G with NaCl concentration from 10 mM to 750 mM, assuming bulk-like ionic conductivity inside the nanopores. In order to correct the conductivity at high salt concentration, the diameter is calculated from Eq. (1) using the ionic conductivity of bulk solution κ . The latter have been measured using a conductimeter (Hanna HI 255 combined meter with conductivity and electrode HI 76310) after preparation.

$$G = \frac{\kappa \pi d^2}{4L} \quad (1)$$

where L and d are the length and diameter of the nanopore.

2.5. Functionalization of the nanopores

Atomic layer deposition: The nanopore diameter was reduced by depositing thin $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ films using a custom-made ALD setup. The Al_2O_3 films were deposited by alternating exposures of TMA and deionized water (H_2O) with the following cycle times: 0.2 s pulse of TMA, 30 s exposure, and 40 s purge with 100 sccm dry Argon. A 2 s pulse, 30 s exposure, and 60 s purge with dry argon were used for H_2O . The ZnO films were deposited by alternating exposures of DEZ and deionized water with the following cycle times: 0.2 s pulse of DEZ, 30 s exposure, and 40 s purge. Again a 2 s pulse, 30 s exposure, and 60 s purge with dry argon were used for H_2O . ALD was carried out at 60 °C. These pulses, exposure, and

Table 1
Details of studied nanopore.

Pore name	Etching time, at 55 °C (s)	N° of $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ bilayers	Diameter after ALD (nm)	Biotin	1st protein	2nd protein	3rd protein
NP ₂₄ Biot	304	15	24	– biotin	StreptAvidin	IgG-biotin	–
NP ₁₁ Biot	276	12	11	– biotin	Avidin	IgG-biotin	–
NP ₂₂ Biot	324	15	22	– biotin	StreptAvidin	BSA-biotin	–
NP ₁₈ Biot	300	9	18	– biotin	Avidin	BSA-biotin	Anti-BSA
NP ₁₆ PEG _{biot}	263	10	16	– PEG – biotin	StreptAvidin	BSA-biotin	Anti-BSA
NP ₂₂ PEG _{biot}	251	7	22	– PEG – biotin	StreptAvidin	IgG-biotin	–
NP ₂₆ PEG _{biot}	244	5	26	– PEG – biotin	Avidin	BSA-biotin	Anti-BSA

purge times were chosen conservatively to ensure completion of the ALD surface reactions and to prevent mixing of the reactive gases. The growth per cycle was about 2 Å/cycle for Al₂O₃ and 2.1 Å/cycle for ZnO [38]. A sequence of five cycles of Al₂O₃ preceding five cycles of ZnO was used to reduce the pore diameter. After ALD deposition, a 48 h *N*-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (AEAPTMS) vapor exposure treatment was performed under vacuum to create a pore surface with a –NH₂ terminal. The nanopores modification was approved by XPS measurement (ESCALAB 250 Thermo Electron) [37].

Nanopore biotinylation: A 0.5 mg of poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide-5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino) ethane was added in 1 mL of a solution MeOH. 50 µL of that solution were added in the cis side of the cell in a 1.8 mL phosphate-buffered saline (PBS) solution (0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4, at 25 °C), for 1 h. The same protocol was followed in order to graft Biotinamidohexanoyl-6-aminoheptanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester.

Avidin or Streptavidin attachment: 100 µL of streptavidin (130 nM) were added, in the cis side of the cell, in 1.8 mL of NaCl (100 mM) and HEPES (1 mM) at pH 7, under an applied voltage of 100 mV, for 30 min. The same protocol was followed for avidin but the applied voltage was –100 mV.

Biotinylation of protein (γ-globulin and BSA): 1 mL of protein (1 mg mL^{–1}) in PBS (0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4, at 25 °C) was added to Poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane dry molar ratio 1:1 and allowed to react for 0.5 h at 20 °C. Then the unreacted biotin-PEG was separated by centrifugation (16000 g, 1 min) using a filter (Biospin P6).

Biotinilated protein insertion: 100 µL of biotin-PEG-protein (γ-globulin or BSA 0.5 mg mL^{–1}) were added, in the cis side of the cell, in 1.8 mL of NaCl (100 mM) and HEPES (1 mM) at pH 8, under an applied voltage of 200 mV (for both proteins), for 1 h.

Anti-BSA insertion: 50 µL of anti-BSA (1 mg mL^{–1}) were added, in the cis side of the cell, in 1.8 mL of NaCl (100 mM) and HEPES (1 mM) at pH 7, without applied voltage, for 1 h.

Rectification factor calculation: to compare all the results a rectification factor has to be defined. R_f is the quotient between the conductance at the positive and negative voltage $R_f = G_+/G_-$. The conductivities $G_{\pm}$ were calculated from the slope of the *I*–*V* curves from 0.3 V to 1 V, and –1 V to –0.3 V, for the positive and negative values respectively.

3. Results and discussion

3.1. Nanopore design

Seven single cylindrical nanopores (Table 1) with high aspect ratio ($L = 13 \mu\text{m}$) were fabricated by a symmetrical etching process of films irradiated by heavy ions. Then, the nanopores were reduced by successive atomic layer deposition of Al₂O₃/ZnO bilayers carried out at 60 °C. The last layer of ZnO enables the functionalization of the free –OH groups which were modified by addition of *N*-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (Fig. 1). After both chemical etching and ALD steps, nanopore diameters d were determined from the linear dependence (Eq. (1)) of the conductance G on NaCl bulk conductivity κ at salt concentration from 10 to 750 mM (Fig. 2a). The nanopore biotinylation were performed using spacers with different lengths. The shorter one was obtained from biotinamidohexanoyl-6-aminoheptanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (noted NP_{biot}) and the longer one by

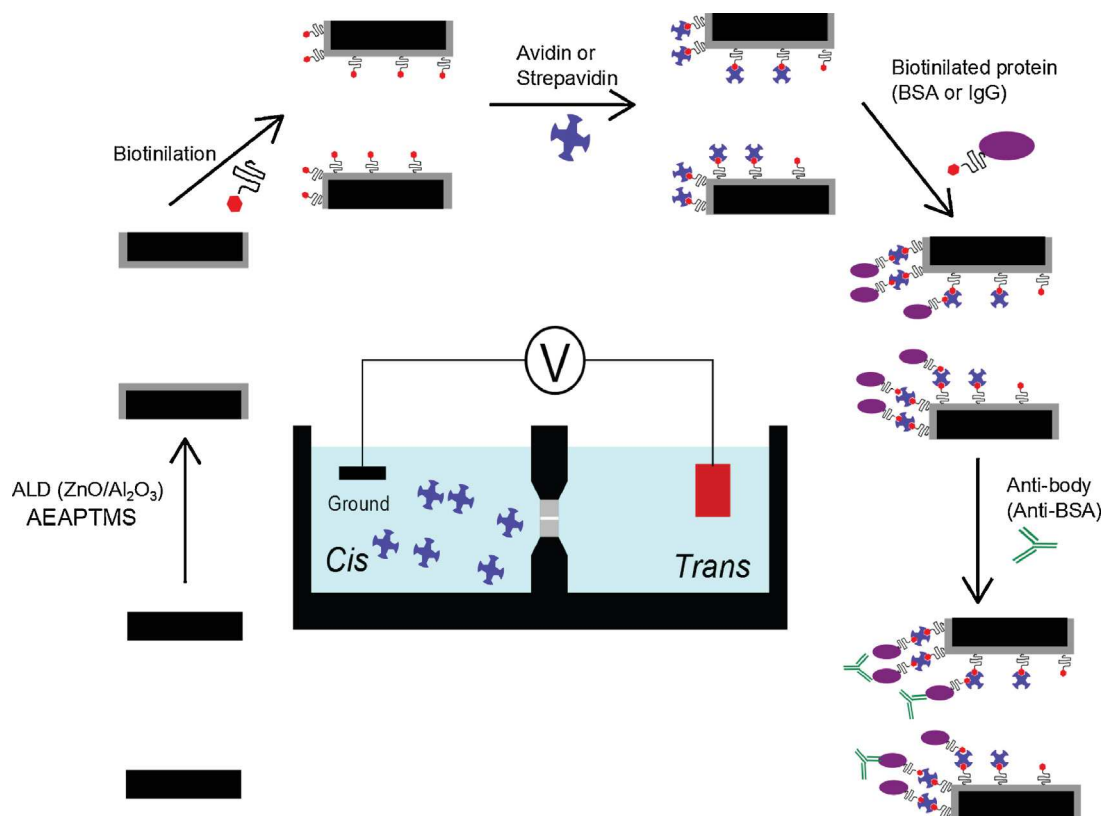


Fig. 1. Scheme of the functionalisation of the pore surface (not to scale).

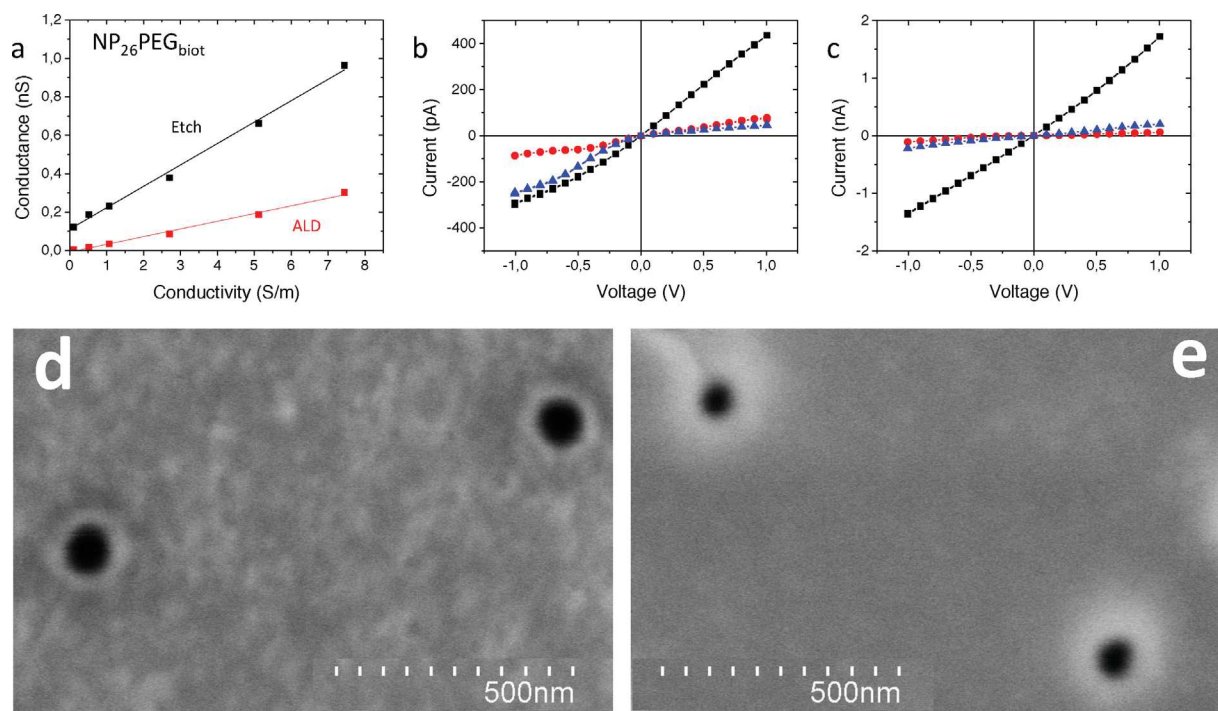


Fig. 2. a) Nanopore conductance of $\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$ after both the chemical etching (black squares) and ALD (red squares) steps for $\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$, nanopore diameters d were determined from the linear dependence (Eq. (1)) of the conductance G on NaCl bulk conductivity κ at salt concentration from 10 to 750 mM. The lines are the linear fits. B, c) Examples of current/voltage response of the nanopore after etching (black), after ALD (red) and after addition of PEG-biotin (blue) at 250 mM of NaCl for (b) $\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$ and (c) $\text{NP}_{24}\text{Biot}$. SEM images of a multipore membrane before (d) and after reduction by atomic layer deposition (e). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

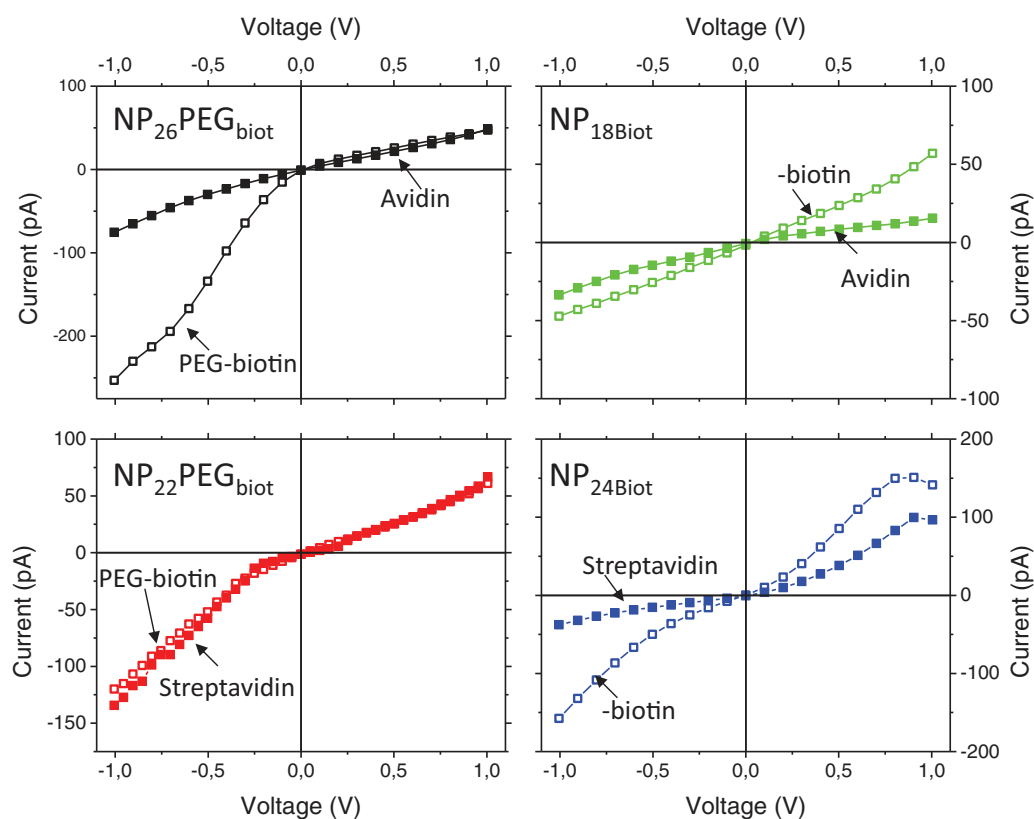


Fig. 3. I - V curves, after the grafting of $-\text{biotin}$ chains (open squares), and after grafting of the proteins (filled squares), black: $\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$, red: $\text{NP}_{22}\text{PEG}_{\text{biot}}$, green: $\text{NP}_{18}\text{Biot}$ and blue $\text{NP}_{24}\text{Biot}$. All the experiments were performed at pH7 and NaCl 100 mM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

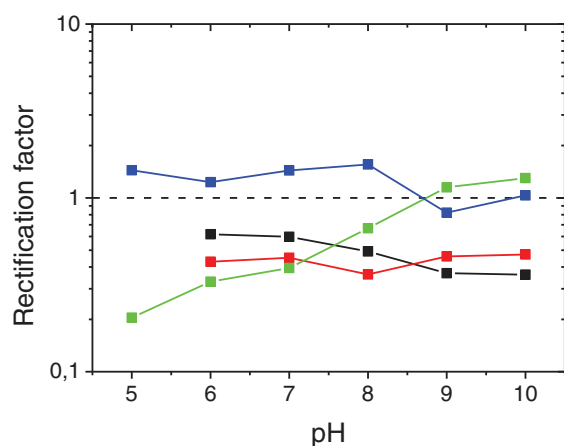


Fig. 4. Rectification factor as a function of the pH for: black: NP₂₆PEG_{biot} –avidin, red: NP₂₂PEG_{biot} –streptavidin, green: NP₁₈biot –avidin, and blue NP₂₄biot –streptavidin. All the experiments were performed at NaCl 100 mM. The results at pH lower than 6 are not shown for the long PEG chains as it has been shown elsewhere, that there is a phenomenon of aggregation [37]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

addition of Poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane (noted NP_xPEG_{biot}). The *I*–*V* responses of the nanopores after each step (chemical etching, ALD and *N*-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine

grafting, as well as biotinylation) were measured under symmetric electrolyte conditions (Fig. 2 and S1). As previously mentioned, the chemical etching process was performed under symmetrical condition. It results a cylindrical nanopore. In this case, the *I*–*V* response is perfectly linear. This is also the case after the functionalization step by ALD and *N*-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine grafting. Thus, we can define the reference state at this step since the rectification factor is equal to 1. The biotinylation was performed under asymmetrical condition since PEG-biotin or biotinamidohexanoyl-6-amino-hexanoic was inserted only in the cis side of the cell, for a short time (1 h). Thus according to literature, the biotinamidohexanoyl-6-amino-hexanoic or PEG-biotins are not grafted along the whole nanopore length [39]. The grafting of biotinamidohexanoyl-6-amino-hexanoic induces only a weak current modification. On the contrary, when nanopore is tethered with PEG-biotin a current rectification is observed. This rectification is usually reported for conical nanopores. It comes from an asymmetry, either of size, and/or charge of the nanopore.

3.2. Avidin/StreptAvidin detection

This work aims at the detection of captured proteins by using the avidin-biotin strategy. Our first question regards the effect of the global charge of the protein on the *I*–*V* response at different pHs. We have selected avidin (IP 10.6) and streptavidin (IP 5.6) since they exhibit opposite charge in large pH range from 6 to 10. After tethering –biotin onto the inner wall of the pore, avidin [or streptavidin] were introduced in the cis side of nanopore for

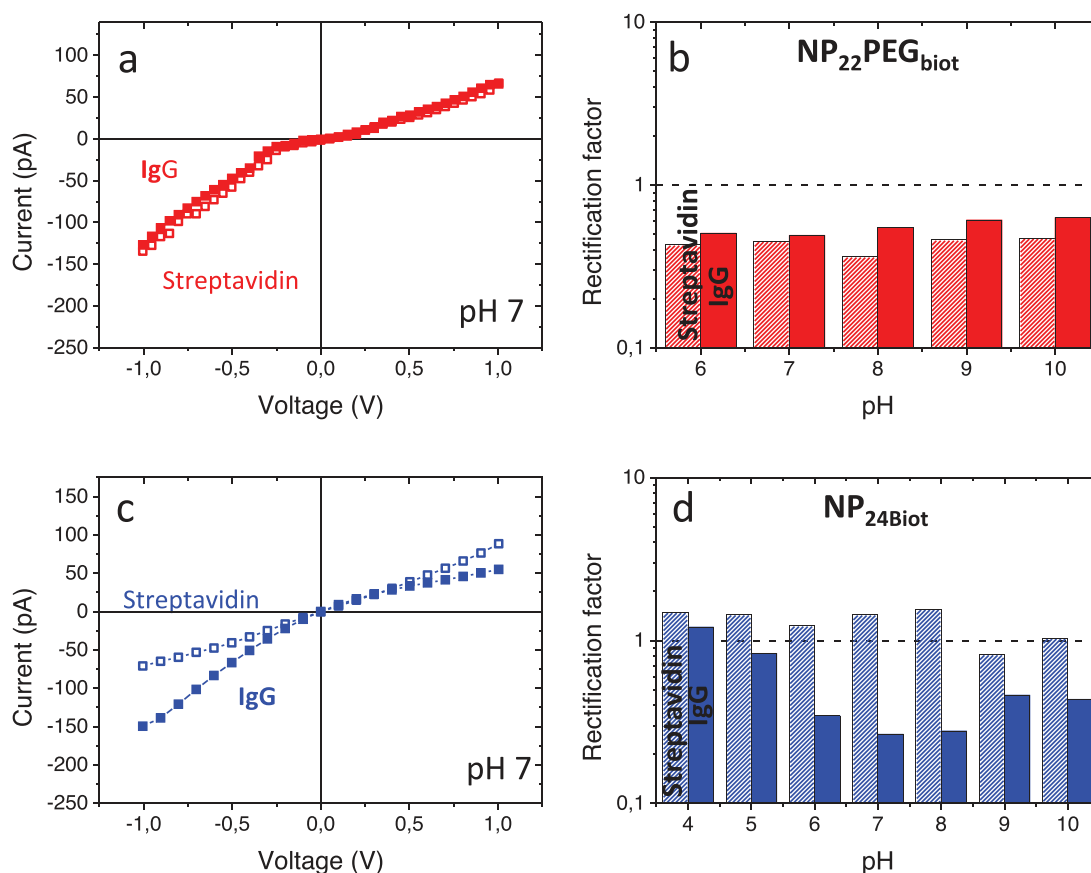


Fig. 5. Left side: *I*–*V* curves at pH 7, NaCl 100 mM, after the addition of streptavidins (open squares), and after grafting of the proteins IgG (filled squares). Right side: comparison of the rectification factor as a function of the pH, between different pores before (patterned column) and after (filled column) the second protein insertion at NaCl 100 mM. a. Biotin-PEG- γ -globulin insertion: red: NP₂₂PEG_{biot}, contains long biotin-PEG chains and streptavidin, and blue: NP₂₄biot, contains short –biotin spacers and streptavidin. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

30 min under a -100 mV potential [or 100 mV respectively]. Then the pore was washed with a buffer solution to remove all unattached proteins before measuring the I - V response. The latter is performed at 100 mM NaCl at pH 7. Under these conditions, avidin is positively charged while streptavidin is negatively charged (Fig. 3). The I - V response shows a clear decrease of the current after proteins insertion for $\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$ and the nanopores with biotin spacers. In the case of $\text{NP}_{22}\text{PEG}_{\text{biot}}$, the current modification induced by streptavidin is less obvious. This could suggest that the proteins were not tethered onto the nanopore. However, we have observed that the nanopore is reversibly clogged at pH 4 and thus proves that streptavidins are tethered onto the nanopore. The low difference should be interpreted by the location of the proteins at the nanopore entrance due to its small diameter. For long spacer (PEG-biotin) the current rectification (defined by the ratio $G_{(+)} / G_{(-)}$) is below 1 before and after, avidin or streptavidin addition, and does not depend of the pH (from 6 to 10). (Fig. 4) This seems to indicate that the charge of the protein has no influence on the current rectification. In the case of short spacer (-biotin), the global charge of the proteins influences the rectification factor. Indeed after the proteins tethering at pH 7, the latter is below 1 for avidin and above 1 for streptavidin. Those results might be due to the nanopore asymmetry induced by the proteins tethering [23]. More specifically, for avidin the current rectification increases with pH in order to reach 1 at pH 9. From this observation, the current rectification seems dependent of the protein charge. Based on that assumption, the current rectification should also increase with pH for streptavidin since the number of negative charge increases. On the contrary our result shows a quasi-constant value for pH from 5 to 8 and a decrease to reach a

value close to 1 at pH 9. Regarding our experimental conditions, only the entrance of the nanopore is functionalized with PEG-biotin. After protein tethering, the nanopore charge is different at its entrance (charge of the protein) and inside the nanopore (charge of amine groups). The rectification factor for both the avidin and streptavidin comes close to 1, above pH 9 which is compatible with the pKa of methoxy propyl ethylendiamine group. In this case, the discrepancy observed for streptavidin could be explained by an ion depletion at the frontier between the proteins and the amine groups [40,41]. Another assumption is that it could come from the orientation of the streptavidins. Indeed, if we consider that the current rectification is due to the charge of the protein, the surface oriented inside the nanopore may not be influenced by the increase of pH.

At this step, our result shows that the nanopore functionalization with short spacer is more suitable than long spacer to discriminate avidin and streptavidin since the current rectification depends on the protein charge. To go further, we investigated, its potentiality to detect a biotinylated protein, using γ -globulin and -BSA. This experiment will permit also to prove if the binding sites of avidin (or streptavidin) are still active and accessible despite the confinement effect. To do it, biotinylated protein (BSA or γ -globulin) were added, in the cis side of the cell, after avidin or streptavidin tethering, under NaCl 100 mM, 10 mM HEPES pH 7 condition. The I - V responses before and after the grafting of biotin-PEG- γ -globulin (IP 6.5) on nanopores decorated with PEG_{biot} -streptavidin or biotin-streptavidin is reported on Fig. 5. For the biotin-PEG chains, the biotin-PEG- γ -globulins tethered on the streptavidin induce an increase of current rectification independent to the pH (from 6 to 10). However the shape of the I - V curves

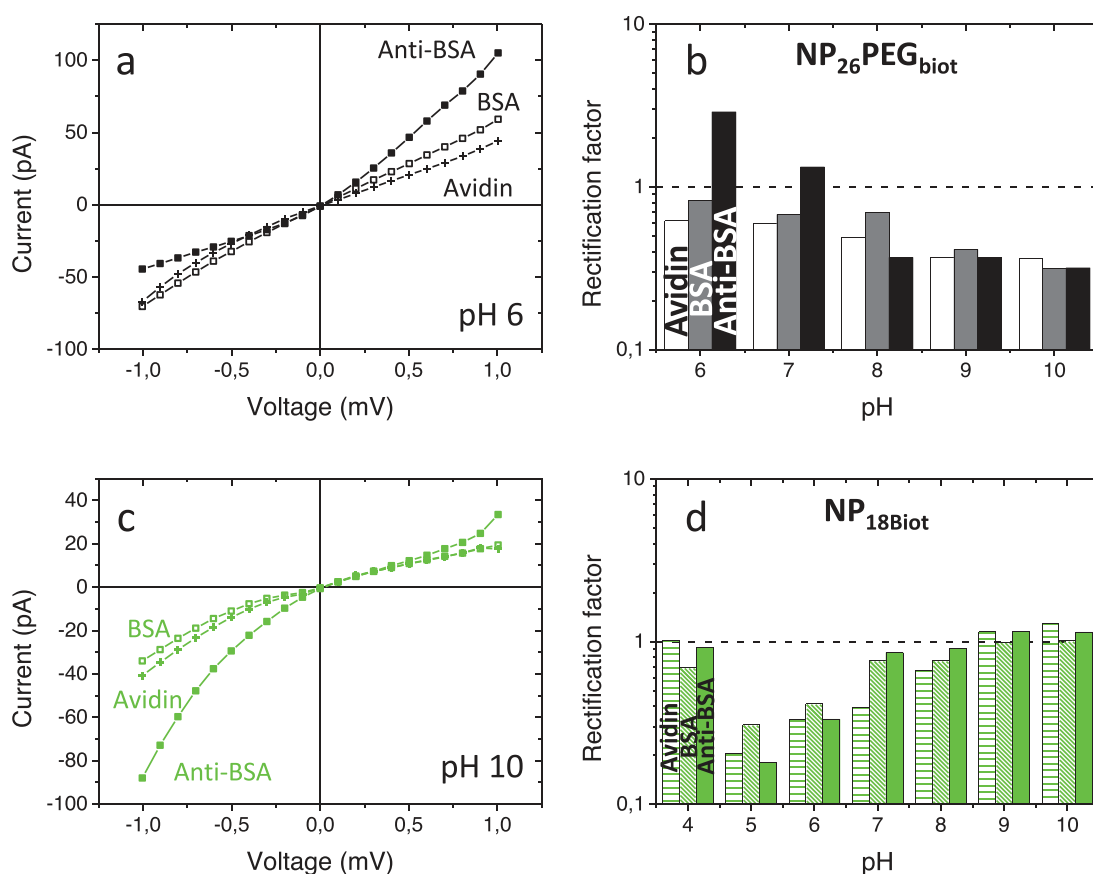


Fig. 6. successive insertion of Avidin, BSA and Anti-BSA for $\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$ (black) and $\text{NP}_{18}\text{Biot}$ (green) Left side: I - V curves at NaCl 100 mM, after avidin insertion (cross), after the addition of BSA (open squares), and after grafting of the anti-BSA (filled squares). Right side: Comparison of the rectification factor as a function of the pH, between different pores after avidin, BSA and anti-BSA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

is the same since the current rectification is always below 1. For short –biotin chains, the insertion of the biotin-PEG- γ –globulin induces a decrease of the rectification factor independent of the pH. This decrease is more pronounced at pH 7 and 8 when streptavidin and γ –globulin have opposite global charges. At these pHs, the inversion of the I–V curve response permits an easy detection of the PEG- γ –globulin.

The biotinylated BSA detection have been also performed on nanopore decorated with avidin. The latter choice is motivated by an opposite global charge of both proteins from pH 5 to 10. Under these conditions, we can expect to observe an inversion of the I–V curve shapes due to the BSA tethering. The rectification factors reported on Fig. 6 do not show the expected inversion. In the case of a short spacer, the addition of biotinylated BSA induces an increase of the rectification factor from pH 5 to 8 and a decrease at pH 4 and pH 9–10. This behavior can be correlated to the global charge inversion of BSA (IP 4.7) and the amine group inside the nanopore. It can be noticed as well that the rectification factor is 1 for pH 9–10, after the BSA insertion. For the long spacer an increase of the current factor rectification is also observed for pH from 6 to 9.

In order to test the suitability of our approach to detect successive protein addition, anti-BSA was added after the BSA tethering on NP₂₆PEG_{biot} and NP₁₈biot. When the anti-BSA is added on short spacers (NP₁₈biot), there is no significant inversion. On the contrary, the I–V curve reported after the anti-BSA addition shows an inversion of the rectification factor for NP₂₆PEG_{biot} at pH 6 and 7. Thus in this case of biotin-PEG, the antibody detection could be not suitable.

4. Conclusion

To sum up, we have shown the integration of bio-recognition elements into a symmetrical nanopore to obtain a functional biosensor. The preparation of single nanopore in polymer foils with asymmetric functionalization was described together with the methods to study their transport properties. We have demonstrated, a simple fabrication and functionalisation of nanopores, by successive tethering of amine functions, and biotins with different spacers. Each step of the functionalization can be monitored since it induces a modification of voltage-current dependence. The asymmetrical grafting leads to a current rectification which is depending to both the protein charges and the free amine groups inside the nanopore. Based on this, our results show the possibility to discriminate avidin and streptavidin at pH below 9. We have also proved that binding sites of both avidin and streptavidin are still active and accessible in the nanopore, despite the confinement effects. This permits the detection of biotinylated protein such as IgG. The proof of concept of single nanopore to detect an antibody was also demonstrated using BSA – antiBSA. Finally this strategy is interesting since the concentration of protein needed for detection is around 1 nM and do not require fluorescence labelling.

Acknowledgment

M. Lepoitevin has a PhD fellowship from the French government. This work was supported by European Institute of Membrane in health project (PS2-2014). Single tracks have been produced in GANIL (Caen, France) in the framework of an EMIR project (P-973-M).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.06.079>.

References

- [1] J.J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D.W. Deamer, Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel, *P Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 13770–13773.
- [2] D. Branton, D.W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S.A. Benner, T. Butler, et al., The potential and challenges of nanopore sequencing, *Nat Biotechnol* 26 (2008) 1146–1153.
- [3] J.J. Kasianowicz, J.W.F. Robertson, E.R. Chan, J.E. Reiner, V.M. Stanford, Nanoscopic Porous Sensors, *Annu Rev Anal Chem* 1 (2008) 737–766.
- [4] F. Haque, J.H. Li, H.C. Wu, X.J. Liang, P.X. Guo, Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA, *Nano Today* 8 (2013) 56–74.
- [5] A. Kocer, L. Tauk, P. DeJardin, Nanopore sensors: From hybrid to abiotic systems, *Biosens Bioelectron* 38 (2012) 1–10.
- [6] M. Lepoitevin, M. Bechelany, J.M. Janot, S. Balme, Nanopore Functionalization for biological channel mimicking, *Science Letters* 4 (2015) 188.
- [7] C. Dekker, Solid-state nanopores, *Nat Nanotechnol* 2 (2007) 209–215.
- [8] P. Apel, Track etching technique in membrane technology, *Radiat Meas* 34 (2001) 559–566.
- [9] U.F. Keyser, D. Krapf, B.N. Koeleman, R.M.M. Smeets, N.H. Dekker, C. Dekker, Nanopore tomography of a laser focus, *Nano Lett* 5 (2005) 2253–2256.
- [10] D. Krapf, M.Y. Wu, R.M.M. Smeets, H.W. Zandbergen, C. Dekker, S.G. Lemay, Fabrication and characterization of nanopore-based electrodes with radii down to 2 nm, *Nano Lett* 6 (2006) 105–109.
- [11] E. Salancon, B. Tinland, Measuring liquid meniscus velocity to determine size of nanopipette aperture, *J Colloid Interf Sci* 392 (2013) 465–469.
- [12] S.M. Avdoshenko, D. Nozaki, C.G. da Rocha, J.W. Gonzalez, M.H. Lee, R. Gutierrez, et al., Dynamic and Electronic Transport Properties of DNA Translocation through Graphene Nanopores, *Nano Lett* 13 (2013) 1969–1976.
- [13] C.A. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, et al., DNA Translocation through Graphene Nanopores, *Nano Lett* 10 (2010) 2915–2921.
- [14] J. Feng, K. Liu, M. Graf, M. Lihter, R.D. Bulushev, D. Dumcenco, et al., Electrochemical Reaction in Single Layer MoS₂: Nanopores Opened Atom by Atom, *Nano Lett* 15 (2015) 3431–3438.
- [15] M. Ali, B. Schiedt, R. Neumann, W. Ensinger, Biosensing with Functionalized Single Asymmetric Polymer Nanochannels, *Macromol Biosci* 10 (2010) 28–32.
- [16] R.E. Gyurcsanyi, Chemically-modified nanopores for sensing, *Trac-Trend Anal Chem* 27 (2008) 627–639.
- [17] K. Kecici, L.T. Sexton, F. Buyukserin, C.R. Martin, Resistive-pulse detection of short dsDNAs using a chemically functionalized conical nanopore sensor, *Nanomedicine-Uk* 3 (2008) 787–796.
- [18] C.C. Harrell, Y. Choi, L.P. Horne, L.A. Baker, Z.S. Siwy, C.R. Martin, Resistive-pulse DNA detection with a conical nanopore sensor, *Langmuir* 22 (2006) 10837–10843.
- [19] S. Cabello-Aguilar, A. Abou Chaaya, M. Bechelany, C. Pochat-Bohatier, E. Balanzat, J.M. Janot, et al., Dynamics of polymer nanoparticles through a single artificial nanopore with a high-aspect-ratio, *Soft Matter* 10 (2014) 8413–8419.
- [20] D. Kaya, A. Dinler, N. San, K. Kecici, Effect of Pore Geometry on Resistive-Pulse Sensing of DNA Using Track-Etched PET Nanopore Membrane, *Electrochimica Acta* 202 (2016) 157–165.
- [21] V. Thangaraj, M. Lepoitevin, M. Smietana, E. Balanzat, M. Bechelany, J.-J. Vasseur, et al., Detection of short ss- and dsDNA using Al₂O₃ conical nanopore designed by atomic layer deposition, *Microchimica Acta* 183 (2016) 1011–1017.
- [22] M. Ali, P. Ramirez, S. Mafe, R. Neumann, W. Ensinger, A pH-Tunable Nanofluidic Diode with a Broad Range of Rectifying Properties, *ACS Nano* 3 (2009) 603–608.
- [23] M. Ali, S. Nasir, W. Ensinger, Bioconjugation-induced ionic current rectification in aptamer-modified single cylindrical nanopores, *Chem Commun* 51 (2015) 3454–3457.
- [24] M. Ali, S. Nasir, P. Ramirez, J. Cervera, S. Mafe, W. Ensinger, Carbohydrate-Mediated Biomolecular Recognition and Gating of Synthetic Ion Channels, *J Phys Chem C* 117 (2013) 18234–18242.
- [25] R.E. Gyurcsanyi, T. Vigassy, E. Pretsch, Biorecognition-modulated ion fluxes through functionalized gold nanotubes as a novel label-free biosensing approach, *Chem Commun* (2003) 2560–2561.
- [26] Z. Siwy, L. Trofin, P. Kohli, L.A. Baker, C. Trautmann, C.R. Martin, Protein biosensors based on biofunctionalized conical gold nanotubes, *J Am Chem Soc* 127 (2005) 5000–5001.
- [27] M.N. Tahir, M. Ali, R. Andre, W.E.G. Muller, H.C. Schroder, W. Tremel, et al., Silicatein conjugation inside nanoconfined geometries through immobilized NTA-Ni(II) chelates, *Chem Commun* 49 (2013) 2210–2212.
- [28] R.S. Wei, V. Gatterdam, R. Wienenke, R. Tampe, U. Rant, Stochastic sensing of proteins with receptor-modified solid-state nanopores, *Nat Nanotechnol* 7 (2012) 257–263.
- [29] L. Lin, Y. Liu, J. Yan, X.S. Wang, J.H. Li, Sensitive Nanochannel Biosensor for T4 Polynucleotide Kinase Activity and Inhibition Detection, *Anal Chem* 85 (2013) 334–340.
- [30] L. Lin, J. Yan, J.H. Li, Small-Molecule Triggered Cascade Enzymatic Catalysis in Hour-Glass Shaped Nanochannel Reactor for Glucose Monitoring, *Anal Chem* 86 (2014) 10546–10551.
- [31] J.C. Yu, P.C. Luo, C.X. Xin, X.D. Cao, Y.J. Zhang, S.Q. Liu, Quantitative Evaluation of Biological Reaction Kinetics in Confined Nanospaces, *Anal Chem* 86 (2014) 8129–8135.

- [32] Y.D. Xu, E. Bakker, Ion Channel Mimetic Chronopotentiometric Polymeric Membrane Ion Sensor for Surface-Confined Protein Detection, *Langmuir* 25 (2009) 568–573.
- [33] J.Y. Feng, J. Liu, B.H. Wu, G.L. Wang, Impedance Characteristics of Amine Modified Single Glass Nanopores, *Anal Chem* 82 (2010) 4520–4528.
- [34] P. Chen, T. Mitsui, D.B. Farmer, J. Golovchenko, R.G. Gordon, D. Branton, Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores, *Nano Lett* 4 (2004) 1333–1337.
- [35] A. Abou Chaaya, M. Le Poitevin, S. Cabello-Aguilar, S. Balme, M. Bechelany, S. Kraszewski, et al., Enhanced Ionic Transport Mechanism by Gramicidin A Confined Inside Nanopores Tuned by Atomic Layer Deposition, *J Phys Chem C* 117 (2013) 15306–15315.
- [36] S. Balme, F. Picaud, M. Manghi, J. Palmeri, M. Bechelany, S. Cabello-Aguilar, et al., Ionic transport through sub-10 nm diameter hydrophobic high-aspect ratio nanopores: experiment, theory and simulation, *Sci Rep-Uk* 5 (2015).
- [37] M. Lepoitevin, G. Nguyen, M. Bechelany, E. Balanzat, J.M. Janot, S. Balme, Combining a sensor and a pH-gated nanopore based on an avidin-biotin system, *Chem Commun* 51 (2015) 5994–5997.
- [38] J.A. Whitby, F. Ostlund, P. Horvath, M. Gabureac, J.L. Riesterer, I. Utke, et al., High Spatial Resolution Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry for the Masses: A Novel Orthogonal ToF FIB-SIMS Instrument with In Situ AFM, *Adv Mater Sci Eng* (2012).
- [39] G. Nguyen, I. Vlassiouk, Z.S. Siwy, Comparison of bipolar and unipolar ionic diodes, *Nanotechnology* 21 (2010).
- [40] H. Daiguji, Y. Oka, K. Shirono, Nanofluidic diode and bipolar transistor, *Nano Lett* 5 (2005) 2274–2280.
- [41] R. Karnik, C.H. Duan, K. Castelino, H. Daiguji, A. Majumdar, Rectification of ionic current in a nanofluidic diode, *Nano Lett* 7 (2007) 547–551.

Supporting Informations: Label – free proteins sensing with track-etched nanopore decorated by avidin/biotin system

Mathilde Lepoitevin, Mikhael Bechelany, Emmanuel Balanzat, Jean-Marc Janot, Sebastien Balme

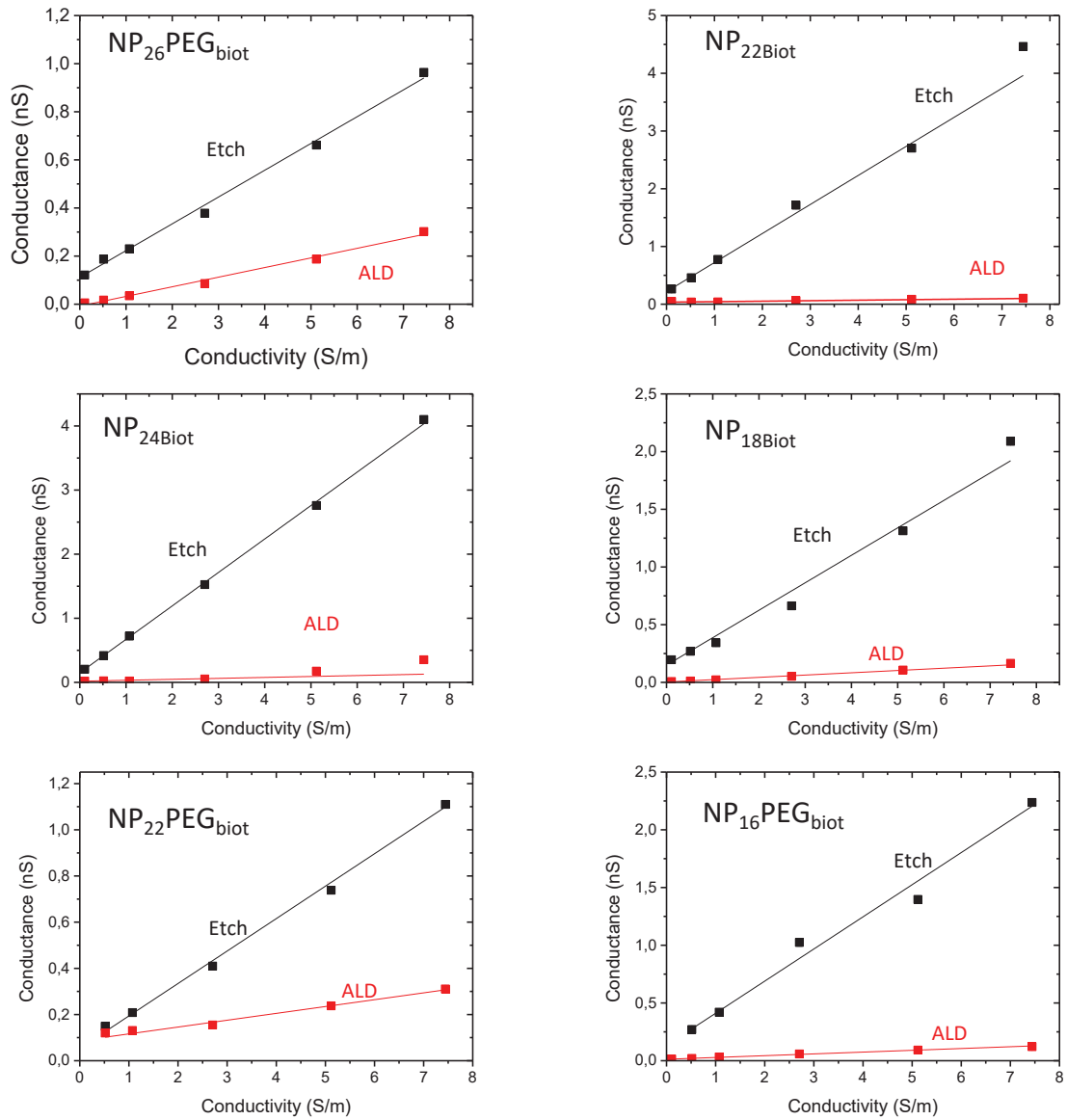


Figure S1 : Linear dependence (equation 1) of the conductance G on NaCl bulk conductivity κ at salt concentration from 10 to 750 mM after chemical etching (black squares) and ALD (red squares) steps for each pore. The lines are the linear fits.

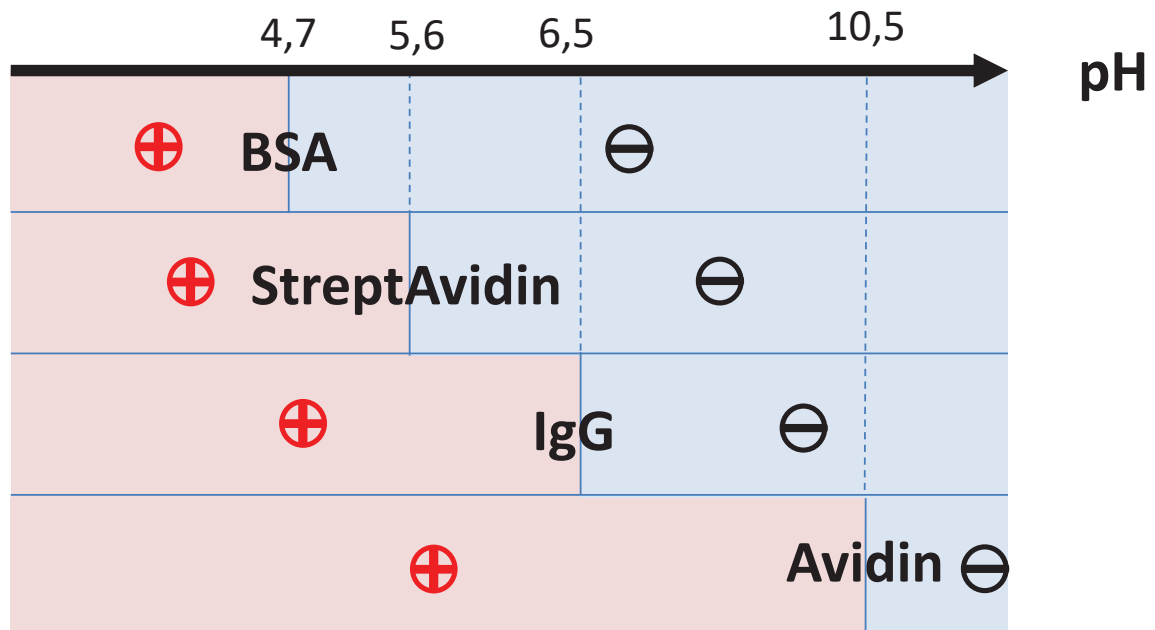


Figure S2: Global charge of the model proteins depending on their pH

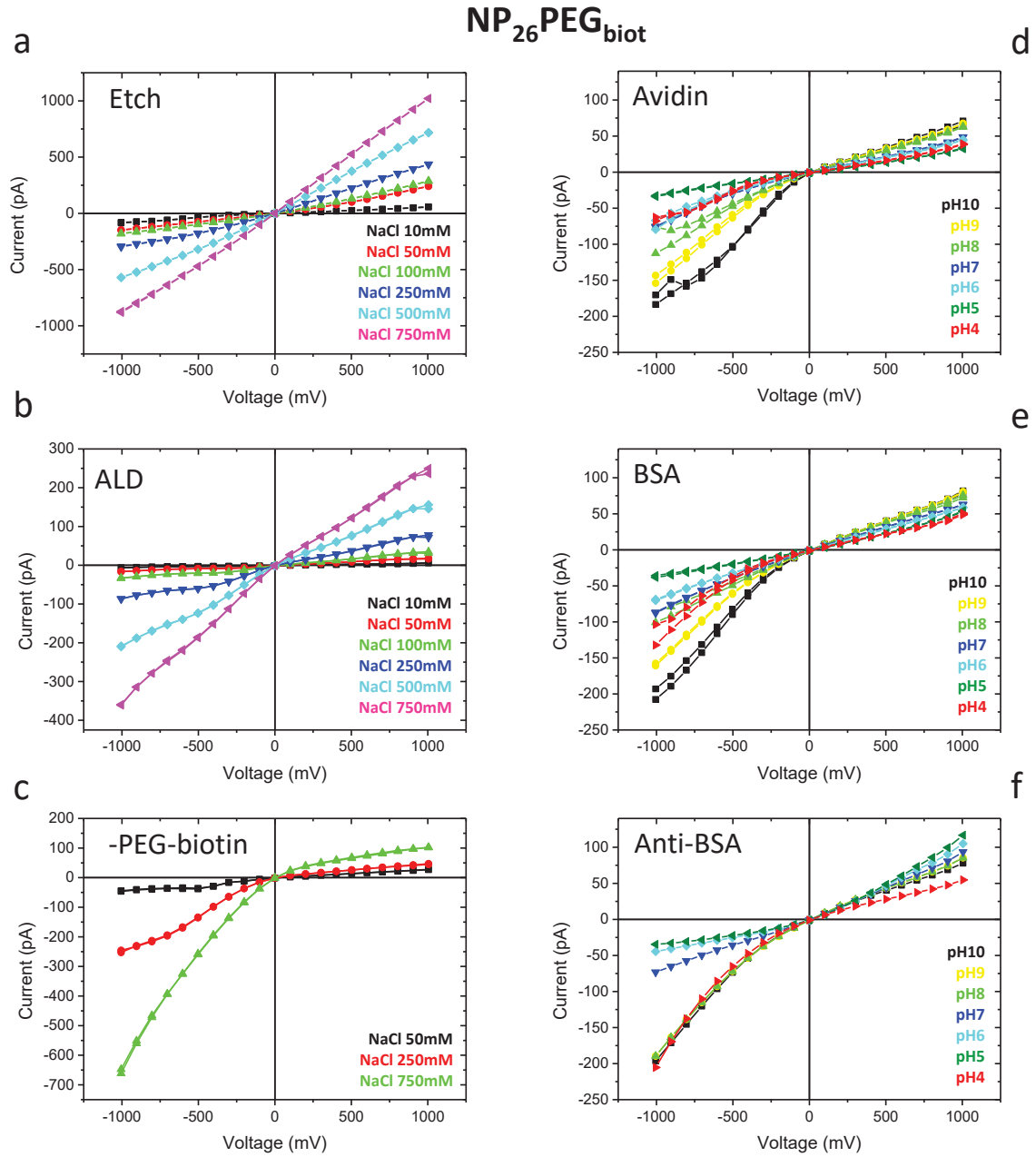


Figure S3 : I-V curves for NP₂₆PEG_{biot}, after the etching process (a), the ALD (b), the grafting of -PEG-biotin chains (c) at different concentrations. I-V curves, after grafting of the avidins (d), BSA (e), and anti-BSA (f) at different pHs and NaCl 100 mM

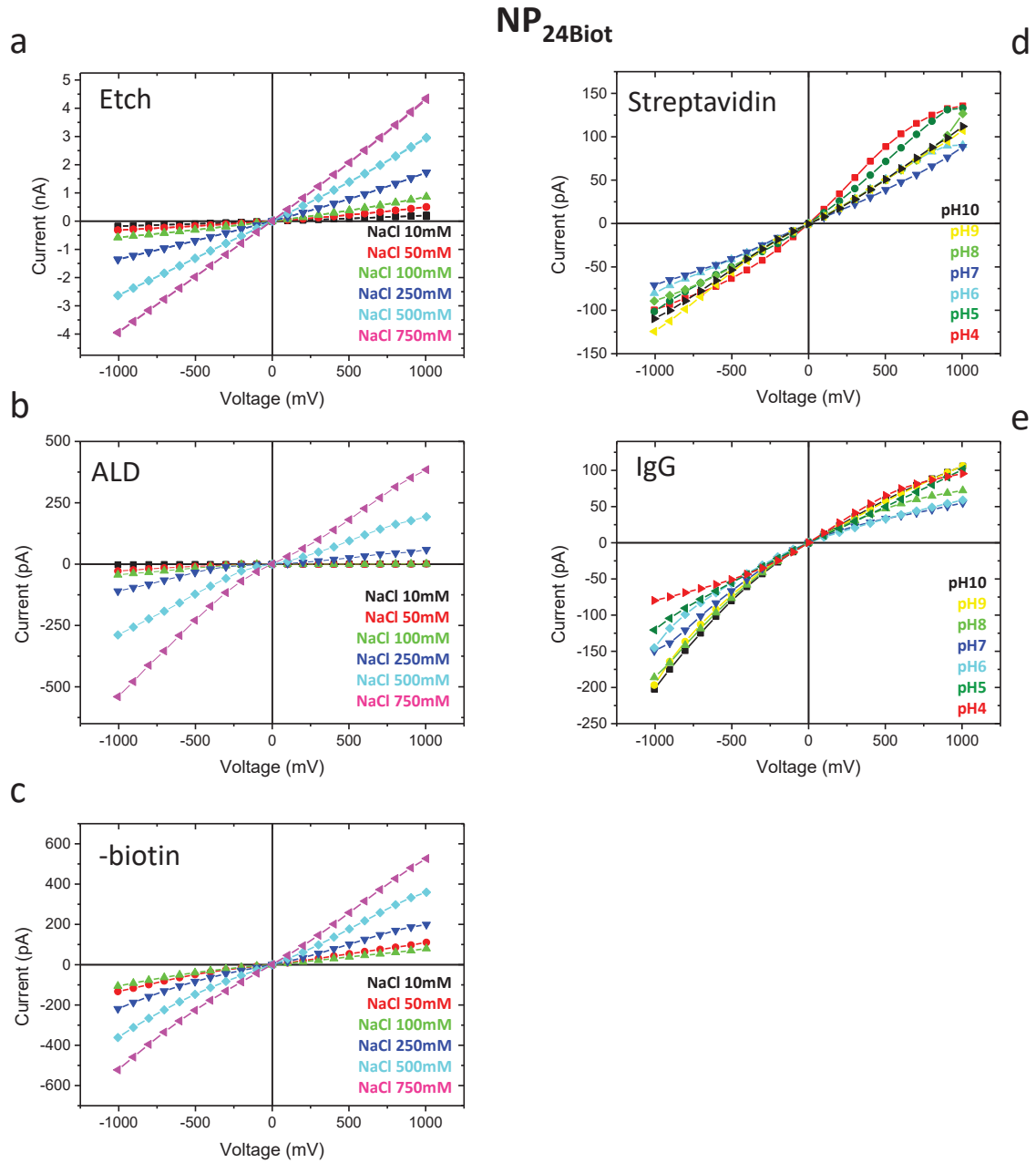


Figure S4: I-V curves for NP₂₄Biot, after the etching process (a), the ALD (b), the grafting of -biotin chains (c) at different concentrations. I-V curves, after grafting of the streptavidins (d), IgG (e), at different pHs and NaCl 100 mM.

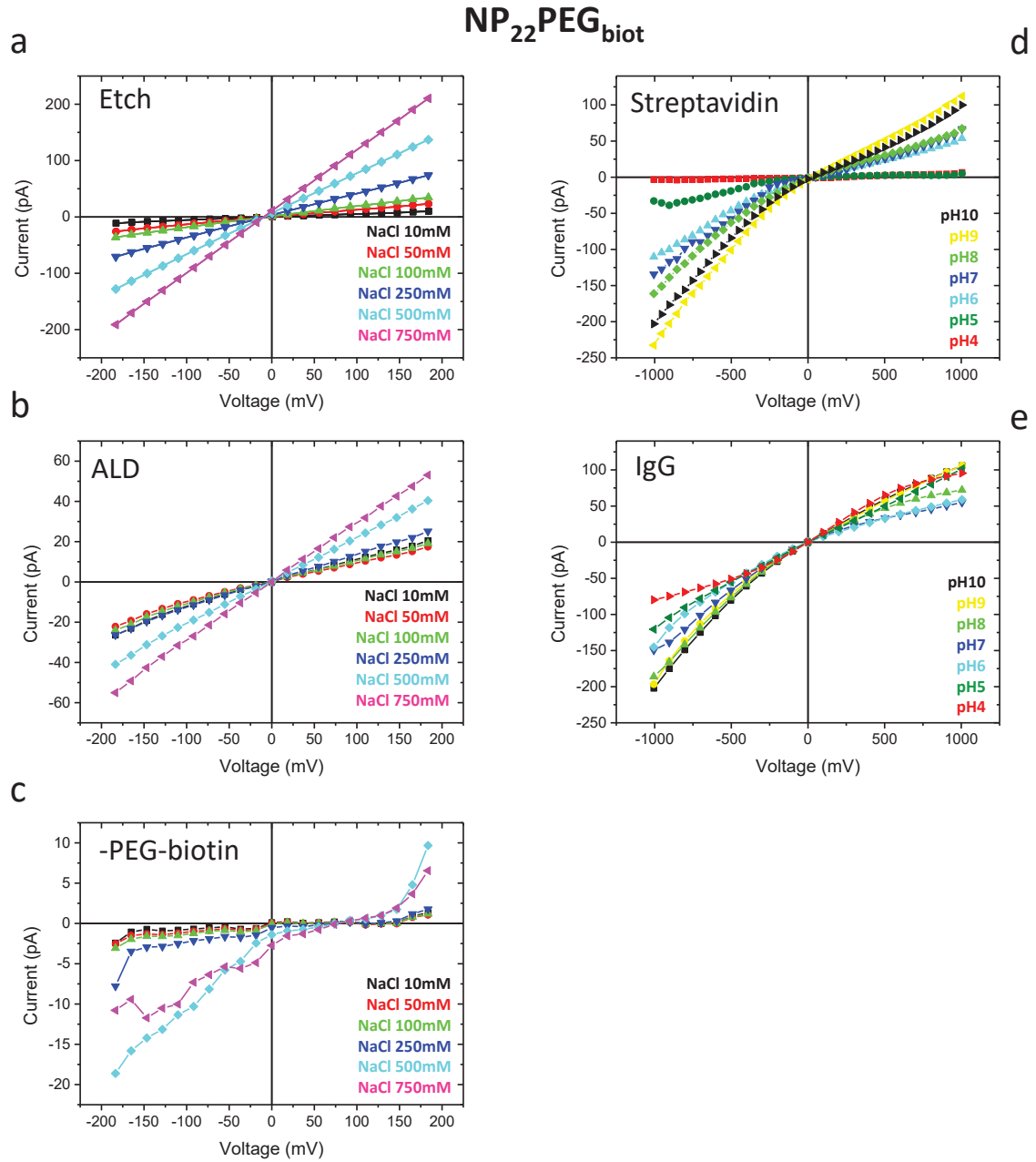


Figure S5 : I-V curves for NP₂₂PEG_{biot}, after the etching process (a), the ALD (b), the grafting of -PEG-biotin chains (c) at different concentrations. I-V curves, after grafting of the streptavidins (d), IgG (e), at different pHs and NaCl 100 mM

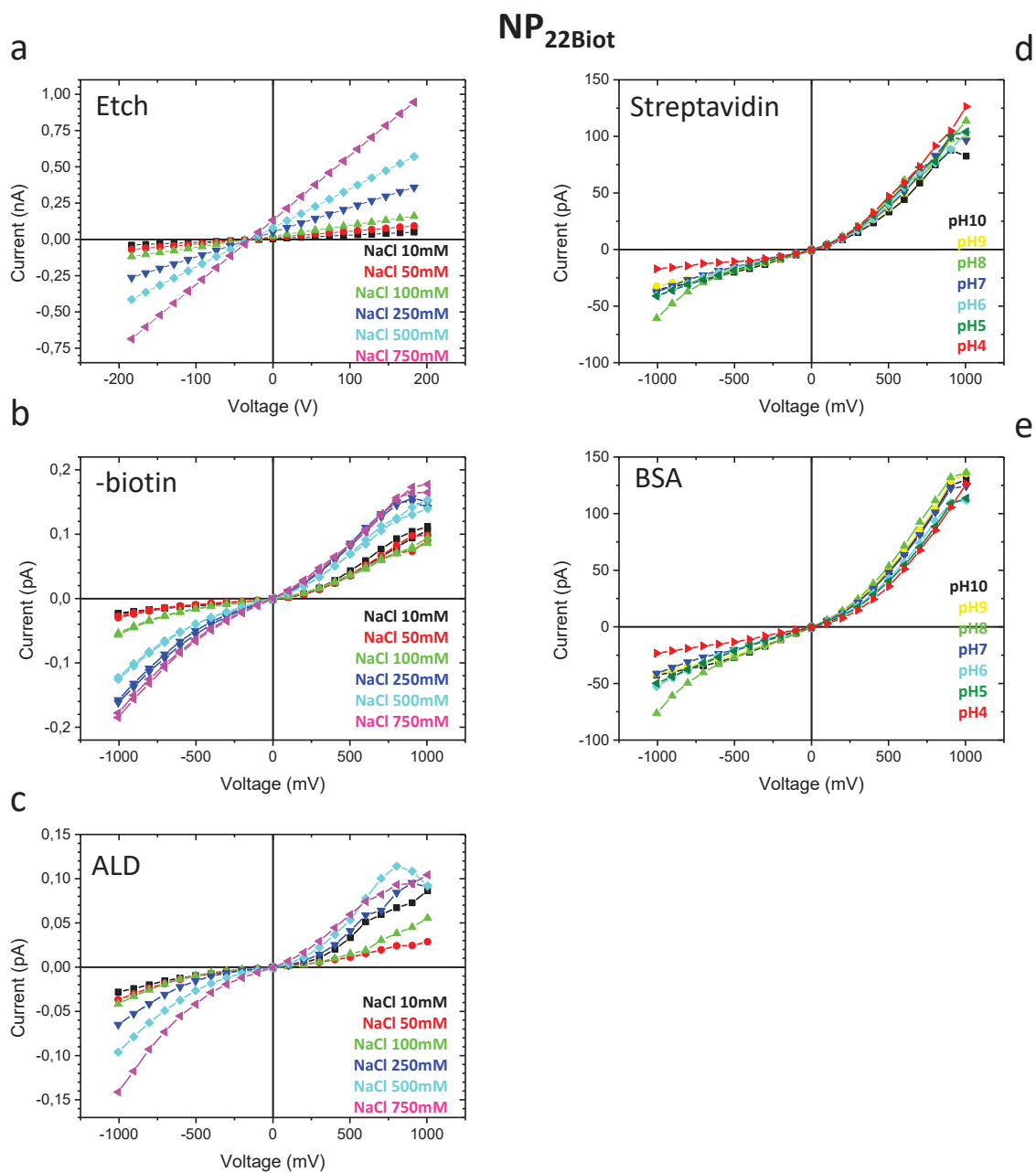


Figure S6 : I-V curves for NP₂₂Biot, after the etching process (a), the ALD (b), the grafting of -biotin chains (c) at different concentrations. I-V curves, after grafting of the streptavidins (d), BSA (e), at different pHs and NaCl 100 mM

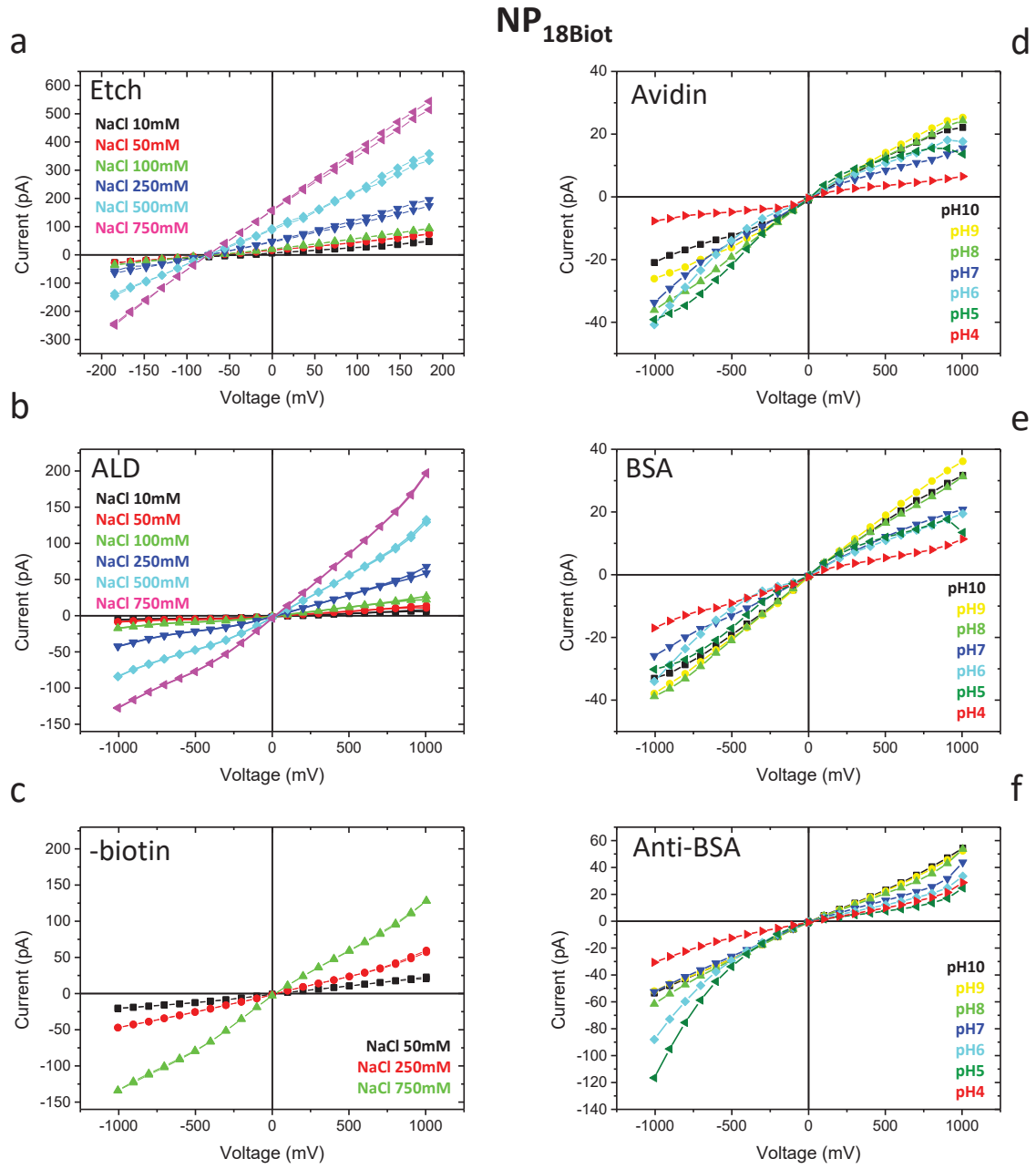


Figure S7 : I-V curves for NP₁₈Biot, after the etching process (a), the ALD (b), the grafting of -biotin chains (c) at different concentrations. I-V curves, after grafting of the avidins (d), BSA (e), and anti-BSA (f) at different pHs and NaCl 100mM

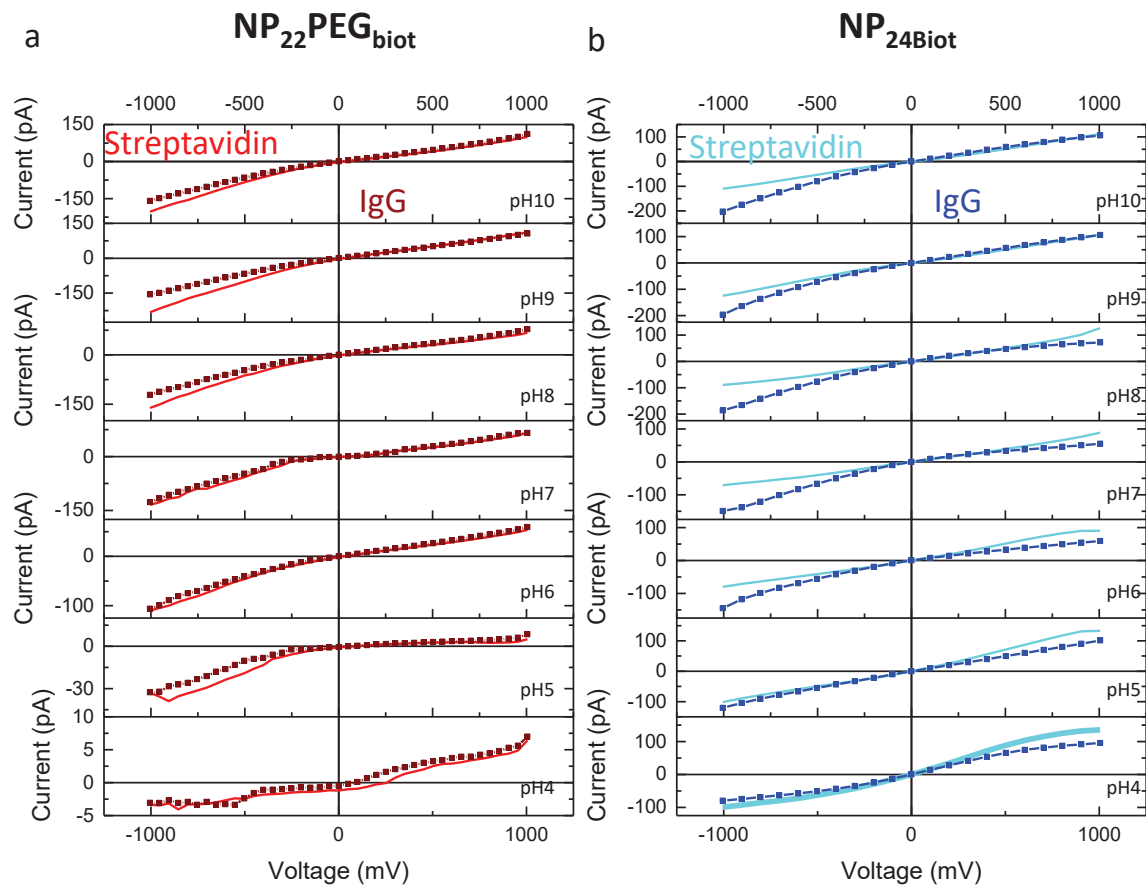


Figure S8 : I-V curves, (a) for NP₂₂PEG_{biot} after grafting of the Streptavidins (red), IgG (wine), and (b) for NP₂₄Biot after grafting of the Streptavidins (cyan), and IgG (blue) at different pHs and NaCl 100 mM

$\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$

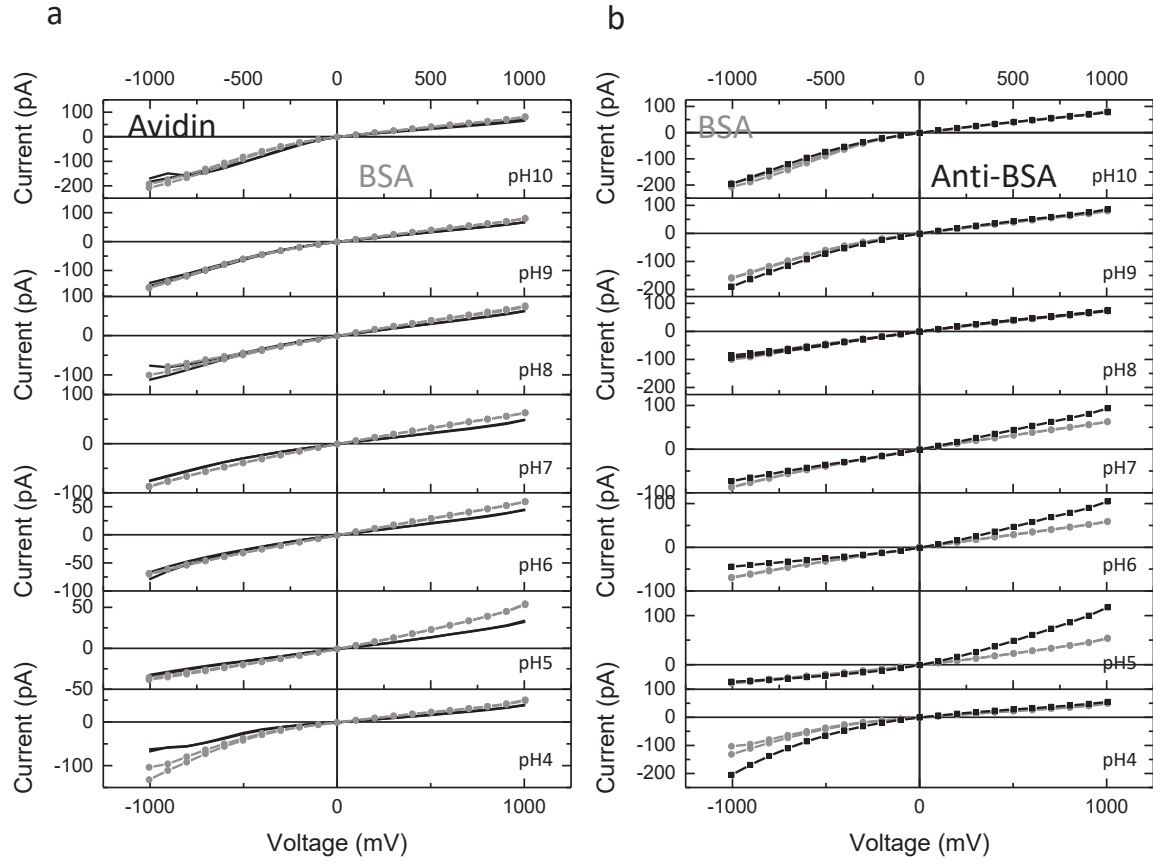


Figure S9 : I-V curves, for $\text{NP}_{26}\text{PEG}_{\text{biot}}$ after grafting of (a) the avidins (black), BSA (grey), and (b) the BSA (grey), anti-BSA (black) at different pHs and NaCl 100 mM

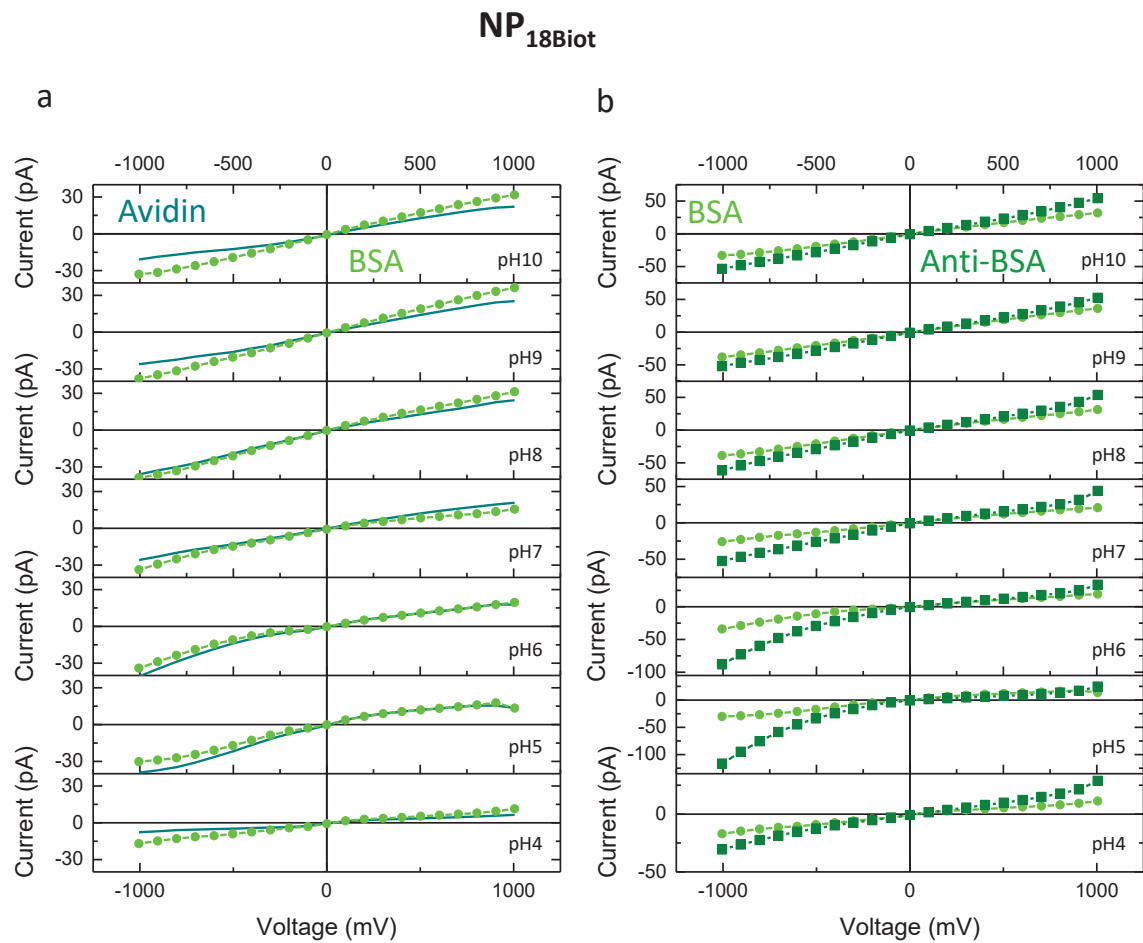


Figure S10 : I-V curves, for NP₁₈Biot after grafting of (a) the avidins (blue), BSA (green), and (b) the BSA (green), anti-BSA (olive) at different pHs and NaCl 100 mM

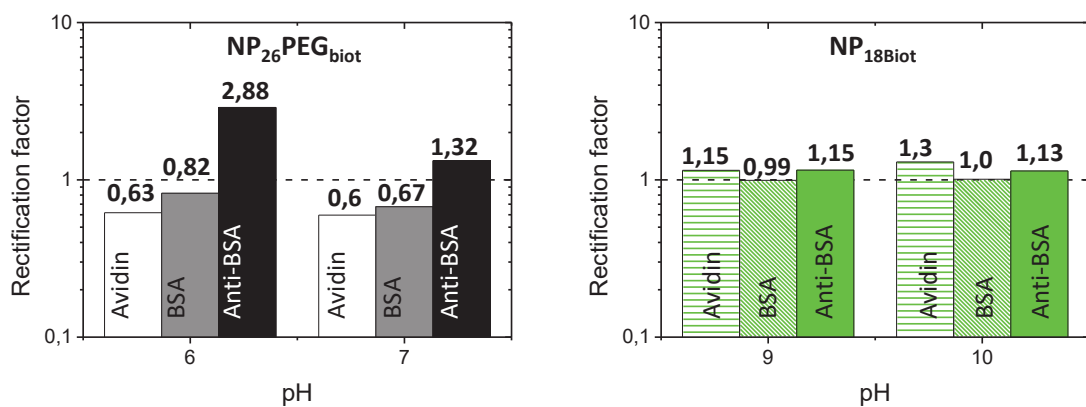


Figure S11: Comparison of the rectification factor as a function of the pH, between different pores after Avidin, BSA and anti-BSA insertion at NaCl 100 mM, black: NP₂₆PEG_{biot}, contains long -biotin-PEG chains and avidin, green: NP₁₈biot, contains short -biotin spacers and avidin.

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 32228

Fast and reversible functionalization of a single nanopore based on layer-by-layer polyelectrolyte self-assembly for tuning current rectification and designing sensors†

Mathilde Lepoitevin,^a Bastien Jamilloux,^a Mikhael Bechelany,^a Emmanuel Balanzat,^b Jean-Marc Janot^a and Sebastien Balme^{*a}

Single track-etched nanopores offer an opportunity to develop different nano-devices such as, ionic diodes or biosensors. Here we report an original approach to functionalize conical nanopores based on layer-by-layer self-assembly of poly-L-lysine and poly(styrene sulfonate). Our results show the possibility to modulate the current rectification properties and to reduce the tip diameter of the nanopore. This strategy permits a fast (less than 1 minute) and reversible functionalization of the nanopore. Based on this, we demonstrate applications in order to detect differences in polyanion (poly(styrene sulfonate), chondroitin sulfate and ssDNA) and avidin using PLL grafted with specific functions (mPEG-biotin).

Received 9th February 2016

Accepted 16th March 2016

DOI: 10.1039/c6ra03698h

www.rsc.org/advances

Introduction

Single solid state nanopore technology offers an opportunity to develop different nano-devices such as, ionic diodes^{1–3} or biosensors.^{4–8} This technology is directly inspired by biological nanopores such as α -hemolysin and its analogues^{9–12} as well as ion channels.¹³ Compared to biological nanopores, solid-state ones can be considered for a larger range of applications due to their long lifetime. Apart from nanopores drilled in an SiN thin layer, which are the most promising for single macromolecule detection, especially DNA,¹⁴ ones obtained by the track-etching technique are particularly interesting for mimicking ion channels or ligand-gate response.⁷ Indeed, they can be produced in different polymer materials (polyethylene terephthalate (PET), polycarbonate (PC), polyimide (PI), Kapton and polytetrafluoroethylene (PTFE)). Regarding the chemical etching conditions, nanopores can be obtained with different shapes such as conical or cylindrical.¹⁵ Conically shaped nanopores are particularly interesting since the current–voltage (I – V) curve exhibits a more or less important current rectification.^{2,16–21} This “ionic diode” effect is dependent on the nanopore tip diameter^{22,23} and on the density of surface charges.^{24,25} Typically for PET, the surface charges are induced by –COOH groups negatively charged at a pH higher than 3.5. In this case,

the ionic transport through the nanopore is lowered when a positive voltage is applied to its base side. In order to tune the ion current rectification, nanopores were chemically functionalized. The grafting of amine groups allows the current rectification to inverse, by changing the surface charges. To do this, different strategies were considered. As an example, functionalization using an electrostatic interaction was reported for the surfactant CTAB.²⁶ The most used method, involves the activation of –COOH groups by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. This has been employed to graft ethylene diamine,^{2,19,27} amine-terminated polymer brushes²⁸ or polyimide.²⁹ These experiments require from several hours to one day, depending on whether the functionalization is expected only at the entrance or along the nanopore. Based on this concept, several examples of sensors^{30–33} or nanovalves^{34–36} were reported. However, the main problem of chemical functionalization is their non-reversibility. Thus, a conical nanopore can be used only once as a sensor and an “*in situ*” modulation of ionic transport properties during an experiment cannot be considered. This substantially limits the interest of these nanopores for sensing applications.

By using the electrostatic interactions of the carboxyl groups on the nanopore surface wall with amine groups of polycations such as, poly(allylamine) or poly-L-lysine, a reversible functionalization can be considered. The deposition, layer-by-layer (LBL) of polyelectrolytes is commonly used to modify surface properties of membranes^{37,38} as well as nanoparticles.³⁹ For single nanopores only LBL of poly(allylamine) (PAH) and poly(styrene sulfonate) (PSS) have been reported.⁴⁰ However, this concept can be extended (i) to modulate “*in situ*” the ionic transport

^aInstitut Européen des Membranes, UMR5635 UM ENSM CNRS, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^bCentre de recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique, UMR6252 CEA-CNRS-ENSICAEN, 6 Boulevard du Maréchal Juin, 14050 Caen Cedex 4, France. E-mail: sebastien.balme@umontpellier.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available: Additional current–voltage response. See DOI: 10.1039/c6ra03698h

properties and (ii) to perform reversible functionalization of the nanopore.

This work aims to propose a fast and reversible functionalization of single nanopores which allows a change to its ionic transport properties. To do it, we considered PET conical nanopore functionalization with poly-L-lysine (PLL) and poly(styrene sulfonate) (PSS). PLL was chosen since it is a weak polycation which is partially charged at neutral pH.⁴¹ We have studied, first, PLL and PLL/PSS LBL adsorption onto a nanopore, and their influence on its ionic transport properties as well as the reversibility of the functionalization. Then PLL and PLL-*g*-PEG-biotin adsorption was also investigated in order to apply this concept in nanopore sensing.

Material and methods

Material

Poly(ethylene terephthalate) (PET) film (thickness 13 μm , biaxial orientation) was purchased from Goodfellow (ES301061). Sodium chloride (S9888), sodium hydroxide (30603), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (E5513), poly-L-lysine hydrobromide (PLL) M_w 30–70 kD (P2636), poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS) M_w 70 kD (243051) poly(ethylene glycol) (*N*-hydroxysuccinimide 5-pentanoate) ether 2-(biotinylamino)ethane (NHS-mPEG-biotin) $M_n = 3800 \text{ g mol}^{-1}$ (757799), avidin from egg white (A9275), sodium tetraborate (221732), trizma hydrochloride (T3253) and CAPS (C2632) were purchased from Sigma-Aldrich. Potassium chloride (POCL-00A) was purchased from LabKem. Ultra-pure water was produced from a Q-grad®-1 Milli-Q system (Millipore). Succinimidyl mPEG (NHS-mPEG) $M_n = 2000 \text{ g mol}^{-1}$ (PG1-SC-2k-1) was purchased from Tebu bio.

Preparation of buffer and polyelectrolyte solutions

The solutions for the pH response measurements were made as follows: the buffer solution of pH 8 used for polyelectrolyte adsorption, to rinse and for *I*-*V* measurements contains NaCl 100 mM, Tris 5 mM and EDTA 1 mM pH 8. The buffer solution of pH 12 used for PLL and PLL/PSS bilayer desorption contains KCl 100 mM and CAPS 10 mM. The final pH of the solutions was adjusted with HCl and NaOH solutions using a pH meter (Hanna HI 221 pH meter, pH electrode HI 1131). PLL and PSS stock solutions were obtained by direct dissolution in water with a final concentration of 1 mg mL⁻¹.

PLL-*g*-[(mPEG)12x-(PEG-biotin)x] synthesis

The synthesis of grafted copolymer PLL-*g*-[(mPEG)12x-(PEG-biotin)x] was adapted from the protocol described by Elbert and Hubbel.⁴² PLL (40 mg mL⁻¹) was dissolved in sodium tetraborate buffer (50 mM pH 8.5). The solution was filtered and sterilized. Then the solution was directly added to solid NHS-mPEG and NHS-PEG-biotin (12 : 1). The mixture was stirred for 6 h at room temperature. Then the unreactive polymers were removed by dialysis against 1 L (24 h) buffer NaCl 100 mM, Tris 5 mM and EDTA 1 mM pH 8 and stored at -20 °C.

Current-voltage measurements

Electrical measurements were performed using a patch-clamp amplifier (EPC10 HEKA electronics, Germany). The current is measured by Ag/AgCl, 1 M KCl electrodes connected to the cell chamber by agar-agar bridges. A single nanopore was mounted in Teflon cell containing an electrolyte solution. One electrode was plugged to the working end of the amplifier (*trans* chamber, base) and the other electrode connected to the ground (*cis* chamber, tip). For *I*-*V* curves, trace currents were recorded as a function of time under ramp voltages from -1 V to 1 V (60 s). All current traces were recorded at a frequency of 20 kHz.

Track-etching nanopores and characterization

Single tracks were produced by Xe irradiation (8.98 MeV u⁻¹) of PET film (13 μm) (GANIL, SME line, Caen, France). Activation of the track was performed by UV exposition for 24 h per side, (Fisher bioblock; VL215.MC, $\lambda = 312 \text{ nm}$) before the chemical etching process. The etching of the conical nanopore was performed under dissymmetric conditions. The PET foil is mounted in a chemical cell in Teflon. On one side of the cell, there is the etchant solution (9 M NaOH), and on the other side the stopping solution (1 M KCl and 1 M of acetic acid). The time is recorded as soon as the etching solution is inserted. A 1 V potential is applied across the membrane, the reference electrode is in the stopping solution and the working electrode in the etchant solution. When the current rises, there is a breakthrough. When it reaches hundreds of pA, the etching process is stopped, and the NaOH solution is replaced by the stopping one.

The tip diameter d_t of the conical nanopore was obtained from the dependence of the conductance G measured in the linear zone of the *I*-*V* curve using eqn (1):

$$G = \kappa \pi d_b d_t / L \quad (1)$$

where κ is the ionic conductivity of the solution, L is the nanopore length (13 μm) and d_b is calculated from the total etching time t using the relationship $d_b = 2.5t$ (the factor 2.5 was determined in our experimental set up using multipore track-etched membranes).

Results and discussion

Single nanopores were fabricated by a track-etching method on PET film. In order to obtain a conical shape, the etching was performed under dissymmetrical conditions. The nanopores used for this study have a tip diameter (d_t) around $11 \pm 2 \text{ nm}$

Table 1 Diameters of conical nanopores

Nanopore	Tip (nm)	Base (nm)
NP-1	10	525
NP-2	12.3	323
NP-3	13.5	570
NP-4	10.2	650

(Table 1). After chemical etching, PET nanopores exhibit a negative surface charge due to carboxylate groups. Thus, I - V curves recorded at pH 8 (NaCl 500 mM, Tris 5 mM, and EDTA 1 mM) exhibit a current rectification. The latter can be quantified by a rectification factor (f_{rec}) calculated from $|I_{(-1 \text{ V})}|/|I_{(1 \text{ V})}|$. According to our experimental conditions, for a negatively charged nanopore, the rectification factor is greater than 1 (Fig. 1 and SI-1†). This current rectification has been interpreted by the formation of the depletion zone inside the nanopore.²⁴ It depends on the nanopore properties such as the surface charge density and the opening angle as well as the salt concentration.

The nanopore functionalization was performed by adding 16 μL of PLL solution (1 mg mL^{-1}) directly on the tip side of the cell chamber containing 1.6 mL of buffer solution at pH 8 (NaCl 500 mM, Tris 5 mM, and EDTA 1 mM) (Fig. 1a). A voltage of -1 V was applied in order to favor the PLL entrance and to monitor the current during the functionalization. Indeed, since the current rectification is strongly dependent on both the nanopore surface charge and angle, it becomes possible to characterize the PLL adsorption on the nanopore during the functionalization process. For all the nanopores, a decrease of the current is observed for a time between 35 to 60 seconds after the PLL addition at the tip side (Fig. 1b). This time does not seem particularly dependent on the nanopore tip diameter. After the current stabilization, typically 2 minutes after the PLL addition, the cell is rinsed with the buffer solution at pH 8 to remove the excess of PLL. The I - V curve exhibits an inversion of current rectification for all nanopores with $f_{\text{rec}} < 1$ (Fig. 1c and SI-1†). This inversion of current rectification indicates a surface charge inversion of the nanopore induced by the PLL adsorption. Basically, it comes from an excess of positive charges from the PLL which blocks the cation transport under a negative

voltage. Regarding the short time required to obtain the inversion of the current rectification, we cannot consider full functionalization along the nanopore length. Thus, the PLL should be located only at the nanopore entrance. Indeed, the inversion of the current rectification is also observed even if the amine groups are located only at the nanopore entrance.²⁹ Interestingly, the current at positive voltage is not strongly impacted by the PLL addition as opposed to the negative voltage. This can be assigned to the functionalization of only the nanopore entrance. Moreover, it has been shown that a bipolar nanopore induces a higher rectification degree compared to a unipolar nanopore with similar surface charge densities on the pore walls.¹⁸

Since PLL is a weak polyelectrolyte, we have attempted to remove it by breaking its electrostatic interactions with the nanopore. In order to do that, the buffer solution at pH 8 was replaced by a buffer solution at pH 12 (KCl 100 mM, and CAPS 10 mM). After 5 min, the cell was rinsed and filled with the buffer solution at pH 8. The I - V curve recorded after the desorption process is similar to the one before PLL adsorption. In order to evaluate the reversibility of PLL functionalization, the adsorption/desorption cycle was repeated 9 times on the same nanopore. The I - V curves are recorded after each cycle with and without PLL (Fig. SI-2†). The results show that the number of cycles does not have a strong influence on the ionic transport properties. Indeed, the rectification factors are between 0.17 ± 0.4 and 4.8 ± 1.2 after PLL adsorption and desorption respectively (Fig. 1d). The nanopore conductivity after PLL desorption is also constant $4.6 \pm 0.6 \text{ nS}$ (Fig. 1e). This means that the nanopore is not clogging during the adsorption/desorption process due to the PLL which stays at the nanopore entrance. Thus at this stage we have proven that PLL adsorption is suitable as a reversible method to modify the ionic transport properties of nanopores.

To go further in our investigation, a second functionalization with PSS after PLL adsorption was considered. Basically, we proceeded as follows: after PLL adsorption and rinse, 16 μL PSS (1 mg mL^{-1}) was added directly to the tip side under 1 V . A voltage is applied to facilitate the polymer entrance in the nanopore. The current trace (Fig. 2) shows a decrease of current after several seconds (typically from 15 s to 60 s). This current decrease suggests the adsorption of negatively charged PSS onto positively charged PLL. After 2 minutes, when the current is stable, the cell is rinsed with buffer solution (pH 8) to remove the excess of PSS. The I - V curves recorded after PSS adsorption exhibit an inversion of the current rectification. The latter increases from 0.5 to 4 and from 0.3 to 3 for the nanopores reported in Fig. 2. Interestingly, the current rectification is more pronounced after PSS addition (3 and 6 for NP-3 and NP-2) than for the raw nanopore (1.5 and 3). This result suggests the successful adsorption of PSS on the PLL layer. The difference in rectification factor can be assigned to the different charge densities of the PSS layer and PET.

In order to confirm the PSS loading as well as to evaluate the reversibility of PLL/PSS bilayer adsorption, the cell was filled with buffer solution at pH 12 for 3 minutes. Then, it was rinsed with buffer solution at pH 8. In the example in Fig. SI-3,† the I - V

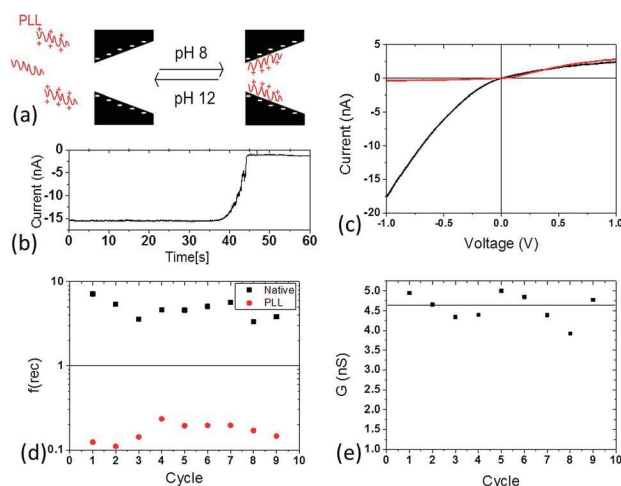


Fig. 1 PLL adsorption on the conical nanopore NP-1: (a) illustration of the experimental protocol, (b) typical current trace recorded during PLL loading at pH 8, NaCl 500 mM, Tris 5 mM, and EDTA 1 mM, -1 V (here for NP-1). (c) I - V curve, before (black) and after PLL (red) loading. Evolution of the rectification factor (with PLL red circle, without PLL black square) (d) and conductance (e) for each cycle of PLL adsorption/desorption. The conductance was measured after PLL removal, on the linear zone of the I - V curve (between -75 mV to 75 mV).

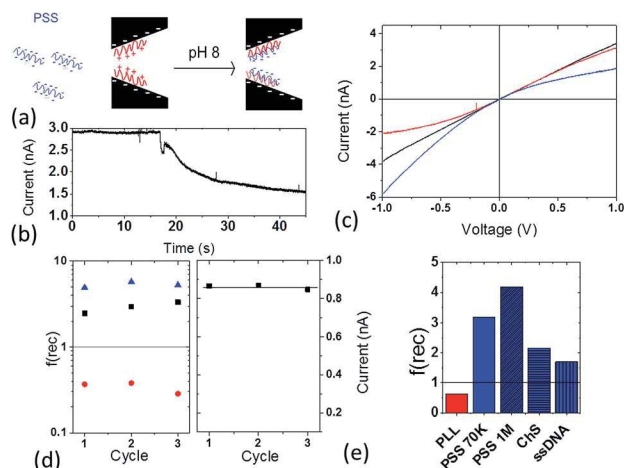


Fig. 2 PLL-PSS bilayer adsorption on NP3 (a) illustration of the experimental protocol, (b) a typical current trace recorded during the PSS loading at pH 8; NaCl 500 mM; Tris 5 mM; EDTA 1 mM, and 1 V (c) I - V curves before (black), after PLL (red) and after PSS (blue) insertion, for NP-3. (d) Reversibility of PLL-PSS functionalization for NP-2 (from I - V curves Fig. S1-3†), evolution of the rectification factor (without PLL/PSS black square, with PLL red circle, with PLL/PSS bilayer blue triangle) and conductance for each cycle of PLL/PSS adsorption/desorption (the conductance was measured after the PLL/PSS removal on a linear zone of the I - V curve between -75 mV to 75 mV). (e) Rectification factor obtained after polyanion loading (NP-2).

curves for 3 cycles of PLL/PSS bilayer adsorption/desorption after each step (PLL adsorption, PSS adsorption and PLL/PSS desorption) are reported. First of all, we observe that after treatment at pH 12, the I - V curve is similar to the one before PLL/PSS adsorption. Thus, this result indicates the reversibility of PLL/PSS bilayer adsorption. In addition, the conductance after each PLL/PSS bilayer adsorption/desorption cycle is constant (Fig. 2). This shows that the diameter at the nanopore entrance is not modified by successive cycles of PLL/PSS bilayer adsorption/desorption. In addition the results show quasi-constant values of f_{rec} at each step: 0.4 ± 0.1 after PLL adsorption, 4 ± 0.2 after PSS adsorption and 3 ± 0.2 after rinse at pH 12 (Fig. 2). This suggests that the adsorption process of PLL and PSS is not affected by the previous PLL/PSS bilayer, and thus confirms the complete reversibility of the functionalization. To go further in our investigation and demonstrate the potentialities of this strategy of functionalization, we have considered sensing applications. Similar experiments were conducted with different polyanions (PSS $M_n = 70$ kD and 1000 kD, chondroitin sulfate and ssDNA) using the same nanopore after PLL adsorption. As expected, when polyanions were added, the rectification factors show a charge inversion of the nanopore. More interestingly the f_{rec} value (Fig. 2e) is dependent on the nature of the polyanion or on its molecular weight for PSS. Thus nanopores decorated with PLL could be used for polyanion detection as well as to modulate the current rectification properties.

Since the formation of one PLL/PSS bilayer inside a nanopore is now proved, multilayer functionalization of nanopores was considered. Starting from a nanopore with a $d_{\text{tip}} = 10$ nm

and $d_{\text{base}} = 650$ nm, PLL and PSS were alternatively introduced in the nanopore. At each step the I - V dependence was recorded at pH 8 after rinsing to remove the excess of polyelectrolytes. The current rectification and the conductance G , extracted from the I - V linear part (-0.1 V to 0.1 V) are reported in Fig. 3. As expected the current rectification is inverted with each adsorbed layer of PLL and PSS. The decrease of conductance indicates a decrease of the tip nanopore diameter induced by successive PLL-PSS bilayer adsorption. Another interesting point is the evolution of the current rectification with the number of layers. Indeed it decreases after PSS and PLL adsorption. This means that the density of the negatively charged surface of the nanopore, after PSS adsorption, decreases as opposed to the density of the positively charged surface after PLL adsorption. Thus using this method to design conical nanopores can be considered since it is possible to modify the tip diameter as well as the density of the surface charges of the nanopore. More generally, both LBL growth and the surface charge depend on the organization of polyelectrolytes (coil or linear). This parameter is connected with the strength of the polyelectrolyte, the concentration and the salt used during the adsorption process, the pH or the temperature.⁴³ However, the diameter size after LBL functionalization cannot be deduced from the conductance since it requires knowing the surface charge of the nanopore as well as the ionic transport inside the LBL.

Beside the modulation of the ionic diode properties and the detection of polyanions, we have considered a functionalization of the nanopore using PLL grafted with a specific function (mPEG-biotin) in order to detect avidin. This system was chosen as a proof of concept since it is a base for developing many kinds of biosensors. The nanopore functionalization was performed by adding PLL-g-[(mPEG)12x-(PEG-biotin)x] (denoted PLL-g-mPEG-biotin) in the tip side of the nanopore under a voltage of 1 V (10 minutes). The I - V curve shows a decrease of both the current rectification, 0.89 (1.8 for raw nanopore) and

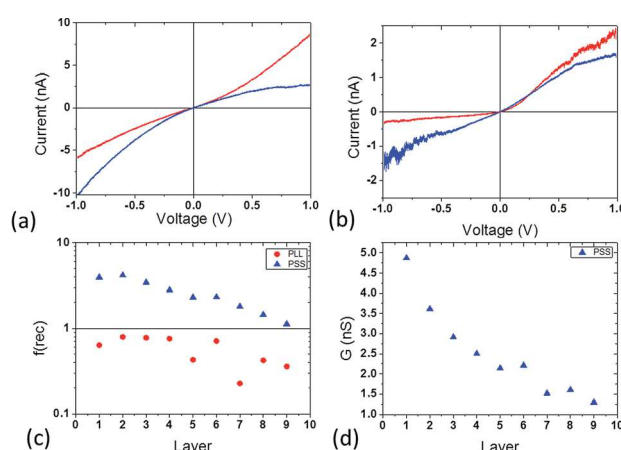


Fig. 3 LBL PLL/PSS deposition on NP-4. I - V curve after PLL (red) and PSS (blue) loading (a) (PLL/PSS)1 and (b) (PLL/PSS)8. Evolution of the factor of rectification (after PLL red circle and after PSS blue triangle) (c) and conductance (d) for each layer of PLL/PSS. The conductance was measured after PSS addition on linear zone of the I - V curve (between -75 mV to 75 mV).

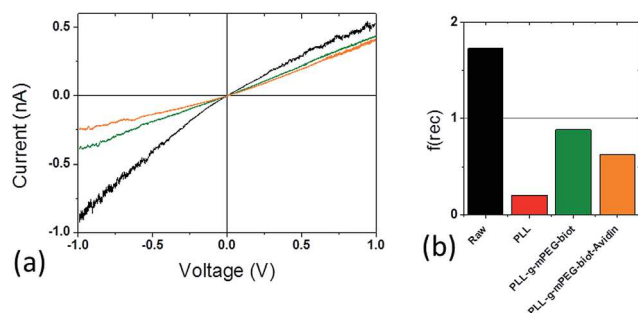


Fig. 4 PLL-g-PEG-biotin functionalization of NP-2 and avidin sensing (a) I - V curve (pH 8; NaCl 500 mM; Tris 5 mM; EDTA 1 mM) before (black), after PLL-g-PEG-biotin (green) and after avidin (orange). (b) Rectification factor obtained for raw nanopore (black), after functionalization by PLL adsorption (red) or PLL-g-PEG-biotin (green) and avidin addition (orange).

the conductance due to the steric volume of PEG (Fig. 4). In addition the current rectification for PLL-g-mPEG-biotin is less pronounced than for PLL. This is correlated with a lower surface charge of PLL-g-mPEG-biotin due to the mPEG-biotin grafting. After that, 16 μL avidin (1 mg mL^{-1}) is added on the tip side under a voltage of -200 mV for 6 minutes. After rinsing, the I - V curve (Fig. SI-5†) exhibits a decrease of both conductance and current rectification (0.6). The latter can be interpreted by an increase of positive surface charge at the nanopore entrance provided by the global positive charge of avidin at pH 8. The functionalization of the nanopore is removed by rinsing it with a solution at pH 12, and the nanopore can be functionalized again.

Conclusions

To sum up, we have demonstrated that PLL is suitable to tune a nanopore, since this functionalization: (i) requires a simple addition of polyelectrolyte on the tip side of the cell and the functionalization is achieved after less than a minute (ii) it can be monitored to control if the functionalization is achieved, and (iii) it is totally reversible at pH 12 without alteration of the nanopore. We have also shown that PLL and PLL/PSS LBL are suitable to modulate the ionic selectivity of a conical nanopore. In addition PLL and PLL-g-PEG-biotin can be used also to design sensors where the nanopore could be re-used. We expect that the polyelectrolyte adsorption onto an asymmetric nanopore can lead to a large variety of new switchable nanofluidic diodes with further applications in different technological areas such as biosensing, or drug delivery. Finally, the advantage of track-etched nanopores is easy upscaling to multipore membranes. Thus, it becomes possible to extend this method in order to design large surface membranes for ionic separation or biosensing.

Acknowledgements

M. Lepoitevin has a PhD fellowship from the French government. This work was supported in part by European Institute of

Membrane in health project (PS2-2014) and by the French Research Program ANR-BLANC, Project TRANSION (ANR-2012-BS08-0023). Single tracks have been produced in GANIL.

Notes and references

- 1 Z. Siwy, E. Heins, C. C. Harrell, P. Kohli and C. R. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10850–10851.
- 2 I. Vlassioug and Z. S. Siwy, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 552–556.
- 3 Z. S. Siwy and S. Howorka, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1115–1132.
- 4 S. Howorka and Z. Siwy, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2360–2384.
- 5 D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. H. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggins and J. A. Schloss, *Nat. Biotechnol.*, 2008, **26**, 1146–1153.
- 6 M. Wanunu, *Phys. Life Rev.*, 2012, **9**, 125–158.
- 7 M. Lepoitevin, M. Bechelany, J. M. Janot and S. Balme, *Sci. Lett. J.*, 2015, **4**, 188.
- 8 S. Cabello-Aguilar, A. Abou-Chaaya, M. Bechelany, C. Pochat-Bohatier, E. Balanzat, J. M. Janot, P. Miele and S. Balme, *Soft Matter*, 2014, **10**, 8413–8419.
- 9 J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton and D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 13770–13773.
- 10 J. Clarke, H. C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid and H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 265–270.
- 11 D. Wendell, P. Jing, J. Geng, V. Subramaniam, T. J. Lee, C. Montemagno and P. X. Guo, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**, 765–772.
- 12 E. A. Manrao, I. M. Derrington, A. H. Laszlo, K. W. Langford, M. K. Hopper, N. Gillgren, M. Pavlenok, M. Niederweis and J. H. Gundlach, *Nat. Biotechnol.*, 2012, **30**, 349–353.
- 13 S. Balme, J. M. Janot, L. Berardo, F. Henn, D. Bonhenry, S. Kraszewski, F. Picaud and C. Ramseyer, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 712–716.
- 14 C. Dekker, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, **2**, 209–215.
- 15 P. Apel, *Radiat. Meas.*, 2001, **34**, 559–566.
- 16 M. Ali, P. Ramirez, S. Mafe, R. Neumann and W. Ensinger, *ACS Nano*, 2009, **3**, 603–608.
- 17 M. Ali, P. Ramirez, H. Q. Nguyen, S. Nasir, J. Cervera, S. Mafe and W. Ensinger, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3631–3640.
- 18 E. B. Kalman, I. Vlassioug and Z. S. Siwy, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 293–297.
- 19 K. P. Singh and M. Kumar, *J. Appl. Phys.*, 2011, **110**, 084322.
- 20 Y. Ai, M. K. Zhang, S. W. Joo, M. A. Cheney and S. Z. Qian, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 3883–3890.
- 21 R. Karnik, C. H. Duan, K. Castelino, H. Daiguji and A. Majumdar, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 547–551.
- 22 P. Y. Apel, I. V. Blonskaya, O. L. Orelovitch, P. Ramirez and B. A. Sartowska, *Nanotechnology*, 2011, **22**, 175302.
- 23 M. L. Kovarik, K. M. Zhou and S. C. Jacobson, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15960–15966.

- 24 D. Constantin and Z. S. Siwy, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2007, **76**, 041202.
- 25 G. Nguyen, I. Vlassiounk and Z. S. Siwy, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 265301.
- 26 L. Wang, Y. Yan, Y. B. Xie, L. Chen, J. M. Xue, S. Yan and Y. G. Wang, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 576–581.
- 27 M. Ali, V. Bayer, B. Schiedt, R. Neumann and W. Ensinger, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 485711.
- 28 S. Nasir, M. Ali and W. Ensinger, *Nanotechnology*, 2012, **23**, 225502.
- 29 M. Ali, B. Schiedt, K. Healy, R. Neumann and A. Ensinger, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 085713.
- 30 M. Ali, S. Nasir, I. Ahmed, L. Fruk and W. Ensinger, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 8770–8772.
- 31 M. Ali, S. Nasir, Q. H. Nguyen, J. K. Sahoo, M. N. Tahir, W. Tremel and W. Ensinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 17307–17314.
- 32 M. Ali, P. Ramirez, M. N. Tahir, S. Mafe, Z. Siwy, R. Neumann, W. Tremel and W. Ensinger, *Nanoscale*, 2011, **3**, 1894–1903.
- 33 M. Ali, B. Schiedt, R. Neumann and W. Ensinger, *Macromol. Biosci.*, 2010, **10**, 28–32.
- 34 A. Alcaraz, P. Ramirez, E. Garcia-Gimenez, M. L. Lopez, A. Andrio and V. M. Aguilera, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 21205–21209.
- 35 S. F. Buchsbaum, G. Nguyen, S. Howorka and Z. S. Siwy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 9902–9905.
- 36 M. Lepoitevin, G. Nguyen, M. Bechelany, E. Balanzat, J. M. Janot and S. Balme, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 5994–5997.
- 37 D. Menne, J. Kamp, J. E. Wong and M. Wessling, *J. Membr. Sci.*, 2016, **499**, 396–405.
- 38 W. Q. Jin, A. Toutianoush and B. Tieke, *Langmuir*, 2003, **19**, 2550–2553.
- 39 Z. H. Lu, M. D. Prouty, Z. H. Guo, V. O. Golub, C. S. S. R. Kumar and Y. M. Lvov, *Langmuir*, 2005, **21**, 2042–2050.
- 40 M. Ali, B. Yameen, J. Cervera, P. Ramirez, R. Neumann, W. Ensinger, W. Knoll and O. Azzaroni, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8338–8348.
- 41 S. E. Burke and C. J. Barrett, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 1773–1783.
- 42 D. L. Elbert and J. A. Hubbell, *Chem. Biol.*, 1998, **5**, 177–183.
- 43 B. Seantier and A. Deratani, in *Ionic interactions in natural and synthetic macromolecules*, ed. A. Ciferri and A. Pecirico, Wiley, Hoboken, New Jersey, 1st edn, 2012.

Annexe 2

Influence of nanopore surface charge and magnesium ion on polyadenosine translocation

This content has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text.

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 128.233.210.97

This content was downloaded on 19/03/2015 at 09:38

Please note that [terms and conditions apply](#).

Influence of nanopore surface charge and magnesium ion on polyadenosine translocation

Mathilde Lepoitevin¹, Pierre Eugène Coulon², Mikhael Bechelany¹,
Julien Cambedouzou³, Jean-Marc Janot¹ and Sebastien Balme¹

¹Institut Européen des Membranes, UMR5635 CNRS-UM2-ENSCM, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

²Laboratoire des Solides Irradiés, École Polytechnique, Route de Saclay, 91128 Palaiseau Cedex, France

³Institut de Chimie Séparative de Marcoule, UMR 5257 CEA/CNRS/ENSCM/Université Montpellier 2, 30207 Bagnols sur Cèze Cedex, France

E-mail: sebastien.balme@univ-montp2.fr

Received 25 October 2014, revised 15 January 2015

Accepted for publication 23 February 2015

Published 18 March 2015



Abstract

We investigate the influence of a nanopore surface state and the addition of Mg^{2+} on polyadenosine translocation. To do so, two kinds of nanopores with a low aspect ratio (diameter $\sim 3\text{--}5\text{ nm}$, length 30 nm) were tailored: the first one with a negative charge surface and the second one uncharged. It was shown that the velocity and the energy barrier strongly depend on the nanopore surface. Typically if the nanopore and polyA exhibit a similar charge, the macromolecule velocity increases and its global energy barrier of entrance in the nanopore decreases, as opposed to the non-charged nanopore. Moreover, the addition of a divalent chelating cation induces an increase of energy barrier of entrance, as expected. However, for a negative nanopore, this effect is counterbalanced by the inversion of the surface charge induced by the adsorption of divalent cations.

Keywords: nanopore, atomic layer deposition, DNA translocation

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

In the last decade, nanopore (NP) technologies have just begun to impact scientific and technological discovery [1–3]. The next major breakthroughs in the development of this technology hinge upon progress made in two parallel avenues of research: (i) the fundamental understanding of the dynamical processes that govern macromolecules translocation through NP and (ii) the availability of methods that allow routine fabrication of nanoscale materials. The understanding of macromolecule translocation requires developing a comprehensive model that accounts, on one hand, for macromolecule hydrodynamics and their interactions with the NP [4] and on the other hand, the influence of small electrolyte flow (typically electro-osmotic flow (EOF) and double layer effect) [5]. There are many aspects of macromolecule translocation through the NP that need to be strongly

explored. The first question concerns the velocity profile of macromolecules. For many applications, it would be advantageous if the macromolecule maintained a constant velocity during the translocation process, since this would simplify the signal analysis [6, 7]. In addition, this question is very closely linked to the resolution of an NP. Presently, solid-state NPs are tens of nanometers thick, limiting the resolution to a minimum of ~ 30 bases [7]. This restricts the resolution of some practical applications, such as DNA sequencing. The second question concerns the entropic energy barrier of the macromolecule entrance inside the NP. Indeed, it has been empirically defined that the electric field in an NP exerts forces of tens of pN on macromolecules [8]. This force seems sufficient to overcome the entropic free-energy barrier associated with (i) the linearizing of the macromolecule, (ii) the interactions with the NP surfaces, and (iii) the EOF [7–12].

Table 1. NPs used in this study.

NP	Initial Pore Diameter (nm)	ALD Layer	Mean Pore Diameter After TMS Grafting (nm)
Native-NP	2.5–3.2	0	
TMS-NP	9.2–10.2	4.46	4.74–5.74

Both macromolecule velocity and the entropic free-energy barrier are strongly linked to the NP properties (aspect ratio, shape, and surface charges) [10, 13]. Indeed, it was shown that the energy barrier of the macromolecule entrance is lower when both the NP and macromolecule (carboxylate modified microspheres) exhibit similar charges, since their diameters are close [14]. To go further in this investigation, we studied the influence of NP surface charge on polynucleotide translocation. To achieve this, we tailored two NPs with diameter close to 3 nm, one negatively charged, and one neutral. Then, we studied the translocation of polydisperse polyA under NaCl concentration 150 mM and 500 mM to show the influence of the electrical double layer on the translocation. We also investigated the influence of Mg^{2+} addition in a polyA solution, as a chelating agent, on the entropic energy barrier of the macromolecule entrance in the NP.

2. Methods section

2.1. Materials

Diethyl zinc (DEZ) ($Zn(CH_2CH_3)_2$, 95% purity, CAS: 557-20-0), trimethylaluminum (TMA) ($Al(CH_3)_3$, 97% purity, CAS: 75-24-1), sodium chloride (S9888), Polyadenylic acid potassium salt noted polyA (P9403) (polydispersity from 600 to 4000 bases), TRIZMA[®] BASE (T-6791) and hexamethyldisilazane (HMDS) (reagent grade, $\geq 99\%$) were purchased from Sigma Aldrich. Potassium chloride was purchased from VWR (26764.298). Deionized water was obtained by Milli-Q system (Millipore). The TetraflowTM flow cell was purchased from NP solutions.

2.2. SiN NP design

SiN membrane window TEM grids (thickness 30 nm, window $50 \times 50 \mu m$) were purchased from Neyco. NPs were drilled by using the electron beam of a TEM JEOL 2010F. Depending on the exposition time and the size of the electron probe (defined by the convergence angle), NPs in the range 2 to 10 nm can be obtained. The initial diameters of the NPs are reported in table 1.

2.3. Tuning the NP diameter using atomic layer deposition (ALD)

The ALD technique allows us to adjust the NP diameter and surface charges. A custom-made ALD setup [15] was used to deposit thin Al_2O_3/ZnO films. The Al_2O_3 films were deposited by alternating exposures of TMA and deionized water

(H_2O) with the following cycle times: 2 s pulse (TMA), 30 s exposure, and 40 s purge with 100 sccm dry argon. A 2 s pulse, 30 s exposure, and 60 s purge with dry argon were used for H_2O . The ZnO films were deposited by alternating exposures of DEZ and deionized water (H_2O) with the following cycle times: 1.5 s pulse (DEZ), 30 s exposure, and 40 s purge. Again a 2 s pulse, 30 s exposure, and 60 s purge with dry argon were used for H_2O . ALD was carried out at 100 °C. These pulses, exposure, and purge times were chosen conservatively to ensure completion of the ALD surface reactions and to prevent mixing of the reactive gases. The growth per cycle was about 2 Å/cycle for Al_2O_3 and 2.1 Å/cycle for ZnO [16, 17]. A sequence of four cycles of Al_2O_3 preceding four cycles of ZnO was used to reduce the pore diameter. After ALD deposition, a 24 h HMDS vapor exposure treatment was performed at room temperature to create a hydrophobic pore surface with a $-Si(CH_3)_3$ bonds (TriMethyl Silane (TMS)), leading to a neutrally charged surface. Thus we obtained two pores of around 3–4 nm (allowing in theory only the translocation of linear polymers) with two different surface charges states at pH 8: one neutral (TMS-NP) and one negative (native-NP according to [10]). The bilayer thickness was measured by small angle x-ray scattering (SAXS) using a setup operating in transmission geometry, and involving a molybdenum anode associated to a multishell mirror (Xenocs) delivering a beam of 0.71 nm wavelength. AFM measurements (AFM NANOMAN 5 from Veeco instrument controlled with a Nanoscope V software) were performed in order to obtain the roughness of the surface.

2.4. Ion current recordings and polynucleotides translocations

A single NP was mounted in a TetraflowTM cell containing a buffer solution (S1: 150 mM NaCl, 1 mM KCl, and 10 mM of TRIS at pH ~ 8 and $\sigma \sim 1.5 \text{ mS cm}^{-1}$, or S2: 500 mM NaCl, 0.5 mM KCl, and 5 mM of tris at pH ~ 8 and $\sigma \sim 4.5 \text{ mS cm}^{-1}$). The current was measured by two Ag/AgCl 1M KCl electrodes isolated from the solution by agar salt bridge. One electrode was plugged to the positive end of the amplifier (trans-chamber) and the other electrode connected to the ground (cis chamber). PolyA translocations through both SiN NPs, native or, reduced by ALD and coated by TMS, were completed as follows. A solution of polyA, under the same buffer as the one in measurement cell, were added to a solution in the cis chamber to reach concentration $C = 5 \cdot 10^{-12} \text{ mg mL}^{-1}$. Positive potentials (+1000, 800, 600 mV) were then applied to the trans-chamber. Ion current was recorded by a patch-clamp post amplifier (EPC10, HEKA Electronics, Germany) at a sampling frequency 200 kHz. The data acquisition was performed by an Instrutech LIH 8+8

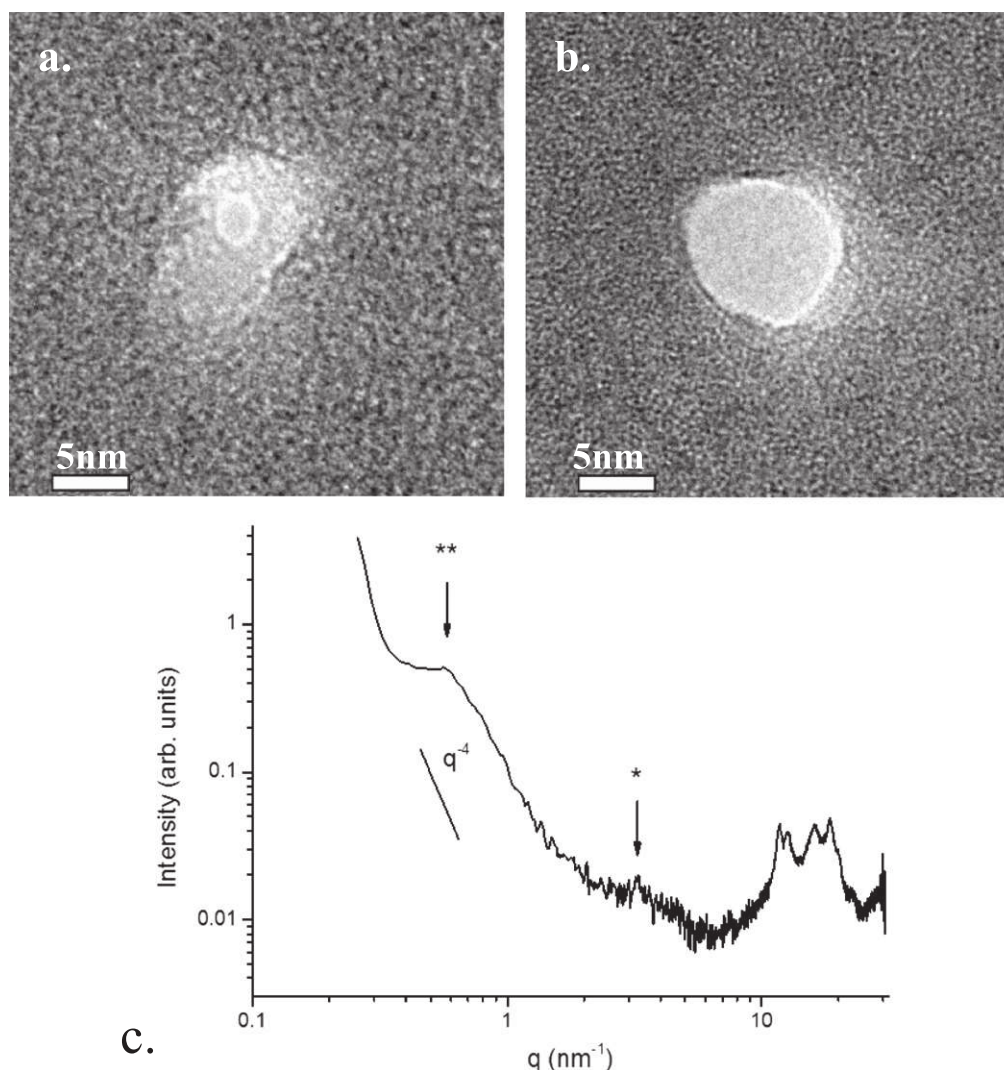


Figure 1. TEM images of SiN NP after drilling (a) native-NP and (b) TMS-NP before reduction. (c) SAXS profile of a sample with 30 bilayers deposited by ALD (four cycles of Al_2O_3 followed by four cycles of ZnO) on a PET multipores membrane.

acquisition card using patch master software (HEKA Electronics, Germany). A lab-made analyzing software (Matlab, Matworks, USA) was used for the data analysis of the dwell time (Δt) and the difference of current intensity (ΔI). Typically our software detects each current event using the derivative method. The events are considered when the current increase is higher 5 pA and the time is longer than 20 μs . For each event, we report the duration Δt and intensity ΔI . The frequency is obtained by the number of events during an experiment.

3. Results and discussion

3.1. NP design and characterization

Two NPs with low aspect ratio were tailored by electron-beam-induced drilling on a silicon nitride (SiN) window (length $L=30$ nm) by TEM. The NP diameters (D) were inspected during fabrication by TEM (figure 1). Note that due to heat diffusion during the electron drilling, the membrane

located around the NP has also been thinned. Typically, SiN thicknesses of few nanometers can be observed. The first NP (native-NP) was used directly after the drilling (2 min) with the following properties (i) a 2.5–3.2 nm diameter, (ii) a hydrophilic surface state, and (iii) a negative surface charge. The second one (TMS-NP) was obtained using the same drilling method (5 min). The initial diameter (9.2–10.2 nm) was reduced by ALD of $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ homogeneous bilayers and TMS treatment. A single NP cannot be characterized by TEM after ALD because it is difficult to localize on the TEM grid.

Thus the only way to know the final size of the pore is to perfectly control the growth of the ALD layers. SAXS experiments were performed to measure the growth rate per cycle of the layers. A bilayer thickness of 1.93 nm determined by SAXS measurement has been obtained inside the NPs for $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminates. Figure 1(c) shows the SAXS measurement performed on 30 sequences of four cycles $\text{Al}_2\text{O}_3/4$ cycles ZnO on a PET track etched membrane with a pore diameter of 200 nm. The SAXS profile presents three

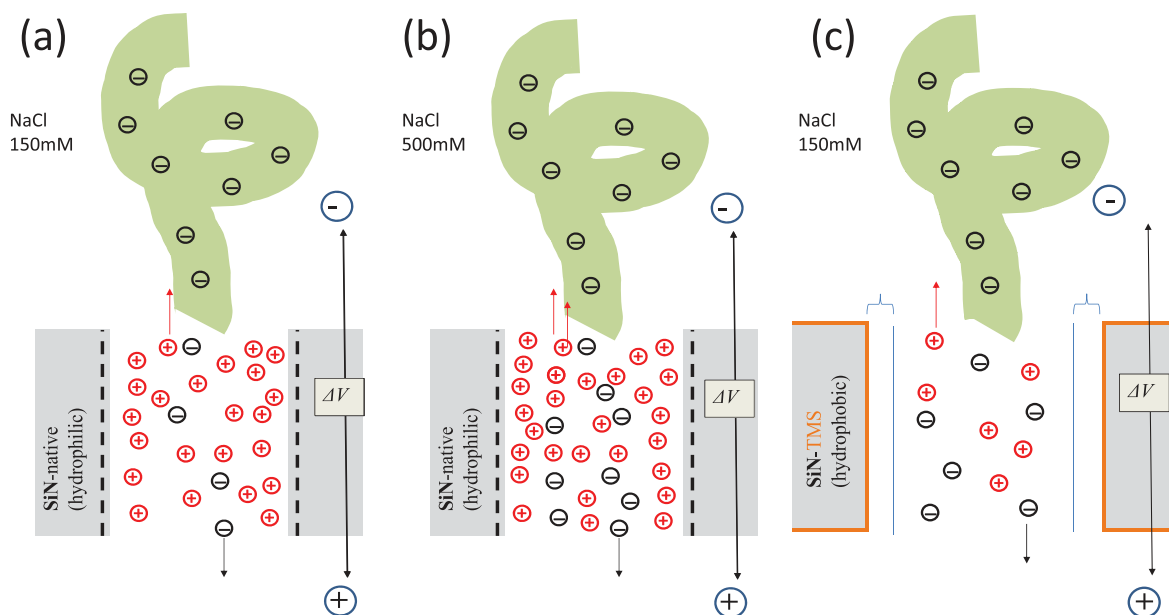


Figure 2. Cartoon to illustrate polyA translocation through NP and the electrolyte distribution. (a) Native -NP at NaCl 150 mM (b) native-NP at NaCl 500 mM and (c) TMS-NP at NaCl 150 mM.

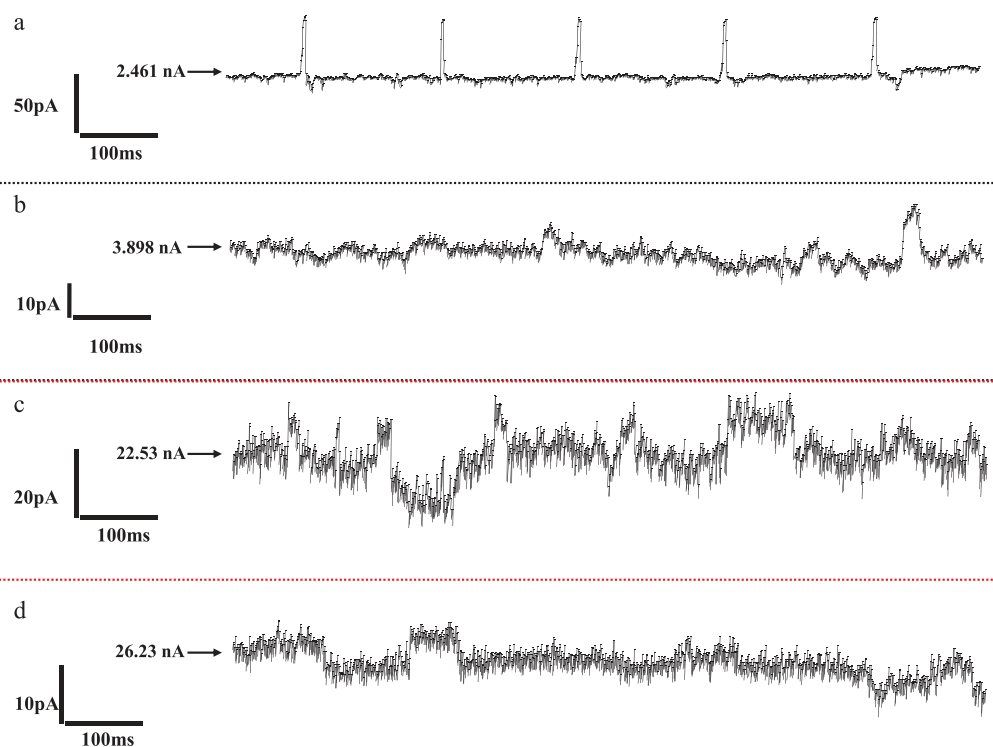


Figure 3. Examples of current trace at 1000 mV. (a) SiN native NaCl 150 mM, (b) SiN native NaCl 500 mM, (c) SiN TMS NaCl 150 mM, and (d) SiN TMS NaCl 500 mM.

main features. First, a structure peak appears at $q = 3.26 \text{ nm}^{-1}$ (i.e., 1.93 nm in the real space) that corresponds to the width of a double layer deposited by ALD. Second, a structural peak appears at $q = 0.55 \text{ nm}^{-1}$ (i.e., 11 nm in the real space) that corresponds to the polymeric structures of the PET membrane. Finally, a q^{-4} slope is observed in the low q region, characteristic of a sharp interface between the air in pores and the layers deposited by ALD. The latter result is indicative of

the quality of the deposition in terms of width control and homogeneity.

We chose to alternate $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ layers to limit the roughness induced by the deposition, which is estimated to 0.25 nm [15]. Regarding the thickness of $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ layers, and the initial diameter size, the second NP (TMS-NP) diameter was calculated to be 4.74–5.74 nm. ALD also allows a conformational coating along the NP thickness as previously

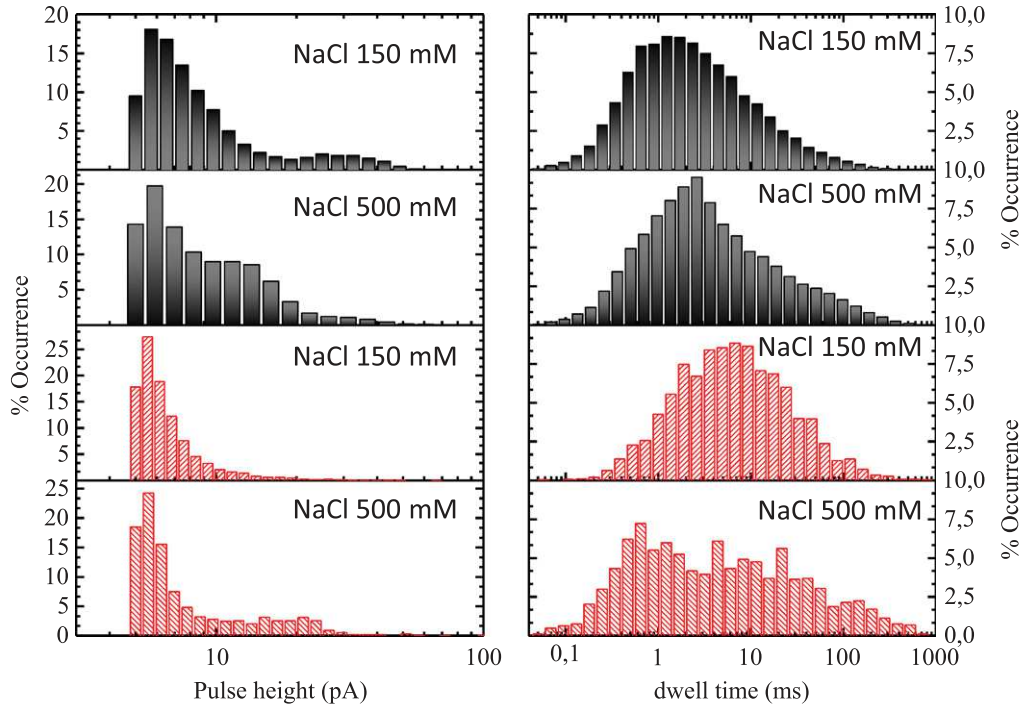


Figure 4. Distributions of event induced by polyA translocations at 150 mM NaCl and 500 mM NaCl. Black columns SiN native, red columns SiN HMDS, left side pulse height (ΔI), right side dwell time (Δt obtained from the enhancement duration).

reported (see figure 2(a) of [18]). After the grafting of TMS, the NP surface exhibited both an uncharged and a hydrophobic character [14]. We chose to design TMS-NP larger than native-NP to obtain a similar distance with low electrolyte concentration. Indeed, for the native-NP this distance is equal to the NP diameter. In the case of the TMS NP, it was previously shown by molecular dynamic simulation that there is a space (0.75 nm) between the NP wall and a structured layer of solvated electrolyte (see figure 8 in [18]). We chose to take this space into account assuming that the polyA translocation can happen only when water and the electrolyte are both present. Thus we consider an effective diameter 3.25–4.25 nm and 2.5–3.2 nm for TMS-NP and native-NP, respectively, where polyA translocation can happen.

3.2. Translocation of polyA through NP

This study focuses on the influence of NPs surface state on polyA translocation at low salt concentration, typically when the Debye length is not negligible compared to the NP diameter. We will then try to explain the influence of surface charges and chelating ions. To achieve this goal, two parameters were studied. The first one is polyA velocity (v_{eff}) inside the NP. It depends on zeta potential for both polyA (ζ_{PA}) and NP (ζ_{NP}), equation (1) [10]. It can be extracted directly from the dwell time of polyA inside the NP.

$$v_{eff} = \frac{\varepsilon E}{\eta} (\zeta_{PA} - \zeta_{NP}) \quad (1)$$

where E is the electric field, ε is the dielectric permittivity ($\varepsilon = \varepsilon_0 \varepsilon_r$; $\varepsilon_r = 78$), and η is the viscosity of the fluid (10^{-3} Pa s). The second parameter is the entropic energy

barrier (U) of the macromolecule entrance inside the NP. It is extracted from the frequency of entrance of polyA inside the NP using Van't Hoff–Arrhenius law [19]. Equation (2).

$$f = \kappa \nu \frac{C \mu_{PA(bulk)} A V}{L} \cdot \exp - \frac{U}{k_B T} \quad (2)$$

where κ is the probability factor, ν is the frequency factor, k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, A is the cross section area of the NP, L is the NP length, $\mu_{PA(bulk)}$ is the polyA mobility, V is the applied voltage, and C is the concentration of polyA.

The influence of the surface state of the NP on polyA translocation ($C = 5 \cdot 10^{-12}$ mg mL $^{-1}$, NaCl = 150 mM, or 500 mM, pH = 8) was studied under an electric field ($E = 3.33 \cdot 10^{-7}$ V m $^{-1}$) (figure 2). A positive voltage was applied on the trans-chamber. Figure 3 reports examples of current traces obtained under 1 V. Regarding the NP diameter and the low salt concentration, polyA translocations induce current enhancements. The latter are due to the high charges of polyA. Indeed, when the latter enters the NP, it leads to a current increase due to an enhanced flow of counter ions along the polynucleotide with respect to the electro-neutrality [11]. A real advantage exists from the experimental point of view to detect current enhancement compared to current blockade [20]. Indeed, the detected event from polyA translocation should be easily discriminated from the current blockades induced by non-translocative events [21], the wetting-dewetting for a hydrophobic NP [22], or the stochastic pore blocking observed experimentally [23] and predicted by theory for weakly charged NPs [24]. From the current enhancements, we have extracted the dwell time (Δt),

Table 2. Detail of current enhancement parameters.

NP	Native-NP		TMS-NP	
NaCl concentration (mM)	150	500	150	500
Dwell time (ms)	1.24	2.61	6.75	4.38
Pulse height (pA)	5.71	5.9	5.54	5.59
Frequency of entrance (s^{-1})	31.65	6.09	4.98	3.12

the intensity of current enhancement (ΔI) (figure 4), and the frequency of entrance (f) (table 2).

At 1000 mV and 500 mM NaCl, for both native-NP and TMS-NP, the ΔI has a bimodal distribution. However the majority of events are centered at 5.9 pA and 5.6 pA, respectively, for native-NP and TMS-NP. The Δt has still only one distribution for both the native-NP and TMS-NP. At 1 V and 150 mM NaCl, both Δt and ΔI have monomodal distributions for both native-NP and TMS-NP (figure 4). The main distribution of ΔI might come from the fact that the polynucleotides preferentially translocate through the pore in unfolded conformations [20, 25, 26]. This should be due to the low salt concentration since at 150 mM and 500 mM, the Debye lengths are quite close to the pore radius ($\lambda_D \sim 0.85$ nm and $\lambda_D \sim 0.4$ nm, respectively). Thus, the diameter accessible to polyA cannot allow translocation in folded conformation. At NaCl 150 mM, average Δt is longer for the TMS-NP (6.76 ms) than native-NP (1.24 ms). The same observation can be completed at NaCl 500 mM. This means that the polyA velocity is higher when the NP also exhibits a negative charge. A similar result was reported in the case of negatively charged nanoparticle translocation through PET NP [14].

Figure 5 reports the frequency of polyA entrance inside the NP. They are extracted from the number of polyA that translocate through the NP during the experiments. The result shows that the frequency increases with applied voltage according to equation (2) [27]. At 500 mM NaCl, the noticeable element is that the surface functionalization has no strong impact on the frequency of entrance. The latter values are quite similar for both native-NP and TMS-NP. If we compare the frequency at 1 V and 150 mM NaCl, we observe a significant difference, indeed for the native-NP $f = 30 s^{-1}$ and the TMS-NP $f = 5 s^{-1}$. The frequency is clearly higher in the case of the native-NP. According to equation (2), the energy barrier increases conversely to the frequency. Thus, at low salt concentration (150 mM NaCl) the frequency is higher for negatively charged NP than uncharged NP. On the contrary, at 500 mM NaCl, their frequencies are similar and independent of the surface state. The global energy of polyA entrance through an NP can be decomposed in three terms [19] equation (3)

$$U = U^* + U_{ES} - ze|V| \quad (3)$$

The term zeV is the energy provided by the electrodes on the particle where z is the apparent charge number of the polyA, e is the elementary charge, and V is the applied voltage. U^* is the entropic barrier linked to the decrease of degrees of freedom and the unfolding of the polymer. U_{ES} is

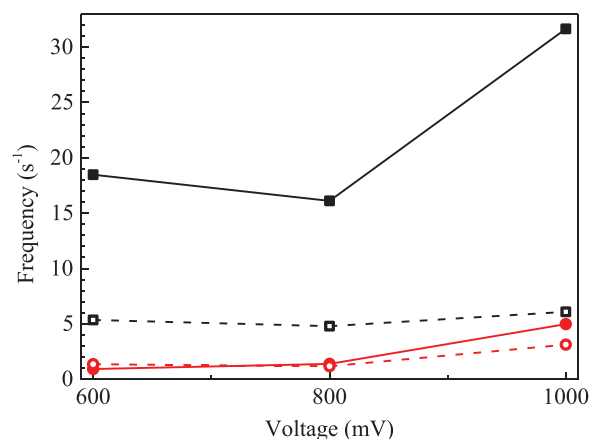


Figure 5. Frequency applied voltage dependence of poly entrance inside NP (SiN native Black squares), (SiN HMDS red dots) NP, at different NaCl concentration (150 mM solid line and 500 mM dashed line).

the electrostatic potential between the internal surface charge of the NP and polyA [14]. Under the experimental condition (NaCl 150 mM, $V = 1$ V, pH 8), the term zeV is similar for all experiments since both voltage V and z are the same. In addition, polyA translocates mostly in linear form through both native-NP and TMS-NP. Thus, it can be assumed that the entropic terms U^* are similar for both NPs. Thus U should depend on the electrostatic term (U_{ES}), which is a function of the surface charge density for both the polyA and the NP [14]. Since polyA are negatively charged, it should be expected that the global energy of entrance in the native-NP (negatively charged) is greater than TMS-NP due to repulsive effects. We observe a decrease of the energy barrier for native-NP, which might seem counterintuitive. Two factors can be used to interpret this result: (i) the electrolyte distribution (Na^+ and Cl^-) inside the NP and (ii) the interaction between the polyA and the surface wall of the NP.

It has been previously demonstrated that the electrolytes that are at the origin of the electro-osmotic flux can have a leading role on the translocation of macromolecules [8, 10]. To ensure the electronegativity of the negatively charged NP, there is a strong excess of positive charges going in the opposite direction to the polymer. In addition, regarding the Debye length (0.8 nm for 150 mM NaCl), the effective diameter where polyA can translocate is around 1.5 nm. Regarding this, the excess of mobile positive charge could help polyA entrance through the NP due to the attractive effect. The higher velocity of polyA through the native pore compared to TMS-NP should result from the same origin. Thanks to the electro-osmotic flux, when the polyA enters the NP, the cations (Na^+) close to the NP walls are going out slowly and in the opposite direction of the macromolecule. In addition, the number of negative charges induced by polyA entrance should temporarily break the electro-neutrality of the NP. This induces an aspiration phenomenon that can explain the faster polyA translocation in a native-NP. In the case of the TMS-NP a different behavior is observed; this is due to the uncharged surface. It can be noticed that the previous

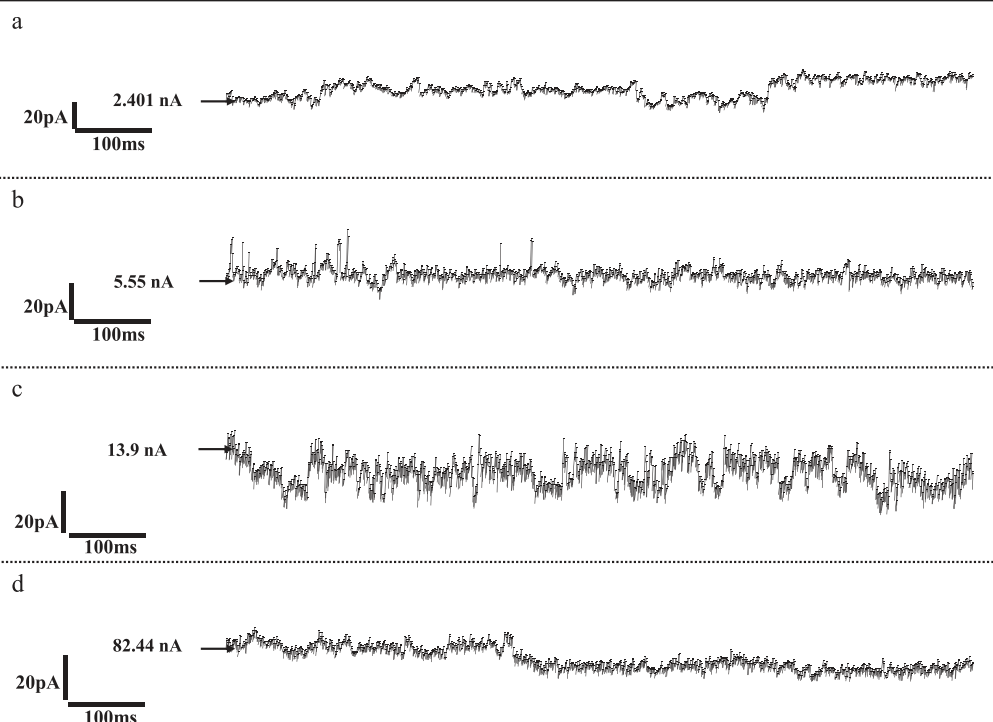


Figure 6. Example of current trace recorded for native-NP under condition: NaCl 150 mM and Mg^{2+} for (a) 1 μM , (b) 10 μM , (c) 100 μM , and (d) 1 mM.

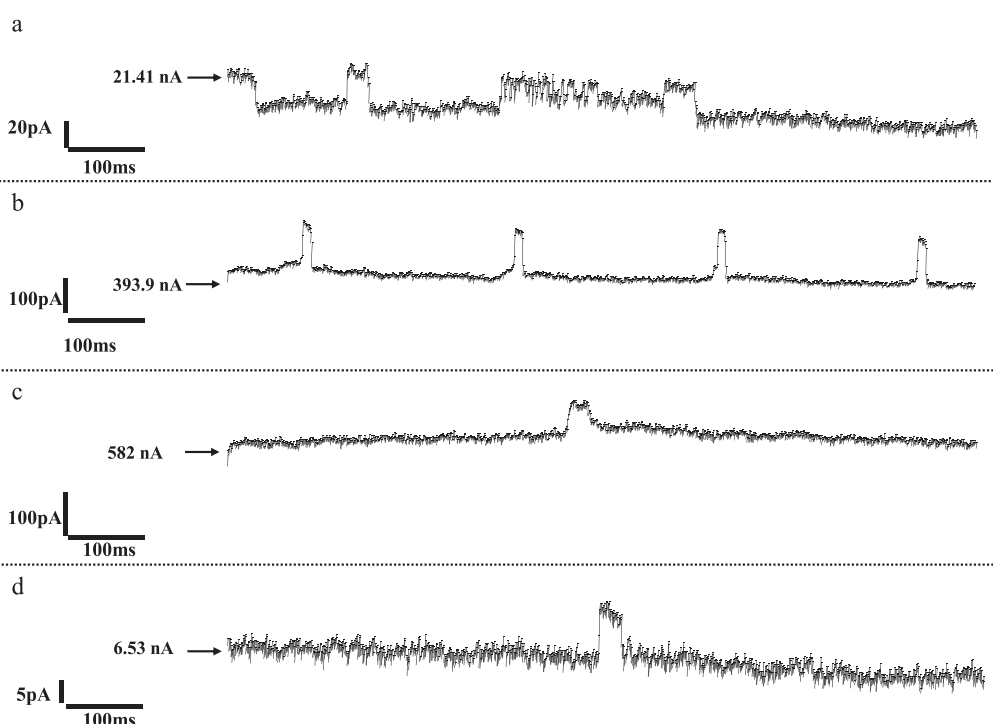


Figure 7. Example of current trace recorded for TMS-NP under condition: NaCl 150 mM and Mg^{2+} (a) 1 μM , (b) 10 μM , (c) 100 μM , and (d) 1 mM.

interpretation does not take into account the possible adsorption of polyA on a SiN or TMS surface close to the NP opening. SiN exhibits a negative zeta potential at pH higher than 3 [28] and thus it should be unlikely that polyA is adsorbed on the surface. For NP-TMS, the possibility of

polyA adsorption needs to be taken into account [29] since silanized glass is used for the DNA combing [30, 31]. The polyA adsorption on both SiN and SiN coated with TMS was evaluated. To make this, the labeled polyA with BOBOTM-3 Iodide (life technology B3586) dye is adsorbed on flat surface

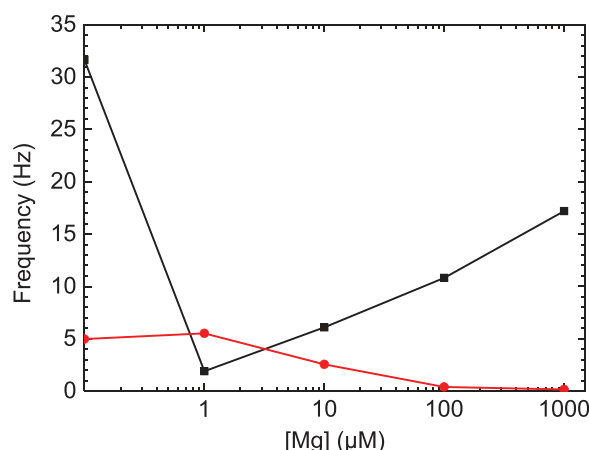


Figure 8. Evolution of the frequency of polyA entrance inside native-NP (black squares) and TMS-NP (red circle) at Mg^{2+} concentration from 1 μM to 1 mM.

(SiN and SiN TMS). The fluorescence emission induced by labeled polyA is measured by confocal fluorescence spectroscopy [32]. Typically, a solution of labeled polyA was deposited on the surface, remained for 30 min, and then the surface was rinsed with a buffer solution to remove the unabsorbed polyA. Then the fluorescence surface was recorded. As expected, no polyA adsorption was observed on native SiN, as opposed to the TMS surface. Considering this, we cannot exclude that the increase of energy barrier of the entrance is induced by polyA adsorbed on the TMS surface due to the repulsive polyA–polyA interaction.

In order to investigate if the behavior previously observed should be linked to the electrostatic potential, we studied the polyA translocation through the same NPs after the addition of a chelating agent (Mg^{2+}). Thanks to the latter, the unfolding of the polyA will be more difficult and thus the entropic free-energy barrier will increase [33, 34]. In addition, Mg^{2+} interaction with a sugar-phosphate backbone group create a decrease of effective charge [35]. Thus experimentally, we expect to observe a strong decrease of the frequency of the polyA entrance inside the NP [36].

The influence of Mg^{2+} on polyA translocation was studied at 150 mM NaCl under a voltage of 1 V. From the current enhancement (figures 6, 7), the frequency of polyA entrance inside the NP was extracted and reported in figure 8 as a function of Mg^{2+} concentration. The result shows that as soon as magnesium is added, a decrease of the frequency is observed in both native-NP and TMS-NP. For TMS-NP, the decrease of the frequency is related to the increase of Mg^{2+} . As expected, the chelation of polyA increases the energy barrier induced by an increase of the entropic component. For the native-NP a different behavior is observed. At 1 μM Mg^{2+} , the frequency decreases drastically from 30 s^{-1} to 2 s^{-1} , as expected. However when the Mg^{2+} concentration is increased, the frequency starts to increase again. This could be explained by the fact that Mg^{2+} can induce a modification of the surface charge [37, 38]. In this case, with the increase of Mg^{2+} concentration, the increase of the entropic barrier, due to the chelating process, is counterbalanced by the charge

modification at the NP surface, which decreases the electrostatic potential.

4. Conclusion

In conclusion we reported the design of low aspect ratio solid-state NPs (diameter ~ 4 nm and thickness 30 nm) with different surface charges. The translocation of polyA through these NPs was studied at low salt concentration. To sum up our experiments, at low salt concentration (NaCl 150 mM), the mobility and the energy barrier are strongly dependent on the NP surface. Indeed the energy barrier is lower for the negatively charged NP than the uncharged one. This counterintuitive result could be explained by the excess of mobile cations, which ensure the electro-neutrality of the NP. With the addition of a chelating agent to polyA (Mg^{2+}), the energy barrier increases as expected independently of the NP surface state. This is due to the increase of energy required to linearize macromolecules. However, when the Mg^{2+} concentration increases, it can be observed that a decrease of the energy barrier for a negatively charged NP is likely due to a charge inversion.

Acknowledgments

M Lepoitevin has a PhD fellowship from the French government. This work is partially supported by the ANR (Agence National de la Recherche, France) via the project ‘TRANSION’ (ANR-2012-BS08-0023) and by the European Institute of Membrane by health project (PS2-2014).

References

- [1] Deamer D W *et al* 2002 Characterization of nucleic acids by nanopore analysis *Accounts Chem. Res.* **35** 817–25
- [2] Kowalczyk S W *et al* 2011 Biomimetic nanopores: learning from and about nature *Trends Biotechnol.* **29** 607–14
- [3] Schneider G F *et al* 2012 DNA sequencing with nanopores *Nat. Biotechnol.* **30** 326–8
- [4] Muthukumar M 2007 Mechanism of DNA transport through pores *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36** 435–50
- [5] Wong C T A *et al* 2007 Polymer capture by electro-osmotic flow of oppositely charged nanopores *J. Chem. Phys.* **126** 164903
- [6] Cabello-Aguilar S *et al* 2013 Slow translocation of polynucleotides and their discrimination by alpha-hemolysin inside a single track-etched nanopore designed by atomic layer deposition *Nanoscale* **5** 9582–6
- [7] Fologea D *et al* 2005 Slowing DNA translocation in a solid-state nanopore *Nano Lett.* **5** 1734–7
- [8] Luan B Q *et al* 2008 Electro-osmotic screening of the DNA charge in a nanopore *Phys. Rev. E* **78** 021912
- [9] Di Fiori N *et al* 2013 Optoelectronic control of surface charge and translocation dynamics in solid-state nanopores *Nature Nano* **8** 946–51
- [10] Firnkes M *et al* 2010 Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis *Nano Lett.* **10** 2162–7

- [11] Galla L *et al* 2014 Hydrodynamic slip on DNA observed by optical tweezers-controlled translocation experiments with solid-state and lipid-coated nanopores *Nano Lett.* **14** 4176–82
- [12] Long D *et al* 1996 Simultaneous action of electric fields and nonelectric forces on a polyelectrolyte: motion and deformation *Phys. Rev. Lett.* **76** 3858–61
- [13] Bacri L *et al* 2011 Dynamics of colloids in single solid-state nanopores *J. Phys. Chem. B* **115** 2890–8
- [14] Cabello-Aguillar S *et al* 2014 Dynamics of polymer nanoparticles through a single artificial nanopore with high-aspect-ratio *Soft Matter* **10** 8413–9
- [15] Abou Chaaya A *et al* 2013 Enhanced ionic transport mechanism by gramicidin in a confined inside nanopores tuned by atomic layer deposition *J. Phys. Chem. C* **117** 15306–15
- [16] Raghavan R *et al* 2012 Nanocrystalline-to-amorphous transition in nanolaminates grown by low temperature atomic layer deposition and related mechanical properties *Appl. Phys. Lett.* **100** 191912
- [17] Elias J *et al* 2012 Urchin-inspired zinc oxide as building blocks for nanostructured solar cells *Nano Energy* **1** 696–705
- [18] Cabello-Aguillar S *et al* 2014 Experimental and simulation studies of unusual current blockade induced by translocation of small oxidized PEG through a single nanopore *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16** 17883–92
- [19] Henrickson S E *et al* 2000 Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore *Phys. Rev. Lett.* **85** 3057–60
- [20] Smeets R M M *et al* 2006 Salt dependence of ion transport and DNA translocation through solid-state nanopores *Nano Lett.* **6** 89–95
- [21] Carlsen A T *et al* 2014 Interpreting the conductance blockades of DNA translocations through solid-state nanopores *ACS Nano* **8** 4754–60
- [22] Powell M R *et al* 2011 Electric-field-induced wetting and dewetting in single hydrophobic nanopores *Nat. Nanotechnology* **6** 798–802
- [23] Shimizu S *et al* 2013 Stochastic pore blocking and gating in PDMS-glass nanopores from vapor-liquid phase transitions *J. Phys. Chem. C* **117** 9641–51
- [24] Buyukdagli S *et al* 2010 Ionic capillary evaporation in weakly charged nanopores *Phys. Rev. Lett.* **105** 158103
- [25] Kowalczyk S W *et al* 2012 Measurement of the docking time of a DNA molecule onto a solid-state nanopore *Nano Lett.* **12** 4159–63
- [26] Kowalczyk S W *et al* 2010 Detection of local protein structures along DNA using solid-state nanopores *Nano Lett.* **10** 324–8
- [27] Meller A *et al* 2001 Voltage-driven DNA translocations through a nanopore *Phys. Rev. Lett.* **86** 3435–8
- [28] Bousse L *et al* 1991 The zeta-potential of silicon-nitride thin-films *J. Electroanal. Chem.* **302** 269–74
- [29] Chan V *et al* 1998 Effect of hydrophobicity and electrostatics on adsorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid interfaces *J. Colloid Interface Sci.* **203** 197–207
- [30] Michalet X *et al* 1997 Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies *Science* **277** 1518–23
- [31] Pasero P *et al* 2002 Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus *Genes & Development* **16** 2479–84
- [32] Balme S *et al* 2006 Potentialities of confocal fluorescence for investigating protein adsorption on mica and in ultrafiltration membranes *J. Membrane Sci.* **284** 198–204
- [33] Misra V K *et al* 1998 On the role of magnesium ions in RNA stability *Biopolymers* **48** 113–35
- [34] Owczarzy R *et al* 2008 Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations *Biochemistry* **47** 5336–53
- [35] Butler J C *et al* 2003 Ion multivalence and like-charge polyelectrolyte attraction *Phys. Rev. Lett.* **91** 028301
- [36] Zhang Y *et al* 2013 Nanopore detection of DNA molecules in magnesium chloride solutions *Nano. Res. Lett.* **8** 245
- [37] van der Heyden F H J *et al* 2006 Charge inversion at high ionic strength studied by streaming currents *Phys. Rev. Lett.* **96** 224502
- [38] Grosberg A Y *et al* 2002 Colloquium: the physics of charge inversion in chemical and biological systems *Rev. Mod. Phys.* **74** 329–45

INFLUENCE OF NANOPORE SURFACE CHARGE ON POLYCYTOSINE TRANSLOCATION

M. LEPOITEVIN, M. BECHELANY, J-M. JANOT, S. BALME

*Institut Européen des Membranes, UMR5635 CNRS-UM2-ENSCM, Place Eugène
Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France*

P. E. COULON

*Laboratoire des Solides Irradiés, École Polytechnique, Route de Saclay, 91128 Palaiseau
Cedex, France*

We investigate the influence of nanopore surface state on poly-cytosine translocation. To do it, two kinds of nanopores with low aspect ratio (diameter $\sim 3-5$ nm, length 30 nm) were tailored: the first one with negative charge surface and the second one uncharged. It was shown that the velocity and the energy barrier strongly depend on the nanopore surface. Typically if the nanopore and polyC exhibit a similar charge, the macromolecule velocity increases and its global energy barrier of entrance in the NP decreases, as opposed to the non-charged nanopore.

1. Introduction

Nanopore-based single-molecule sensors are being developed for variety of biotechnological applications (e.g., next-generation sequencing)[1]. By applying an electric potential across an insulating nanopore and monitoring the current, biomacromolecule (e.g. DNA, Protein) could be detected and characterized. Translocation process depends on both nanopore and biomacromolecule properties (size, length, charge...)[2]. The objective of this work is to study the influence of a nanopore surface charge on polycytosine translocation. To do it we investigated the fundamental mechanisms governing the translocation of a macromolecule through a nanopore. The understanding of those processes has to take into account (i) the dynamics of the macromolecules and their interactions with the nanopore[3], (ii) the influence of the electro-osmotic flow (EOF)[4] (iii) of the Stern layer[5].

2. Methods section

2.1. *SiN Nanopore design*

SiN nanopores (thickness 30 nm) were drilled by using a TEM JEOL 2010F. The native nanopore exhibits negative surface charge (2.5-3.2 nm). TMS nanopore was tailored using ZnO/Al₂O₃ deposition by ALD and coated by Trimethyl silane function to ensure an uncharged surface (4.7-5.7 nm)

2.2. *Ion current recordings and polynucleotides translocations*

Single nanopore was mounted in a Tetraflow™ cell containing a buffer solution (S1: 150 mM NaCl, and 10 mM TRIS at pH~8 or S2: 500 mM NaCl, and 5 mM TRIS at pH~8). PolyC translocations ($C = 5 \cdot 10^{-12}$ mg mL⁻¹) through nanopores were done under positive potential (+1V; $E = 3.33 \cdot 10^{-7}$ V.m⁻¹). Ion current was recorded by a patch-clamp post amplifier (EPC10, HEKA electronics, Germany) at a sampling frequency 200 kHz.

3. Results and discussion

This study focuses on the influence of the surface state of the nanopore on the polyC translocation at low salt concentration, when the Debye length cannot be neglected compare to the pore diameter. We studied two parameters (i) the velocity which depends on the charge of both the pC and the nanopore and directly extracted from the dwell time of the pC inside the nanopore. (ii) the entropic energy barrier (U) of macromolecule entrance inside the nanopore., extracted from the frequency of entrance of polyC inside the nanopore using Van't Hoff-Arrhenius law.[6]

$$f = v \frac{C \mu_{pC(bulk)} A V}{L} \cdot \exp - \frac{U}{k_B T} \quad (1)$$

Where v is the frequency factor, k_B is the Boltzmann constant and T is the

temperature, A is the cross section area of the nanopore, L is the nanopore

length, $\mu_{\text{pC(bulk)}}$ is the polyC mobility, V is the applied voltage and C is the concentration of polyC. The entropic energy barrier (U) of macromolecule entrance inside the nanopore is linked to (i) the entropic part depending on the unfolding of the macromolecule (ii) the electrostatic potential depending on the charge difference between the nanopore and the macromolecule.

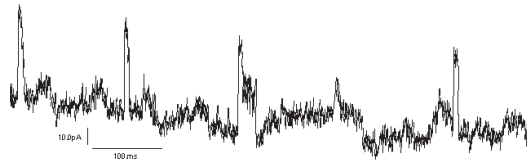


Figure 1: Example of current enhancement at 1V for SiN-nat at 150mM NaCl

With respect to our experimental protocol, the polyC translocation leads to current enhancements. The latters are due to the high charges of the polyC. Indeed when macromolecule enters the nanopore, it induces a strong increase of the current due to the increase of the counter ions flow along the polynucleotide, in order to respect the electroneutrality. From those enhancements, the dwell time Δt , the current enhancement intensity ΔI , and the frequency of entrance were extracted.

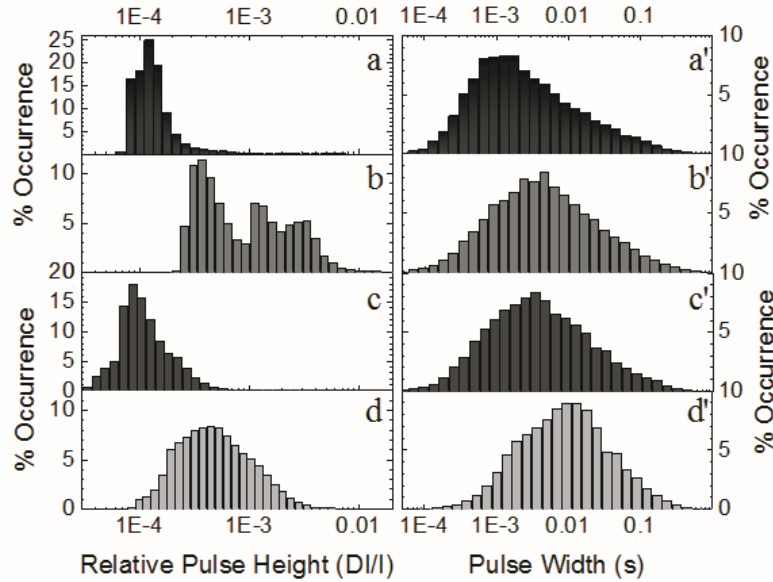


Figure 2: Distributions of events induced by polyC translocations. (a, a') SiN-nat NaCl 150mM, (b, b') SiN-nat NaCl 500mM, (c, c') SiN-TMS NaCl 150mM, (d, d') SiN-TMS NaCl 500mM, left side current enhancement, right side dwell time

The pulse height distribution and the dwell time are mainly monomodal under 150mM NaCl for both native-NP and TMS-NP. This single distribution of the ΔI indicates that polyC translocate through the pore in a preferentially linear fashion. This can be explained by the low ionic strength which induced a Debye length similar than the pore radius. Thus, it would forbid the translocation of the molecule in a folded way. In addition, the average dwell-time is longer in the case of the TMS-NP (3.5 ms under NaCl 150mM; 10 ms under NaCl 500mM) compare to the native-NP (1.3 ms under NaCl 150mM; 4.5 ms under NaCl 500mM). Thus this would imply that the velocity of polyC is faster through nanopore with similar charged.

The frequency of entrance under 1V is highest for the native-NP at 150mM. It means the energy barrier of entrance is lowest. When the ionic force is increased, the frequency decreases even more. In the case of the TMS-NP the ionic force matters too but less. Surprisingly, with a

large Debye length leading to a strong exclusion phenomenon, and when the pore and the macromolecule bear the same charge, the entrance of the latter is boosted. This counter-intuitive result can be explained by the ion organization inside charged nanopore. Indeed at low ionic strength the nanopore surface is covered by a layer of counter ion.

Thus the polyC sees the pore as if it was positively charged, and thus would be attracted at its entrance. In term of energy the electrostatic component is more favorable. The velocity could be explained by the drift of mobility between “small” counter ions and the “large” macromolecule. Thus when the latter enters inside the nanopore, it breaks its electroneutrality. And thus the molecule might be sucked up.

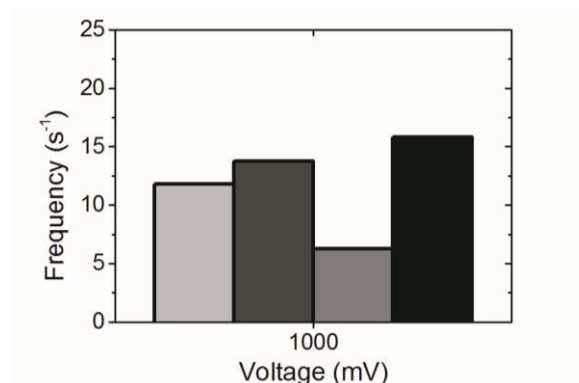


Figure 3: Frequency of entrance of the polyC inside the nanopore. From right to left: (black) SiN-nat NaCl 150mM, (grey) SiN-nat NaCl 500mM, (dark grey) SiN-TMS NaCl 150mM, (light grey) SiN-TMS NaCl 500mM

4. Conclusion

We have demonstrated that we are able to design nanopores with a controlled diameter and different surface states, in particular one with no surface charges, with a zeta potential of zero, used as a reference. We have shown that there is a difference of velocity in between the ions and counter ions, inducing that all the translocation mechanisms are governed by those surface charges.

1. D.W. Deamer and D. Branton. *Accounts of Chemical Research* **35**, 817-825 (2002).
2. S. Cabello-Aguilar, et al. *Nanoscale* **5**, 9582-9586 (2013).
3. M. Muthukumar. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **36**, 435-450 (2007).
4. M. Firnkes, et al. *Nano Letters* **10**, 2162-2167 (2010).
5. C.T.A. Wong and M. Muthukumar. *Journal of Chemical Physics* **126** (2007).
6. S. Cabello-Aguilar, et al. *Soft Matter* **10**, 8413-8419 (2014).

Detection of short ssDNA and dsDNA by current-voltage measurements using conical nanopores coated with Al₂O₃ by atomic layer deposition

Vidhyadevi Thangaraj^{1,2} · Mathilde Lepoitevin¹ · Michael Smietana³ · Emmanuel Balanzat⁴ · Mikhael Bechelany¹ · Jean-Marc Janot¹ · Jean-Jacques Vasseur³ · Sivanesan Subramanian² · Sebastien Balme¹

Received: 11 September 2015 / Accepted: 2 December 2015
© Springer-Verlag Wien 2015

Abstract DNA detection using solid state nanopores is limited by the difficulty of the detection of short DNA strands due to their very short dwell time. Here, we report on the fabrication of nanopores using a track-etching technique along with the atomic layer deposition of aluminum oxide. This method allows shaping of conical nanopores, controlling their diameter, and passivation of the surface by Al₂O₃. Through the optimized nanopore, short DNA (10 nM) having 10 and 40 nucleotides in length were detected both at the single stranded and double stranded levels. The analysis of current trace shows signal to noise ratio of 2 and 4 for ssDNA and dsDNA respectively and a dwell time at ms scale. This is possible because of both the high aspect ratio and the Al₂O₃ coating that permit to decrease the DNA velocity.

Keywords Aluminum oxide · Track etching · Conductometry · Patch-clamp amplifier · DNA translocation · Dwell time

✉ Sebastien Balme
sebastien.balme@univ-montp2.fr

¹ Institut Européen des Membranes, IEM UMR-5635, Université de Montpellier, ENSCM, CNRS, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

² Department of Applied Science and Technology, AC Tech, Anna University, Chennai 600025, India

³ Institut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM UMR5247 Université de Montpellier, ENSCM, CNRS, Place Eugène Bataillon, Montpellier, France

⁴ Centre de recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique, UMR6252 CEA-CNRS-ENSICAEN, 6 Boulevard du Maréchal Juin, 14050 Cedex 4 Caen, France

Introduction

Single nanopore technologies have opened the route to multiple applications such as DNA detection and sequencing [1–3] or macromolecule mass spectroscopy [4]. This technology is considered as one of the major breakthroughs in the field of the nanotechnologies for the last decades. However this method is not simply a nanoscale “counter Coulter”. Indeed at nanoscale, the effect of the interaction between nanopore, biomacromolecule and electrolyte cannot be neglected [5, 6]. There are three major strategies using the single nanopore as molecular sensors. The first is inserting a biological channel inside a phospholipid membrane. This way offers the most promising results for DNA sequencing application [7] as well as unfolded protein detection [8]. The second approach is based on the production of solid state nanopore [9]. The last one is the hybrid biological/artificial solid-state nanopores by direct insertion of biological channels. Solid state nanopore can be made in different type of materials: polymer [10], silicon based [11], or graphene [12, 13]. For biomacromolecules (DNA, protein) sensing, the most used nanopore is SiN due to its low aspect ratio. One of its limitations comes from the fast translocation of DNA which makes difficult the detection of DNA shorter than 100mer. Indeed detection of 25 bp DNA was performed through graphene [13] and SiN nanopore [14] with dwell times of 12.5 μs and 20 μs respectively. The measurement of short time events is difficult using patch-clamp amplifier with sample rate of 200 kHz. Using a fast amplifier, 35 bp DNA have been successfully detected by Carson et al. [15]. In order to increase the DNA dwell time inside nanopore from μs to ms scale, two strategies are considered. The first one involves modified biological nanopore (basically a α-hemolysin mutant). Based on this, it becomes possible to

detect less than 10 mers DNA [16] as well as one nucleotide [17, 18]. The second one involves biological nanopore confined inside biomimetic nanopore with high aspect ratio typically the polymeric ones using track-etching methods [19]. The track-etched technique permits nanopore design in different polymer materials (polyethylene terephthalate (PET), polycarbonate (PC), polyimide (PI), Kapton and polytetrafluoroethylene (PTFE). Regarding the chemical etching condition, different shapes of nanopore can be obtained [10]. Among the geometry and the polymer that can be used, the conical nanopore in PET is the most efficient for sensing macromolecule, such as protein [20], DNA [21–23] as well as smaller molecule such as porphyrin [24]. Nevertheless, the polymeric nanopores were less used than SiN for biomacromolecule sensing since they suffer from two limitations: (i) the difficulty to predict precisely the size of the tip diameter before etching process and (ii) the fluctuation of the current likely due to the mobility of free polymer chains after chemical etching. In order to overcome these problems, the nanopore can be fashioned after the etching process by atomic layer deposition (ALD). Indeed the latter is a powerful technique to fashion nanostructure with complex shapes and high aspect ratio. It also permits to deposit different oxides materials which broaden the range of nanopore functionalization. It was used to tune SiN and polymeric nanopore with different oxides such as TiO_2 , Al_2O_3 or ZnO [25]. For polymeric materials, the ALD process is performed at low temperature (60 °C). It permit to reduce the diameter up to 1 nm in PET nanopores [26].

Polymer nanopore fashioned by ALD was used to detect proteins macromolecules or nanoparticles [27]. For DNA detection, the deposition of Al_2O_3 on SiN nanopore permits to passivate the non-ideal surface of SiN and then to obtain a better signal to noise ratio [28, 29]. Venkatesan et al. [30] have shown that DNA transport studies reveal an order-of-magnitude reduction in translocation velocities relative to Si_3N_4 or SiO_2 nanopores. A better signal to noise ratio and a decrease of translocation velocity are crucial to facilitate the analysis of current blockades and thus detect short DNA strands. Regarding that, we have investigated the possibility of short ssDNA and dsDNA detection using a conical nanopore coated by Al_2O_3 . To achieve this, we tailored conical nanopores with tip diameter close to 2 nm. Then, we studied the translocation of ssDNA (T_{40}) and dsDNA ($\text{A}_{40}/\text{T}_{40}$ and $\text{A}_{10}/\text{T}_{10}$).

Material and methods

Nucleotide synthesis

The oligodeoxynucleotides were synthesized from commercially available phosphoramidites (Link Technologies Ltd., Scotland). Syntheses were performed in 1 μmol scale using

ABI 381A DNA synthesizer by standard phosphoramidite chemistry with conditions described in Table 1.

All oligonucleotides synthesized were analyzed by MALDI-TOF MS on a Voyager DE (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with a 337 nm nitrogen laser (Table 2).

Track-etching nanopore

Single nanopore was tailored by track-etched method [19]. The single tracks were produced by Xe irradiation (8.98 MeV u^{-1}) (GANIL, SME line, Caen, France) of polyethylene terephthalate (PET) film (thickness 13 μm , biaxial orientation ES301061 Goodfellow (13 μm). The activation of track was performed by UV exposition 24 h per side, (Fisher bioblock; VL215.MC, $\lambda = 312 \text{ nm}$) before chemical etching process. The etching of conical nanopore was performed under dissymmetric condition. The PET foil was mounted in a chemical cell in Teflon. One side of the cell is filled with the etchant solution (9 M NaOH), and the other one with the stopping solution (1 M KCl and 1 M of acetic acid). The time is recorded as soon as the etching solution is inserted. A 1 V potential is applied across the membrane, the reference electrode is in the stopping solution and the active electrode in the etchant. When the current rises to a hundred of pA, there is a breakthrough. To stop the etching process, the NaOH solution is replaced by the stopping one.

The tip diameter of conical nanopores d_t was calculated from the dependence of the conductance G (from -100 mV to 100 mV) with KCl concentration, assuming bulk-like ionic conductivity inside the nanopores. In order to correct the conductivity at high salt concentration, the diameter is calculated from Eq. 1 using the ionic conductivity of solution κ . The latter have been measured using a conductimeter (Hanna HI 255 combined meter with conductivity and electrode HI 76310) after preparation.

The tip diameter d_t of conical nanopore is also estimated from the conductance using Eq. 1 [31]:

$$G = \kappa \pi d_b d_t / 4L \quad (1)$$

Where d_b is calculated from the total etching time t using the relationship $d_b = 2.5t$. The factor 2.5 was determined in our

Table 1 Coupling conditions for oligonucleotide syntheses

Step	Reaction	Reagent	Time (s)
1	Deblocking	3 % Trichloroacetic Acid in dichloromethane	35
2	Coupling	0.1 M amidite in CH_3CN + 0.3 M 5-benzylmercaptotetrazole in CH_3CN	180
3	Capping	$\text{Ac}_2\text{O}/\text{THF}/\text{Pyridine}$ +10 % 1-Methylimidazole in THF	8
4	Oxidation	0.1 M I_2 in $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}/\text{Pyridine}$	15

Table 2 MALDI MS of synthesized ODNs

Sequence	Calcd m/z [M-H] [−]	Obs m/z [M-H] [−]
A ₄₀	12,425.9	12,425.1
T ₄₀	12,065.5	12,065.8
A ₁₀	3060.0	3060.6
T ₁₀	2969.9	2969.4

laboratory using multipore membrane track. This factor is close to the 2.13 one usually reported in literature.

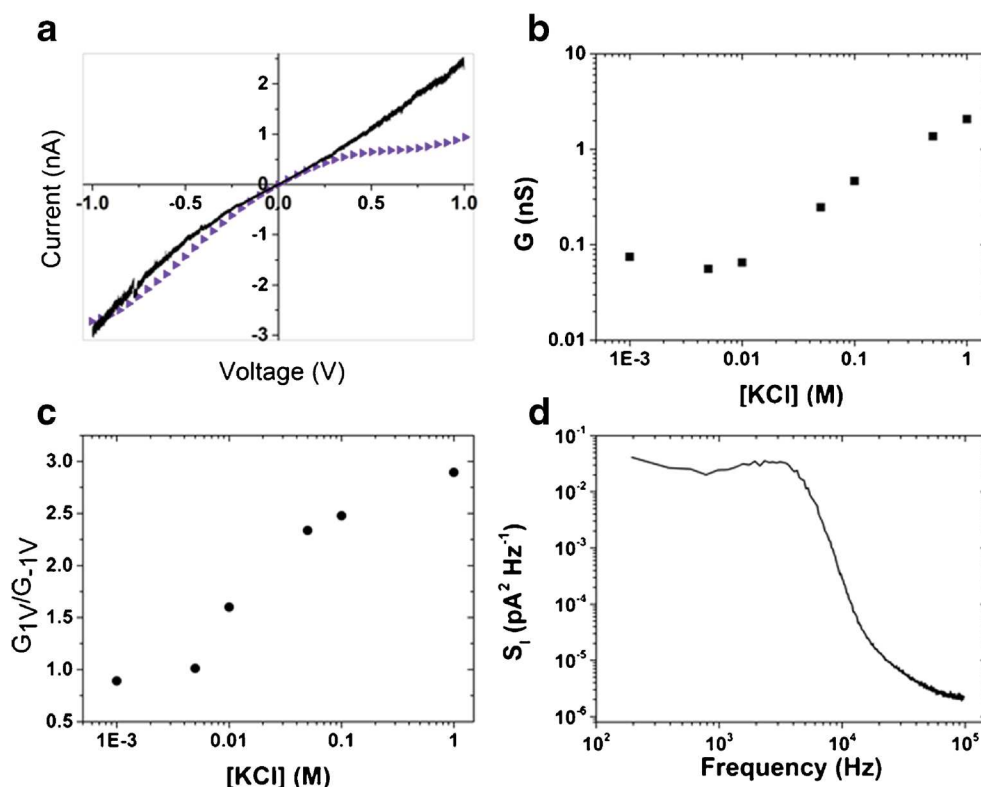
Atomic layer deposition

The nanopore was coated by thin Al₂O₃ films using a custom-made atomic layer deposition setup. The Al₂O₃ films were deposited by alternating exposures of trimethylaluminum (TMA) (Al(CH₃)₃, 97 % purity, CAS: 75–24–1) and deionized water (H₂O) with the following cycle times: 0.2 s pulse (TMA), 30 s exposure, and 40 s purge with 100 sccm dry Argon. A 2 s pulse, 30 s exposure, and 60 s purge with 100 sccm dry argon were used for H₂O. ALD was carried out at 60 °C. These pulse, exposure, and purge times were chosen conservatively to ensure completion of the ALD surface reactions and to prevent mixing of the reactive gases. The growth per cycle was about 2 Å cycle^{−1} for Al₂O₃.

Current-voltage measurement

Electrical measurement was performed using a patch-clamp amplifier (EPC10 HEKA electronics, Germany). The single nanopore is mounted between two Teflon chambers containing the same electrolyte solution. The current is measured by Ag/AgCl, 1 M KCl electrodes connected to the cell chamber by agar-agar bridges. One electrode was plugged to the working end of the amplifier (trans chamber, base) and the other electrode connected to the ground (cis chamber, tip). For I-V curves, current traces were recorded as a function of time under applied voltages from 1 V to −1 V by 50 mV step. Data has been recorded at 2 kHz. DNA translocation experiments were performed under KCl 1 M, TRIS 10 mM, EDTA 1 mM at pH of 8.4. The polynucleotide samples were added on cis chamber (tip side of nanopore) to reach a final concentration of 10 nM. Positive potentials (500 mV) were then applied to trans chamber. Ion current was recorded at a sampling frequency of 200 kHz. Those experiments were repeated 8 times in 4 successive days. The detection of DNA was achieved for all experiments. After a 2 weeks period, we observed an increase of the current fluctuation making difficult the current blockade detection. The data analysis of the dwell time (Δt) and the difference of current intensity (ΔI) were performed using fitmaster software (HEKA). The events are considered when the current increase is higher than 25 pA and the time upper than 50 μ s. For each event, we report the duration Δt and the relative intensity $\Delta I/I$.

Fig. 1 Ionic transport of a nanopore (a) IV curve before (black) and after (blue) coating of Al₂O₃ by ALD, (b) conductivity and (c) rectification factor for the Al₂O₃ nanopore as a function of KCl concentration at pH 8.4 (d) Current power spectral densities versus frequency for conical nanopore at +500 mV, recorded at 200 kHz, filtered at 10 kHz in KCl 1 M; Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.4



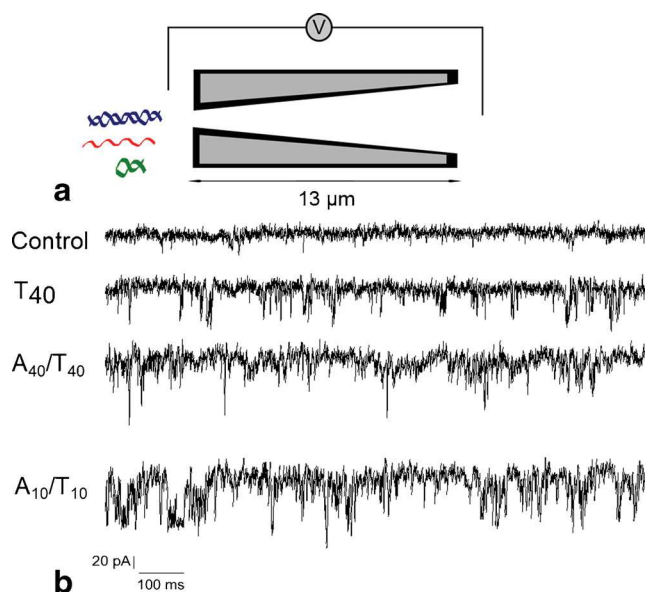


Fig. 2 **a** schematic representation of nanopore detection by Al_2O_3 coated nanopore. **b** Example of current traces obtained without DNA (noted control) and with different samples T_{40} , A_{40}/T_{40} and A_{10}/T_{10} . The current level of all traces has a mean value of $340 \text{ pA} \pm 20 \text{ pA}$

Results and discussion

As previously mentioned, conical nanopore obtained by track-etching methods was less used than SiN nanopore for DNA detection. One of the reasons should be the strong fluctuation of current [32]. The coating of nanopore by Al_2O_3 was considered to passivate the surface for limiting the fluctuation and adjust the tip diameter. After chemical etching, the nanopore diameter was obtained by conductivity measurement (KCl 1 M) (Fig. 1) using Eq. 1. Here, the nanopore exhibits a tip diameter of 3 nm and a base one of 225 nm. After two ALD cycles of Al_2O_3 (thickness of 0.4 nm), the tip diameter is reduced to 2.2 nm. The deposition of Al_2O_3 by ALD permits also to modify the surface charge of the nanopore. It has been shown that the isoelectric point of Al_2O_3 is close to 5 [33]. The translocation of DNA experiments are usually performed at pH 8.4 through a negative nanopore. Indeed, a negative nanopore seems to increase the capture rate

of DNA compared to a positive [34] or hydrophobic nanopore [25]. In order to confirm the surface charge, the ionic conductivity of nanopore was studied at pH 8.4. In Fig. 1b, the KCl conductance $G([\text{KCl}])$, follows two regimes: (i) constant at low concentration, $[\text{KCl}] < 0.01 \text{ mol l}^{-1}$, and (ii) a roughly linear increase at high concentration, $[\text{KCl}] > 0.1 \text{ mol l}^{-1}$, as commonly observed for charged nanopore. However at this stage the presence of charge cannot be claimed since uncharged nanopore can follow the same behavior [26]. Thus in order to confirm the presence of charge on the nanopore surface, the rectification factor (G_{1V}/G_{-1V}) was also analyzed. According to our experimental setup, if the rectification factor is more than 1, the nanopore exhibits a negative surface charge. The results reported in Fig. 1b show clearly an increase of the rectification factor with the KCl concentration. Obviously, this behavior is the opposite of the one observed for raw PET nanopore [32]. This confirms both, the coating with Al_2O_3 layer and the negative surface charge of Al_2O_3 at pH 8, as expected. It can be noticed that Al_2O_3 layer is stable for pH lower than 10. In order to complete the nanopore characterization, the current power spectral densities (S_i) have been recorded under experimental condition used for DNA detection (0.5 V, KCl 1 M; Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.4) (Fig. 1d). The low value of S_i at high frequency can be assigned to the low dielectric constant of PET.

The experimental detection of small DNA strands was performed from tip to base side of nanopore under buffer solution (KCl 1 M; Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.4). DNA strands were added on the tip chamber and a positive voltage of 500 mV was applied on the trans-chamber. The voltage applied was selected as a good compromise between current stability and the possible detection of current blockade. DNA samples are composed as follow: (i) one ssDNA and (ii) two dsDNA. The ssDNA are homopolythymidylates made of 10 and 40 thymidines (T_{10} and T_{40}). Before the addition in the electrochemical cell, dsDNA are prepared by mixing the corresponding homopolythymidylates with their complementary strand (A_{10} or A_{40}) at room temperature (25 °C). Typical current trace for control, T_{40} , A_{40}/T_{40} and A_{10}/T_{10} are reported on Fig. 2. We can notice that all DNA samples can be detected using our nanopore. This was possible because this nanopore

Fig. 3 Histogram of events parameters **(a)** dwell time and **(b)** the relative current blockades. In red T_{40} $n = 3868$ events, in blue A_{40}/T_{40} $n = 4017$ events and in green A_{10}/T_{10} $n = 13,468$ events

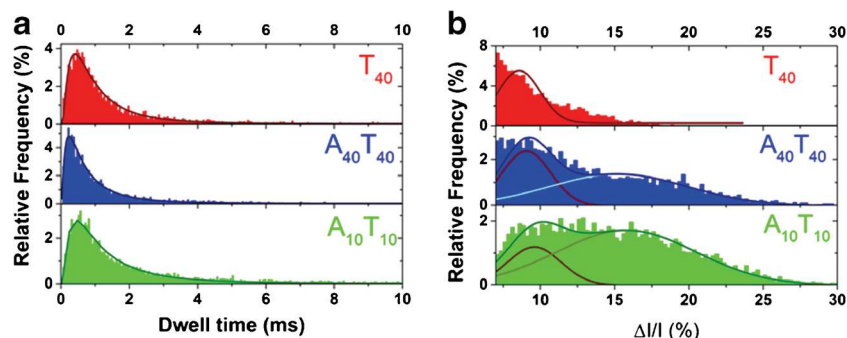


Table 3 Centered value of histogram of events

Sample	Dwell time (ms)	Relative current blockade $\Delta I/I$ (%)	
T ₄₀	0.86	8.5	-
A ₄₀ /T ₄₀	0.65	9.06	15.24
A ₁₀ /T ₁₀	1.07	9.60	15.79

exhibits a tip diameter optimized for the detection. Indeed similar experiments conducted with a larger nanopore (typically diameter larger than 6 nm) cannot permit to extract current blockades. Thus at this stage, our first objective to detect short DNA strands is achieved.

From the current blockades, the dwell time (Δt) and the relative current blockade ($\Delta I/I$) are extracted. Histogram of $\Delta I/I$ and Δt are plotted in Fig. 3. In order to determine the center of each distribution, the $\Delta I/I$ and Δt are fitted using Gaussian and logarithm normal law respectively. For T₄₀, both $\Delta I/I$ and Δt distribution exhibit monomodal distributions centered at 8.5 % and 0.86 ms respectively. For sample containing dsDNA (A₄₀/T₄₀ and A₁₀/T₁₀), the distributions of $\Delta I/I$ are clearly bimodal. The later can be fitted by two Gaussians centered around 9 % and 15 % (Table 3). This bimodal distribution can be assigned to a difference of dsDNA geometry (totally unfolded and double folded) when it enters inside the nanopore. However this assumption is very unlikely regarding the tip diameter which cannot permit the translocation of folded dsDNA. Another assumption can be considered to explain the two $\Delta I/I$ distributions. Indeed, dsDNA (A₄₀/T₄₀ and A₁₀/T₁₀) were obtained by simply mixing polyA and polyT. In this case, both paired AT and unpaired polyA and polyT are in equilibrium in solution. In this case, the low values of $\Delta I/I$ (centered at 9.06 % and 9.60 % for sample A₄₀/T₄₀ and A₁₀/T₁₀ respectively) are assigned to unpaired A or T translocation since the values are close to 8.6 % obtained for T₄₀. The higher value of $\Delta I/I$ around 15 % is assigned to the translocation of paired AT. This assumption is supported by the fact that the diameter of dsDNA is larger than ssDNA and thus takes up more space inside the nanopore. In addition,

a previous study of dsDNA translocation on conical nanopore (tip diameter of 4 nm) reports relative current blockades between 15 to 30 % [21].

As opposed to $\Delta I/I$, the distribution of Δt for A₄₀/T₄₀ and A₁₀/T₁₀ does not clearly show a bimodal distribution. However, the distributions are centered respectively at 0.65 ms and 1.06 ms. To go further in our analysis of the dwell time, the map of events is plotted in Fig. 4. With respect to our previous assumption, the events with low $\Delta I/I$ are considered from ssDNA translocation. A limit value of $\Delta I/I$ can be roughly estimated at 13 % according to the result obtained for T₄₀. Based on this, the dwell time of event corresponding to the highest $\Delta I/I$ value for A₄₀/T₄₀ and A₁₀/T₁₀ are respectively shorter (centered around 0.3 ms) and longer (centered around 1.5 ms) than ssDNA (0.86 ms). This result seems counterintuitive regarding the literature [26]. Indeed, it was commonly reported an increase of the dwell time with the length of the DNA strands [15]. Thus, this point should be clarified. Most studies for DNA detection are performed on SiN nanopore with a thickness smaller than 30 nm corresponding to the length of 91 bp unfold dsDNA. For dsDNA with more than 100 bp, the length of the strand is longer than the nanopore and thus it is the factor which determines its dwell time. In our experiment, the A₄₀/T₄₀ and A₁₀/T₁₀ have unfolded length estimated at 13.2 nm and 3.3 nm respectively. The DNA detection is done in the nanopore zone where the diameter permits it. If we assume that this diameter is 6 nm (the limit where we are able to detect DNA), the corresponding thickness of nanopore zone detection is 158 nm. The latter is more than ten times longer than the DNA length. Regarding that, the key factors which drive the dwell time become the DNA velocity given by the number of charge. Thus, in our configuration, the DNA dwell time inside the nanopore decreases with the number of charges and thus the number of nucleotides as shown by our results.

In order to discuss about the interest of our approach for short DNA strand detection, we can compare our results with the ones reported in the literature on both solid-state and biological nanopore (Table 4). As previously mentioned, DNA detection is commonly performed by SiN nanopore. The latter is limited for the detection of DNA strand with more or less

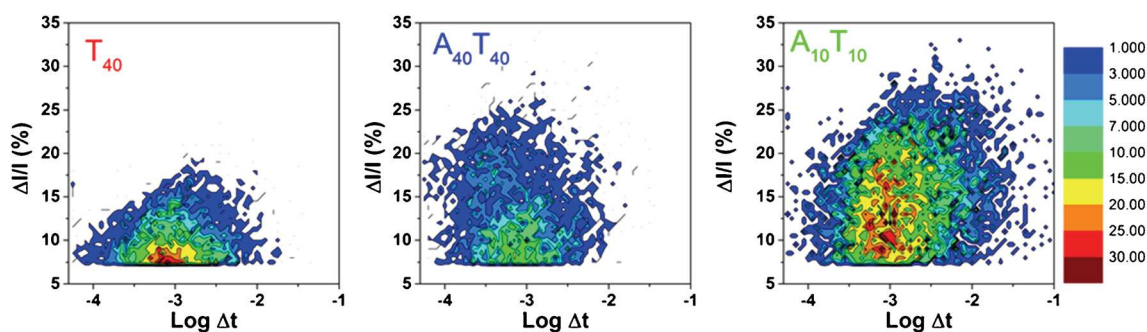
**Fig. 4** Scattered plot of relative current blockade vs dwell time of all events detected

Table 4 Figures of merit of recently reported nanopore-based methods for determination of short DNA

Type of nanopore	Limit of DNA length	Nanopore	Dwell time	Discrimination	Reference
Solid-state	25 bp DNA	SiN	20 μ s	DNA vs RNA	[14]
	35 bp dsDNA	SiN	10 μ s	-	[15]
	25 bp dsDNA	Graphene	12.5 μ s	-	[13]
	10 bp ds DNA	Conical track etched	1.06 ms	ssDNA vs dsDNA (partially)	This work
Biological	1 nucleotide	α - haemolysin mutants	4.3 to 11.6 ms	Nucleotide	[17]
	1 nucleotide	α - haemolysin mutants	7.1 to 19.8 ms	Nucleotide	[18]
	7 nucleotides	α - haemolysin modified with DNA	45 ms	Specific ssDNA sequence	[16]

100 bp. However, the detection of 25 bp dsDNA was reported with a dwell time of 20 μ s [14]. Carson and co-worker [15] have successfully detected dsDNA 35 bp using a high resolution amplifier with a dwell time close to 10 μ s. In the case of graphene nanopore, the dwell time for DNA 25 bp is 12.5 μ s [13]. For all these studies which involved solid-state nanopore, the short dwell time cannot permit to consider the detection of smaller DNA strands. Shorter DNA was only detected by modified biological nanopores [17, 18], since the dwell time can be increased from μ s to ms scale. With low aspect ratio nanopore, the decrease of the electric field induces a strong increase of the dwell-time and permits the detection of DNA of 40 bp and 10 bp with dwell time of 0.85 ms to 1.06 ms. However, this should be moderated by the low relative current blockade (lower than 20 %) which can make difficult the detection of events. The signal-to- noise ratio (SNR) can be calculated from Eq. 2:

$$SNR = \frac{|\Delta I|}{I_{noise,RMS}} \quad (2)$$

where $I_{noise,RMS}$ is calculated from the square root of the integral current power spectral densities (Fig. 1d). The SNR for dsDNA and ssDNA are 4.16 and 2.3 respectively. These values are lower than the one obtained for low aspect ratio SiN nanopore. Indeed under similar conditions, salt concentration (1 M KCl) and tip diameter (3 nm), the expected SNR is upper than 15 [35]. In our case, the $I_{noise,RMS}$ is 12 pA, the weak SNR is directly assigned to the low current blockade ratio induced by short DNA. It is also at the origin of the overlap of $\Delta I/I$ distribution of dsDNA and ssDNA. Thus using this nanopore is not suitable for high resolution analysis i.e. nucleotide discrimination without a strong enhancement of the SNR. In order to improve the SNR, one way should be to reduce the volume where the DNA is detected. This could be achieved with semi-cigare shaped nanopore. Polymer nanopore presents other advantage since the sample is easier to manipulate than biological. Indeed, it does not require painting phospholipid. In addition, it is more robust than SiN or graphene single sheet since the risk to break the window where the SiN is suspended does not exist with

polymer film. Finally, this nanopore is very stable since it can be re-used during more than 3 weeks without alteration.

Conclusion

To sum up our results, we have designed a conical nanopore by the conformal deposition of Al_2O_3 using the ALD technique. This method permits to adjust the tip diameter and the charge of the nanopore in order to optimize the DNA detection. With this optimized nanopore, we have successfully detected short ssDNA made of 40 nucleotides as well as 10mer and 40mer dsDNA (10 nM) with long dwell time of 0.85 ms, 1.07 ms and 0.65 ms respectively. This is possible because of the length of the nanopore (13 μ m) as well as the Al_2O_3 coating that permit to decrease the DNA velocity inside the nanopore. However this long dwell time which facilitates the DNA detection is counterbalanced by a weak SNR of 4.16 and 2.3 for dsDNA and ssDNA respectively. For dsDNA sample prepared in situ before detection, our results permit to consider the discrimination of paired and unpaired DNA strand with an enhancement of the SNR by the modification of the nanopore shape. Regarding that, we hope that these results will permit also to revive track etched nanopore for DNA detection.

Acknowledgments V. Tangaraj has a fellowship of Erasmus Mundus Svaagata. M. Lepoitevin has a PhD fellowship from the French government. Single tracks have been produced in GANIL (Caen, France) in the framework of an EMIR project (P-973-M).

References

1. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW (1996) Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *P Natl Acad Sci USA* 93:13770–13773
2. Branton D, Deamer DW, Marziali A, Bayley H, Benner SA, Butler T, Di Ventra M, Garaj S, Hibbs A, Huang XH, Jovanovich SB, Krstic PS, Lindsay S, Ling XSS, Mastrangelo CH, Meller A, Oliver JS, Pershin YV, Ramsey JM, Riehn R,

- Soni GV, Tabard-Cossa V, Wanunu M, Wiggin M, Schloss JA (2008) The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 26:1146–1153
3. Shi J, Hou J, Fang Y (2015) Recent advances in nanopore-based nucleic acid analysis and sequencing. *Microchim Acta*. doi:10.1007/s00604-015-1503-y
4. Robertson JWF, Rodrigues CG, Stanford VM, Rubinson KA, Krasilnikov OV, Kasianowicz JJ (2007) Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *P Natl Acad Sci USA* 104:8207–8211
5. Kasianowicz JJ, Robertson JWF, Chan ER, Reiner JE, Stanford VM (2008) Nanoscopic porous sensors. *Annu Rev Anal Chem* 1: 737–766
6. Reiner JE, Balijepalli A, Robertson JWF, Campbell J, Suehle J, Kasianowicz JJ (2012) Disease detection and management via single nanopore-based sensors. *Chem Rev* 112:6431–6451
7. Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, Langford KW, Hopper MK, Gillgren N, Pavlenok M, Niederweis M, Gundlach JH (2012) Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nat Biotechnol* 30: 349–353
8. Oukhaled G, Mathe J, Biance AL, Bacri L, Betton JM, Lairez D, Pelta J, Auvray L (2007) Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording. *Phys Rev Lett* 98(15):158101. doi:10.1103/PhysRevLett.98.158101
9. Li J, Yu D, Zhao Q (2015) Solid-state nanopore-based DNA single molecule detection and sequencing. *Microchim Acta*. doi:10.1007/s00604-015-1542-4
10. Apel P (2001) Track etching technique in membrane technology. *Radiat Meas* 34:559–566
11. Li J, Stein D, McMullan C, Branton D, Aziz MJ, Golovchenko JA (2001) Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature* 412: 166–169
12. Merchant CA, Healy K, Wanunu M, Ray V, Peterman N, Bartel J, Fischbein MD, Venta K, Luo ZT, Johnson ATC, Drndic M (2010) DNA translocation through graphene nanopores. *Nano Lett* 10: 2915–2921
13. Freedman KJ, Ahn CW, Kim MJ (2013) Detection of long and short DNA using nanopores with graphitic polyhedral edges. *ACS Nano* 7:5008–5016
14. Wanunu M, Dadosh T, Ray V, Jin JM, McReynolds L, Drndic M (2010) Rapid electronic detection of probe-specific microRNAs using thin nanopore sensors. *Nat Nanotechnol* 5:807–814
15. Carson S, Wilson J, Aksimentiev A, Wanunu M (2014) Smooth DNA transport through a narrowed pore geometry. *Biophys J* 107:2381–2393
16. Howorka S, Cheley S, Bayley H (2001) Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nat Biotechnol* 19:636–639
17. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H (2009) Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol* 4:265–270
18. Astier Y, Braha O, Bayley H (2006) Toward single molecule DNA sequencing: direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *J Am Chem Soc* 128:1705–1710
19. Cabello-Aguillar S, Balme S, Abou-Chaaya A, Bechelany M, Balanzat E, Janot JM, Pochat-Bohatier C, Miele P, Dejardin P (2013) Slow translocation of polynucleotides and their discrimination by α -hemolysin inside a single track-etched nanopore designed by atomic layer deposition. *Nanoscale* 5:9582–9586
20. Wharton JE, Jin P, Sexton LT, Home LP, Sherrill SA, Mino WK, Martin CR (2007) A method for reproducibly preparing synthetic nanopores for resistive-pulse biosensors. *Small* 3:1424–1430
21. Mara A, Siwy Z, Trautmann C, Wan J, Kamme F (2004) An asymmetric polymer nanopore for single molecule detection. *Nano Lett* 4:497–501
22. Harrell CC, Choi Y, Home LP, Baker LA, Siwy ZS, Martin CR (2006) Resistive-pulse DNA detection with a conical nanopore sensor. *Langmuir* 22:10837–10843
23. Kecici K, San N, Kaya D (2015) Nanopore detection of double stranded DNA using a track-etched polycarbonate membrane. *Talanta* 144:268–274
24. Heins EA, Siwy ZS, Baker LA, Martin CR (2005) Detecting single porphyrin molecules in a conically shaped synthetic nanopore. *Nano Lett* 5:1824–1829
25. Lepoitevin M, Coulon P-E, Bechelany M, Cambedouzou J, Janot JM, Balme S (2015) Influence of nanopore surface charge and magnesium ion on PolyAdenosine translocation. *Nanotechnology* 26:144001
26. Balme S.; Picaud F.; Manghi M.; Palmeri J.; Bechelany M.; Cabello-Aguillar S.; Abou-Chaaya A.; Miele P.; Balanzat E.; Janot J. M. (2015) Ionic transport through sub 10 nm hydrophobic nanopore: experiment, theory and simulation. *scientific reports* 5: 10135
27. Bechelany M, Balme S, Miele P (2015) Atomic layer deposition of biobased nanostructured interfaces for energy, environmental and health applications. *Pure Appl Chem* 87:751–758
28. Chen P, Mitsui T, Farmer DB, Golovchenko J, Gordon RG, Branton D (2004) Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores. *Nano Lett* 4:1333–1337
29. Chen P, Gu JJ, Brandin E, Kim YR, Wang Q, Branton D (2004) Probing single DNA molecule transport using fabricated nanopores. *Nano Lett* 4:2293–2298
30. Venkatesan BM, Shah AB, Zuo JM, Bashir R (2010) DNA sensing using nanocrystalline surface-enhanced Al₂O₃ nanopore sensors. *Adv Funct Mater* 20:1266–1275
31. Harrell CC, Lee SB, Martin CR (2003) Synthetic single-nanopore and nanotube membranes. *Anal Chem* 75:6861–6867
32. Ramirez P, Gomez V, Cervera J, Nasir S, Ali M, Ensinger W, Mafe S (2015) Energy conversion from external fluctuating signals based on asymmetric nanopores. *Nano Energy* 16:375–382
33. Lichty P, Kreider P, Kilbury O, King D, Weimer AW, Wirz M, Steinfeld A, Dinair D (2013) Surface modification of graphite particles coated by atomic layer deposition and advances in ceramic composites. *Int J Appl Ceram Technol* 10:257–265
34. Kim YR, Min J, Lee IH, Kim S, Kim AG, Kim K, Namkoong K, Ko C (2007) Nanopore sensor for fast label-free detection of short double-stranded DNAs. *Biosens Bioelectron* 22:2926–2931
35. Smeets RMM, Keyser UF, Dekker NH, Dekker C (2008) Noise in solid-state nanopores. *P Natl Acad Sci USA* 105:417–421

Résumé

Un nanopore artificiel est une ouverture de taille nanométrique faite dans un film mince synthétique (polymère ou inorganique). Un nanopore unique peut être considéré comme l'élément simple constitutif d'une membrane. Les récentes avancées dans ce domaine ont ouvert des opportunités pour développer des outils pour la détection de molécules cibles à faible concentration (fmol L^{-1}), en temps réel. Les nanopores artificiels s'inspirent des canaux biologiques situés dans la membrane cellulaire. Ces derniers permettent le transport d'ions ou de molécules entre les milieux intra- et extra-cellulaires, grâce à leurs fortes sélectivités ou leurs propriétés d'ouverture/fermeture. Comparé à leurs homologues biologiques, les limitations des nanopores solides sont leurs manques de sélectivité et de réponse aux stimuli extérieurs. Toutefois, les nanopores solides ont l'avantage d'être beaucoup plus résistant, robuste et facile à manipuler que les pores biologiques. Ainsi la fonctionnalisation de leur surface, avec des systèmes plus ou moins complexes, permettrait d'améliorer à la fois leurs propriétés de transport sélectif, leurs capacités de détection de biomolécules ou encore d'étudier plus précisément les mécanismes fondamentaux du transport des macromolécules en milieu confiné.

Dans cette thèse, nous avons conçu dans un premier temps des nanopores bi-fonctionnels, répondant au pH, et à l'attache d'un ligand. Pour fabriquer ces nanopores bi-fonctionnels, nous avons utilisé un système biotine-avidine fixé dans des nanopores polymères. Nous avons démontré qu'il est possible de moduler l'ouverture et la fermeture du nanopore avec le pH de façon réversible. De plus, il est possible de détecter des protéines biotinylées et des anticorps par l'analyse des rectifications de courant. Le principal défaut de cette stratégie est son irréversibilité. En utilisant une stratégie similaire combinée avec des polyélectrolytes, nous avons obtenu des fonctionnalisations réversibles. Ils permettent de moduler la sélectivité ionique du pore et les propriétés de conduction en fonction du pH et de ligand. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux questions fondamentales de la translocation de polynucléotide, plus précisément de l'analyse de l'influence de l'état de surface du nanopore (hydrophobicité, charge), dans les conditions où la distance de Debye devient équivalente au diamètre du nanopore. Nous avons démontré que si le nanopore présente la même charge que la PolyAdénosine et la PolyCytosine, la vitesse de passage de la molécule augmente et la barrière globale d'énergie d'entrée du nanopore diminue par rapport au nanopore non-chargé hydrophobe. Ensuite, en modifiant la surface d'un nanopore en PET, nous avons montré qu'il est possible de détecter des brins simples et doubles d'ADN très courts (10 à 40 bases). Enfin, nous avons tenté une fonctionnalisation de nanopores pour éviter l'adsorption non spécifique des protéines afin d'étudier la translocation de longs fibrilles d'amyloïdes de lysozyme. Cet objectif n'a pas été complètement atteint compte tenu des résultats qui ne permettent pas d'affirmer quand au passage des molécules à travers le pore.

Dans cette thèse nous nous sommes attachés à montrer l'intérêt et la nécessité de fonctionnaliser les pores, aussi bien pour obtenir des nanopores biomimétiques stimuli-répondants (pH et ligand) ou anti-bioadhérants que pour des études fondamentales de transport. Il est également facile de transposer cette technique à des membranes multipores. Il est donc possible de concevoir des membranes optimisées pour des applications de séparation ionique, de capture de molécules cibles ou plus généralement de filtration.

Abstract

Artificial nanopores are nanometer sized aperture made in synthetic thin films (polymer or inorganic). A single nanopore can be considered as a constitutive element from membranes. Recent advances in this field are bringing new tools for real time detection of target molecules at low concentration (fmol L^{-1}). Biological channels inside the cell membrane are used as models to design solid-state nanopores. They allow ions or molecules transport through intra- and extra-cellular side, thanks to their high selectivity and their gating properties. Compared to their biological counterparts, limitations of the synthetic nanopores are their lack of selectivity and unresponsiveness towards external stimuli. However, the solid state presents several advantages compared to the biological ones, such as nanopores robustness, the control of the number of pores and a long lifetime (several days or weeks). Thus their surface functionalization would increase their selective transport properties, their abilities to detect biomolecules or to study more in details their fundamental mechanisms.

In this thesis, we design first bi-functional nanopores, pH- and ligand-gated. To do it, we used biotin-avidin system grafted inside a polymeric nanopore. We demonstrated that it is possible to reversibly gate the nanopore with pH modulation. Moreover, we are able to detect protein labeled with biotin and antibodies by analyzing the current rectification. The major drawback comes from the irreversibility of its covalent bonds. By using a similar concept combined with polyelectrolytes, we obtain a reversible functionalization. Depending on the ligand, the ionic selectivity and the conduction properties can be modulated. Next, we focused on fundamental questions regarding polynucleotides translocation, and more precisely on the influence of the surface state of the nanopore (hydrophobicity, charge) when the Debye distance is similar to the pore diameter. We show that if the nanopore has the same charge as the polyAdenosine or polyCytosine, the translocation time decreases, and the energy barrier of entrance decreases compared to an uncharged hydrophobic nanopore. Then, by modifying the surface of the nanopore made in PET film, we are able to detect short single and double strand of DNA (10 to 40 bases). Finally, we tried to functionalize PET nanopores to avoid unspecific adsorption of proteins and to study the translocation of long fibrils of amyloids from lysozyme. This goal has not been entirely reach since we cannot claim that the fibrils translocate through the pore.

In this thesis we show the interest and the need to functionalize the nanopores, to obtain biomimetic stimuli-responsive (pH and ligand), to avoid unspecific adsorption or to study transport properties with the nanopore. It is easy to upscale those techniques to multipores membranes. Thus it is possible to design membranes to enhance their ionic separation, target molecule detection or more generally filtration applications.