



HAL
open science

Transport directionnel dans un nanopore

Bastien Molcrette

► **To cite this version:**

Bastien Molcrette. Transport directionnel dans un nanopore. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSEN054 . tel-03445785

HAL Id: tel-03445785

<https://theses.hal.science/tel-03445785v1>

Submitted on 24 Nov 2021

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.



Numéro National de Thèse : 2021LYSEN054

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée par

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 52

Physique et Astrophysique de Lyon (PHAST)

Discipline : Physique

Soutenue publiquement le 25/10/2021, par :

Bastien MOLCRETTE

Transport directionnel dans un nanopore

Devant le jury composé de :

Aleksandra RADENOVIC, Professeure à l'EPFL - Rapporteur

Jean-François JOANNY, Professeur au Collège de France - Rapporteur

Christophe YBERT, Directeur de recherche à l'Institut Lumière Matière - Examineur

Kirone MALLICK, Directeur de recherche à l'IPhT Saclay - Examineur

Fabien MONTEL, Chargé de recherche HDR à l'ENS de Lyon - Directeur de thèse

Remerciements

Trois semaines se sont écoulées depuis ma soutenance et je ne prends qu'à présent le temps de coucher par écrit ces quelques mots de gratitude pour les personnes m'ayant soutenu durant ces trois années de thèse.

Pour commencer, je tiens à remercier mon jury de thèse, soit Aleksandra Radenovic et Jean-François Joanny en tant que rapporteurs ainsi que Christophe Ybert et Kirone Mallick en tant qu'examinateurs, pour leur patience, leur écoute et leur bienveillance à mon égard, que ce soit lors de nos échanges épistolaires ou lors de la soutenance elle-même. J'ai beaucoup apprécié la discussion que nous avons pu avoir à l'issue de ma présentation.

Ensuite, le navire n'aurait pas pu aller bien loin sans un capitaine d'exception, mon directeur de thèse Fabien Montel. Dès notre première rencontre, à l'occasion de mon projet expérimental de M1, Fabien m'est apparu comme une personne très chaleureuse et débordante d'humanité; Fabien a tout de suite su me partager son enthousiasme de la biophysique et la beauté de la science bien faite. J'ai été absolument ravi de pouvoir réaliser ma thèse sous sa direction; à travers sa bonne humeur quotidienne et sa bienveillance à toute épreuve, Fabien s'est révélé être un directeur de thèse exceptionnel, toujours disponible et à l'écoute de toutes mes suggestions, même les plus farfelues! Aujourd'hui, je pars vers de nouveaux horizons, m'enfonçant un peu plus dans la jungle de la biologie, mais j'y vais d'un pas confiant grâce aux enseignements de ma thèse. Merci Fabien d'avoir eu confiance en moi lorsque j'ai toqué à ta porte il y a trois ans. Même si on a compté beaucoup de flashes depuis, les plus beaux sont certainement ceux qu'on avait dans les yeux face à la beauté de notre science.

Pour compléter l'équipage, Léa était la personne parfaite. Son dynamisme et sa générosité ont été un véritable rayon de soleil dans mon travail quotidien. Merci Léa pour ton soutien tout au long de ma thèse, j'ai adoré travailler à tes côtés ainsi que nos sorties culinaires; bien plus qu'une collègue, j'ai trouvé une amie dans notre collaboration au labo. Je te souhaite un bon courage pour ta dernière année, tu vas voir, ça passe vite; on se donne rendez-vous l'année prochaine pour ta soutenance, qui, j'en suis certain, sera fantastique!

Pas tout à fait dans l'équipe Nanopore mais au coeur de la biophysique au laboratoire, je profite de la place qui m'est donnée ici pour remercier tout particulièrement Cendrine Moskalenko, sans qui toute mon aventure en biophysique n'aurait probablement jamais eu lieu. Cendrine m'a fait confiance dès le début de mon aventure à l'ENS lorsqu'elle m'a accepté pour son projet de stage sur les R-Loops; c'est à partir de là que tout a commencé. Cendrine fait sans aucun doute partie des personnes les plus adorables que j'ai eues la

chance de rencontrer ; sa bienveillance et ses qualités humaines me sont apparues dès notre première rencontre. Cendrine a été mon mentor durant toute ma scolarité à l'ENS, elle était toujours disponible pour répondre à mes interrogations, toujours présente pour me prodiguer ses meilleurs conseils. Je souhaite à tous les étudiants de France et de Navarre de trouver leur Cendrine à eux. Merci Cendrine pour ton dévouement et la passion que tu m'as transmise.

Dans ce paragraphe, je remercie plus globalement tous les acteurs ayant contribué de près ou de loin à la réussite de mon projet de thèse, par leur aide dans mon travail, leurs conseils ou tout simplement leur présence : Christophe Place (merci pour ta bienveillance depuis notre première rencontre autour du TIRF et pour ta confiance à propos du projet Japon), Sigolène Lecuyer, Eric Freyssingéas et Martin Castelnovo (équipe de biophysique du laboratoire) ; Nicolas Terrier, Jérôme Degouttes et Patrick Pittet, pour leur accueil et leur aide lors de mes sessions de dépôt d'or en salle blanche ; Céline Freton pour m'avoir formé et aidé lors de mes sessions de mesures MST ; l'ensemble des membres de Lumicks et plus particulièrement Zsombor Balassy et Aida Llauro Portell pour leur aide lors de nos mesures en pinces optiques ; Yeraldinne Carrasco-Salas pour sa bonne humeur communicative, son aide lors de mon traitement d'image et son expertise en AFM ; Benjamin Laplace, Jérémy Ferrand et Kennedy Nixon Chagua Encarnacion mes anciens collègues de bureau ; l'ensemble des doctorants et postdocs du laboratoire, avec une pensée toute particulière pour les habitués du café-passerelle le midi dont je faisais partie : David Dumont, Eric Brillaux, Jérémy Sautel, Lucas Méthivier, Hélène Piot-Durand, Léo Mangeolle, Thomas Boquet, Aubin Archambault, Thomas Basset, Simon Vincent, Baptiste Bermond, François Liénard, Ariane Gayout, Salambô Dago, Théophile Remond, Baptiste Ferrero, Raphaël Menu, Marcelo Guzman, Alex Fontana, Lucas Menou, Laura Lemahieu, Jérôme Thibaut, Richard Pedurand, Pauline Husseini, Clément Toupoint et tous les autres... Un grand merci également au service administratif du laboratoire, notamment Laurence Mauduit et Fatiha Bouchneb, ainsi qu'au service informatique et plus globalement à toutes les personnes travaillant au sein du laboratoire et participant à la qualité et au confort qui y règne.

J'ai également une pensée pour tous les acteurs de l'école doctorale PHAST, qui m'ont fait confiance pour la réussite de cette thèse, ainsi qu'à tous ceux ayant contribué à ma formation lors de mon parcours au département de physique de l'ENS Lyon : professeurs, correcteurs de TD, encadrants de TP, service administratif...

Difficile d'écrire mes remerciements sans citer les acteurs de mon monde en dehors du travail : le sport ! Qu'aurait été ma thèse sans mes séances de sport, sans mes sessions de boxe ? Je tiens à remercier ici mes entraîneurs, Franck Ménéroud et Matthieu Quidu. Franck m'a appris les bases de la boxe à travers son cours de savate à l'ENS. Je pense avoir loupé moins de cours de savate sur mes quatre années de boxe qu'il n'y a de doigts sur une main. Au début de ma deuxième année de thèse, j'ai toqué au cours de MMA du jeudi après-midi avec Matthieu ; je ne savais alors pas où ce simple élan me mènerait. Quelques mois plus tard, je participai au championnat de France de kick-boxing universitaire et terminai vice-champion de France. Je pense pouvoir dire que la boxe a changé ma vie, elle m'a apporté tellement de choses nouvelles. Je ne regrette qu'une seule chose, c'est de ne pas avoir débuté plus tôt, tant les bienfaits sont grands. Merci Franck et Matthieu de proposer une telle qualité d'enseignement sur le noble art. Merci d'avoir été là lors de mes moments difficiles et de m'avoir poussé toujours plus loin, dans ma pratique de la boxe,

dans mon travail, dans ma vie. Merci également à tous mes partenaires d'entraînement, à mon équipe, Gabriel, Pierre, Tanguy, Johanne, Fred, aux champions passés et ceux à venir.

Un grand merci aux musiciens que j'ai côtoyés à la fanfare de l'ENS Lyon et plus particulièrement à Jason Reneuve, Thomas Kosc, Camille Eloy, Lucas Reneuve et Grimaud Pillet. J'ai découvert à la fanfare une tout autre manière de jouer et d'appréhender la musique, beaucoup plus libre et personnelle que celle que je connaissais auparavant. J'ai adoré notre quartet de trompette et je garde un souvenir impérissable de nos prestations. Je souhaite à chaque musicien de trouver le plaisir de jouer qui a été le mien durant mes années à la fanfare.

A tous mes amis : Antoine, pour toutes nos sorties culinaires, nos sessions de sport, nos balades interminables et nos discussions et envolées philosophiques ; je suis heureux pour toi Frérot que tu aies trouvé une situation sympathique, tu le mérites. A Thomas, pour ton extrême gentillesse et ta grandeur d'âme, pour toutes ces sorties billards et toutes ces soirées partagées ; je suis heureux également que tu aies trouvé ta place en tant que professeur, le monde serait meilleur avec plus d'enseignants comme toi. A Guillaume, Etienne, Léon, Léo, Georges, Marie, Paul, Simon et Maxen, mes amis rencontrés à Lyon ; pour toutes nos sorties, soirées et moments du quotidien, nos parties de baby-foot, tous les jeux auxquels on a joué ensemble ; vous serez toujours les bienvenus chez moi ; à chacun, je souhaite une très grande réussite dans vos projets personnels et professionnels et espère par-dessus tout que vous vous épanouirez dans votre vie. A mes anciens coloc, Maxime, Constance, Julia et Laetitia ; le temps a passé mais je ne vous ai pas oubliés et je garde un souvenir précieux de notre vie commune à mon arrivée à l'ENS. Une pensée également pour Eric et Melvin, mes amis d'avant ma vie à Lyon ; là-encore, je ne donne sûrement pas assez de nouvelles mais je pense bien à vous et espère vous revoir très vite. Concernant des rencontres un peu plus récentes, je remercie Lucie, Sophie, Constance et Florian pour toutes nos soirées jeux sur Discord et nos sorties dans Lyon ; tout cela a pas mal changé ma vie, comme quoi il n'y aura pas eu que du négatif dans les périodes de confinement...

A ma famille : mes parents, Sylvie et Laurent, pour leur soutien depuis toujours, pour m'avoir permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui, pour avoir façonné ma route et donné l'élan nécessaire à ma course pour voler à présent de mes propres ailes. Votre fils est fier de ses racines, fier de sa famille et je porterai nos valeurs aussi loin qu'il me sera permis d'aller. A mes soeurs, Alice et Laura, dont je suis extrêmement fier ; leur engagement dans le soin aux autres est le plus beau d'entre tous et est à l'image des belles personnes qu'elles sont. Je suis très heureux pour vous d'avoir trouvé le bonheur respectivement avec Benjamin et Gauthier ; j'ai une pensée toute particulière pour mes deux nièces Anna et Zélie, qui sont absolument adorables ! Tonton est fier de ses nièces ! J'adresse également mes pensées les plus affectueuses plus globalement à toute ma famille, à mes grands-mères Madeleine et Marie-Agnès, à mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, aux amis de la famille qui m'ont soutenu. Une pensée toute spéciale pour mes arrière-grands-parents André et Simone, dont l'absence me pèse, ainsi que mon grand-père Charles, à qui je dédie ce manuscrit : physicien par passion, je sais qu'il aurait aimé être présent lors de ma thèse ; je suis certain qu'il a assisté à ma soutenance de là-haut...

A Marine, mon âme soeur, pour ton amour, ton soutien quotidien, pour ta bienveillance, pour ton humour, pour ta présence... Toi seule connaît les secrets de mon ouvrage comme celui de mon coeur et je rends ici hommage à notre vie commune, à tous nos

Remerciements

moments passés et tous ceux qui viendront ; à cette belle vie qui se profile devant nous et au bonheur de t'aimer.

Enfin à vous, lecteurs, qui que vous soyez ; ne baissez jamais les bras, soyez fiers et incarnez-vous dans ce que vous êtes de meilleur. Battez-vous pour ce qui a de la valeur pour vous et soyez épanouis dans votre vie.

A mon grand-père Charles,
aux curieux des sciences et d'esprit,
à nos rêves.



Prometheus bringt der Menschheit das Feuer, Friedrich Heinrich Füger (1817).

Abstract :

Some natural systems known as Brownian ratchets use thermal fluctuations to extract mechanical power. In these systems, diffusion is biased in order to achieve unidirectional biological processes. Good examples are the molecular motors as kinesins or myosins that walk on the cytoskeleton and use ATP to bias their movement. Another case is the transport of mRNA between the nucleus and the cytoplasm through Nuclear Pore Complexes (NPC). The NPC is a large molecular complex which selects molecules that enter or exit the nucleus. It has been shown to be highly selective and directional. To study the directional transport of biomolecules through the NPC, a simplified mimetic device based on nanoporous membranes was designed. Our approach used near-field microscopy technique, Zero Mode Waveguide for Nanopores. With this method single DNA molecules translocation through nanopores was observed in real time. Ratchet agents which are polycations that bind strongly to the DNA and cannot diffuse through the pore were added on the exit side of the membrane. We quantified the effect of the ratchet agent on the translocation frequency of DNA molecules and established the proof of principle of the translocation ratchet. From these measurements, we defined a ratchet efficiency that we characterized according to its geometrical and kinetics parameters and compared with coarse grained modeling. We observed a critical length of 3 kbp for the DNA molecule to trigger the ratchet effect, that we explained according to a DNA loop formation model.

Résumé :

Il existe dans la nature des systèmes connus sous le nom de ratchets browniens qui utilisent les fluctuations thermiques pour extraire un travail mécanique. Dans ces systèmes, la diffusion est biaisée de manière à rendre possible des processus biologiques unidirectionnels. Les moteurs moléculaires en sont de bons exemples, comme la kinésine et la myosine qui se déplacent sur le cytosquelette et utilisent l'ATP pour biaiser leurs mouvements. Un autre cas est le transport d'ARNm entre le noyau et le cytoplasme à travers le pore nucléaire (NPC). Le pore nucléaire est un complexe moléculaire massif sélectionnant les molécules qui peuvent entrer ou sortir à travers le noyau. Le pore nucléaire a été prouvé comme très sélectif et directionnel. Pour étudier la directionnalité du transport de biomolécules à travers le pore nucléaire, nous avons développé un système simplifié mimétique basé sur les membranes nanoporeuses. Notre approche s'est basée sur une technique de microscopie de champ proche, le Zero-Mode Waveguide pour nanopores. Avec cette méthode, nous avons observé la translocation en temps réel de molécules d'ADN uniques à travers des nanopores. Des agents de ratchet, constitués de polycations se liant fortement à l'ADN et ne pouvant pas diffuser à travers le pore, ont été ajoutés à la sortie des nanopores. Nous avons quantifié l'effet de ces agents de ratchet sur la fréquence de translocation des molécules d'ADN et mis en évidence le fonctionnement expérimental du mécanisme de ratchet de translocation. A partir de ces mesures, nous avons défini une efficacité de ratchet que nous avons caractérisée par rapport à ses paramètres géométriques et cinétiques puis nous l'avons comparée à des modèles phénoménologiques. Nous avons notamment observé l'existence d'une longueur critique de 3 kbp pour la taille de la molécule d'ADN pour activer l'effet de ratchet, ce que nous avons expliqué à partir d'un modèle de formation de boucles d'ADN.

Table des matières

I	Introduction	1
1	Transport membranaire dans les cellules	3
1.1	Transport passif	5
1.1.1	Transport diffusif à travers la membrane	5
1.1.2	Diffusion à travers un pore protéique	6
1.2	Transport actif	9
1.2.1	Classifications	9
1.2.2	Transporteurs actifs primaires	9
1.2.3	Transporteurs actifs secondaires	10
1.2.4	Transporteurs actifs d'acides nucléiques et de protéines	11
1.3	Ratchet brownien	12
1.3.1	Machine <i>Ratchet and pawl</i>	12
1.3.2	Ratchet de translocation	17
2	Les translocons	27
2.1	Généralités	27
2.2	Translocases à Hsp70	28
2.2.1	Hsp70	28
2.2.2	Complexe Sec61/SecYEG	31
2.2.3	Complexe TIM/TOM	38
2.2.4	Complexe TIC/TOC	42
2.3	Pilus type IV et complexe PilQ	43
2.3.1	Conjugaison	45
2.3.2	Transduction	45
2.3.3	Transformation	45
2.4	Résumé sur les translocons	50
2.5	Pore nucléaire	51
2.5.1	Structure du pore nucléaire	51
2.5.2	Cycle d'import/export et bi-directionnalité	52
2.5.3	Sélectivité du pore nucléaire	53
2.5.4	Modèles pour le mécanisme de transport à travers le réseau de FG-Nups	54
2.5.5	Pore nucléaire et directionnalité	60
2.5.6	Applications technologiques	67
3	Physique des polymères confinés	69
3.1	Généralités sur la physique des polymères	69

3.1.1	Modèle de la chaîne idéale	70
3.1.2	Modèle Worm Like Chain	71
3.1.3	Modèles de chaîne à volume exclu	74
3.2	Physique des polymères confinés	78
3.2.1	Notion de blob	80
3.2.2	Régime de Odijk	82
3.2.3	Observations expérimentales	83
3.3	Physique de la translocation de polymère dans des nanopores	85
3.3.1	Modèle de barrière de Kramers	85
3.3.2	Modèle de translocation de Muthukumar	86
3.3.3	Théorie de la propagation de tension	89
3.3.4	Modèle de succion	98
3.4	Simulations de ratchet de translocation	108
3.4.1	Étude d'Elston	108
3.4.2	Étude de Zandi <i>et coll.</i>	109
3.4.3	Étude de Suhonen et Linna	110
3.4.4	En résumé	112
II	Méthodes	115
1	Microscopie à effet Zero-Mode Waveguide pour nanopores	117
1.1	Effet Zero-Mode Waveguide	117
1.1.1	Principes généraux de l'effet Zero-Mode Waveguide	117
1.1.2	Expérience de Levene <i>et coll.</i>	119
1.1.3	Développement	120
1.1.4	Applications	125
1.2	Mise en place expérimentale d'un ratchet de translocation artificiel	127
1.2.1	Membranes track-etched et métallisation	128
1.2.2	Molécules d'ADN	133
1.2.3	Polycations	135
1.2.4	Fabrication des bouchons pour la translocation	137
1.2.5	Montage expérimental pour la microscopie ZMW	137
1.2.6	Analyse des données	141
2	Microscale Thermophoresis	143
2.1	Généralités sur la thermophorèse	143
2.2	Microscale Thermophoresis	147
2.3	Comparaison de la MST avec les autres techniques de mesure de K_d	149
III	Résultats	153
1	Translocation d'ADN par mécanisme de ratchet de translocation	155
1.1	Preuve de principe du ratchet de translocation	155
1.1.1	Protocole expérimental	155
1.1.2	Résultats préliminaires	158

1.1.3	Rejet de l'hypothèse osmotique	161
1.2	Relation entre la fréquence de translocation et la concentration en agents de ratchet	163
1.2.1	Cas du PEI	163
1.2.2	Introduction du rendement du ratchet Y	166
1.2.3	Protocole expérience à pression fixe	168
1.2.4	Résultats	169
1.3	Rendement de ratchet Y selon l'agent de ratchet	171
1.4	Relation entre le rendement de ratchet Y et la constante de dissociation K_d	173
1.4.1	Mesures de K_d par MST	175
1.4.2	Rendement de ratchet Y en fonction de K_d	179
1.4.3	Modèle cinétique du ratchet de translocation	181
1.5	Rendement de ratchet Y en fonction de la taille du nanopore	183
1.6	Rendement de ratchet Y en fonction de la longueur de la molécule d'ADN	188
1.6.1	Modèle phénoménologique du ratchet de translocation	192
1.6.2	Observation des boucles d'ADN par pinces optiques	199
1.7	Ratchet de translocation par effet mauvais solvant	204
1.7.1	Ratchet par mauvais solvant : un problème débattu	204
1.7.2	Dispositif expérimental	205
1.7.3	Effet de ratchet de translocation par 2-propanol	206
1.7.4	Effet de ratchet de translocation par PEG	210
1.7.5	En résumé	212
2	Translocation d'ADN simple brin	213
2.1	Protocole expérimental	214
2.1.1	ADN avec structures secondaires utilisés dans nos expériences	214
2.1.2	Préparation des molécules d'ADN	214
2.1.3	Déroulement de l'expérience	215
2.2	Translocation d'ADN simple brin avec structures secondaires	216
2.3	Translocation d'ADN simple brin en présence de dNTP	220
2.4	Modèle d'unzipping	222
2.4.1	Développements théoriques du modèle d'unzipping	222
2.4.2	Validation expérimentale du modèle d'unzipping	224
2.4.3	Mesures de K_d et k_{off}	225
2.4.4	Généralisation du modèle d'unzipping	226
2.4.5	Conclusion	228
2.5	ADN simple brin et ratchet de translocation	228
2.5.1	Protocole	229
2.5.2	Ratchet de translocation et structures secondaires	229
2.5.3	Effet de l'héparine sur le ratchet de translocation avec ADN λ dénaturé	232
2.5.4	Translocation d'ADN Φ X et M13mp18 en présence de PEI	234
	Projet Annexe : Switchable Nanopores by Cononsolvency Effect	237

Première partie

Introduction

Transport membranaire dans les cellules

La cellule, unité de base de la structure du monde vivant, s'organise en compartiments : en premier lieu sa couche externe, appelée membrane plasmique, formée d'une bicouche lipidique et délimitant les contours de la cellule (Fig.1.1). La cellule est un système ouvert, elle nécessite des échanges permanents entre son milieu intérieur et son environnement pour le maintien de son métabolisme : eau, sucres, ions, protéines, lipides, etc.

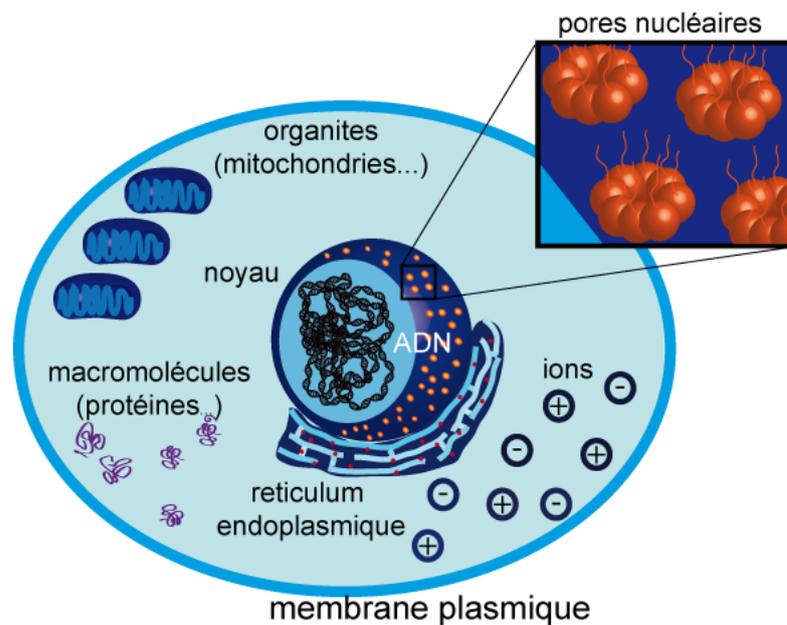


FIGURE 1.1 – Organisation d'une cellule eucaryote.

La cellule peut également posséder des sous-compartiments autres que sa membrane plasmique ; on les appelle organites, car ils sont à la cellule ce que les organes sont au corps humain : des sous-unités compartimentées et assurant une fonction spécifique (Fig.1.1). Le plus connu d'entre eux est le noyau cellulaire, donnant la famille des eucaryotes ("qui possèdent un noyau"), en comparaison aux procaryotes ("qui ne possèdent pas de noyau"). Le noyau cellulaire est le centre de contrôle de la cellule, il contient l'information génétique, l'ADN (acide désoxyribonucléique), un copolymère structuré en double hélice et constitué

de la répétition de monomères d'adénine, de thymine, de cytosine et de guanine (A,T,C,G), appelés bases. Ces bases sont complémentaires deux à deux (A-T et C-G) entre les deux brins formant la double hélice. Les bases s'organisent en séquences appelées gènes, chaque gène servant à la production d'une protéine spécifique. Les protéines sont des polymères d'acides aminés exerçant des fonctions diverses nécessaires au métabolisme de la cellule. Il existe un grand nombre d'organites, selon les espèces, comme les mitochondries (Fig.1.1), qui sont les centrales énergétiques de la cellule et responsables de la production d'ATP via la respiration cellulaire. L'ATP (adénosine triphosphate) est une petite molécule de 507 Da utilisée par la cellule comme source d'énergie chimique pour catalyser la majorité des réactions biologiques, comme la synthèse des protéines (traduction) ou le transport actif de molécules à travers la cellule. Pour cela, l'ATP hydrolyse son groupe phosphate terminal, ce qui libère entre 20 et 30 $k_B T$, selon l'environnement physiologique[1] (1 $k_B T$ correspond à l'énergie thermique accessible dans un bain thermostaté à une température T : à température ambiante, soit 25°C, on a 1 $k_B T = 4,114$ pN.nm).

Le plus souvent, les molécules ne sont pas produites au niveau de leur site d'action, ou elles doivent d'abord passer par un certain nombre de transformations avant d'acquies leur forme physiologique. C'est le cas par exemple des ARNs (acides ribonucléiques), copies simple brin de portions d'ADN génomique (à l'intérieur du noyau), servant de codes pour la synthèse des protéines hors du noyau au niveau des ribosomes. Par conséquent, le transport de ces molécules d'un compartiment à l'autre de la cellule est une étape essentielle au métabolisme cellulaire.

Du fait de la barrière physique que constituent les membranes biologiques, la cellule a développé un grand nombre de stratégies spécifiques selon le type de molécules à transporter, associées à des canaux de translocations adéquats. Ces canaux sont des complexes protéiques transmembranaires qu'on appelle translocons. Le chapitre 2 de ce manuscrit est exclusivement consacré à la description des translocons les plus étudiés de la littérature. Parmi les stratégies de translocation développées par la cellule, on distingue 2 mécanismes de transport distincts : la diffusion simple (ou transport passif) et le transport actif. La différence entre les deux vient du sens de la translocation par rapport aux potentiels chimiques de part et d'autre de la membrane. La différence de potentiels chimiques est donnée par la relation de Nernst :

$$\Delta\mu = k_B T \ln \left(\frac{C_1}{C_2} \right) + z.e (V_1 - V_2), \quad (1.1)$$

où C_1/C_2 et V_1/V_2 sont respectivement les concentrations et potentiels du soluté de part et d'autre de la membrane et $z.e$ est sa charge électrique ; pour les espèces neutres, $z = 0$ (z : valence de la charge). On peut établir une différence de potentiel typique ΔV^* en comparant l'énergie thermique $k_B T$ et la charge élémentaire e , ce qui donne $\Delta V^* = k_B T/e \simeq 25$ mV. Avec cette échelle, un transport de charge s'effectuant sous champ électrique nécessite une différence de potentiel supérieure à 25 mV pour compenser l'agitation thermique.

Dans le cas du transport passif, le soluté diffuse dans le profil d'enthalpie libre et descend le gradient électrophorétique. A l'inverse, dans le transport actif, le soluté remonte le profil d'enthalpie libre et doit ainsi franchir une barrière dont la hauteur est fixée par la différence de potentiels chimiques donnée dans l'équation (1.1).

Le gradient électrophorétique n'est pas la seule composante de la barrière énergétique dans le cas du transport actif, le confinement du soluté dans le pore durant la translocation

réclame un coût entropique. Cette composante entropique est d'autant plus grande que le rapport d'échelle entre le soluté et le diamètre du pore est proche de 1 et que le confinement nécessite un changement de conformation du soluté, comme la dénaturation d'une protéine par exemple. Dans le cas d'un ion de faible masse moléculaire comme l'ion sodium, ce coût entropique est négligeable en comparaison du coût enthalpique pour remonter le gradient électrophorétique; en revanche, pour une protéine, la variation d'entropie est telle que $\Delta S \propto k_B \left(\frac{R_{prot}}{R_{pore}}\right)^3$ [2] : pour une protéine de 3 nm de diamètre passant à travers un pore de 1 nm de diamètre, le coût entropique serait d'environ $9 k_B T$.

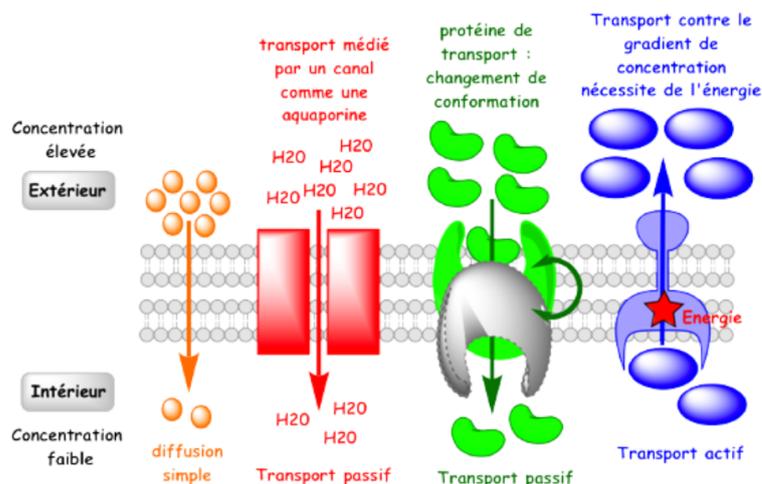


FIGURE 1.2 – Les différents types de transport membranaire : (orange) diffusion simple, où le transport suit le gradient de concentration pour les molécules liposolubles ou les gaz ; (rouge,vert) diffusion facilitée, qui requiert des pores protéiques transmembranaires sélectionnant les molécules pour la translocation et pouvant changer de conformation au cours du processus (mais sans apport extérieur d'énergie) ; (bleu) transport actif, qui requiert un complexe protéique transmembranaire consommant de l'énergie (souvent des molécules d'ATP) pour réaliser des translocations à l'encontre du gradient de concentration. (Extrait du site personnel de E. Jaspard -<http://biochimej.univ-angers.fr/> - Droits réservés).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à ces trois types de pores, décrivant les spécificités de chacun en les illustrant de différents exemples biologiques. Nous terminerons par la description d'un cas particulier de transport actif, appelé le ratchet brownien, qui est le mécanisme au coeur de ce manuscrit.

1.1 Transport passif

1.1.1 Transport diffusif à travers la membrane

Le transport passif se définit comme la diffusion d'un soluté selon le gradient de concentration sans source extérieure d'énergie. Le transport du soluté s'effectue selon la loi de Fick :

$$\mathbf{J} = -D\nabla C, \quad (1.2)$$

où J est le flux en soluté (en $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), D le coefficient de diffusion (en $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) du soluté et C sa concentration (en mol/m^3).

Seules les molécules lipophiles et apolaires sont susceptibles de traverser des membranes par diffusion, comme les hormones stéroïdes ou les acides gras ; pour les autres types de molécules, elles ne pourront traverser cette barrière qu'à condition d'être de petite taille (typiquement des gaz comme O_2 ou N_2).

En tant que processus passif, la diffusion n'est pas régulée et sa vitesse n'est fonction que de la concentration en soluté. Ainsi le transport s'effectue jusqu'à l'obtention d'un équilibre des concentrations entre les deux compartiments de la membrane. De plus, le transport passif est un processus relativement lent en raison de l'étape d'incorporation du soluté au sein de la bicouche lipidique, qui freine sa diffusion.

Parmi les molécules polaires susceptibles de diffuser à travers les membranes, on peut citer le cas particulier de la molécule d'eau : en effet, bien qu'elle puisse diffuser à travers des bicouches lipidiques, les flux d'eau à travers les organes et cellules du corps humain (composé à près de 65% d'eau), via la respiration ou la transpiration par exemple, ne peuvent pas être expliqués par une diffusion simple de l'eau à travers les membranes biologiques.

1.1.2 Diffusion à travers un pore protéique

Pour expliquer ce paradoxe, l'existence d'un transporteur dédié au transport de l'eau à travers les cellules était suspecté, jusqu'à sa découverte en 1988 par Denker *et coll.*[3], qui a valu le prix Nobel de chimie en 2003 à Peter Agre, partagé avec Roderick MacKinnon. Ce transporteur, une protéine de 28 kDa, est appelé aquaporine et fait partie de la famille des transporteurs à diffusion facilitée.

En effet, pour les solutés insolubles dans les membranes lipidiques, le transport à travers la membrane s'effectue via un complexe protéique transmembranaire spécifique du soluté, appelé uniport, ce qui permet la translocation de tous types de molécules : hydrophiles ou hydrophobes, polaires ou apolaires, etc. Le transport passif à travers un pore transmembranaire est également appelé diffusion facilitée.

Il existe différents types de transporteurs par diffusion à travers un pore :

- les canaux ioniques de communication cellulaire : ce sont des complexes protéiques permettant l'échange de molécules entre deux cellules adjacentes. Citons par exemple le cas de la jonction communicante, un canal composé de deux structures appelées des connexons dans chaque membrane cellulaire. Les connexons sont eux-mêmes des hexamères de connexines organisées de manière à former un pore de 1,4 nm de diamètre, pour une hauteur totale de la jonction de 15 nm[4]. Avec cette taille, les jonctions communicantes peuvent transporter des ions, des hormones et tout type de molécules d'une masse inférieure à 1 kDa[5]. La spécificité des jonctions communicantes provient de l'organisation interne de leur pore et des interactions spécifiques entre les résidus le composant et les solutés. Par exemple, les jonctions communicantes formées par les connexines Cx50, Cx46 ou Cx26 sont spécialisées dans le transport facilité de cations[4].
- les canaux ioniques à stimuli : ces complexes protéiques sont spécialisés dans le transport d'ions, avec la particularité de pouvoir s'ouvrir sous l'action d'un stimulus extérieur : liaison avec un ligand spécifique ou modification du potentiel membranaire.

Ce type de canaux est capable de faire transiter plus de 10^6 ions par seconde[6], ceci pour un pore d'un diamètre de 5 Å pour le canal potassique par exemple[7]. Les canaux ioniques jouent un rôle primordial dans le processus de potentiel d'action en permettant le passage d'ions à travers la membrane suite à sa dépolarisation[8].

- les porines : les porines sont des complexes protéiques transmembranaires spécialisés dans la translocation de molécules très spécifiques ; à chaque porine correspond un type de molécule donné. La structure, généralement en feuillets β , forme un pore d'un diamètre variable selon la porine, généralement 1-2 nm[9, 10] et même 2.8 Å pour l'aquaporine[11].

Le cas de l'aquaporine est intéressant pour illustrer le principe de la diffusion facilitée : comme il a été expliqué dans la partie 1.1, ce transporteur a été découvert suite aux recherches menées pour lever le paradoxe sur les flux hydriques à travers les cellules du corps humain, entre les volumes brassés par l'organisme (un rein pouvant filtrer jusqu'à 100 L d'eau par jour pour une personne en bonne santé[12]) et la vitesse réduite de la diffusion des molécules d'eau à travers des membranes lipidiques. La découverte de l'aquaporine a été réalisée par Denker *et coll.*[3], ce qui a valu le prix Nobel de chimie pour Peter Agre en 2003.

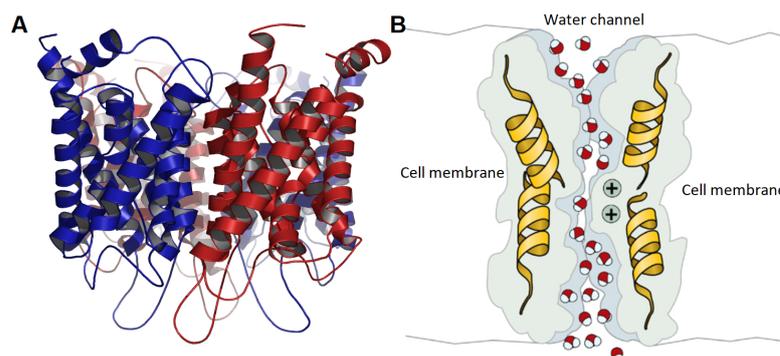


FIGURE 1.3 – Structure de l'aquaporine : A) Structure quaternaire de l'aquaporine en tant qu'homotétramère, avec un monomère composé de 6 hélices- α . B) Représentation schématique de la translocation de molécules d'eau à travers le canal de l'aquaporine. (Extraits de [13, 14]).

L'aquaporine est donc un complexe protéique transmembranaire de 28 kDa, existant chez de nombreuses espèces, notamment 13 aquaporines différentes identifiées pour l'humain[15, 16]. Sa structure est sous forme d'homotétramère, chaque monomère étant composé de 6 hélices- α . L'ensemble forme un pore en forme de sablier dont le diamètre le plus fin (au niveau des résidus His 201 et Arg 216) fait 2.8 Å[11], ce qui est équivalent au diamètre de Van der Waals d'une molécule d'eau[17].

La sélectivité de l'aquaporine lui vient de sa structure en forme de sablier, les molécules d'eau sont progressivement alignées lors de leur transport par diffusion à travers le canal, jusqu'au goulot de 2.8 Å ne permettant le passage que d'une seule molécule à la fois[18]. Une étude théorique de Gravelle *et coll.*[19] a montré que l'angle du cône d'entrée de l'aquaporine était optimisé par rapport à sa longueur pour maximiser la perméabilité du pore, assurant ainsi un transport optimal de l'eau à travers la membrane. Pour cela,

les auteurs ont développé un modèle analytique de l'écoulement du fluide à travers l'aquaporine, avec un écoulement axisymétrique 2D à bas nombre de Reynolds. L'équation de Navier-Stokes a été résolue par une méthode d'éléments finis avec différentes conditions aux limites, allant de l'absence complète de longueur de glissement à un glissement total du fluide sur les parois. Dans ce modèle simplifié de l'aquaporine, la résistance hydraulique totale R du pore est estimée à partir de la relation suivante :

$$R = \frac{C_\infty \eta}{a^3} \left[\left(1 + \frac{L}{a} \tan \alpha \right)^{-3} + \sin \alpha \right], \quad (1.3)$$

avec C_∞ une constante égale à 3,75, η la viscosité, a le rayon du pore au niveau de son col, L la longueur du cône d'entrée et α son angle.

En minimisant la relation (1.3) par rapport à α , on trouve que l'angle d'ouverture maximisant la perméabilité du pore α_{opt} évolue en loi d'échelle comme $(L/a)^{-3/4}$. La figure 1.4A. représente l'angle d'ouverture de différents types d'aquaporines selon le rapport L/a ; sur le même graphique est représentée une zone grisée correspondant à la région maximisant la perméabilité du pore, dont l'extension est dépendante de la largeur b au col ($b/a = 1-5$). A partir de ce graphique, les auteurs ont montré que l'angle optimal pour la perméabilité de l'aquaporine a été sélectionné par l'évolution.

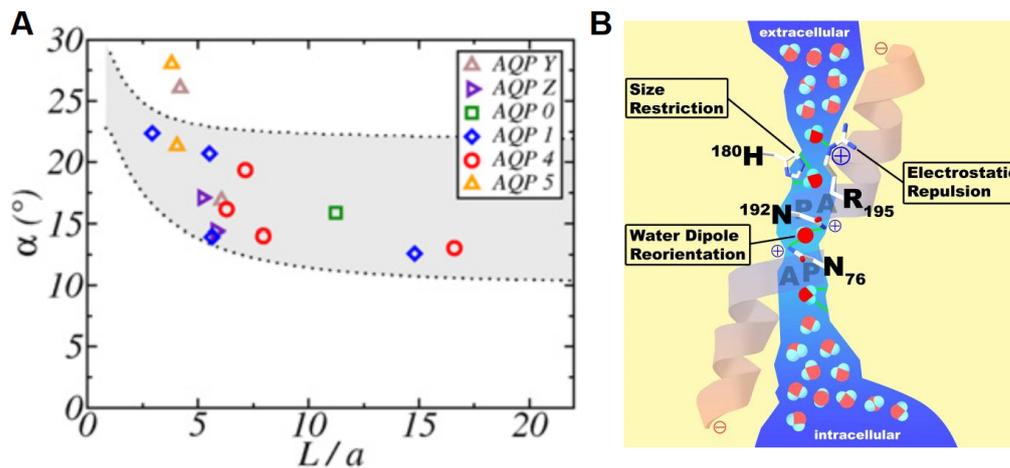


FIGURE 1.4 – Sélectivité de l'aquaporine : A) Angle α du cône d'entrée de l'aquaporine en fonction de sa longueur pour différents types d'aquaporines ; (zone grisée) région théorique maximisant la perméabilité du pore. B) La structure de l'aquaporine dispose de trois éléments assurant la sélectivité du pore pour les molécules d'eau : exclusion des cations par répulsion électrostatique des résidus His180 et Arg195, sélection en taille par un goulot d'étranglement de 2.8 Å et réorientation dipolaire par la paire de résidus Asn192 et Asn76. (A extrait de [19] ; B extrait de [16]).

Après le passage du goulot (sélection en taille), la molécule d'eau est renversée par une réorientation de son dipôle, ce qui la libère temporairement de ses liaisons H avec les molécules en amont et en aval, l'isolant de la file (Fig.1.4B)[20] ; ce mécanisme permet à la fois de favoriser l'éjection du pore de la molécule d'eau, ce qui accélère le transport, mais également de prévenir la translocation d'ion oxonium H_3O^+ par rupture de la liaison H lors de l'inversion du dipôle.

Pour empêcher les autres molécules que l'eau de pénétrer dans le pore, l'aquaporine dispose donc de trois atouts : l'exclusion des molécules plus grandes que 2.8 Å par son goulot d'étranglement, l'exclusion des cations grâce à ses résidus His180 et Arg195 et la réorientation dipolaire par les résidus Asn192 et Asn76 (Fig.1.4B)[21, 22, 23]. L'exclusion des cations par répulsion électrostatique est essentielle pour éviter la translocation de protons et cations accompagnant les molécules d'eau, susceptibles de perturber le potentiel de la membrane. Une étude de Chen *et coll.*[22] a montré par simulation en dynamique moléculaire qu'une mutation de la paire de résidus His180 et Arg195, responsables de la répulsion des protons à l'entrée de l'aquaporine, entraînait une baisse de près de 20 kcal/mol (environ 34 $k_B T$).

1.2 Transport actif

A l'inverse du transport passif, le transport actif se définit par son besoin en apport d'énergie extérieure, chimique ou électrostatique[24, 25, 26]. Grâce à cet apport en énergie, les transporteurs actifs se présentent comme des machines thermodynamiques capables de transporter des solutés à l'encontre du gradient de concentration (d'où la nécessité d'un apport énergétique) ou pour permettre de franchir une barrière entropique (par exemple dans le cas de la translocation d'une protéine à travers un pore étroit, impliquant alors un confinement de la protéine dans le pore).

1.2.1 Classifications

En tant que catalyseur du transport de molécules, les transporteurs actifs sont considérés comme des enzymes, qu'on nomme alors translocases. Autrefois, la translocase était exclusivement le nom donné au complexe protéique responsable de la translocation de l'ARN à travers le ribosome lors de sa traduction, aujourd'hui appelé EF-G (elongation factor G)[27]. Depuis la découverte d'autres complexes enzymatiques permettant la translocation de molécules diverses, ce terme a été élargi pour désigner l'ensemble de ces complexes. Dans la classification des enzymes, les translocases sont désignées par la classe EC 7 (enzyme commission)[28] ; elles sont ensuite subdivisées selon la nature des molécules qu'elles transportent, comme la classe EC 7.1 pour les transporteurs de protons ou EC 7.4 pour les acides aminés et les peptides. Cette dernière classe fera l'objet d'une étude détaillée dans le chapitre 2. Au-delà d'une classification selon le type de molécules transportées, il est possible de distinguer les transporteurs actifs selon la source d'énergie les alimentant : transporteurs actifs primaires ou secondaires.

1.2.2 Transporteurs actifs primaires

Les transporteurs actifs primaires correspondent aux transporteurs se servant de l'hydrolyse de l'ATP pour générer un transport à l'encontre du gradient électrochimique ou pour faciliter le franchissement d'une barrière entropique. C'est le cas par exemple de la pompe sodium-potassium (Fig.1.5)[29, 30] : cette pompe collecte d'abord passivement trois ions sodium dans sa cavité, puis l'hydrolyse d'une molécule d'ATP provoque la fermeture de la cavité par phosphorylation de la pompe et l'ouverture de l'autre extrémité du pore, relâchant ainsi les ions sodium précédemment capturés. Lorsque la cavité a été

débarassée de ses ions sodium par simple diffusion, deux ions potassium sont captés par le pore avant d'être relargués de l'autre côté de la membrane lors de la déphosphorylation de la pompe puis l'association d'une nouvelle molécule d'ATP.

Du point de vue énergétique, la pompe sodium-potassium fonctionne de façon optimale : en effet, d'après la relation (1.1), la barrière d'énergie pour contrer le gradient électrophorétique s'élève à environ $6 k_B T$ (en prenant $C_1 = 145 \text{ mM}$, $C_2 = 10 \text{ mM}$, $z = 1$ et $V_1 - V_2 = 85 \text{ mV}$) par ion sodium transporté. En sachant que 3 ions sodium sont transportés simultanément par la pompe sodium, l'énergie nécessaire pour le fonctionnement de la pompe sodium doit être de $18 k_B T$ [31]. La source d'énergie utilisée est celle de l'hydrolyse de l'ATP, qui fournit environ $20 k_B T$ [1], ce qui correspond quantitativement au fonctionnement optimal de la pompe pour le nombre d'ions transportés.

Avec ce mécanisme, un cycle d'hydrolyse d'ATP permet le transport de deux ions différents en sens opposés à l'encontre de leur gradient de concentration, ce qui n'aurait pas été possible avec une diffusion simple ou facilitée. Lorsque le complexe protéique est capable de transporter deux espèces ou plus, on le qualifie de cotransporteur, avec la dénomination antiport lorsque les espèces transportées dans le cycle ATPase le sont dans des directions opposées (comme c'est le cas pour la pompe sodium-potassium), ou symport si la direction est la même, comme les cotransporteurs glucose sodium dépendant[24, 30, 32].

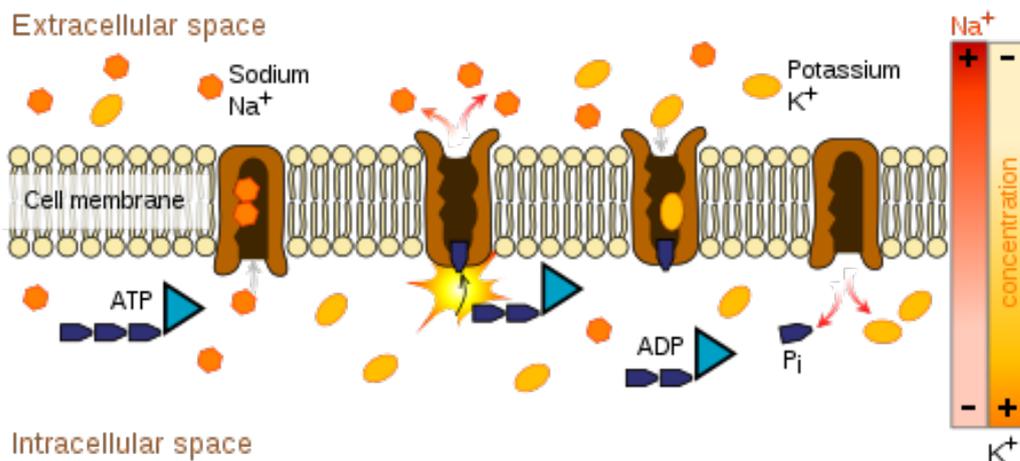


FIGURE 1.5 – Schéma du mécanisme de fonctionnement de la pompe sodium-potassium. (Extrait de [33]).

1.2.3 Transporteurs actifs secondaires

Les transporteurs actifs secondaires se servent d'un gradient électrochimique pour le transport d'une molécule contre son propre gradient de concentration. Ce gradient électrochimique peut être lui-même issu de l'activité d'un transporteur actif primaire, comme le gradient généré par l'activité de la pompe sodium-potassium, d'où l'appellation de transport actif secondaire. C'est le cas en particulier des cotransporteurs glucose sodium dépendant précédemment cités[32, 34] : l'activité de la pompe sodium-potassium participe à la génération d'un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane, qui

tend à se ré-équilibrer par diffusion des ions sodium le long de leur gradient. Le transporteur sodium glucose (Sodium-Glucose Linked Transporter, SGLT), un symport constitué d'hélices- α transmembranaires (11 pour SGLT1, 14 pour SGLT2[34, 35]), utilise le gradient d'ions sodium pour transporter simultanément deux ions sodium avec une molécule de glucose (Fig.1.6) ; les ions sodium descendent leur gradient de concentration et fournissent l'énergie nécessaire à la molécule de glucose pour remonter son propre gradient.

Dans le cas du transporteur glucose-sodium, le gain en énergie apporté par le transport des deux ions sodium est de $12 k_B T$ environ ; avec cette énergie, le glucose est capable de remonter son gradient de concentration d'un facteur 10^5 .

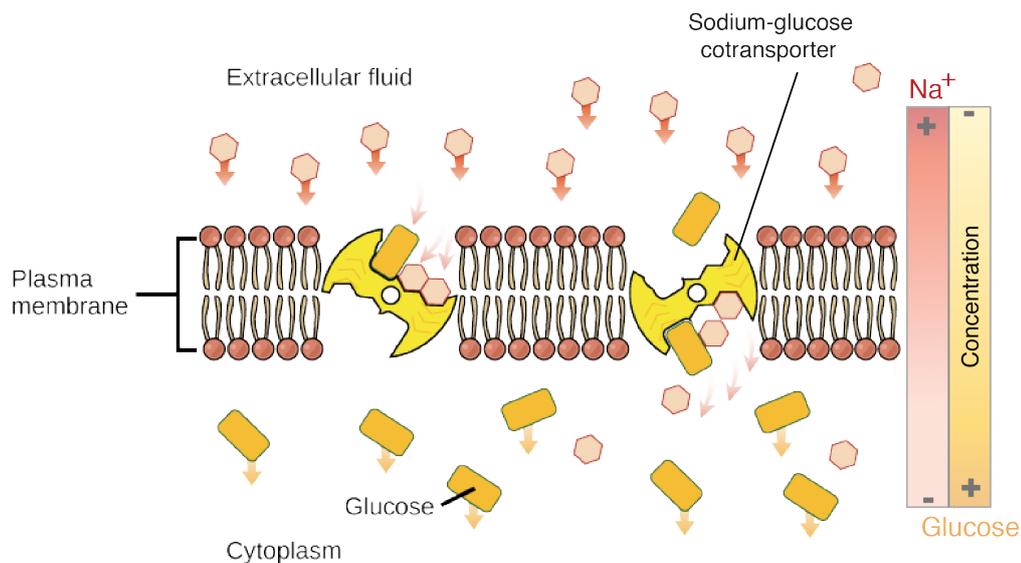


FIGURE 1.6 – Schéma du mécanisme de fonctionnement de la pompe sodium-glucose. (Extrait de [36]).

1.2.4 Transporteurs actifs d'acides nucléiques et de protéines

Certains transporteurs biologiques ont développé des stratégies plus complexes que les exemples présentés auparavant, en raison notamment de la complexité des objets à transporter : ADN, ARN, protéines, etc. Le coût énergétique pour assurer la translocation de telles molécules peut être bien plus élevé que l'énergie récupérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, en raison notamment de coût entropique en cas de confinement dans un pore étroit ou enthalpique si la translocation nécessite l'absence de structures rigides ou bien trop grandes sur la molécule par rapport au pore (structures secondaires pour les protéines, double brin pour l'ADN...). Par exemple, la myoglobine, une protéine de 17 kDa chargée de stocker l'oxygène dans les muscles, nécessite une enthalpie libre de $16 k_B T$ pour être dénaturée, ou encore le lysozyme, une protéine de 17 kDa, chargée de lyser la paroi bactérienne des bactéries Gram +, requiert environ $23 k_B T$ pour être dénaturée[37, 38, 39]. Pour ces molécules, l'hydrolyse de l'ATP n'est pas ou peu suffisante pour assurer la translocation, elles nécessitent d'autres mécanismes.

Une stratégie développée par un certain nombre de complexes protéiques consiste à sélectionner les mouvements diffusifs de la molécule uniquement s'ils vont dans le sens de la translocation et interdire tous les autres : c'est ce qu'on appelle un ratchet brownien. Ces systèmes biologiques font l'objet du chapitre 2, où les exemples les plus étudiés seront décrits en détail. La suite et fin de ce chapitre développe le modèle du ratchet brownien, au coeur de ce manuscrit.

1.3 Ratchet brownien

1.3.1 Machine *Ratchet and pawl*

L'idée du ratchet brownien a été développée initialement en 1912 par le physicien Marian Smoluchowski[40], connu pour ses travaux en physique statistique sur les processus de diffusion, en réponse au paradoxe soulevé par Gabriel Lippmann^{1 2} en 1900 à l'occasion du Congrès International de Physique de Paris [41] concernant la possibilité d'extraire un travail à partir de molécules de gaz en mouvement, même avec une température uniforme, ce qui est contraire au principe de Carnot. Le système du ratchet brownien sera par la suite popularisé par Richard Feynman dans ses cours de physique à Caltech[42] sous la forme du système *ratchet and pawl* (Fig.1.7) : le système considéré est celui de deux roues couplées entre elles via un axe. La première roue, une simple pale symétrique, est située dans un bain thermique à une température T ; sous l'effet des chocs avec les particules de fluide soumises au mouvement brownien, la pale est libre de fluctuer dans les deux sens de rotation. La seconde roue est une roue crantée, donc asymétrique, couplée à un cliquet ; par conséquent, cette roue crantée n'est autorisée à tourner que dans une seule direction ; l'ensemble de la roue crantée et du cliquet est situé dans un bain thermique à température T égale à celle du premier bain thermique. Avec ce système, on pourrait aisément penser que la pale sert de moteur et entraîne la roue crantée lorsque les chocs erratiques des particules sur la pale l'entraînent dans le sens de la roue crantée ; autrement la rotation inverse de la pale est prohibée par le système de cliquet. En accrochant une masse à l'axe entre les deux roues, on pourrait penser que la masse serait progressivement soulevée sous l'effet des fluctuations sélectionnées par le système. Ce système décrit le principe à la base du mécanisme de ratchet brownien : un système capable de sélectionner des fluctuations browniennes dans une direction donnée afin d'en extraire un travail exploitable.

Ce mécanisme *ratchet and pawl* n'est cependant pas physiquement réalisable, conformément au second principe de la thermodynamique : pour un système macroscopique à l'équilibre, il est impossible d'extraire un travail à partir de fluctuations thermiques d'une seule source thermique. En effet, si on considère une machine thermique, le rendement maximal correspond au rendement de Carnot, c'est-à-dire au cas où les processus en jeu sont réversibles et ne produisent donc pas d'entropie. Ce rendement η est tel que $\eta = \frac{W}{Q_1} = 1 - \frac{T_2}{T_1}$, où W est le travail fourni par la machine, Q_1 la chaleur fournie par la

1. Il est intéressant de noter que la genèse du ratchet brownien est souvent attribuée à tort à Richard Feynman, alors que l'article fondateur de ce mécanisme est celui de Marian Smoluchowski, en allemand, lui-même en réponse à celui de Gabriel Lippmann, en français. Nous pouvons observer ici tout l'intérêt d'une langue universelle pour la communication scientifique !

2. Le lecteur attentif remarquera le paradoxe de la réflexion précédente dans une thèse elle-même rédigée en français : Hoc erat in votis.

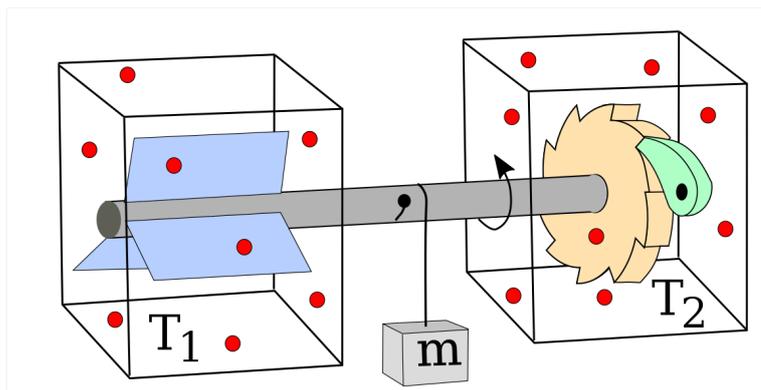


FIGURE 1.7 – Machine *Ratchet and pawl* de R. Feynman : une pale symétrique est plongée dans un bain thermique à température T_1 et est, de ce fait, soumise à un mouvement brownien, c'est-à-dire isotrope et erratique. Cette pale est reliée à une roue crantée, elle-même reliée à un cliquet. Cette roue crantée se situe dans un bain thermique à une température T_2 . Une masse m est suspendue à l'axe reliant les deux roues et est soulevée par le mécanisme du ratchet brownien. (*ratchet* en anglais) (Extrait de [43]).

source chaude et T_2 et T_1 sont respectivement les températures des bains froid et chaud. Le rendement de la machine est nul dans le cas où les deux bains sont à la même température. Dans le cas réel, avec production d'entropie, le rendement est même encore plus faible que celui du cycle de Carnot, c'est pourquoi une machine thermique ne peut pas produire un travail utile à partir d'une seule source thermique. Le lecteur intéressé trouvera plus de détails sur les notions de rendement énergétique pour les moteurs moléculaires dans les revues suivantes : Parrondo et de Cisneros [44], Zimmermann et Seifert[45], Li et Toyabe[46].

Le système du ratchet brownien nécessiterait d'être à une échelle nanométrique pour que les collisions des molécules de gaz sur les pales puissent produire un déplacement non-négligeable. A cette échelle, le ressort agissant sur le cliquet de la roue dentée serait également animé d'une dynamique brownienne, tout comme la roue dentée elle-même. Pour pouvoir tourner d'un cran sur la roue dentée, les pales doivent fournir l'énergie nécessaire pour compenser l'énergie élastique ϵ du cliquet ; si l'énergie fournie est inférieure à ϵ , le cliquet exerce une pression sur la dent de la roue qui la ramène dans sa position initiale. Si les deux bains thermiques sont à la même température, alors une énergie thermique égale à ϵ peut également être fournie à la roue dentée et au cliquet par le second bain thermique, par simples fluctuations. Lorsque le cliquet subit une fluctuation de ϵ , la roue dentée est libre de fluctuer dans les deux sens de rotation de manière isotrope. Ainsi, la roue dentée a une rotation nulle en moyenne, ce qui invalide le fonctionnement de la machine *ratchet and pawl*.

Pour aller plus loin, on peut intégrer dans le bilan d'énergie le couple $L\theta$ pour soulever la masse par rotation d'un cran θ de la roue dentée : la probabilité que la roue dentée tourne pour lever la masse est alors proportionnelle à $\exp\left(-\frac{L\theta+\epsilon}{k_B T_1}\right)$, contre $\exp\left(-\frac{\epsilon}{k_B T_2}\right)$ pour le sens inverse. Les températures sont prises à partir des bains thermiques fournissant la chaleur pour la transformation. Avec l'hypothèse que les préfacteurs des deux taux de transitions soient identiques, on montre facilement que la roue tourne de manière à

lever la masse si la température du premier bain thermique (avec les pales) est plus grande que celle du second bain (avec le ratchet), conformément au second principe de la thermodynamique.

On peut tracer l'évolution de la vitesse de rotation ω de la roue dentée en fonction du couple $L\theta$ dans le cas où les deux bains thermiques sont à la même température T (Fig.1.8) :

$$\omega = (k_+ - k_-) \theta \quad (1.4)$$

$$= \frac{\theta}{\tau} \left(e^{-\frac{L\theta + \epsilon}{k_B T}} - e^{-\frac{\epsilon}{k_B T}} \right) \quad (1.5)$$

$$= \frac{\theta}{\tau} e^{-\frac{\epsilon}{k_B T}} \left(e^{-\frac{L\theta}{k_B T}} - 1 \right), \quad (1.6)$$

où k_+ et k_- sont les taux de transition de la roue dans le sens direct ou indirect et τ^{-1} est le préfacteur de ces taux de transition.

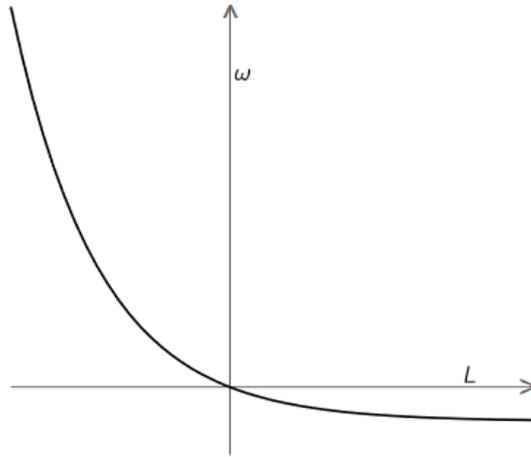


FIGURE 1.8 – Vitesse angulaire de la machine *ratchet and pawl* en fonction du couple $L\theta$. (Extrait de [42]).

La vitesse angulaire de la roue dentée n'est positive (sens direct, levage de la masse) qu'avec un couple négatif, ce qui n'est pas réalisable physiquement.

Pour que cette machine fonctionne, il est nécessaire que le premier bain thermique, où se situent les pales, soit à une température plus élevée que celle du bain où se situent la roue dentée et le cliquet, ce qui revient à créer un moteur ditherme classique. De plus, le moteur ne pourrait fonctionner qu'à la condition d'une parfaite indépendance thermique entre les deux bains thermiques, ce qui est impossible du fait du couplage mécanique entre les deux roues. J. M. R. Parrondo et P. Español[47] ont également publié une critique de l'étude de Feynman sur la machine *ratchet and pawl*, remettant en cause certaines de ses hypothèses de travail, comme la réversibilité des processus élémentaires, conduisant à une absence de dissipation et un rendement proche de celui du rendement de Carnot dans le cas où les deux bains thermiques sont à des températures différentes.

Cette objection vient de la présence de deux bains thermiques en contact via le mécanisme du ratchet, ce qui ne peut pas conduire à un état d'équilibre et une production

d'entropie nulle. Ces remarques ne concernent que le calcul du rendement de la machine par Feynman[42] mais ne remettent pas en question les conclusions qu'il en tire.

Parrondo et Español suggèrent de remplacer l'apport d'énergie du second bain thermique vers le premier (contenant les pales) provenant d'une rotation indirecte de la roue dentée (en remontant les crans) $L\theta + \epsilon$ par $(1 - \gamma)(L\theta + \epsilon)$, avec γ un facteur de dissipation rendant compte de l'irréversibilité du processus. Avec ce facteur de dissipation, les deux bains tendent à s'équilibrer, diminuant progressivement le rendement de la machine.

Ainsi, comme l'assure le second principe de la thermodynamique, en moyenne pour un système macroscopique à l'équilibre, il est impossible de tirer un travail exploitable d'un bain thermique seul. Les grandeurs utilisées dans les principes de thermodynamique (entropie, travail, température...) correspondent à des mesures moyennes et n'ont de signification véritable qu'avec l'hypothèse ergodique. Pour l'entropie, un système peut localement évoluer en réduisant temporairement son entropie, mais une mesure moyenne de celle-ci sur la durée tend vers une augmentation, selon le second principe de la thermodynamique. Par conséquent, un système macroscopique ne pourrait pas réaliser un mécanisme de ratchet brownien en raison de sa taille trop importante. Pour sa réalisation, il est nécessaire d'avoir un système nanométrique dont la dynamique temporelle est comparable à celle des molécules du bain thermique. Un tel système pourrait localement réduire son entropie et mettre en oeuvre un mécanisme de ratchet brownien.

Marcelo O. Magnasco[48] a montré qu'une particule se déplaçant dans un potentiel asymétrique est capable de réaliser un transport directif à partir d'une dynamique brownienne avec un apport énergétique extérieur ; cet apport d'énergie peut se faire via une énergie chimique (hydrolyse d'une molécule d'ATP, liaison avec un ligand spécifique...) ou encore une force extérieure (force électrostatique, forçage hydrodynamique...) (Fig.1.9B). Dans son étude, Magnasco formalise la dynamique d'une particule brownienne dans un potentiel périodique asymétrique sous l'action d'une force externe corrélée dans le temps (Fig.1.9A), ce qui provoque une rupture de la réversibilité des processus élémentaires (*detailed balance*).

En résumé, pour créer un mécanisme de ratchet brownien, il est nécessaire d'avoir un système nanométrique dont la dynamique est corrélée en temps avec le mouvement des particules du bain thermique ; un apport d'énergie extérieure est nécessaire pour alimenter le processus et le système doit avoir une symétrie brisée pour rompre la réversibilité des processus élémentaires.

Paradoxe de Parrondo

Au-delà de son intérêt conceptuel, le ratchet brownien trouve des applications tout à fait pratiques dans certains domaines, dont le plus connu est le paradoxe de Parrondo en théorie des jeux[49, 50]. Le paradoxe de Parrondo, du nom de son créateur Juan Parrondo, peut être résumé de la manière suivante : en considérant deux jeux de hasard à espérance négative en interaction, il est possible de gagner en jouant alternativement l'un et l'autre.

Le principe derrière ce paradoxe est celui du ratchet brownien : les gains/pertes, représentés à la manière d'un paysage énergétique, sont semblables au paysage énergétique d'un ratchet brownien, en forme de dents de scie, pour l'un des deux jeux, tandis que le second est linéaire avec une pente favorisant les pertes. Pour le premier jeu, représenté par le point A sur la figure 1.10, il peut s'agir d'un simple lancer de pièce truquée défavorable

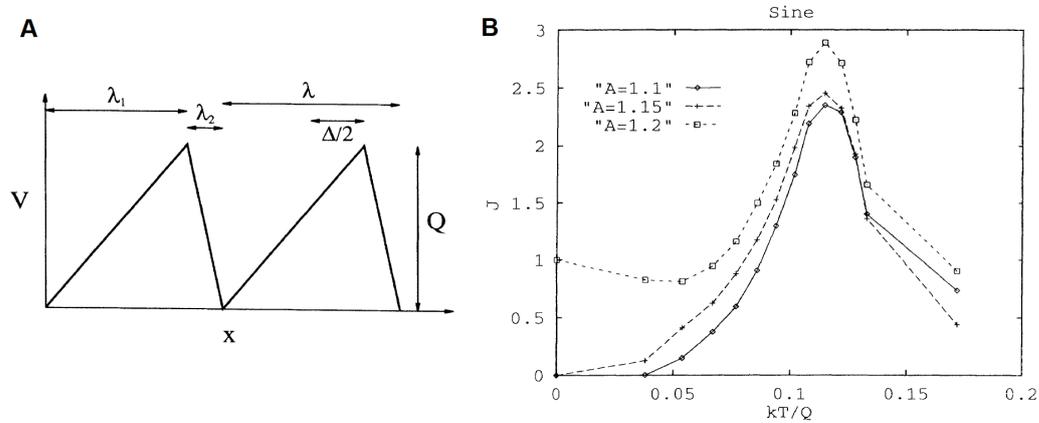


FIGURE 1.9 – Etude de M. O. Magnasco : A) potentiel périodique asymétrique dans lequel une particule brownienne est piégée. Cette particule est soumise à une force extérieure sinusoïdale d’amplitude A et de pulsation ω . B) Courant de particules en fonction de l’énergie thermique (normalisée par la hauteur du potentiel périodique), pour différentes amplitudes de la force extérieure. (Extrait de [48]).

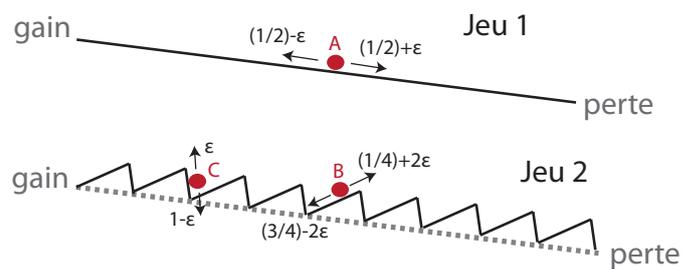


FIGURE 1.10 – Paradoxe de Parrondo : profils de gain des deux jeux, le premier formant un potentiel linéaire favorisant les pertes, le second un profil en dents de scie menant à des positions d’équilibre mais globalement défavorable pour le joueur.

au joueur. Le deuxième jeu utilise deux pièces B et C de probabilités différentes dont les lancers sont déterminés selon une règle précise ; cela peut être de lancer la pièce B si le tapis du joueur n'est pas un multiple de 3, sinon de lancer la pièce C.

En jouant alternativement ces deux jeux, il est possible de remonter le potentiel en dents de scie et ainsi amasser des gains, à la manière d'un mécanisme de ratchet brownien : en alternant les deux jeux, il est possible de limiter le lancer de la pièce C, très défavorable au joueur en la remplaçant par la pièce A, puis de retomber dans la position d'équilibre à gauche (vers les gains) grâce à la pièce B.

Le paradoxe de Parrondo est analogue au modèle du potentiel flash développé par Armand Ajdari et Jacques Prost[51], où une particule brownienne diffuse dans un potentiel périodique en temps et en espace ; plus précisément, le potentiel alterne entre une forme parfaitement plate autorisant la diffusion libre dans l'espace avec un potentiel en dents de scie rappelant celui du deuxième jeu. Ce potentiel peut être induit physiquement par l'application intermittente d'un champ électrique piégeant les particules de manière périodique. Ce modèle a connu un grand succès dans la modélisation des moteurs moléculaires tels que la kinésine ou la myosine, expliquant la directionnalité de leurs déplacements le long des microtubules et des filaments d'actine[52, 53, 54].

Le paradoxe de Parrondo trouve d'autres applications qu'en théorie des jeux, il se retrouve également dans l'étude des dynamiques de populations[55] ou en finance[56].

Le lecteur intéressé pourra se référer à la revue de Harmer et Abbott[57] ou celle plus récente de Lai et Cheong[58].

1.3.2 Ratchet de translocation

Modèle de Simon, Peskin, Odell et Oster

Nous avons vu dans la section précédente que le mécanisme *ratchet and pawl* développé pour illustrer le concept du ratchet brownien n'est pas physiquement réalisable, en raison notamment de l'absence de source d'énergie extérieure. Cependant, une alternative physiquement possible a été conceptualisée par Simon, Peskin, Odell et Oster[59, 60], motivée par la compréhension du mécanisme à l'origine de la translocation des protéines à travers les pores membranaires de la cellule[61, 62, 63, 64]. En effet, dans les cellules, il n'existe pas de gradient de température de part et d'autre des membranes permettant d'expliquer le transport des protéines. En revanche, la compartimentation des organites des cellules (noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique...) permet le maintien de gradient chimique autour des membranes, pouvant servir comme source d'énergie pour le transport des protéines. C'est à partir de ce constat que Simon, Peskin, Odell et Oster[59, 60] ont développé le modèle du ratchet de translocation.

Dans le modèle du ratchet de translocation, le système considéré est celui d'un substrat en translocation à travers un pore membranaire de diamètre d équivalent à l'épaisseur du substrat (Fig.1.11). Ce substrat peut revêtir différentes formes : tige rigide ou polymère pour des modélisations, protéines et acides nucléiques pour les exemples biologiques. Le chapitre 2 regroupe les exemples les plus étudiés dans la littérature. Aucune force n'est initialement exercée sur le substrat, la translocation s'effectuant exclusivement par diffusion, avec un coefficient de diffusion D . Le coût entropique de confinement du substrat dans le pore n'est pas considéré ici ; nous verrons dans les chapitres suivants des modèles prenant en compte le coût énergétique de confinement du substrat, comme le modèle de

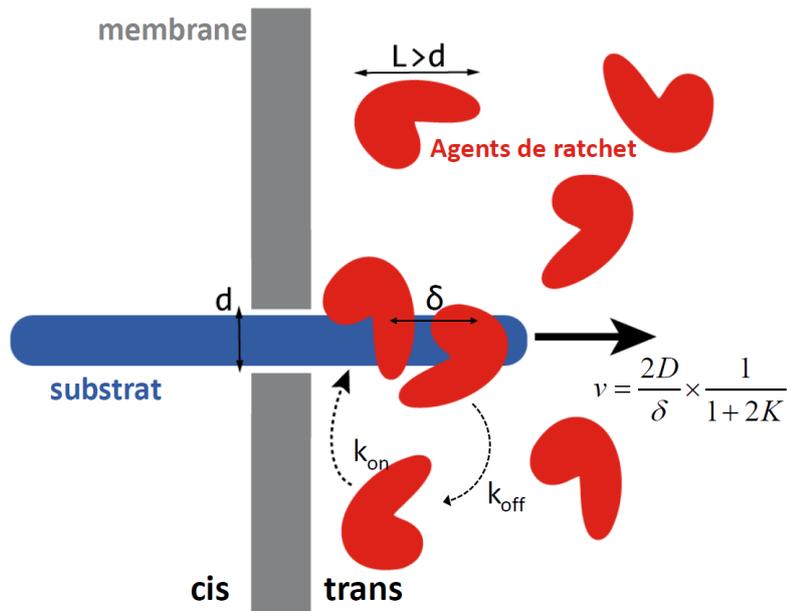


FIGURE 1.11 – Modèle du ratchet de translocation : on considère un substrat (représenté par une tige) diffusant (coefficient de diffusion D) à travers un pore membranaire étroit de diamètre d . Des particules, appelées agents de ratchet, disposant d'une forte affinité ($k_{on} \gg k_{off}$) pour le substrat sont situées en aval du pore (côté "trans"); ces agents de ratchet font une taille L plus grande que le diamètre du pore, ce qui les empêche de diffuser à travers le pore. En se liant successivement au substrat dès qu'une portion suffisante de celui-ci a diffusé à travers le pore, les agents de ratchet liés empêchent la rétro-diffusion du substrat, favorisant de cette manière sa translocation. Il s'agit bien d'un mécanisme de ratchet brownien puisque le mouvement du substrat est entraîné par des fluctuations sélectionnées. La vitesse moyenne de translocation du substrat est alors égale à $v = \frac{2D}{\delta} \times \frac{1}{1+2K}$, où δ est la distance entre deux sites d'adsorption successifs des agents de ratchet sur le substrat et K est la constante de dissociation de cet équilibre.

succion par exemple. Du côté de la sortie du pore (côté trans) se trouvent des particules, appelées agents de ratchet, d'une taille L plus grande que la taille du pore et dotées d'une grande affinité pour le substrat ($k_{on} \gg k_{off}$). En raison du rapport de tailles entre les agents de ratchet et le pore, un gradient de concentration est établi entre les deux côtés de la membrane. Biologiquement, les agents de ratchets sont le plus souvent des protéines qu'on qualifie de chaperonnes car elles viennent couvrir le substrat pour lequel elles sont spécifiques, afin d'assurer certaines fonctions biologiques. Le chapitre 2 décrit en particulier le cas des protéines Hsp70 et ComEA.

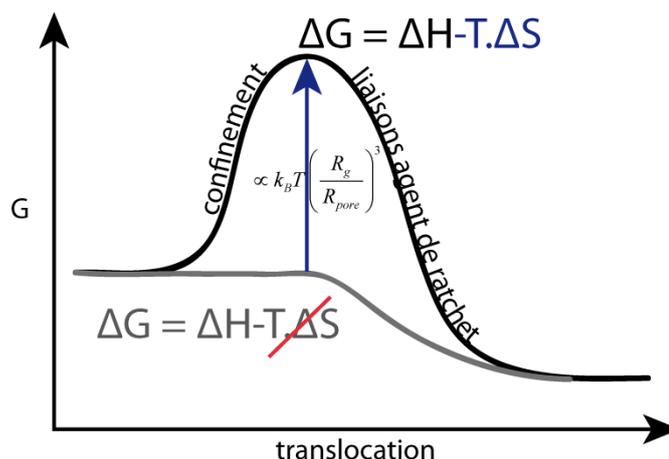


FIGURE 1.12 – Paysage énergétique du ratchet de translocation : en absence de coût entropique de confinement, la translocation se résume à une diffusion entre deux potentiels chimiques ; avec le confinement, le polymère rencontre une barrière d'entrée dont la hauteur est proportionnelle à la réduction de l'espace accessible au polymère, avec R_g le rayon de giration du polymère et R_{pore} le rayon du pore.

Lorsqu'un agent de ratchet se lie au substrat, celui-ci empêche la rétro-diffusion du substrat à travers le pore, favorisant ainsi sa translocation vers le côté trans de la membrane (Fig.1.13). L'agent de ratchet n'exerce pas de force de traction directe sur le substrat, comme c'est le cas par exemple pour les moteurs moléculaires tels que les kinésines et myosines respectivement pour les filaments de microtubules et d'actines. L'agent de ratchet étant plus grand que la taille du pore, il est impossible qu'il traverse le pore même lié au substrat ; par conséquent, le substrat ne peut pas non plus reculer dans le pore, toutes les fluctuations thermiques l'y emmenant sont bloquées par la liaison de l'agent de ratchet. Ainsi seules les fluctuations thermiques favorisant la translocation du substrat vers le côté trans de la membrane sont autorisées, ce qui fait de ce système une véritable application de ratchet brownien. L'énergie permettant de sélectionner les fluctuations thermiques provient de la liaison chimique du substrat avec l'agent de ratchet. Pour faire perdurer ce mouvement, il est nécessaire que des agents de ratchet se lient successivement au substrat dès qu'une fraction de celui-ci le permet, afin de renouveler leur activité de blocage de la rétro-translocation. Ce sont ces multiples liaisons qui alimentent la poursuite de la translocation.

Du point de vue énergétique, le ratchet de translocation correspond à une diffusion entre deux potentiels chimiques (Fig.1.12). Ces potentiels sont issus du gradient de concen-

tration d'agents de ratchet entre les deux côtés de la membrane. Plus précisément, on a la relation suivante :

$$\frac{\Delta\mu}{k_B T} \propto \ln\left(\frac{C_{trans}}{C_0}\right), \quad (1.7)$$

où C_{trans} est la concentration en agents de ratchet à la sortie du nanopore (côté trans) et $C_0 = 1$ M. Avec une concentration de l'ordre de quelques mM pour l'agent de ratchet (concentration typique de la chaperonne Hsp70, voir la section 2.2.1 du chapitre 2), on a $\Delta\mu \simeq -7 k_B T$.

Si on néglige la composante entropique du confinement du polymère dans le nanopore, la translocation ne présente pas de barrière d'entrée et le potentiel chimique suffit à assurer le transport. En revanche, si on considère ce coût entropique, l'apport du potentiel chimique peut se révéler insuffisant, en particulier pour les grandes molécules nécessitant un changement de conformation pour traverser le pore biologique (rupture de structures secondaires, déformation...); le polymère doit alors subir des modifications permettant d'abaisser cette barrière d'entrée, comme c'est le cas par exemple pour les protéines transportées à travers le pore nucléaire, qui se lie à des transporteurs spécifiques facilitant la translocation (voir section 2.5 du chapitre 2).

On peut estimer le coût entropique de confinement de la manière suivante : la composante entropique de la barrière d'entrée du pore provient de la réduction de l'espace accessible au polymère à l'intérieur du pore. Dans le cas d'un polymère flexible, la chaîne s'organise à l'intérieur du pore sous forme de pelotes successives appelées blobs dont le diamètre correspond à celui du pore[65]. Pour chaque blob, l'énergie de confinement est de $k_B T$. Par conséquent, l'énergie totale (en unité $k_B T$) pour confiner le polymère dans le pore correspond au rapport entre le volume du polymère en bulk au volume d'un seul blob, c'est-à-dire le nombre de blobs formés dans le pore (en supposant un pore infiniment long) : $\Delta S/k_B \propto \left(\frac{R_g}{R_{pore}}\right)^3$, où R_g est le rayon de giration du polymère et R_{pore} est le rayon du pore. Ces coûts entropiques seront discutés plus en détail dans le chapitre 3.

Ainsi, un potentiel chimique de l'ordre de $7 k_B T$ pourrait alimenter le transport d'une molécule subissant un confinement réduisant de moitié sa taille. Toutefois, il est important de noter que cette estimation n'est valide que pour un polymère flexible ne possédant pas de structures secondaires à rompre. Dans la majorité des cas, les molécules transportées par ratchet de translocation sont des protéines globulaires, donc le coût entropique réel est plus grand. Néanmoins, l'estimation précédente constitue une borne inférieure pour la barrière d'entrée.

Peskin *et coll.*[60] ont formalisé la relation force-vitesse pour le mécanisme de ratchet de translocation dans le cas simple où le substrat est une tige rigide sur laquelle se trouvent des sites d'adsorption d'agents de ratchet séparés d'une longueur δ (Fig.1.14A). Une force extérieure est appliquée sur la tige pour s'opposer à la translocation; cette force peut prendre différentes formes : force électrostatique, entraînement hydrodynamique, force osmotique... Nous considérerons ici le cas du ratchet de translocation parfait, c'est-à-dire pour lequel la liaison entre l'agent de ratchet et le substrat est irréversible et immédiate dès qu'un site d'adsorption est disponible (soit $k_{on} \gg k_{off}$). Expérimentalement, cela pourrait se retranscrire dans le cas où les agents de ratchet disposent d'une très forte affinité pour le substrat (constante de dissociation K très petite par rapport à la concentration en agent de ratchet) dans un milieu saturé en agents de ratchet. Dans ce schéma, dès qu'une longueur δ de substrat franchit le pore, un agent de ratchet vient immédiatement se lier au

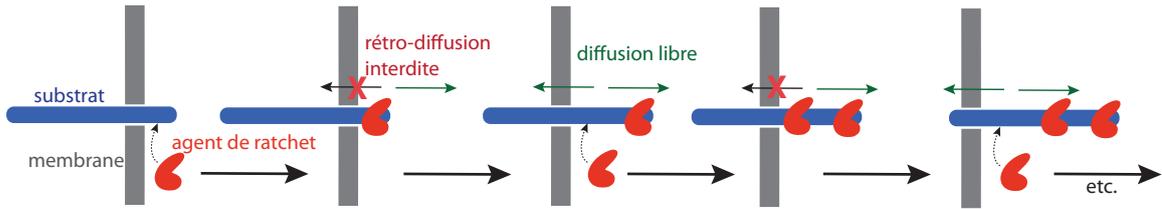


FIGURE 1.13 – Mécanisme du ratchet de translocation : une tige diffuse librement à travers un pore étroit. La diffusion est ensuite biaisée par l’association d’un agent de ratchet au substrat, empêchant la rétro-diffusion du substrat à travers le pore. Lorsque le substrat a diffusé d’une longueur suffisante, un autre agent de ratchet vient s’y lier, ce qui entretient la translocation.

site d’adsorption. Ainsi, si on considère la variable $x(t)$ comme la position du premier site d’adsorption disponible depuis la sortie du pore en $x = 0$, alors $x(t)$ est compris entre 0 et δ . On définit ensuite la variable $c(x,t)$ comme la densité de la variable $x(t)$; en particulier, on a :

$$\int_0^\delta c(x, t) dx = 1. \quad (1.8)$$

On définit ensuite le flux de sites d’adsorption $\Phi(x, t)$ tel que :

$$\Phi(x, t) = -\frac{Df}{k_B T} c - D \frac{\partial c}{\partial x}, \quad (1.9)$$

avec D le coefficient de diffusion du substrat et f la force extérieure qui s’oppose à la translocation.

Le substrat ne subissant aucune transformation altérant sa nature, le flux $\Phi(x, t)$ et la densité $c(x,t)$ répondent à l’équation de conservation suivante :

$$\frac{\partial \Phi}{\partial x} + \frac{\partial c}{\partial t} = 0. \quad (1.10)$$

Avec la règle d’adsorption définie plus haut (un site d’adsorption devient occupé par un agent de ratchet dès que sa position est égale à δ), un nouveau site apparaît dès qu’un site disparaît en $x = \delta$; par conséquent on a la relation suivante :

$$\Phi(0, t) = \Phi(\delta, t). \quad (1.11)$$

De même, le site en $x = \delta$ n’étant plus libre, on a la condition suivante :

$$c(\delta, t) = 0. \quad (1.12)$$

A l’état stationnaire, le flux Φ est constant, d’après la relation (1.10). L’hypothèse de stationnarité se justifie expérimentalement si la dynamique d’association entre les agents de ratchet et le substrat est plus rapide que le temps de diffusion moyen du substrat sur la longueur d’un site d’adsorption et que la longueur totale du substrat est nettement plus grande que la taille d’un site d’adsorption.

Avec l'hypothèse de stationnarité, l'équation (1.9) se résout facilement et on obtient l'expression suivante pour la densité $c(x)$:

$$c(x) = \frac{k_B T \Phi}{D f} \left(e^{\frac{f(\delta-x)}{k_B T}} - 1 \right). \quad (1.13)$$

En intégrant ensuite la densité $c(x)$ sur l'intervalle $[0, \delta]$, avec la normalisation de $c(x)$ (1.8), on obtient la relation suivante :

$$1 = \int_0^\delta c(x, t) dx = \frac{\Phi \delta^2}{D} \times \frac{k_B T}{f \delta} \left(e^{\frac{f \delta}{k_B T}} - 1 - \frac{f \delta}{k_B T} \right), \quad (1.14)$$

$$\Rightarrow \Phi = \frac{D}{\delta} \times \frac{\frac{f \delta}{k_B T}}{e^{\frac{f \delta}{k_B T}} - 1 - \frac{f \delta}{k_B T}}. \quad (1.15)$$

Le flux se définit comme la fréquence moyenne à laquelle les sites d'adsorption traversent le pore. Par conséquent, on peut définir la vitesse moyenne de translocation v du substrat à partir du flux d'après la relation (1.15) telle que :

$$v = \delta \times \Phi \Rightarrow v = \frac{2D}{\delta} \times \frac{\frac{1}{2}\omega^2}{e^\omega - 1 - \omega}, \quad (1.16)$$

avec $\omega = \frac{f \delta}{k_B T}$ le travail de la force extérieure s'opposant à la translocation du substrat (en unité de $k_B T$).

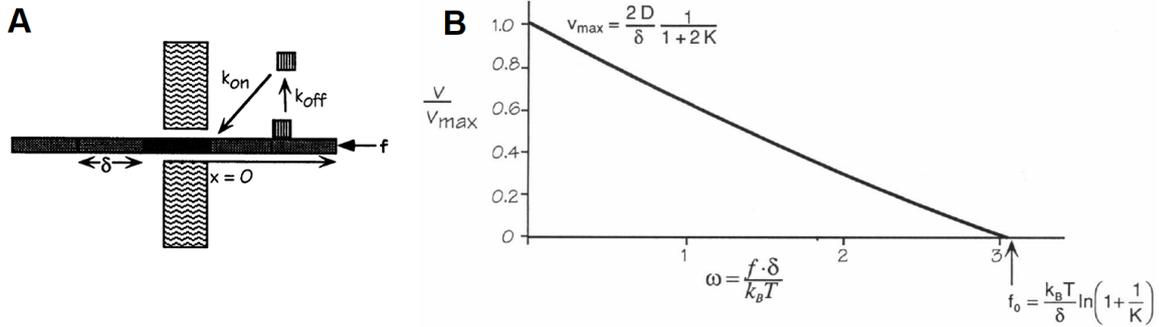


FIGURE 1.14 – Modèle de Peskin *et coll.* : A) structure du ratchet de translocation ; les sites d'adsorption sont espacés d'une longueur δ et les agents de ratchet sont en équilibre d'adsorption avec des taux d'association/dissociation k_{on} et k_{off} . Une force extérieure est exercée sur la tige pour s'opposer à sa translocation. B) Relation force-vitesse pour le ratchet de translocation. (Extrait de [60]).

Le raisonnement à l'origine de la relation (1.16) s'appuie sur l'hypothèse d'un ratchet parfait, c'est-à-dire que les agents de ratchet s'associent systématiquement aux sites d'adsorption du substrat dès leur mise à disposition. Il s'agit d'un cas limite lorsque les agents de ratchet sont en forte concentration, très supérieure à la constante de dissociation K de l'équilibre d'adsorption. De manière plus générale, on peut considérer le cas d'un ratchet imparfait en tenant compte de l'équilibre d'adsorption des agents de ratchet sur le substrat en intégrant les taux d'association/dissociation k_{on} et k_{off} à travers la constante de

dissociation $K = \frac{k_{off}}{k_{on}}$. La probabilité p qu'un site d'adsorption soit occupé par un agent de ratchet est alors $p = \frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}}$. Le raisonnement précédent reste inchangé à l'exception de la condition aux limites (1.12) : il faut considérer à la place la condition suivante :

$$c(\delta) = (1 - p) \times c(0). \quad (1.17)$$

Cette relation dérive d'un raisonnement distinguant les sites se déplaçant vers la gauche et ceux allant vers la droite, en considérant la possibilité d'être réfléchi par le pore si le site est occupé par un agent de ratchet. Le lecteur intéressé pourra trouver le détail de ce calcul dans l'annexe B de l'article de Peskin *et coll.*[60].

Dans le cas du ratchet imparfait, la relation force-vitesse finale est la suivante :

$$v = \frac{2D}{\delta} \left[\frac{\frac{1}{2}\omega^2}{\frac{e^\omega - 1}{1 - K(e^\omega - 1)} - \omega} \right]. \quad (1.18)$$

D'après la relation (1.18), la vitesse maximale développée par le ratchet de translocation est $v_{max} = \frac{2D}{\delta} \times \frac{1}{1+2K}$ et la force d'arrêt (qui permet de stopper la translocation) est $f_0 = \frac{k_B T}{\delta} \times \ln\left(1 + \frac{1}{K}\right)$ (Fig.1.14B). En ordre de grandeur, en considérant une protéine avec un coefficient de diffusion typique de 10^{-7} m²/s[66], avec des sites d'adsorption espacés de quelques nm et une constante de dissociation de l'ordre de quelques μ M, on obtient une vitesse de translocation maximale de 100-1000 μ m/s et une force d'arrêt de quelques pN. À titre de comparaison, le rapport des durées pour traverser une longueur L entre un mécanisme de diffusion simple et un mécanisme de ratchet de translocation s'exprime comme le rapport L/δ . Ainsi, pour traverser un pore biologique comme le complexe protéique Sec61 (voir section 2.2.2) d'une longueur de 14 nm avec un pas pour le ratchet de translocation de 8 nm, un mécanisme de ratchet de translocation accélère le transport d'une protéine de près de deux fois par rapport à un mécanisme de diffusion simple. Cette efficacité augmente linéairement avec la longueur du pore à traverser.

Plus les sites d'adsorption sont proches, plus la translocation est rapide. Cela s'explique simplement par un temps de diffusion du substrat réduit pour amener un nouveau site d'adsorption à la sortie du pore. De même, la vitesse de translocation augmente lorsque la constante de dissociation diminue : la liaison entre l'agent de ratchet et le substrat étant plus forte, on trouve alors en moyenne plus d'agents de ratchet liés, ce qui accélère le transport.

Étude de Krapivsky et Mallick

Krapivsky et Mallick[67] ont développé un modèle du ratchet de translocation analogue à celui développé par Simon, Peskin, Odell et Oster mais leur permettant d'accéder à la fonction de grande déviation du système. Les auteurs considèrent le cas d'un ratchet irréversible, c'est-à-dire que les agents de ratchet ne peuvent pas se dissocier du substrat en translocation, d'abord dans le cadre d'une modélisation discrète de la translocation (avec des sites d'adsorption bien définis sur la tige en translocation) puis dans un modèle continu (où les agents de ratchet peuvent se fixer partout sur la tige). Par un raisonnement dimensionnel, les auteurs aboutissent à une loi d'échelle entre la vitesse de translocation v et le taux d'association λ des agents de ratchet sur la tige comme $v \propto \lambda^{1/3} D^{2/3}$ dans le régime de faible association $\lambda l^3/D \ll 1$ et $v \propto D/l$ dans le régime de forte association

$\lambda^3/D \gg 1$, avec D la constante de diffusion de la tige en absence de ratchet de translocation et l la taille d'un agent de ratchet (Fig.1.15). Ces résultats ont ensuite été retrouvés par les approches plus formelles du modèle discret et continu. Ainsi, d'après l'étude théorique de Krapivsky et Mallick, la vitesse de la translocation par ratchet est indépendante du taux d'association de l'agent de ratchet et du substrat lorsque celui-ci est grand, ce qui se rapproche de l'expression de la vitesse maximale (1.16) de translocation du modèle de Simon, Peskin, Odell et Oster lorsque $K \ll 1$. En revanche, le modèle de Krapivsky et Mallick s'éloigne du modèle précédent à faible taux d'association. Cette différence peut s'expliquer par le choix d'un contrôle cinétique de la translocation (avec $k_{on} \gg k_{off}$) dans le cas du modèle de Krapivsky et Mallick, contre un contrôle thermodynamique pour le second modèle. Cette hypothèse vient du choix d'une irréversibilité de l'association entre l'agent de ratchet et le substrat en translocation, qui peut se traduire expérimentalement par un taux d'association bien plus grand que le taux de dissociation.

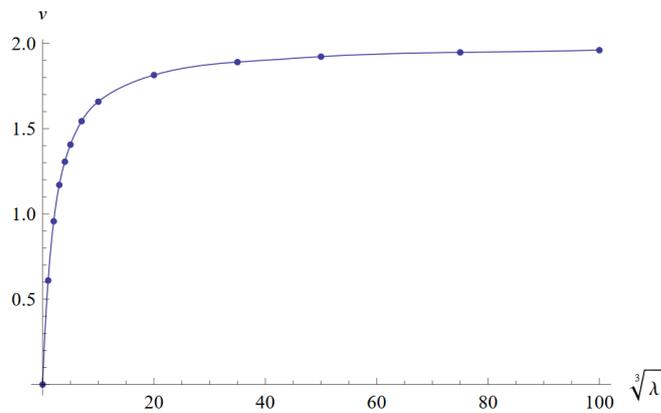


FIGURE 1.15 – Modèle de Krapivsky et Mallick : vitesse de translocation en fonction du taux d'association entre un agent de ratchet et la tige en translocation, d'après le modèle continu de l'étude. (Extrait de [67]).

Au-delà du profil de vitesse de translocation prédit par le modèle de Krapivsky et Mallick, cette étude montre l'importance du type de contrôle pour la dynamique de la translocation : contrôle cinétique ou contrôle thermodynamique. Dans le cas des translocons biologiques, c'est-à-dire des systèmes hors équilibre par excellence, le contrôle cinétique apparaît comme le plus probable.

Compétition spécificité/association

Afin d'optimiser le transport d'un substrat par mécanisme de ratchet de translocation, le système idéal allierait à la fois une très faible constante de dissociation entre l'agent de ratchet et le substrat et une faible spécificité de l'agent de ratchet pour la séquence du substrat : en effet, dans le but de réduire la distance entre deux sites d'adsorption successifs, il est nécessaire que l'agent de ratchet puisse se lier indifféremment sur toute la séquence du substrat. Or, une faible constante de dissociation entre une espèce et son substrat implique généralement une forte spécificité de l'espèce pour une séquence spécifique du substrat, comme c'est le cas pour les anticorps par exemple (constante de

dissociation K dans la gamme pM-nM pour les anticorps[68, 69]; $K = 40$ fM pour la liaison biotine-streptavidine[70]). À moins que le substrat ne contienne de nombreuses répétitions du motif ciblé par le ligand, il est plus intéressant d'avoir un ligand moins spécifique d'une séquence particulière mais capable de se lier à l'ensemble du substrat, par exemple un polycation si le substrat est chargé négativement comme c'est le cas de la molécule d'ADN[71, 72, 73].

Résumé

Nous avons vu que le mécanisme de ratchet de translocation est physiquement réalisable ; les fluctuations thermiques initient le mouvement et la présence d'agents de ratchet liés au substrat à la sortie du pore sélectionne celles favorisant la translocation. Ce processus de sélection est alimenté en énergie par les liaisons formées entre les agents de ratchet et le substrat.

La réalisation du ratchet de translocation pour des processus de transports transmembranaires au sein de la cellule a été mise en évidence pour plusieurs systèmes protéiques. C'est un mode de transport qui semble optimisé en raison des contraintes imposées par le milieu cellulaire (température homogène, nombreuses membranes formant des obstacles physiques au transport...). Nous passerons en revue dans le chapitre suivant ces différents systèmes biologiques, nous verrons en particulier comment le ratchet de translocation constitue un élément clé dans le transport cellulaire.

Les translocons

2.1 Généralités

Le transport de protéines à travers la cellule se présente souvent comme une étape clé du métabolisme cellulaire. La majorité des protéines sont synthétisées dans le cytosol de la cellule après traduction par les ribosomes des ARN messagers, qu'il s'agisse de cellules procaryotes ou eucaryotes.

Ces protéines, aussi appelées préprotéines ou précurseurs protéiques, se présentent sous une forme non-fonctionnelle, (repliement partiel, transformations post-traductionnelles manquantes, etc.) et doivent de ce fait être adressées aux organites adéquats (réticulum endoplasmique, mitochondrie, chloroplaste, etc.) pour être activées[74, 75, 76]. Se pose alors le problème de la reconnaissance des préprotéines par les récepteurs surfaciques des organites ciblés : le plus souvent, cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire d'une séquence signal à l'extrémité N de la préprotéine, appelée peptide signal ou séquence signal ; un peptide signal est généralement assez court (15-30 acides aminés en moyenne, parfois plus de 50) et amphiphile (disposant à la fois d'une région hydrophobe et une autre hydrophile souvent chargée positivement)[77]. Le peptide signal est clivé par une enzyme peptidase après l'internalisation de la préprotéine par l'organite cible, ce qui initie sa maturation[77]. Par des mécanismes spécifiques, le peptide signal est reconnu par des protéines de surface qui l'adressent ensuite au complexe protéique transmembranaire assurant la translocation de la préprotéine vers la lumière de l'organite : on appelle translocon ce complexe protéique[78, 79].

Le terme translocon est parfois confondu avec celui de translocase. Cependant, les deux termes renvoient à deux notions distinctes : d'après du Plessis *et coll.*[78], le translocon renvoie au complexe protéique comportant le canal central (ou pore) par lequel la préprotéine traverse la membrane. Ici, il n'y a pas de notion de transduction d'énergie alimentant le mécanisme de translocation, seule la structure est prise en compte.

Concernant la translocase, elle est décrite comme le complexe du translocon associé à la source d'énergie pour la translocation[78]. La translocase englobe ainsi le translocon et est spécifique du mode de translocation. Avec cette définition, deux translocases distinctes peuvent contenir le même translocon : c'est le cas par exemple du translocon Sec61, pour lequel la translocation peut s'effectuer avec le ribosome pour moteur dans le cas d'une translocation co-traductionnelle ou de la molécule chaperonne BiP pour une translocation

post-traductionnelle[80, 81, 82] (voir section 2.2.2).

Dans notre étude, nous nous restreindrons aux translocases de classe 7.4, c'est-à-dire catalysant la translocation d'acides aminés et de peptides. L'existence de structures secondaires, tertiaires et quaternaires, pouvant localement se déplier sous l'effet de fluctuations (protein breathing)[83, 84, 85] ou de l'association avec des molécules chaperonnes (comme les molécules de la famille Hsp) confère à cette classe des propriétés uniques du fait des conformations dynamiques des molécules à faire transiter. La translocation doit s'opérer avec une forme globalement dépliée de la protéine pour faciliter sa déformation et son confinement dans le translocon.

Les translocases ont recours à l'hydrolyse de molécules d'ATP pour mettre en oeuvre la translocation ; on retrouve cette particularité dans la nomenclature enzymatique : les translocases sont toutes classées dans la sous-catégorie EC 7.4.2, pour signifier leur activité ATPase[28]. À partir de cette énergie libérée, les translocases mettent en oeuvre des mécanismes variés pour assurer la translocation. Parmi ces mécanismes, celui du ratchet de translocation est employé avec succès par un certain nombre de translocases, comme les translocons Sec61 (réticulum endoplasmique) et TIM/TOM (mitochondrie) ou potentiellement TIC/TOC (chloroplaste)[80, 81, 82, 86, 87, 88, 89, 90, 91]. Dans la majorité des cas, le ratchet de translocation fait appel à la protéine chaperonne Hsp70 pour jouer le rôle d'agent de ratchet (description détaillée dans la section 2.2.1).

Dans les sections suivantes, nous décrirons le fonctionnement des chaperonnes Hsp70, puis nous dresserons un aperçu général des mécanismes d'import de protéines pour les translocons Sec61, TIM/TOM et TIC/TOC. Nous poursuivrons par le translocon PilQ associé au pilus type IV des bactéries pour l'import d'ADN exogène par transformation, fonctionnant sur un modèle de ratchet de translocation avec pour agent de ratchet la protéine ComEA. Nous terminerons par la description du pore nucléaire (Nuclear Pore Complex, NPC), qui est le translocon du noyau permettant des échanges de molécules entre le cytoplasme et le noyau de manière sélective et bi-directionnelle selon un mécanisme s'apparentant à un ratchet de translocation.

2.2 Translocases à Hsp70

2.2.1 Hsp70

Parmi les translocons évoqués dans la section 2.1, il a été prouvé pour au moins deux d'entre eux (Sec61 et TIM/TOM) que leur activité translocase était intimement liée à la présence de la molécule chaperonne Hsp70[92, 93, 94, 95]. Les protéines de la famille Hsp (Heat shock proteins) tirent leur nom de leurs fonctions de réponse à un stress cellulaire ; ce stress peut correspondre à un choc thermique (chaud ou froid), une exposition aux UV, un changement brusque de pH, une dégradation de la structure de la cellule... Lors de telles situations, la cellule sécrète des protéines Hsp pour assurer diverses tâches de maintien de son intégrité : stabilisation de protéines, aide au repliement et correction des protéines mal-repliées, détection des protéines à digérer...[96, 97]. Ces opérations s'effectuent par liaison de la protéine Hsp avec son substrat par activité ATPase ; cette liaison isole la protéine de son environnement, ce qui limite sa dégradation. La liaison nécessite un dépliement partiel de la protéine, ce qui permet de réinitialiser sa conformation en cas de mauvais repliement. Bakunts *et coll.*[98] ont par exemple montré qu'un stress homéostatique du réticulum

endoplasmique de cellules HeLa induit en réponse une augmentation significative de la concentration de protéines BiP (famille Hsp70), passant de 0,5 mM à 1,5 mM, représentant ainsi près de 30-40% du protéome du réticulum endoplasmique (Fig.2.1). Les protéines Hsp constituent ainsi une famille de molécules aux multiples fonctions essentielles à la survie de la cellule (Fig.2.2.a); leur altération est à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives[99, 100, 97].

Les protéines Hsp70 (de poids moléculaire 70 kDa) occupent une place de premier plan pour les translocases protéiques en raison de leur capacité à se lier de manière stable à un grand nombre de peptides de natures différentes[94, 97, 102]. Cette propriété est issue de leur structure dynamique composée de 4 sous-unités distinctes : un domaine à l'extrémité N de 45 kDa pouvant lier une molécule d'ATP, appelé NBD (nucleotide binding domain), deux domaines de 10 et 15 kDa servant de supports pour la protéine à lier, respectivement SBD α et SBD β (substrate binding domain) et un domaine terminal non-structuré à l'extrémité C, d'une taille variable (Fig.2.2.c). L'organisation de ces sous-unités entre elles est hautement dépendante de l'association du domaine NBD avec une molécule d'ATP (Fig.2.2.b). Les dimensions spatiales des protéines Hsp70 varient selon les spécificités propres à chaque protéine de cette famille ainsi que leur conformation suivant qu'elles soient liées ou non à une molécule d'ATP. De manière générale, leur rayon de giration est d'environ 4-5 nm[103, 104, 105, 106].

Le domaine SBD β , un β -sandwich, possède dans sa structure une cavité lui permettant de piéger un peptide ; le centre de la cavité est constitué de 5 poches hydrophobes pouvant accueillir chacune un résidu. L'anatomie de la poche indique une préférence des protéines Hsp70 pour les substrats dotés d'un coeur hydrophobe, mais il a été montré qu'elles peuvent aussi se lier avec la plupart des peptides[107, 94]. C'est pour cette raison qu'on retrouve des protéines Hsp70 dans de nombreux organites de la cellule.

Lorsque la molécule d'ATP coordonnant les sous-unités de la protéine Hsp70 est hydrolysée, elle libère une énergie libre comprise entre 20 et 30 $k_B T$, selon l'environnement physiologique[1]. Le domaine SBD α , une hélice α , se décroche du domaine NBD pour venir se plaquer contre la cavité du domaine SBD β et ainsi bloquer le peptide engagé dans cette cavité, à la manière d'une "tenaille" moléculaire. Kasper *et coll.*[108] ont calculé l'énergie de ce piège moléculaire par une méthode numérique de différences finies en estimant les apports relatifs des contributions entropiques, apolaires et électrostatiques au profil d'énergie libre. En prenant comme modèle la protéine DnaK, de la famille des Hsp70, les auteurs ont mesuré une énergie de piégeage comprise entre 12 et 16 $k_B T$.

Sous l'action d'une enzyme appelée NEF (nucleotide exchange factor), la molécule d'ADP liée au domaine NBD est remplacée par une nouvelle molécule d'ATP, provoquant un changement de conformation menant à un déplacement du domaine SBD α , ce qui libère la cavité du domaine SBD β et le peptide s'y trouvant[97] (Fig.2.2.c).

L'ATP liée au domaine SBD se situe au centre des quatre sous-unités, ce qui limite beaucoup son hydrolyse basale (environ une molécule d'ATP hydrolysée toutes les 6 à 40 minutes)[109]. Cependant, au contact avec une protéine possédant un domaine J (J domain protein, JDP), ce taux d'hydrolyse est multiplié par un facteur 15 000[110]. Un domaine J est formé d'une hélice α organisée sous forme d'une hairpin flexible, d'une longueur d'environ 70 résidus et possédant un motif His-Pro-Asp (HPD). Ce motif est reconnu à la jonction entre les domaines NBD et SBD β , ce qui stimule l'activité ATPase de la protéine Hsp70[97].

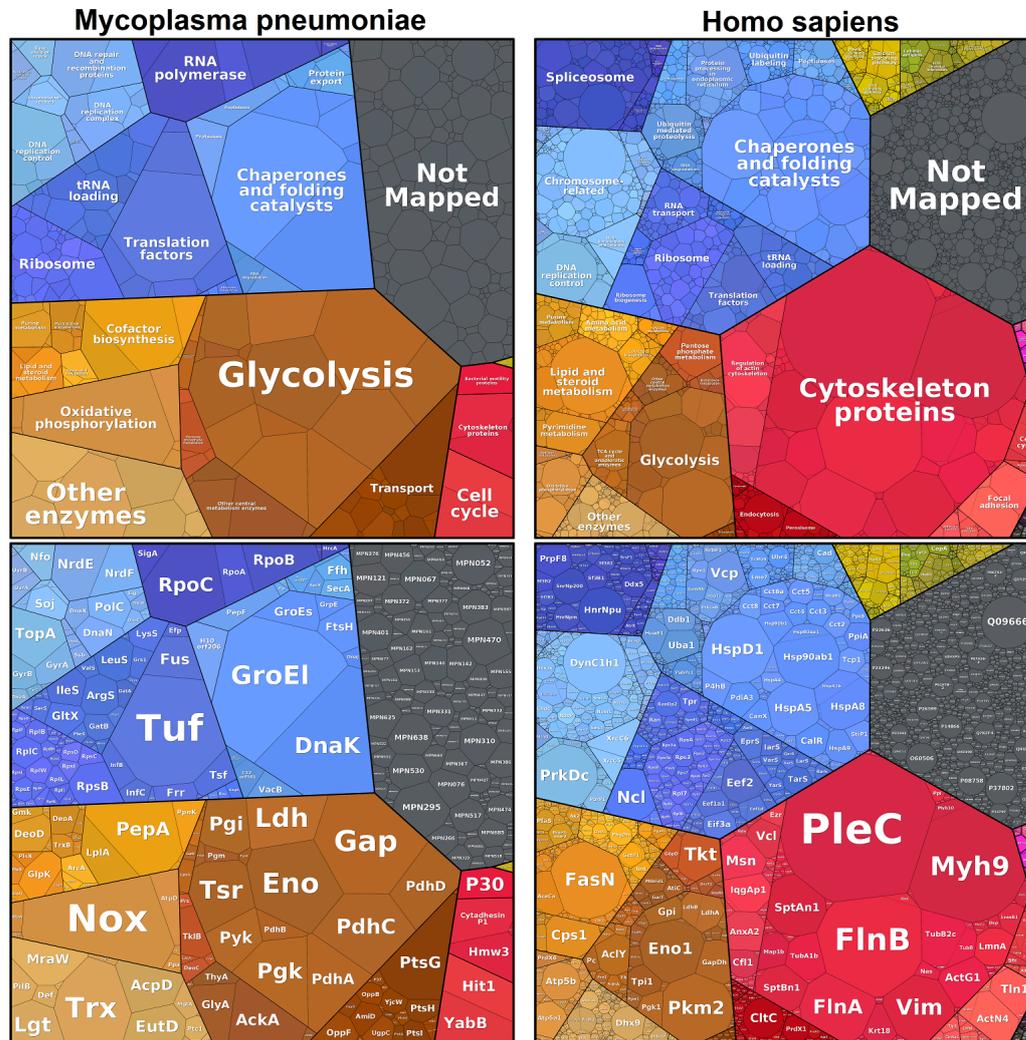


FIGURE 2.1 – Représentations du protéome cellulaire des espèces *Mycoplasma pneumoniae* et *Homo sapiens* : les cartes du haut regroupent les protéines par fonctions, celles du bas recensent chaque protéine individuellement. La taille des polygones associés à chaque protéine est directement proportionnelle à l'abondance de la protéine (nombre de copies de la protéine divisé par sa masse). Les protéines Hsp70 sont essentiellement contenues dans la région bleue "Chaperonnes and folding catalysts". Par exemple, les protéines DnaK et HSPA5 (aussi connues sous le nom de BiP) sont des protéines homologues de la famille des Hsp70 chez les procaryotes et les eucaryotes pour la translocation des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique ; on observe sur ces cartes leur abondance relative chez les deux espèces. (Extrait de [101]).

Cette capacité des protéines Hsp70 à lier à des peptides se révèle essentielle pour comprendre la dynamique de translocation d'un certain nombre de translocases. En effet, ces molécules agissent en tant que chaperonnes pour la translocation, dont l'activité est régulée par le domaine J d'un complexe protéique constituant le translocon ainsi que d'enzymes NEFs. Les protéines Hsp70 sont alors susceptibles de se comporter en tant qu'agents de ratchet dans le cadre d'un mécanisme de ratchet de translocation. Ce principe est illustré dans les sections suivantes à travers les translocons Sec61, TIM/TOM et TIC/TOC.

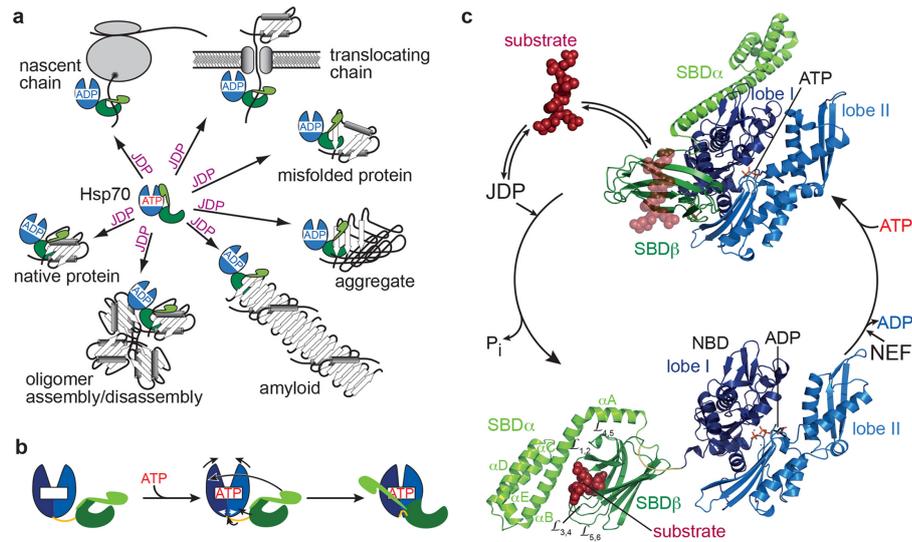


FIGURE 2.2 – La protéine Hsp70 : a) Diversité des fonctions de la protéine Hsp70. b) Changement de conformation de la protéine Hsp70 par coordination de ses quatre sous-unités par une molécule d'ATP. c) Structure et mécanisme de piégeage d'un peptide par une protéine Hsp70 via son cycle ATPase. (Extrait de [94]).

2.2.2 Complexe Sec61/SecYEG

Après traduction d'un ARN messager en protéine par les ribosomes cytoplasmiques, la préprotéine nouvellement formée doit subir des modifications post-traductionnelles pour acquérir sa forme physiologique. Ces étapes de maturation ont lieu chez les cellules eucaryotes dans le réticulum endoplasmique, un organe au contact du noyau[111].

L'accès au réticulum endoplasmique, délimité par une bicouche lipidique, nécessite une étape de translocation de la préprotéine à travers l'hétérotrimère Sec61 (Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ)[80, 81, 82]. Il s'agit du canal central d'un ensemble de complexes protéiques au travers duquel transitent les préprotéines. Le diamètre du canal central de Sec61 fait entre 40 Å et 60 Å[112], pour une largeur du complexe de 100 Å et une longueur de 140 Å[113]. Ce transport peut s'effectuer suivant deux modes distincts : translocation co-traductionnelle et translocation post-traductionnelle.

La translocation co-traductionnelle

La translocation co-traductionnelle est présente chez la plupart des organismes (procaryotes et eucaryotes), il s'agit du mode principal de translocation des protéines vers le réticulum endoplasmique. La force permettant la translocation est générée par la synthèse simultanée de la protéine par le ribosome durant sa translocation [114]. Pour cela, un peptide signal initialement traduit est reconnu par le complexe protéique SRP (Signal Recognition Particle), qui se lie par interaction hydrophobe[115] à ce peptide signal et au ribosome, avec une énergie d'interaction de l'ordre de $11-24 k_B T$ [116]. Le SRP est ensuite adressé au récepteur membranaire SRP du réticulum endoplasmique puis à Sec61, ce qui provoque l'ouverture du canal central et le début de la translocation. La force générée par l'hydrolyse de molécules de GTP pour la polymérisation des acides aminés dans le ribosome assure la translocation de manière processive avec un pas correspondant à 3 bases d'ARN (1 nm)[117] et une force d'environ 26 pN[118, 119]. La force à l'origine de cette translocation est générée par une translocase associée au ribosome appelée facteur d'élongation 2 (EF-2) chez les eucaryotes et facteur d'élongation G (EF-G) chez les bactéries[120]. Cette enzyme utilise l'énergie de l'hydrolyse d'une molécule de GTP (analogue à celle d'une molécule d'ATP, soit environ $20 k_B T$). La barrière d'énergie pour initier la translocation est estimée à $12 k_B T$ [121, 122]. Connaissant le pas et la force du ribosome, nous pouvons déduire que le travail réalisé par ce moteur moléculaire est d'environ $6 k_B T$, ce qui conduit à un rendement η d'environ 30% pour le ribosome en tant que translocase. Cette estimation est en adéquation avec la hauteur de la barrière énergétique de $12 k_B T$, les $20 k_B T$ de l'hydrolyse de la molécule de GTP servant à passer cette barrière et à fournir un travail pour la translocation.

Pour mesurer la force exercée par le ribosome lors de la translocation du peptide naissant, Sinha *et coll.*[118] ont mesuré par bioluminescence l'activité enzymatique d'un ribosome lors de la traduction d'un ARNm; des oligomères d'ADN complémentaires de la séquence ARN étaient hybridés à l'ARN, constituant des barrières énergétiques pour la traduction. En estimant par simulation l'énergie de ces barrières, les auteurs ont pu mesurer l'énergie pour laquelle le ribosome était stoppé et ont pu en déduire la force d'arrêt du ribosome comme étant égale à $(26,5 \pm 1)$ pN.

Le pas du ribosome (un codon, c'est-à-dire 3 bases d'ARN, 1 nm) a été mesuré pour la première fois par Wen *et coll.*[117] : pour cela, les auteurs ont utilisé un système de pinces optiques couplé à des micro-pipettes pour mesurer la traduction par un ribosome d'une molécule d'ARN piégée par la pince optique et la micro-pipette. La molécule d'ARN formait une hairpin que le ribosome devait rompre base par base lors de la traduction (Fig.2.3A). Ces ruptures de liaisons de la hairpin augmentaient progressivement la longueur de contour de la molécule d'ARN, ce qui permettait de suivre en temps réel et à l'échelle de la molécule unique le processus de traduction (Fig.2.3B-C). Grâce à ce système expérimental, Wen *et coll.* ont observé que le ribosome fonctionne de manière discrète avec un pas correspondant à 3 bases d'ARN (un codon) (Fig.2.3D); l'étape de translocation s'effectue en 0,1 s, suivie d'un temps d'arrêt de 2,8 s environ, sous l'application d'une force de piégeage de 20 pN.

La translocation se termine par le clivage de la séquence signal par le complexe Sec61. Ce mécanisme de translocation est également le principal pour l'insertion de protéines membranaires grâce à l'ouverture latérale du canal central de Sec61 [78].

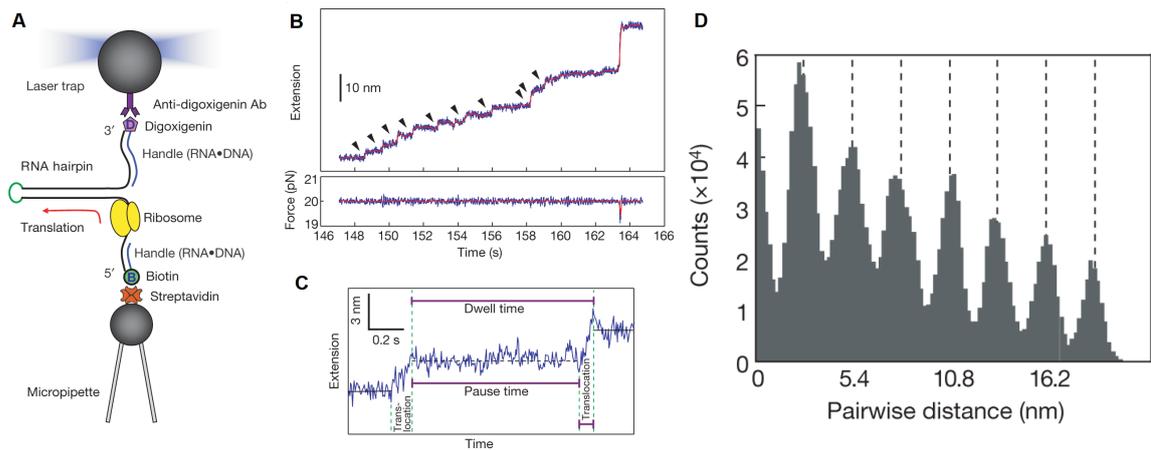


FIGURE 2.3 – Expérience de Wen *et coll.* : A) Système expérimental. B) Evolution de l’extension de la molécule d’ARN en fonction du temps à force constante (20 pN). C) Détail de la courbe B montrant deux événements de translocation séparés d’un temps d’arrêt. D) Histogramme des gains d’extension de la courbe B, montrant des pics de distribution tous les multiples de 2,7 nm, ce qui correspond à une longueur de 3 bases d’ARN étirées à 20 pN. (Extrait de [117]).

La translocation post-traductionnelle

Chez les cellules eucaryotes, il existe un mode de translocation dite post-traductionnelle car elle s’effectue sans l’action conjointe du ribosome. Cela concerne principalement les petites protéines ou celles dont le peptide signal est trop hydrophile pour assurer une liaison durable avec le complexe SRP. Pour réaliser une translocation post-traductionnelle, le complexe Sec61 s’associe avec un autre complexe trans-membranaire, Sec62/Sec63 [123, 124, 113]. Les protéines nouvellement synthétisées sont d’abord couvertes de molécules chaperonnes Hsp permettant leur repliement partiel et limitant le risque d’agrégats (Fig.2.4.1), puis le peptide signal est reconnu par le complexe Sec, ce qui provoque la dissociation des molécules chaperonnes. Par un processus passif de diffusion à travers le canal central de Sec61 (constante de diffusion $D = 200\text{-}400 \text{ nm}^2/\text{s}$ [125]), la protéine traverse le pore et atteint la lumière du réticulum endoplasmique où elle est captée par BiP (Binding Immunoglobulin Protein), un complexe de la famille des Hsp70 (voir section 2.2.1) [92, 93, 94] (Fig.2.4.2). Lorsqu’une molécule BiP est liée à la protéine, elle empêche sa rétro-diffusion à travers le canal central de Sec61 (la protéine BiP faisant une taille de 8-10 nm, contre un diamètre de 4-6 nm pour le pore[112, 103, 104, 105, 106]), favorisant ainsi son transport vers la lumière à la manière d’un ratchet de translocation. Une autre molécule BiP se lie à la protéine dès qu’elle a diffusé d’une longueur suffisante, ce qui entretient le mécanisme de ratchet brownien (Fig.2.4.3). La translocation se termine après le clivage de la séquence signal (Fig.2.4.4), puis la protéine s’éloigne du domaine J du complexe Sec63, ce qui facilite la libération des molécules BiPs par échange de leur ADP liée en ATP (Fig.2.4.5).

Chez les cellules procaryotes, il existe un translocon similaire à Sec61 pour les eucaryotes, appelé SecYEG (SecY, SecE, SecG)[80, 81, 82]. Ce translocon assure le transport des protéines vers le périplasma de la bactérie (espace intermédiaire entre les membranes

interne et externe). En plus du mode de translocation co-traductionnelle, les cellules procaryotes disposent d'un mode de translocation post-traductionnelle faisant intervenir la protéine SecA, un complexe protéique cytosolique qui pousse la protéine à travers SecYEG par une activité ATPase[80, 81, 82].

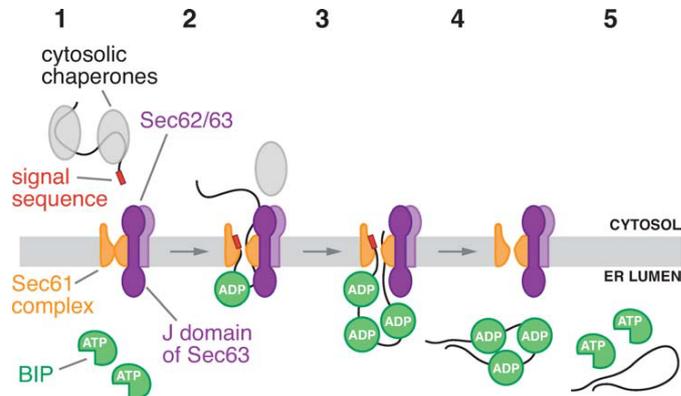


FIGURE 2.4 – Illustration de la translocation post-traductionnelle : 1) La protéine nouvellement synthétisée est couverte de molécules chaperonnes, limitant les risques d'agrégats qui pourraient perturber la translocation. 2) Le peptide signal est reconnu par le complexe Sec, ce qui libère les molécules chaperonnes dans le cytosol. La protéine diffuse de manière passive à travers le canal central de Sec61, puis elle est capturée par une protéine BiP dans la lumière, qui se lie à elle après hydrolyse de son ATP liée au contact du domaine J du complexe Sec63. 3) Par mécanisme de ratchet brownien, la rétro-diffusion de la protéine est inhibée par la présence de molécules BiP liées, ce qui favorise la translocation, une nouvelle molécule BiP se liant dès que la longueur de protéine le permet. 4) Lorsque la dernière portion de protéine quitte le cytosol, la séquence signal est clivée, ce qui libère la protéine dans le cytosol. 5) En dehors de la zone d'influence du domaine J du complexe Sec63, l'échange d'ADP liée en ATP (par action de protéines de remplacement NEFs) entraîne la dissociation des molécules BiP de la protéine, ce qui termine la translocation. (Extrait de [80]).

Le mécanisme de la translocation post-traductionnelle impliquant le complexe BiP a été la première mise en évidence d'un ratchet de translocation biologique, jusqu'alors simple curiosité théorique. L'expérience qui a mené à cette conclusion a été réalisée par Matlack *et coll.*[126] en 1999.

Expérience de Matlack *et coll.*

Matlack *et coll.* ont recréé *in vitro* un système analogue à la membrane du réticulum endoplasmique à partir de liposomes sur lesquels des complexes Sec extraits de levures ont été insérés[124]. Des molécules chaperonnes BiP ont ensuite été ajoutées dans la lumière des liposomes en présence d'ATP. Enfin, des protéines prepro- α factor (165 résidus, soit environ 58 nm linéairement)[127, 128] ont été mises en solution avec les liposomes. Ces protéines étaient liées à leur extrémité C à un ARNt dont la structure secondaire ne permettait pas son transit à travers le canal central de Sec61 (70-90 nucléotides en moyenne, soit environ 5-7 nm de largeur[129]). Ainsi, la protéine ne pouvait pénétrer dans

le liposome qu'à partir de son extrémité N sans pouvoir être internalisée complètement dans la lumière, son ARNt lié étant bloqué à l'entrée du complexe Sec (Fig.2.5.A).

La proportion de protéines ayant réalisé une translocation à travers le complexe Sec a été quantifiée par immunoprécipitation de la lumière des liposomes. Grâce à cette technique, les auteurs ont pu contrôler précisément chaque variable de l'expérience et ont mis en évidence les éléments clés assurant la translocation post-traductionnelle. En particulier, Matlack *et coll.* ont montré la nécessité d'un domaine J au complexe Sec pour activer l'hydrolyse de l'ATP liée aux molécules BiP et que c'est la position luminale de ce domaine J sur le complexe Sec63 qui donne sa directionnalité au transport (près de six fois plus de protéines BiP liées à la protéine lorsque le complexe Sec possède un domaine J luminale, par rapport au cas où ce domaine est non-fonctionnel).

Les auteurs ont ensuite démontré que la translocation post-traductionnelle s'effectue selon un mécanisme de ratchet brownien avec la molécule BiP comme agent de ratchet. Pour cela, ils ont comparé dans un premier temps la rétro-diffusion de protéines initialement localisées dans la lumière du liposome (excepté leur ARNt lié) en présence de molécules BiP lumineuses avec et sans ATP. Des protéases ont été ajoutées au milieu extérieur dans le but de digérer les portions de protéines externes au liposome, c'est-à-dire celles ayant rétro-diffusé à travers le complexe Sec (Fig.2.5.B). En suivant l'évolution de la fraction de protéines toujours contenue dans les liposomes (au moyen d'une quantification par SDS PAGE des longueurs de fragments de protéines), les auteurs ont observé que la déplétion du liposome en ATP entraînait une migration progressive de la protéine vers le milieu extérieur (avec un temps de sortie d'environ 20 minutes), contrairement à la condition avec ATP où la protéine restait exclusivement dans le liposome (Fig.2.5.B). Cette observation est attribuée à l'activité des molécules chaperonnes BiP, liées à la protéine après l'hydrolyse de leur ATP liée et qui empêchent la protéine de rétro-diffuser à travers le canal central de Sec61, à la façon d'un ratchet de translocation. Les auteurs ont également observé indirectement par quantification de la masse des protéines après translocation que les protéines pouvaient être chaperonnées par 6 ou 7 molécules BiP simultanément. En considérant une taille typique de 8 nm par molécule BiP[103], une protéine prepro- α factor de 165 résidus (58 nm) peut théoriquement être recouverte au maximum par 7 chaperonnes BiP. Cette estimation est en très bonne adéquation avec les mesures expérimentales, apportant ainsi du crédit au mécanisme de ratchet de translocation avancé pour expliquer le fonctionnement de la translocase Sec.

Pour appuyer cette interprétation, Matlack *et coll.* ont remplacé les molécules BiP par des anticorps spécifiques à trois séquences de la protéine dans la lumière du liposome. Ils ont ensuite quantifié la fraction de protéines ayant réalisé une translocation à travers le complexe Sec en fonction du type d'anticorps en présence (Fig.2.5.C). Les auteurs n'ont pas observé d'augmentation significative des translocations en présence d'anticorps ciblant une séquence proche de l'extrémité liée à l'ARNt (c'est-à-dire traversant le complexe Sec à la fin de la translocation) par rapport à la condition témoin sans aucune molécule chaperonne luminale. En revanche, la présence d'anticorps proches de la séquence signal (traversant le complexe Sec au début de la translocation) a augmenté d'un facteur 5 la réussite des translocations et cette augmentation a été renforcée d'un facteur 10 par ajout des anticorps ciblant les autres séquences de la protéine (Fig.2.5.C). A partir de ces observations, les auteurs ont mis en évidence la possibilité d'une translocation post-traductionnelle gouvernée par un mécanisme de ratchet de translocation avec des anticorps

pour agents de translocation, validant ainsi l'interprétation faite précédemment pour les molécules chaperonnes BiP.

A partir d'estimations de la constante de dissociation K_d entre la protéine BiP et un peptide[125], on peut estimer la force effective du mécanisme de ratchet de translocation de la manière suivante :

$$f_{RT} = \frac{k_B T}{L_{BiP}} \times \ln \left(1 + K_d^{-1} \right), \quad (2.1)$$

avec f_{RT} la force effective du ratchet, L_{BiP} la taille d'une protéine BiP (8 nm) et K_d la constante de dissociation entre la protéine BiP et le peptide (environ 60 μ M, normalisée par la concentration standard 1 M).

Cette expression pour la force du ratchet dérive de l'équation (1.18) du chapitre 1 pour la vitesse du ratchet imparfait (avec considération de la constante de dissociation entre l'agent de ratchet et le substrat). il suffit pour cela de résoudre l'équation pour une vitesse de ratchet nulle, ce qui revient à résoudre l'équation suivante :

$$1 - K_d \left[\exp \left(\frac{f_{RT} L_{BiP}}{k_B T} \right) - 1 \right] = 0 \quad (2.2)$$

On trouve ainsi une force effective de ratchet environ égale à 5 pN, ce qui est comparable à la force générée par une seule molécule de kinésine[130]. Si on compare cette force à la force qui serait générée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (environ 20 $k_B T$) en absence de dissipation et travaillant sur la longueur de la protéine BiP, on trouve environ 10 pN, ce qui correspond au double de la force générée par le ratchet de translocation, soit un rendement de la translocase d'environ 50%. On peut expliquer cette différence par les changements conformationnels de la protéine BiP après hydrolyse de son ATP liée ; ses quatre domaines se réorganisent et viennent piéger le peptide en contact avec la chaperonne BiP, ce qui constitue un coût entropique qu'on peut évaluer en première approximation par la formule d'estimation suivante[131] :

$$\Delta S = k_B T \ln \left(\frac{C_{BiP}}{C_0} \right), \quad (2.3)$$

où C_{BiP} est la concentration en chaperonnes BiP utilisée dans l'expérience de Matlack *et coll.*, soit 10 μ M et $C_0 = 1$ M. D'après cette formule, on peut estimer le coût entropique du changement conformationnel de la molécule BiP lors de l'hydrolyse de son ATP liée à environ 12 $k_B T$. En comptant un travail du ratchet de 10 $k_B T$ ($f_{RT} \times L_{BiP}$) et le coût entropique de 12 $k_B T$, on retrouve en bonne approximation les 20 $k_B T$ fournis par l'hydrolyse de l'ATP de la chaperonne BiP.

En ce qui concerne la vitesse maximale du ratchet de translocation, on peut l'estimer via la relation suivante, provenant de la vitesse maximale du ratchet de translocation établie dans la relation (1.18) du chapitre 1 dans le cas du ratchet parfait ($K_d = 0$) en absence de force freinant la translocation ($\omega = 0$) :

$$v_{RT,max} = \frac{D}{2L_{BiP}}, \quad (2.4)$$

ce qui mène à $v_{RT,max} \simeq 50$ nm/s, ce qui est 16 fois moins rapide que la kinésine *in vitro*[132]. Ces estimations sont quantitativement comparables à celles réalisées dans les

études de Liebermeister *et coll.* (2001) et Elston (2002)[133, 125], qui ont repris les données des expériences de Matlack *et coll.* pour développer des modèles statistiques de translocation de protéines à travers le translocon Sec61 en présence de chaperones BiP par mécanisme de ratchet de translocation.

Matlack *et coll.* rappellent toutefois que le mécanisme de ratchet brownien n'exclut pas la possibilité d'un transport actif généré par un changement de conformation de BiP lors de l'hydrolyse de son ATP liée et qui pourrait exercer une force sur le reste de la protéine (power stroke); cependant les observations faites par Matlack *et coll.* et les estimations de l'étude de Elston suggèrent que le mécanisme de ratchet brownien suffit à lui seul pour expliquer la translocation post-traductionnelle chez les cellules eucaryotes, les deux modèles (ratchet de translocation et power stroke) mènent à des résultats comparables pour les forces et les vitesses de translocation : $f_{PS} \simeq 2 - 4$ pN et $v_{PS,max} \simeq 120$ nm/s. La vitesse de translocation dans le cas du modèle power stroke est deux fois plus grande que celle du modèle de ratchet de translocation, ce qui peut s'expliquer par les natures différentes des deux mécanismes : le ratchet brownien sélectionne des fluctuations favorables d'un mouvement erratique alors que le modèle power stroke ne dépend seulement que de la fréquence d'association et d'activité ATPase de la chaperonne BiP. Il est important également de noter que ces deux modèles ne s'excluent pas l'un l'autre et il est tout à fait envisageable qu'ils prennent place en simultanément durant la translocation.

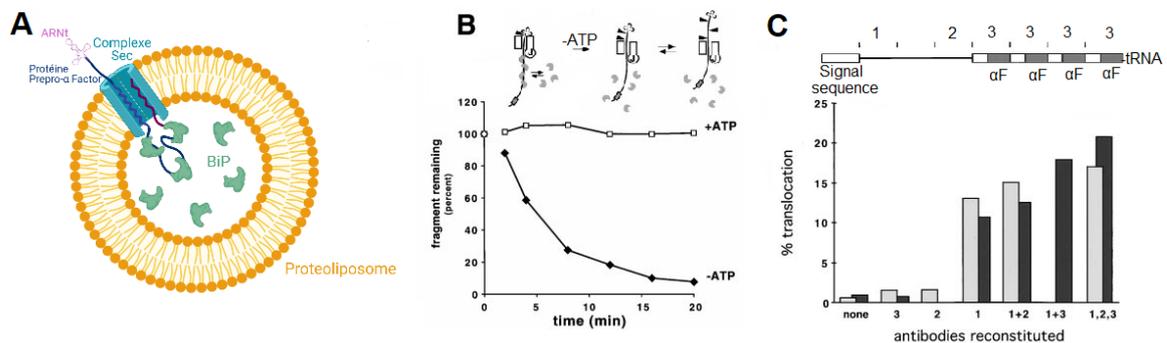


FIGURE 2.5 – Expérience de Matlack *et coll.*[126] : A) Système expérimental composé d'un liposome recouvert à sa surface par des complexes transmembranaires Sec. Des protéines prepro- α factor en solution sont libres de traverser le complexe Sec par translocation post-traductionnelle mais un ARNt fixé à l'extrémité C de la protéine l'empêche d'être complètement internalisée dans le liposome. L'intérieur du liposome ne contient que des molécules chaperonnes BiP liées à de l'ATP. B) Mise en évidence du rôle de BiP dans la translocation post-traductionnelle : la protéine est initialement dans la lumière du liposome, seule son extrémité avec ARNt est à l'extérieur. Des protéases se trouvent en solution à l'extérieur du liposome et peuvent digérer les portions de protéines en dehors de la lumière. Le milieu est ensuite déplété en ATP puis la portion de protéine située dans la lumière est mesurée au cours du temps. Le résultat est ensuite comparé à la condition sans déplétion d'ATP. C) Ratchet brownien en présence d'anticorps : la protéine BiP est remplacée par un mélange d'anticorps ciblant 3 portions distinctes de la protéine et la proportion de translocations réussies est quantifiée selon la composition du mélange d'anticorps (les couleurs grise et noire correspondent à deux réalisations différentes de l'expérience). (B et C adaptés de [126]).

2.2.3 Complexe TIM/TOM

Généralités

Les mitochondries sont des organites essentiels à la survie de la grande majorité des cellules eucaryotes en tant que principales unités productrices d'ATP[134, 135]. Elles interviennent également dans un grand nombre de voies de régulation du métabolisme cellulaire, de la croissance à la mort de la cellule[136, 137, 138]. Du fait de leur rôle primordial dans la survie d'un organisme eucaryote, de nombreuses maladies, en particulier les maladies dégénératives, trouvent leur origine dans des anomalies mitochondriales[139, 140, 141].

Les mitochondries, en tant qu'organites issus de l'endosymbiose d'une cellule primitive avec une α -protéobactérie[142, 143], possèdent leur propre voie de sécrétion de protéines à partir d'ADN mitochondrial transcrit puis traduit directement dans la matrice mitochondriale[134, 135]. Cependant, par transfert originel d'une partie du génome mitochondrial vers le noyau, 90 à 99% des protéines mitochondriales sont codées dans le noyau et nécessitent un transport du cytosol vers la matrice mitochondriale[144, 145].

Les mitochondries possèdent la particularité d'avoir deux bicouches lipidiques les séparant du cytosol, une couche interne et une externe[137]. En raison de cette particularité, la translocation d'une préprotéine nécessite une machinerie moléculaire plus complexe que pour la translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique. Ce transport s'effectue de manière active à travers le complexe transmembranaire TIM/TOM (Translocase of Inner/Outer Membrane)[86, 87, 88].

Actuellement, cinq modes de translocation ont été décrits pour le fonctionnement du complexe TIM/TOM[87]. Nous ne détaillerons ici que la voie principale nécessitant une préséquence signal sur la préprotéine. Le fonctionnement des quatre autres voies de translocation est décrit en détail dans les revues suivantes : [146, 147, 87].

Translocation par préséquence

La voie de translocation par préséquence concerne environ 60% des protéines mitochondriales nucléaires (synthétisées dans le noyau)[148]. La préséquence (ou peptide signal) de ces protéines est située à l'extrémité N ; elle est d'une taille allant de 15 à 50 acides aminés en moyenne, qui s'organisent selon une hélice α amphiphile (c'est-à-dire possédant à la fois un groupe hydrophile et hydrophobe) et chargée positivement pour sa partie hydrophile[149]. Ce qui suit résume la translocation par préséquence (Fig.2.6) ; une description plus détaillée est disponible dans les revues suivantes : [87, 88].

La préséquence est d'abord reconnue par le récepteur transmembranaire Tom20 via sa partie hydrophobe, qui l'adresse au récepteur Tom22 par sa partie positive. Le récepteur Tom22 est situé au centre d'un assemblage de 3 complexes Tom40 constituant chacun un canal de translocation à travers la membrane externe ; les centres des pores sont espacés de 5 nm et ont chacun un diamètre de 1,9–2,7 nm ainsi qu'une longueur de 5-6 nm[150, 151]. La translocation de la préséquence à travers Tom40 s'effectue selon un processus de diffusion facilitée en raison de l'interaction spécifique entre la préséquence et des régions hydrophobes et hydrophiles internes au canal Tom40, dont l'ouverture est provoquée par l'arrivée de la préséquence. Une fois la translocation à travers Tom40 terminée, la préséquence est captée dans l'espace intermembranaire par le récepteur Tim50 qui l'adresse au

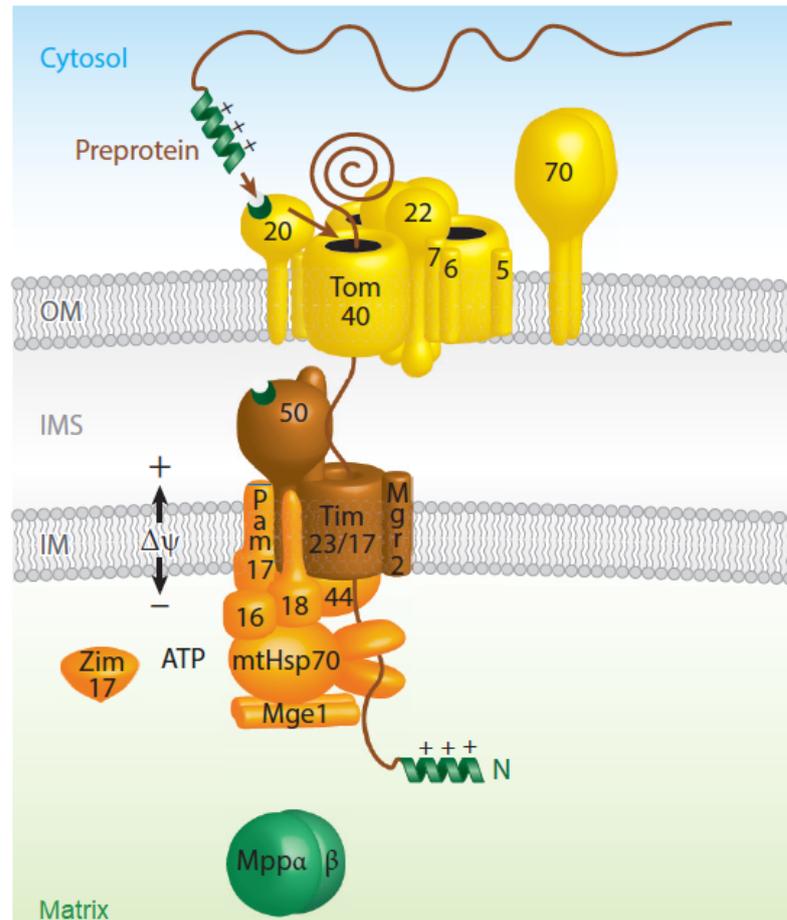


FIGURE 2.6 – Translocation par préséquence du complexe TOM/Tim23 : la préprotéine est initialement captée par les récepteurs Tom20 et Tom22 via la surface hydrophobe de sa préséquence (une hélice α amphiphile chargée positivement) puis elle est adressée au translocon Tom40 qui se charge de l'acheminer vers l'espace intermembranaire par diffusion facilitée. La préséquence se lie ensuite au récepteur intermembranaire Tim50 qui l'adresse au translocon Tim23. La translocation de la préséquence à travers Tim23 s'effectue grâce à une différence de potentiel entre le milieu intermembranaire et la matrice mitochondriale où elle est ensuite clivée par une peptidase (mitochondrial processing peptidase, MPP). Le reste de la préprotéine est transportée à travers le complexe TOM/Tim23 par l'action conjointe de molécules chaperonnes mtHsp70 et du complexe PAM (presequence translocase-associated motor) : le complexe PAM possède un domaine J activant l'hydrolyse d'ATP par mtHsp70, ce qui lui permet de se lier de manière stable à la préprotéine à la sortie de Tim23. Cette liaison limite la rétro-diffusion de la préprotéine à travers le complexe TOM/Tim23 selon un processus semblable à un ratchet brownien et assure l'internalisation complète de la préprotéine dans la matrice mitochondriale. (Adapté de [87])

translocon Tim23 de la membrane interne. L'interaction entre la préséquence et Tim50 provoque l'ouverture de Tim23 et la translocation à travers le canal de Tim23 (diamètre 1,9-2,7 nm, longueur 7 nm [151]) s'effectue au moyen d'un gradient de proton (typiquement 180 mV[152]) entre l'espace intermembranaire (+) et la matrice mitochondriale (-), maintenu par l'activité de la chaîne respiratoire ; la partie positive de la préséquence est entraînée vers la matrice mitochondriale, chargée négativement. Une fois la translocation par forçage électrostatique de la préséquence à travers Tim23 terminée, la préséquence est clivée par une peptidase (MPP, mitochondrial processing peptidase).

Modèle du ratchet de translocation pour la translocation à travers le pore TIM

Cependant, du fait de la diversité des acides aminés constituant la préprotéine, la différence de potentiel intermembranaire est inefficace pour assurer la translocation du reste de la molécule, seule sa préséquence y est sensible. Pour réaliser ce processus, le complexe Tim23 est couplé côté matrice mitochondriale à un ensemble de complexes assurant l'activité translocase du translocon TIM/TOM : des molécules chaperonnes mtHsp70 (de la même famille de molécules que la protéine chaperonne BiP du réticulum endoplasmique) se trouvent dans la matrice mitochondriale sous une forme liée à une molécule d'ATP ; ces molécules chaperonnes ont un rayon de giration d'environ 2 nm[153]. MtHsp70 est recrutée par le complexe Tim44 qui la met en contact avec le translocon Tim23, puis des complexes PAM (Presequence translocase-associated motor) associés à Tim23, Pam16 et Pam18, respectivement J-like et J protéines, activent l'hydrolyse de l'ATP liée des chaperonnes mtHsp70, ce qui provoque un changement de leur conformation et leur liaison avec la préprotéine sortante de Tim23. MtHsp70, sous forme ADP liée à la préprotéine, limite sa rétro-diffusion dans le translocon Tim23 à la manière d'un ratchet brownien[95]. Ainsi, dès que la préprotéine diffuse vers la matrice mitochondriale sur la longueur d'une protéine mtHsp70 (soit 4 nm), une autre molécule mtHsp70 vient se lier à la sortie de Tim23 pour maintenir la dynamique de ratchet de translocation.

Lorsque la préprotéine est intégralement dans la matrice mitochondriale, les molécules chaperonnes mtHsp70 sont dissociées de leur substrat par régénération de leur ATP liée sous l'action de NEFs (nucleotide exchange factors) et d'autres protéines chaperonnes (Hsp60-Hsp10) viennent prendre le relai de mtHsp70 pour empêcher l'agrégation des protéines et assurer leur repliement.

Modèles alternatifs

Un mécanisme alternatif a été proposé pour expliquer le processus moteur de la translocation[154] : dans ce modèle, mtHsp70 exerce une force de traction sur la préprotéine lors de son changement de conformation suite à l'hydrolyse de son ATP liée, à la manière d'un levier (modèle power stroke, semblable à celui évoqué pour le translocon Sec61). La translocation se fait alors sous l'action d'une force de traction comme c'est le cas pour des moteurs moléculaires tels que la kinésine ou la myosine[155].

Un troisième modèle a également été proposé par De Los Rios *et coll.*[156] dans le but de fusionner les modèles du ratchet de translocation et power stroke en un seul, appelé modèle du "tirage entropique" (entropic pulling). Dans ce modèle, la présence de chaperonnes associées à la protéine en translocation réduit l'espace accessible à la

protéine lorsqu'elle est proche du pore (Fig.2.7A-B), par un effet de surface. La protéine chaperonnée proche de la sortie du pore est contrainte dans ses fluctuations à ne pas intersecter la membrane interne; l'espace qui lui est accessible est donc réduit en raison de son volume plus grand par association avec les protéines chaperonnes. Cela engendre un coût entropique $-T\Delta S$ supplémentaire pour la protéine lorsqu'elle est proche de la membrane interne, que les auteurs estiment à environ $5 k_B T$, et qui décroît avec la distance au pore (Fig.2.7C), tel que :

$$\frac{\Delta S}{k_B} = \ln \left(\frac{V_{chap}}{V_{libre}} \right), \quad (2.5)$$

où V_{chap} et V_{libre} sont respectivement les volumes de l'espace accessible au polymère chaperonné et non-chaperonné.

Du point de vue énergétique, ce coût entropique est équivalent à une réduction de l'espace accessible d'un facteur 150. Ce facteur correspond environ au rapport du volume d'une protéine BiP de rayon de giration 5 nm à celui d'un segment de Kuhn d'une protéine $L_{Kuhn} = 2L_p \simeq 1 \text{ nm}$ [157] (un monomère de Kuhn représente la taille typique d'un monomère dans le cas d'un polymère semi-flexible, avec L_p sa longueur de persistance; le lecteur intéressé trouvera plus de détails à ce sujet dans la section 3.1 du chapitre 3). Dans ce schéma, un monomère chaperonné voit son volume fixé par celui de la protéine chaperonne, ce qui contraint ses déplacements proches du pore, d'où la force de tirage entropique.

Au-delà d'une distance de 30 résidus environ (soit 10 nm), cette barrière entropique devient négligeable par rapport à l'énergie thermique. La force de "tirage entropique" est estimée entre 10 et 20 pN, ce qui est 2 à 4 fois supérieur à la force effective de ratchet calculée précédemment pour la translocase Sec.

Dans le modèle du tirage entropique, ce n'est pas la taille supérieure de la protéine chaperonne par rapport à celle du pore qui empêche la rétro-diffusion de la protéine mais la réduction de l'entropie de la protéine chaperonnée proche du pore, ce qui diffère du schéma classique du ratchet de translocation. Le coût entropique supplémentaire au voisinage du pore pousse la protéine chaperonnée à s'en éloigner, ce qui est analogue à la force de tirage évoquée dans le modèle power stroke. Au-delà de 30 résidus, l'énergie thermique devient supérieure à ce coût entropique et la protéine peut diffuser librement. Cette longueur de 30 résidus peut être vue comme la limite effective du pore pour le mécanisme de ratchet de translocation, la protéine chaperonnée subissant une force d'origine entropique la repoussant si elle s'approche à moins de 30 résidus de la sortie du pore. Dans ce schéma, le tirage entropique entraîne la protéine loin de la sortie du pore et le ratchet de translocation empêche sa rétro-diffusion à moins de 30 résidus du pore.

Une origine entropique de la force considérée dans le modèle power stroke pourrait permettre de réconcilier ce modèle avec celui du ratchet de translocation, les deux étant inclus dans le modèle du tirage entropique. Autrement, il serait nécessaire de trouver sur la protéine Hsp70 le mécanisme exact de levier permettant de tirer la protéine hors du pore. Ce levier nécessite un substrat sur lequel s'appuyer et donc une orientation précise de l'adsorption de la chaperonne Hsp70 par rapport à celui-ci. Or, nous avons vu précédemment que la liaison entre la chaperonne Hsp70 et une protéine n'est pas spécifique de la séquence de cette protéine; il semble difficilement concevable qu'une force de levier mécanique nécessitant une géométrie aussi précise puisse assurer efficacement la translocation d'une grande variété de protéines.

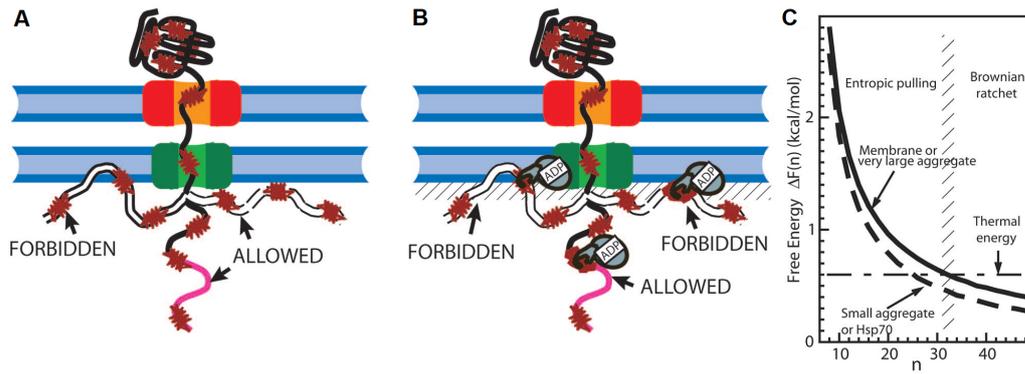


FIGURE 2.7 – Modèle du tirage entropique - Translocation d'une protéine à travers le complexe TIM/TOM : A) en absence de chaperonnes ; B) en présence de chaperonnes. Les protéines chaperonnes réduisent l'espace accessible à la protéine proche de la sortie du pore. Il s'agit d'un effet de surface se réduisant avec la distance au pore. Par conséquent, il existe un coût entropique supplémentaire au voisinage de la sortie du pore, qui tend à éloigner la protéine chaperonnée de la membrane interne. C) Profil d'énergie libre de la translocation en fonction de la distance à la sortie du pore (mesurée en nombre de résidus). Le coût entropique supplémentaire devient négligeable par rapport à l'énergie thermique au-delà de 30 résidus, où le mécanisme de ratchet de translocation devient le moteur de la translocation. (Extrait de [156]).

2.2.4 Complexe TIC/TOC

De manière analogue aux mitochondries, les chloroplastes constituent des organites essentiels à la survie des cellules végétales. Leur fonction principale consiste en leur activité de photosynthèse, qui leur permet de produire du glucose et de générer des molécules d'ATP à partir de l'énergie lumineuse[158, 159].

Les chloroplastes sont issus de l'endosymbiose d'une cellule eucaryote primordiale et d'une cyanobactérie[160, 161]. De même que pour la mitochondrie, un transfert génétique entre la cyanobactérie et sa cellule hôte a eu lieu ; on dénombre aujourd'hui plus de 95% des protéines chloroplastiques produites dans le noyau[160, 162]. Par conséquent, une voie de translocation de ces préprotéines du cytosol vers le stroma du chloroplaste a été développée par la cellule, impliquant les translocons TIC/TOC (Translocon at the Inner/Outer envelope membrane of Chloroplasts)[89, 90, 91].

La majorité des préprotéines destinées au chloroplaste et synthétisées dans le cytosol possède un peptide signal sur leur extrémité N servant à initier la translocation. Ces préprotéines sont également couvertes de molécules chaperonnes Hsp70 et Hsp90 limitant les risques d'agrégation de la préprotéine avec d'autres protéines du cytosol et la maintenant partiellement dénaturée[163]. Le peptide signal est initialement reconnu par les complexes membranaires Toc33 et Toc159 dans la membrane extérieure du chloroplaste. Ces complexes possèdent une activité GTPase couplée au canal central du translocon TOC, le complexe Toc75, s'ouvrant lors de l'hydrolyse de GTP par Toc33 et Toc59[164]. Le rayon de ce canal mesure entre 1,4 et 2,6 nm[165]. Toc75 facilite la translocation du peptide signal au moyen de domaines POTRA (polypeptide transport-associated) chaperonnant la translocation du peptide signal[166].

Une fois dans le milieu intermembranaire, le complexe Tic22 agit comme chaperonne pour le peptide signal, facilitant son accès au complexe TIC[167] ; le complexe Tic236 est également suspecté de lier physiquement les translocons TOC et TIC, ceci facilitant la translocation des préprotéines[168]. Une fois dans le stroma du chloroplaste, le peptide signal est clivé par une enzyme SPP (stromal processing peptidase)[169].

La structure du translocon TIC fait actuellement débat, ses sous-unités et les interactions entre elles sont l'objet de recherches actives[89, 90, 91]. Néanmoins, le complexe Tic20 est envisagé comme le canal central du translocon TIC et son activité est régulée par l'intermédiaire d'un réseau complexe de protéines (1 MDa)[170]. Le rayon du canal central du complexe Tic20 mesure entre 0.8 et 1.4 nm[165].

Le moteur pour la translocation de la préprotéine à travers le translocon TIC n'a pas été clairement établi : l'hypothèse principale explique que c'est la présence de molécules chaperonnes cpHsp70, Hsp90C et Hsp93, qui fournirait la force motrice nécessaire à la translocation de la préprotéine par interaction directe avec elle. Cette force serait issue de l'activité ATPase de ces protéines et elle serait régulée par les complexes associés au translocon TIC[164]. Dans ce schéma, les similitudes entre le translocon chloroplastique TIC et le translocon mitochondrial TIM sont fortes, le mécanisme d'import de préprotéine dans le stroma du chloroplaste pourrait s'effectuer selon un modèle de ratchet de translocation. Cependant, pour stimuler l'activité ATPase des protéines chaperonnes Hsp70, il est nécessaire qu'au moins un complexe proche de la sortie du canal central du translocon Tic20 possède dans sa structure un domaine J, ce qui n'a pas été mis en évidence jusqu'ici[170, 90].

Une seconde hypothèse fait appel à la présence dans la membrane interne d'un complexe imposant (2 MDa) appelé Ycf2-FtsHi, avec une forte activité ATPase, pouvant être recruté par le translocon TIC pour assurer la translocation de la préprotéine[171]. À l'heure actuelle, il n'est pas possible de trancher entre les deux hypothèses. Des études plus poussées sont attendues, pour la caractérisation d'une part des interactions entre les chaperonnes Hsp et les sous-unités du translocon TIC, d'autre part une description précise de la structure et de l'activité du complexe Ycf2-FtsHi. Ces deux hypothèses ne sont toutefois pas exclusives l'une de l'autre.

2.3 Pilus type IV et complexe PilQ

En plus du transfert de gènes vertical (par la division cellulaire), les bactéries disposent d'un transfert de gènes horizontal (TGH), c'est-à-dire un mécanisme permettant d'intégrer dans une cellule une nouvelle séquence génétique sans duplication de celle-ci[172, 173, 174]. Ce mode de transfert est en grande partie responsable de l'antibiorésistance développée par certaines bactéries en réponse à un agent antibiotique présent dans leur environnement[175, 176].

Le transfert horizontal de gènes s'articule selon trois sous-modes distincts[177] :

- la conjugaison ;
- la transduction ;
- la transformation.

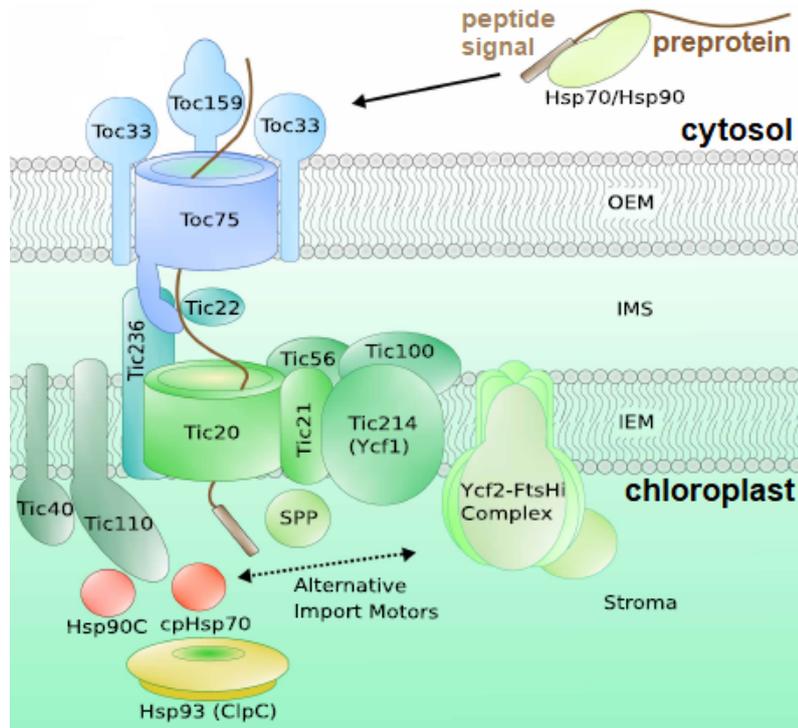


FIGURE 2.8 – Translocation par le complexe TIM/TOM : une préprotéine synthétisée dans le cytosol, initialement chaperonnée par des molécules de la famille Hsp, est captée par les complexes Toc33 et Toc159 via son peptide signal à l'extrémité N. Le peptide signal est ensuite adressé à Toc75, qui constitue le canal central de translocation pour le translocon TOC (Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplasts) qui facilite la diffusion du peptide signal vers le milieu intermembranaire. Le complexe Tic22 sert ensuite d'intermédiaire entre les translocons TOC et TIC (Translocon at the Inner envelope membrane of Chloroplasts), où le peptide signal est capté par un complexe TIC d'une taille de 1 MDa, dont le canal de translocation est formé par le complexe Tic20. Deux possibilités ont été envisagées pour expliquer le moteur de la translocation du reste de la préprotéine : la première fait appel aux protéines chaperonnes cpHsp70, Hsp90C et Hsp93 qui procéderaient d'une manière semblable à la protéine chaperonne mtHsp70 pour le translocon TIM ; une seconde repose sur l'existence d'un second complexe transmembranaire (Ycf2) en mesure d'exercer une force sur la préprotéine par une activité ATPase. Une fois la préprotéine entièrement dans le stroma du chloroplaste, le peptide signal est clivé par une enzyme SPP (stromal processing peptidase) et la préprotéine est chaperonnée par des molécules Hsp. (Adapté de [91]).

2.3.1 Conjugaison

Le premier sous-mode de TGH, la conjugaison, implique un transfert direct du matériel génétique d'une bactérie donatrice vers une bactérie réceptrice par contact physique entre les deux cellules[178]. Pour cela, une bactérie dotée du facteur de fécondité[179] (facteur F) développe à sa surface des pili sexuels (ou pili F), consistant en des filaments de pilines d'une longueur pouvant aller jusqu'à 5 μm et d'un diamètre de 6-7 nm ; ils sont en général au nombre de trois par bactérie F^+ . Ces pili sont polymérisés à une vitesse moyenne de $39,5 \pm 4,4$ nm/s[180] à la surface de la bactérie F^+ et ils ont pour fonction la recherche dans leur environnement de bactéries F^- , capables de recevoir du matériel génétique par conjugaison[181, 180]. Une fois le contact avec la bactérie F^- réalisé, le pilus sexuel se dépolymérise par son centre à une vitesse de $15,8 \pm 3,0$ nm/s[180], ce qui mène au contact physique entre les deux bactéries. Le pilus sexuel est ensuite reconverti en pont cytoplasmique permettant l'échange d'ADN plasmidique ou chromosomique entre les deux cellules[178]. Seul un brin d'ADN est transmis à la bactérie F^- , puis le brin complémentaire est synthétisé par la cellule. La translocation de cet ADN simple brin s'effectue par transport actif via le complexe protéique relaxosome, disposant d'une activité ATPase assurant la directionnalité du transport[182].

2.3.2 Transduction

Le second sous-mode de transport évoqué plus haut, la transduction, fait intervenir des bactériophages comme vecteurs de transduction : un bactériophage infecte d'abord une bactérie et s'intègre dans son chromosome. Lorsque le bactériophage se libère du chromosome bactérien, il peut emporter avec lui une séquence ADN chromosomique qu'il pourra transmettre à une autre bactérie infectée[183].

2.3.3 Transformation

Le troisième sous-mode de transport, la transformation, est le mode le plus intéressant pour notre étude puisqu'il fait intervenir un mécanisme de ratchet de translocation comme moteur pour l'import de matériel génétique dans une bactérie réceptrice.

Pili sexuels et pili communs

A la différence de la conjugaison, la transformation ne fait intervenir qu'une seule bactérie ; la séquence ADN est récupérée directement dans l'environnement de la bactérie, en général il s'agit de fragments résiduels après la lyse d'une autre bactérie[184, 185, 186]. Pour récupérer ces fragments d'ADN, la bactérie développe des pili dits communs à sa surface : ces pili sont constitués de filaments formés par polymérisation de pilines ; ils peuvent atteindre une longueur de quelques μm et ont un diamètre d'environ 5-8 nm[187, 188]. Les pili communs peuvent sembler assez proches dans leur structure aux pili sexuels, cependant ils n'assurent pas les mêmes fonctions : du fait de leur nature dynamique (vitesse d'extension de $0,5 \pm 0,2$ $\mu\text{m/s}$, semblable à la vitesse de rétraction[189]) et de la force conséquente qu'ils sont capables d'exercer (> 100 pN, pour une longueur de persistance de 5 μm)[188, 190], les pili communs assurent la motilité de la bactérie, son organisation en micro-colonies ou encore la captation d'objets biologiques environnant. C'est cette dernière

fonction qui intervient dans la transformation, où l'objet recherché est une séquence ADN exogène.

Parmi les pili communs, le pilus type IV (PT4) occupe un rôle essentiel pour la transformation puisqu'il agit de concert avec les complexes transmembranaires PilQ et PilC pour réaliser la translocation de la séquence ADN captée[188]. Nous décrivons dans la suite ce mécanisme pour les bactéries Gram- (possédant deux membranes interne et externe, séparées entre elles par une couche de peptidoglycane); les bactéries Gram+ possèdent une machinerie cellulaire proche de celle décrite pour les Gram-, mais la transformation est moins bien comprise, d'où le choix retenu ici.

Mécanisme de la transformation

La transformation commence par la polymérisation des filaments de pilines formant le PT4 au niveau du complexe PilC de la membrane interne (Fig2.9); PilC s'associe aux complexes PilD et PilB pour le recrutement de pilines depuis la membrane interne et leur polymérisation en filaments par activité ATPase[185, 186, 188]. Le pilus traverse la périplasme et débouche dans le milieu extracellulaire via le pore membranaire PilQ. Lorsque le PT4 entre en contact avec une séquence ADN exogène, une dépolymérisation des filaments de pilines s'opèrent depuis le complexe PilC (membrane interne) sous le contrôle du complexe PilT, à une vitesse supérieure à 2000 nm/s[191], introduisant ainsi une portion de la molécule d'ADN à l'intérieur du périplasme. Cette portion est ensuite captée par les protéines chaperonnes ComEA libres dans le périplasme : la protéine ComEA (8 kDa) possède deux motifs hélice-hairpin-hélice, d'une longueur d'environ 20 résidus et espacés entre eux d'environ 1 nm[192], capables de se lier de manière non-spécifique à la double hélice d'une molécule d'ADN double brin[193, 186] avec une énergie de liaison de $49 \pm 14 k_B T$ [194] et une enthalpie libre de $20 k_B T$ (d'après la formule $\frac{\Delta G}{k_B T} = \ln(K_d)$, où $K_d \simeq 3$ nM[195]); on en déduit la variation d'entropie de la réaction d'association ΔS telle que $\frac{\Delta S}{k_B} \simeq -69$. Ce gain d'enthalpie libre par association de la protéine ComEA est nécessaire pour alimenter la translocation de l'ADN en énergie car le périplasme des bactéries Gram- ne contient pas de molécules d'ATP[196]. Nous constatons que l'énergie récupérée dans cette association est comparable à celle récupérée lors de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

En se liant à la séquence ADN en cours de translocation à travers le complexe PilQ, ComEA empêche sa rétro-diffusion à travers le pore membranaire et promeut ainsi sa translocation directive à la manière d'un ratchet de translocation[191, 186]. Il a été montré que la translocation de la molécule d'ADN à travers la membrane externe est indépendante de sa translocation à travers la membrane interne, les deux processus étant découplés[197, 198]. Une fois la séquence ADN complètement internalisée dans le périplasme, elle est captée par le complexe ComEC de la membrane interne, qui assure sa translocation vers le cytoplasme par activité ATPase. Le mécanisme mis en oeuvre par ComEC n'est pas connu à ce jour, il est possible qu'un gradient électro-chimique soit à l'origine de ce mécanisme; une hypothèse alternative fait appel au ratchet de translocation avec pour agents de ratchet les protéines cytosoliques SsbB, DprA, and RecA[186].

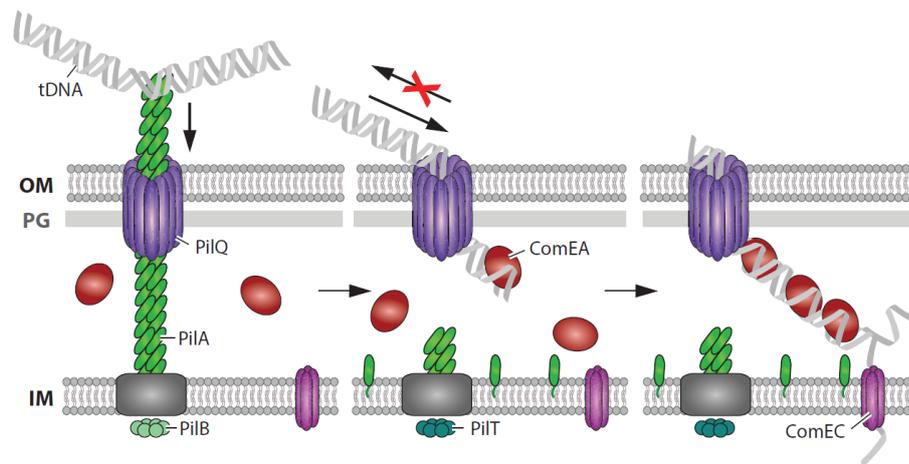


FIGURE 2.9 – Transformation par le pilus type IV : une molécule d'ADN exogène (transforming DNA, tDNA) est initialement capturée par le pilus type IV, formé de multiples filaments de pilines polymérisées, ce qui provoque la rétraction du pilus par dépolymérisation des pilines à sa base. La rétraction du pilus entraîne avec lui une portion de l'ADN exogène au sein du périplasma, où il est capté par des complexes ComEA qui se lient à la double hélice de manière non-spécifique. La présence de ComEA lié empêche la rétro-diffusion de la molécule d'ADN à travers le pore membranaire PilQ, ce qui favorise sa translocation vers le périplasma à la manière d'un ratchet de translocation. Une fois l'ADN internalisé dans le périplasma, un complexe ComEC de la membrane interne déshybride l'ADN double brin pour le transporter ensuite vers le cytoplasme de la bactérie selon un mécanisme encore inconnu ; le second brin d'ADN reste dans le périplasma où il sera digéré. (Extrait de [186]).

Expérience de Hepp *et coll.*

Le mécanisme de ratchet de translocation présent dans la transformation a été mis en évidence par Hepp *et coll.*[191] en 2016 à partir d'une expérience de pinces optiques : dans cette étude, les auteurs ont mis en contact une molécule d'ADN de 10 kbp, liée à une extrémité par liaison biotine-streptavidine à une micro-bille piégée par une pince optique, et une bactérie, *Neisseria gonorrhoeae*, sur un gel d'agar (Fig.2.10A). Les bactéries utilisées dans cette étude présentaient une mutation pour la protéine pilV, jouant un rôle dans l'assemblage du pilus ; il a été montré qu'une telle mutation augmente la fréquence de transformation et limite la motilité de la bactérie, ce qui présentait des avantages significatifs pour la réalisation d'une expérience de pince optique[191, 199]. Les auteurs ont mesuré l'évolution de la longueur d'ADN entre la bille et la bactérie au cours du temps à force constante (force clamp). Pour des forces inférieures à 17 pN, la réduction progressive de la longueur d'ADN par son internalisation à l'intérieur de la bactérie a toujours été observée (Fig.2.10B), ce qui signifie que le moteur à l'origine de la transformation peut générer une force de 17 pN. Ensuite, les auteurs ont observé qu'une mutation du gène codant pour la protéine ComEA, provoquant une baisse de 75% de la concentration de ComEA dans le périplasma, induisait une baisse significative de la vitesse de translocation moyenne (Fig.2.10C), passant de (194 ± 47) nm/s pour le témoin à (71 ± 26) nm/s pour la version de ComEA mutée[191]. De plus, la relation force-vitesse mesurée pour l'import d'ADN dans la bactérie suivait de manière quantitative les prédictions du modèle du ratchet de translocation 2.6 (Fig.2.10D), établi précédemment dans la section 1.3.2 du chapitre 1 :

$$v(F) = \frac{2D}{a} \times \frac{\frac{1}{2}\omega^2}{\frac{e^\omega - 1}{1 - K(e^\omega - 1)} - \omega}, \quad (2.6)$$

avec v la vitesse de translocation, F la force exercée par la pince optique, $D = (250 \pm 100)$ nm².s⁻¹ le coefficient de diffusion de l'ADN dans le pore membranaire PilQ, $a = (1.6 \pm 0.3)$ nm la distance moyenne entre deux sites d'adsorption de ComEA sur l'ADN, $K = (1.2 \pm 0.8) \times 10^{-3}$ la constante de dissociation de l'équilibre d'adsorption de ComEA sur l'ADN et $\omega = \frac{Fa}{k_B T}$.

Le pas a du ratchet estimé ici est en bon accord avec la taille caractéristique séparant les deux motifs hélice-hairpin-hélice de la protéine ComEA, indiquant une densité de molécules adsorbées importante, l'ADN est fortement couvert en chaperonnes ComEA, ce qui contribue au succès du ratchet de translocation.

A partir des mesures de force et de pas ci-dessus, nous pouvons en déduire le travail réalisé par le ratchet de translocation : on trouve que ce travail vaut environ $7 k_B T$, ce qui correspond à un rendement de 35%. Ce travail est quantitativement comparable à celui calculé pour la translocase Sec dans la section 2.2.2 et le facteur d'élongation du ribosome 2.2.2.

Toutes ces observations, associées aux observations d'études précédentes montrant que l'absence totale de complexes ComEA dans le périplasma inhibe la transformation[200, 198, 194], mettent en évidence le mécanisme de ratchet de translocation pour l'import d'ADN exogène dans une bactérie par transformation. Il s'agit également de la première étude expérimentale retrouvant avec succès la relation force-vitesse prédite par le modèle du ratchet de translocation 2.6.

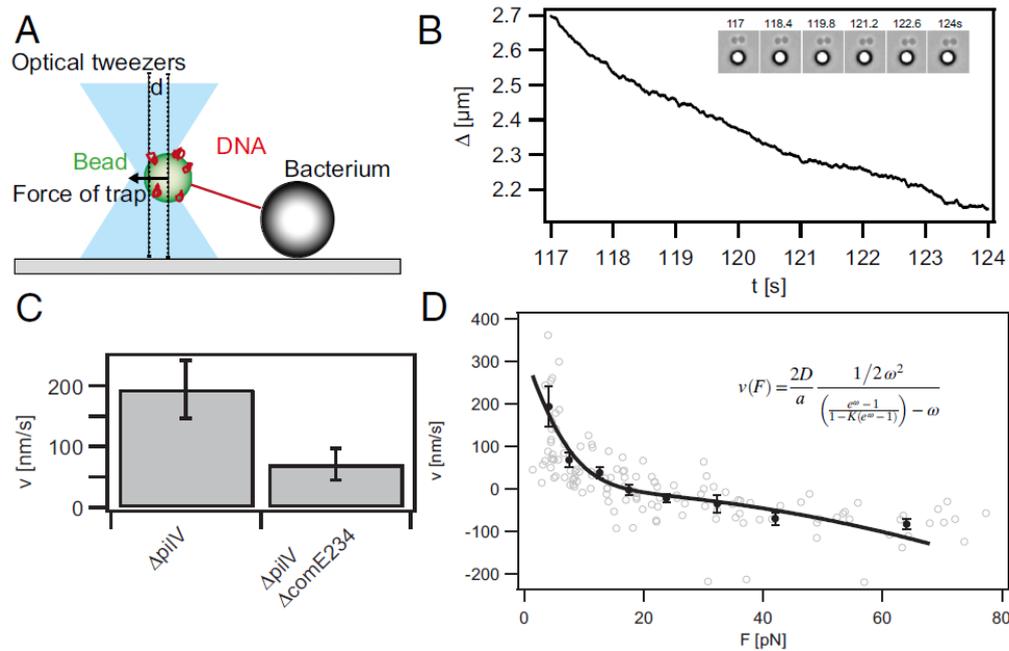


FIGURE 2.10 – Expérience de Hepp *et coll.* : A) Système expérimental constitué d’une pince optique piégeant une micro-bille sur laquelle est attachée une séquence ADN de 10 kbp par liaison biotine-streptavidine; la molécule d’ADN est mise en contact avec une bactérie *Neisseria gonorrhoeae* sur un support d’agar. La longueur d’ADN entre la bille et la bactérie est mesurée au cours du temps à force constante. B) Longueur d’ADN entre la bille et la bactérie au cours du temps pour une force de 4 pN pour la pince optique. C) Vitesse moyenne de translocation entre la condition témoin ($\Delta pilV$) et la condition mutée pour le gène codant pour la protéine ComEA ($\Delta pilV \Delta comE234$). D) Relation force-vitesse mesurée pour l’import d’ADN dans la bactérie *Neisseria gonorrhoeae*, avec ajustement des données expérimentales par le modèle du ratchet de translocation 2.6. (Extrait de [191]).

2.4 Résumé sur les translocons

Nous avons vu à travers les exemples de translocons précédents se dessiner un système type du ratchet biologique. Bien que ces complexes protéiques aient des fonctions différentes, que les molécules transportées ne soient pas les mêmes et que les protéines intervenant dans le processus de transport soient elles-aussi différentes, nous retrouvons toujours les mêmes ingrédients :

- un nanopore dynamique pouvant s'ouvrir ou se fermer ;
- une protéine à transporter disposant d'une séquence spécifique reconnue par le nanopore et provoquant son ouverture ;
- un moteur moléculaire, sous forme de "nano-pince" captant le substrat en translocation et accélérant le transport.

A travers ces trois éléments principaux, nous distinguons un système à la fois spécifique et directionnel.

Les translocons sont spécifiques : en effet, le nanopore ne s'ouvre que si la protéine en translocation dispose d'une séquence signal. Le plus souvent, cette séquence est chargée positivement, ce qui permet à la translocase de capter la protéine et de l'insérer dans le nanopore. Cette séquence signal est ensuite transportée de l'autre côté du nanopore par la différence de potentiel membranaire, où elle est finalement captée par un moteur moléculaire comme Hsp70. Sans cette séquence signal, la translocation n'est pas permise, d'une part car le nanopore n'est pas ouvert, d'autre part car la protéine n'est pas guidée vers l'autre extrémité du pore par la différence de potentiel membranaire. Ce double contrôle assure la spécificité du transport par la translocase.

Les translocons sont directionnels : une fois la séquence signal acheminée de l'autre côté du nanopore, les protéines comme Hsp70 s'associent au substrat en translocation et assurent son transport grâce à leur activité ATPase. En particulier, le travail fourni par ces moteurs moléculaires permet de compenser le coût entropique de confinement de la protéine à l'intérieur du nanopore, ce qui constitue le principal frein à la diffusion libre de ces molécules à travers des nanopores passifs. Ces pinces moléculaires empêchent la rétro-diffusion de la protéine à travers le nanopore, ce qui favorise le transport de la molécule. Ces moteurs moléculaires ne sont situés que d'un seul côté du nanopore, ce qui permet de donner la directionnalité du translocon. En effet, une protéine ayant déjà réalisé sa translocation ne peut plus repartir en arrière, en premier lieu parce que sa séquence signal devrait remonter le potentiel membranaire sans source d'énergie à disposition, ce qui est défavorisé énergétiquement, mais aussi parce que la protéine ne pourrait pas être tirée par les protéines Hsp70, celles-ci n'étant présentes que d'un seul côté du nanopore.

En combinant directionnalité et spécificité, les translocons se présentent comme des systèmes biologiques optimisés pour le transport de macromolécules à travers les membranes biologiques. Nous allons voir dans la suite de ce chapitre un autre exemple de système biologique combinant ces caractéristiques et permettant un transport bi-directionnel spécifique de très nombreuses molécules : le pore nucléaire.

2.5 Pore nucléaire

Parmi les translocons que comportent la cellule, le pore nucléaire est certainement le plus complexe d'entre eux, assurant des fonctions diverses comme le transport de molécules entre le noyau et le cytosol ou encore la régulation de l'expression génétique[201, 202].

Du fait de la présence d'un noyau encapsulant le matériel génétique des cellules eucaryotes, une étape supplémentaire de translocation à travers l'enveloppe nucléaire est nécessaire pour réaliser la traduction des ARNs messagers en protéines par rapport aux cellules procaryotes. Cette étape de translocation est hautement régulée au niveau du pore nucléaire (Nuclear Pore Complex, NPC), dont le rôle est de sélectionner les molécules devant traverser l'enveloppe nucléaire tout en restant imperméable aux autres molécules, ceci dans les deux sens, que ce soit pour l'import de molécules nécessaires à la transcription ou la réplication de l'ADN génomique (polymérases, acides nucléiques...), pour l'export de molécules hors du noyau, notamment l'ARN messenger ou plus simplement la diffusion libre de petites molécules comme des sucres ou des ions entre le cytosol et le noyau[201, 202].

2.5.1 Structure du pore nucléaire

Le pore nucléaire est un complexe protéique d'une masse moléculaire allant de 50 MDa à plus de 120 MDa[202], ce qui le classe parmi les complexes protéiques les plus imposants de la cellule. Selon l'espèce, on peut compter entre 100 et plus de 10 000 pores nucléaires sur une enveloppe nucléaire[203], en sachant qu'un seul pore nucléaire permet le transport de près de 100 MDa/s (soit sa propre masse en une seconde), correspondant en moyenne à 1000 molécules par seconde[204]. Ses dimensions peuvent varier d'une espèce à l'autre, mais le pore nucléaire de *Xenopus laevis* peut être décrit comme un cylindre de 125 nm de diamètre pour une hauteur d'environ 200 nm[205] (Fig.2.11). La structure centrale insérée dans l'enveloppe nucléaire dispose d'une symétrie octogonale autour de son axe transversal à l'enveloppe nucléaire dont le motif est composé d'environ 34 protéines différentes, appelées des nucléoporines (Nups)[206]. Ces motifs sont asymétriques entre le cytoplasme et le noyau, avec 8 nucléoporines cytoplasmiques non-structurées, formant ce qu'on appelle les filaments cytoplasmiques (d'une taille de 50 nm) et 8 nucléoporines nucléaires organisées selon une structure en forme de panier, appelé panier nucléaire (d'une taille de 75 nm)[205]. Le panier nucléaire apparaît comme une structure rigide (longueur de persistance de 3 μ m pour les filaments[207]). Entre les deux se trouve la matrice centrale, en forme de sablier haut de 90 nm et dont le diamètre part de 45-50 nm au centre pour atteindre 70 nm à ses extrémités[205]. Au sein de ce canal se trouvent des nucléoporines en forme de filaments attachés aux parois de la matrice centrale, composant 30% de la composition totale du pore nucléaire[202]. Ces filaments sont structurés selon une répétition de résidus phénylalanine (F) et glycine (G), c'est pourquoi ces protéines sont appelées FG-Nups. Les FG-Nups, d'une longueur entre 50 et 200 nm[208], sont organisées dans le canal central du pore nucléaire selon un réseau dynamique et non-structuré du fait des interactions faibles entre régions hydrophobes de plusieurs FG-Nups, de l'ordre de $k_B T$, permettant une réorganisation rapide du réseau, ainsi que de la grande flexibilité des filaments (longueur de persistance de 0.4 nm en moyenne, correspondant à la taille d'un acide aminé[209]) et l'absence de structures secondaires.

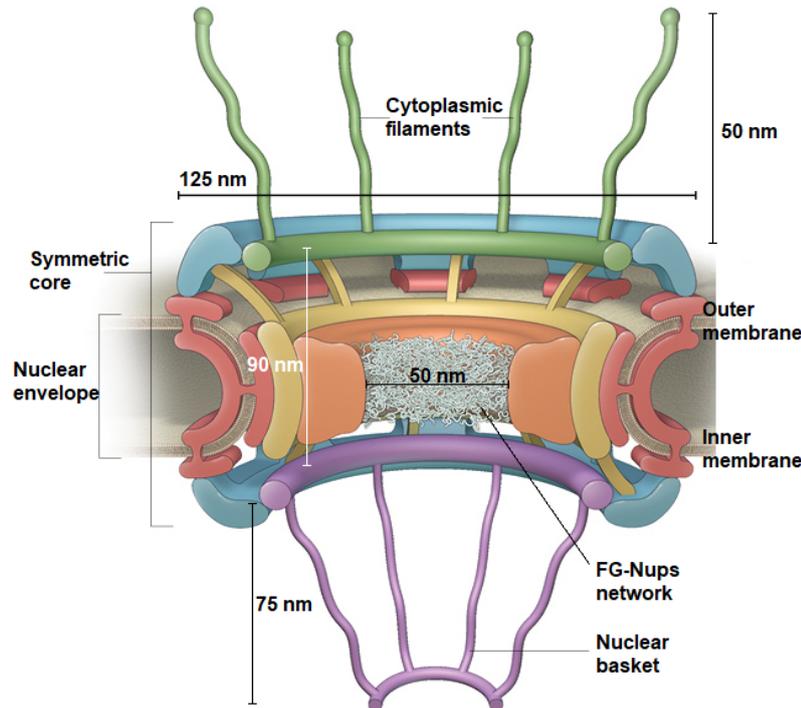


FIGURE 2.11 – Structure du pore nucléaire. (Adapté de [210]).

2.5.2 Cycle d'import/export et bi-directionnalité

Le pore nucléaire est un translocon sélectif et directionnel à la fois pour l'import ou l'export de molécules du noyau[201]. Pour cela, il agit de concert avec différentes classes de protéines spécifiques :

- les facteurs de transport nucléaire (Nuclear Transport Factors, NTFs), dont le rôle est d'identifier les molécules devant être transportées à travers le pore nucléaire ;
- la protéine Ran (RAt sarcoma-related Nuclear protein), une petite protéine de 25 kDa à activité GTPase permettant de donner la directionnalité du transport selon l'orientation du gradient de concentration de Ran.

Les NTFs sont des protéines capables de traverser le réseau de FG-Nups du pore nucléaire (on dit qu'elles sont solubles). Elles se lient aux molécules devant traverser l'enveloppe nucléaire (qu'on appellera cargos) par reconnaissance d'une courte séquence d'acides aminés (Nuclear Localization Sequence, NLS, pour l'import ; Nuclear Export Sequence, NES, pour l'export) sur le cargo. Une étude de Lee *et coll.* a mis en évidence trois règles générales pour la reconnaissance d'une séquence NLS par la karyophérine $\beta 2$ (NTF) : celle-ci est non-structurée en l'absence de substrat, elle est globalement de charge négative et possède une séquence consensus R/H/KX₂₋₅PY à son extrémité C[211]. Une fois l'interaction spécifique établie entre un NTF et un cargo via sa séquence NLS/NES, le cargo devient lui-même soluble dans le réseau de FG-Nups du pore nucléaire et peut amorcer sa translocation. Nous verrons dans la suite les différents mécanismes proposés pour cette translocation.

La plupart des NTFs font partie de la famille des karyophérines (Kaps), qui se déclinent ensuite en importines ou exportines suivant la direction de la translocation qu'elles accom-

pagent, mais on trouve également d'autres types de NTFs en dehors des karyophérines, comme les facteurs d'export NXT1, Mex67 ou Mtr2 responsables de l'export de ribonucléoprotéines (composés mixtes d'ARN et d'acides aminés, comme les ribosomes ou la SRP) chez *Saccharomyces cerevisiae*[201]. On dénombre au moins 20 karyophérines différentes chez l'humain, contre 14 chez la levure. Chaque karyophérine est spécifique d'un cargo en particulier (à travers sa séquence NLS/NES)[212].

La protéine Ran est une petite protéine de 25 kDa, de la famille des protéines G (à activité GTPase)[213]. Elle s'observe donc sous deux formes : une forme GTP et une autre GDP. La protéine RanGTP se trouve essentiellement dans le noyau de la cellule, tandis que la forme RanGDP est majoritaire dans le cytosol ce qui conduit à un gradient de concentration pour les deux espèces de part et d'autre de l'enveloppe nucléaire. Cette asymétrie est essentielle pour comprendre l'origine de la directionnalité du transport à travers le pore nucléaire.

En effet, la protéine RanGTP augmente l'affinité d'une exportine pour les séquences NESs associées, accélérant ainsi l'export du cargo à travers le pore nucléaire[213]. Lorsqu'elle hydrolyse sa GTP liée, elle affaiblit l'affinité entre le cargo et l'exportine, ce qui mène à sa dissociation et à la libération du cargo dans le cytosol, empêchant ainsi toute rétro-translocation du cargo à travers le pore nucléaire. L'exportine, libre elle aussi, peut alors diffuser vers l'intérieur du noyau afin d'être réemployée pour un nouveau cycle d'export. L'hydrolyse de la GTP liée à la protéine Ran est stimulée par la présence de la protéine RanGAP (Ran GTPase Activating Protein), essentiellement localisée à l'extérieur du noyau (Fig.2.12).

A l'inverse, dans le cas de l'import, la protéine RanGTP diminue l'affinité d'une importine pour les séquences NLSs[213]. Ainsi, lorsqu'un cargo lié à une importine termine sa translocation à travers le pore nucléaire et débouche dans le noyau, la protéine RanGTP se lie à l'importine, ce qui provoque la libération du cargo à l'intérieur du noyau. L'importine liée à RanGTP peut alors rétro-diffuser dans le pore nucléaire, puis l'hydrolyse de la GTP liée provoque la dissociation de l'importine et de la protéine Ran, permettant le recyclage de la karyophérine(Fig.2.12).

Pour stimuler la régénération de la protéine RanGDP en RanGTP et maintenir le gradient de concentration à travers le pore nucléaire, des facteurs d'échanges RanGEF (Ran GTP Exchange Factor) se trouvent dans le noyau, permettant ainsi le remplacement des GDP en GTP[214]. RanGAP et RanGEF participent au maintien de la directionnalité du transport à travers le pore nucléaire en alimentant le cycle d'export/import des cargos liés aux karyophérines par l'intermédiaire de la protéine Ran.

2.5.3 Sélectivité du pore nucléaire

L'élément central du pore nucléaire permettant sa sélectivité est son réseau de FG-Nups à l'intérieur du canal : comme expliqué précédemment, les FG-Nups sont des filaments possédant à la fois des parties hydrophiles et d'autres hydrophobes (amphiphiles). Ces dernières peuvent interagir entre filaments pour former les noeuds du réseau, avec une énergie de l'ordre de $k_B T$; ainsi, par simples fluctuations thermiques, le réseau se réorganise en permanence. La sélectivité du pore nucléaire doit donc provenir de ses propriétés structurales.

Des études ont montré l'existence d'un canal central au sein du réseau de FG-Nups

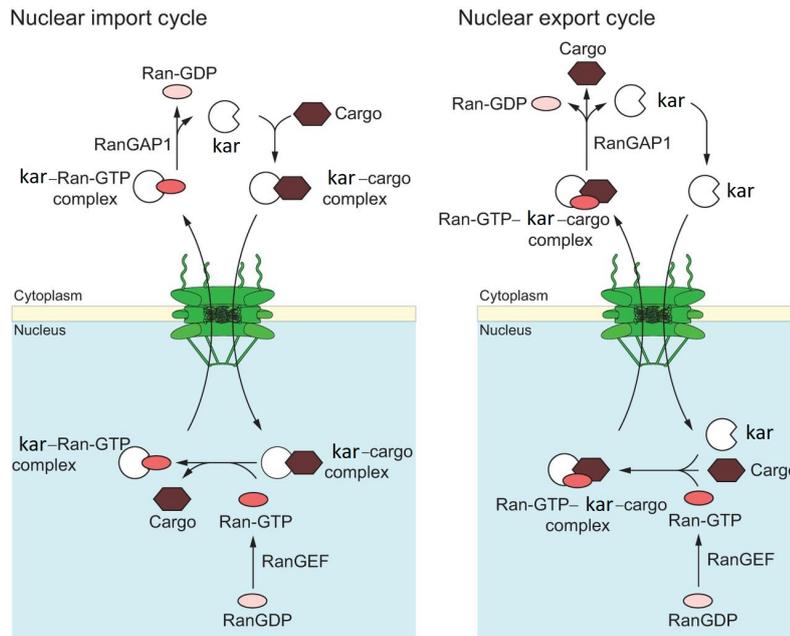


FIGURE 2.12 – Cycles d’import/export des cargos à travers le pore nucléaire en présence de karyophérines (kar) et de la protéine Ran. (Extrait de [215]).

permettant la diffusion libre de molécules de petites tailles (jusqu’à 29 kDa[216]), avec un diamètre d’environ 5,3 nm[217]. Ce canal permet la diffusion libre de petites molécules comme les ions ou les sucres afin d’assurer l’homéostasie du noyau et du cytosol. Les molécules de masse plus grande que 29 kDa sont fortement ralenties dans leur diffusion à travers le réseau de FG-Nups et celles supérieures à 61 kDa sont totalement stoppées à l’entrée du pore nucléaire[216]). Les molécules d’une extension spatiale supérieure au plus petit diamètre du pore (45-50 nm) peuvent le traverser moyennant un changement de conformation et accompagnées d’un NTF[218, 219]. Ghavami *et coll.*[220] ont observé par simulations Monte Carlo du pore nucléaire que la présence de motifs hydrophobes à la surface du cargo diminue de près de $3 k_B T$ la barrière d’énergie libre formée par le réseau de FG-Nups, permettant au cargo de la traverser la simples fluctuations thermiques. Les auteurs ont alors pu établir les régimes de transports selon la taille et la densité en motifs hydrophobes du cargo.

2.5.4 Modèles pour le mécanisme de transport à travers le réseau de FG-Nups

Malgré les avancées réalisées sur la compréhension de la structure du pore nucléaire, il n’existe pas, à l’heure actuelle, de consensus scientifique sur le mécanisme précis expliquant la sélectivité de la translocation. Néanmoins, plusieurs modèles ont été proposés pour en rendre compte, dont les modèles suivants :

- Virtual gating[221] ;
- Phase sélective[204, 222] ;
- Réduction de dimension[223] ;

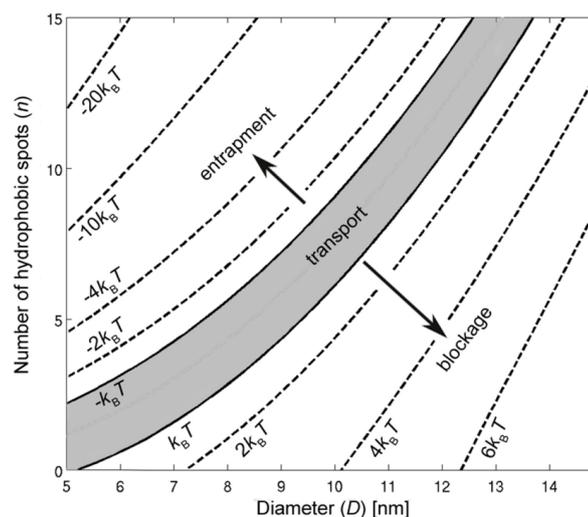


FIGURE 2.13 – Densité de motifs hydrophobes du cargo en fonction de son diamètre. La translocation du cargo n'est permise que dans la zone grisée ; au-dessus de cette zone, le cargo est piégé à l'intérieur du réseau de FG-Nups et rencontre une forte barrière d'énergie libre pour en ressortir ; en dessous, le cargo ne peut pas pénétrer dans le pore. (Extrait de [220]).

- Kap-centric[224] ;
- Brosse de polymères[225] ;
- Forêt[226].

Le modèle Virtual gating, proposé par Rout *et coll.*[221], décrit le réseau de FG-Nups remplissant l'espace intérieur du pore nucléaire comme une barrière énergétique d'origine entropique : du fait de la présence de ce réseau en constante réorganisation, l'espace accessible à une molécule en translocation est fortement réduit, ce qui confine la molécule et réduit son entropie (Fig.2.14A). Par conséquent, le franchissement du réseau de FG-Nups nécessite un coût entropique d'autant plus grand que la molécule est grande. En revanche, lorsque le cargo est lié à une karyophérine, celle-ci peut se lier de manière transitoire avec les FG-Nups, ce qui permet un gain enthalpique réduisant le coût entropique de la translocation (Fig.2.14B). Ainsi, en considérant la translocation à travers le pore nucléaire comme le franchissement d'une barrière d'enthalpie libre, le processus devient réalisable lorsque la hauteur de cette barrière est de l'ordre de l'énergie thermique $k_B T$ (Fig.2.14B). Pour qu'un tel modèle soit valide, il faut que l'association entre la karyophérine et les FG-Nups ne soit pas trop forte (c'est-à-dire un taux de dissociation k_{on} élevé) afin d'éviter un ralentissement de la translocation. De même, les variations d'enthalpie libre lors de la translocation doivent toujours rester positives pour éviter un piégeage du cargo à l'intérieur du pore nucléaire en cas de barrière d'énergie pour en ressortir.

Le modèle de phase sélective, proposé par Ribbeck *et coll.*[204, 222], considère le réseau de FG-Nups comme un gel hydrophobe uniquement perméable aux molécules d'une taille inférieure à celle de la maille du réseau et aux grandes molécules accompagnées d'une karyophérine. Pour les premières, la translocation s'effectue simplement par diffusion d'une particule à travers un réseau tri-dimensionnel ce qui explique la perméabilité

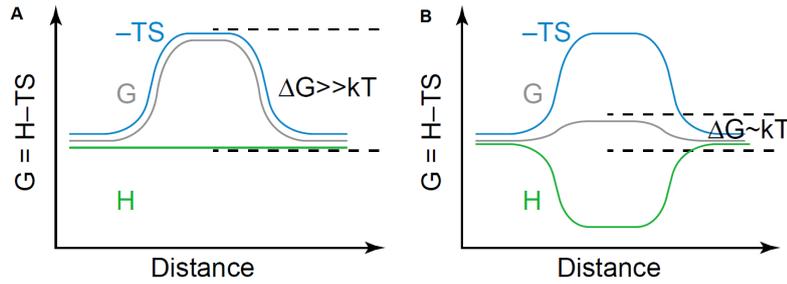


FIGURE 2.14 – Modèle Virtual gating - Profil d'enthalpie libre du cargo selon l'avancement de la translocation : A) sans karyophérine ; B) avec karyophérine. La karyophérine réduit l'enthalpie libre du cargo par liaison transitoire avec les FG-Nups du pore nucléaire. (Extrait de [221]).

des molécules d'une taille inférieure à 29 kDa[216]. Pour les secondes, l'interaction entre les récepteurs hydrophobes de la karyophérine (Nuclear Transports Receptors, NTR) avec les noeuds hydrophobes du réseau de FG-Nups déstabiliserait le réseau et entraînerait sa rupture locale par simples fluctuations thermiques, ce qui permettrait le passage du cargo tout entier (Fig.2.15B). A l'inverse, un cargo ne disposant pas de karyophérine liée ne pourrait passer le réseau qu'à la suite d'une rupture spontanée du réseau sous l'effet de fortes fluctuations thermiques, considérées comme improbables(Fig.2.15A).

Le modèle de réduction de dimension, développé par R. Peters[223], propose une translocation gouvernée par la diffusion du cargo lié à une karyophérine sur la surface interne du pore nucléaire, recouverte de motifs FG. Dans ce modèle, la karyophérine interagit avec la surface des filaments cytoplasmiques ou le panier nucléaire, recouverts de motifs FG pour lesquels les karyophérines ont une bonne affinité (Fig.2.16). Une fois lié à cette surface, le cargo et la karyophérine diffusent le long de cette surface qui recouvre l'intérieur du pore nucléaire, jusqu'à atteindre l'extrémité du pore et être libérés via l'action de la protéine Ran. Au contraire, les petites molécules peuvent diffuser librement dans le canal central du réseau de FG-Nups. Dans ce modèle, les filaments cytoplasmiques et le panier nucléaire jouent un rôle d'initiateurs de la translocation en captant les karyophérines liées à des cargos en attente de translocation.

Le modèle Kap-centric, développé par Kapinos *et coll.*[224], considère les karyophérines comme parties structurantes du réseau de FG-Nups. Les karyophérines libres (non-complexées à des cargos) disposent d'une forte affinité pour les FG-Nups et s'intègrent au réseau de manière stable ($K_d \simeq 100$ nM et $k_{off} < 10^{-3}$ s⁻¹[224]). À concentration physiologique, le réseau de FG-Nups est dense en karyophérines liées, ce qui constitue une barrière entropique élevée pour les cargos disposant d'une faible affinité pour les FG-Nups et non-chaperonnés par des karyophérines (Fig.2.17). En revanche, l'association entre un cargo et une karyophérine diminue l'interaction entre la karyophérine et le réseau de FG-Nups, ce qui permet son transit rapide au sein du pore nucléaire. Ainsi, dans le modèle Kap-centric, on distingue deux phases au sein du pore nucléaire : une phase dense en karyophérines, avec une dynamique lente, située proche des parois et qui réticule le réseau de FG-Nups hydrophobe ; la seconde phase est caractérisée par des karyophérines faiblement liées au réseau de FG-Nups, pouvant circuler librement au niveau du canal central formé par le réseau et permettant ainsi la translocation sélective et rapide des cargos.

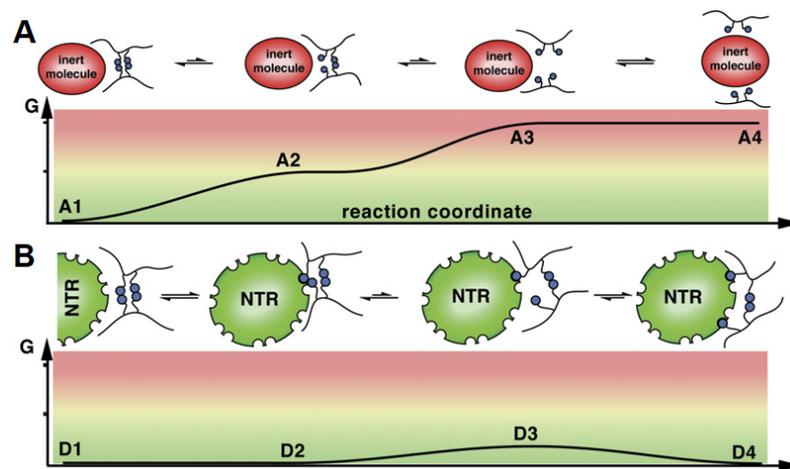


FIGURE 2.15 – Modèle de phase sélective - Profil d'enthalpie libre du cargo selon l'avancement de la translocation : A) pour un cargo non-lié à une karyophérine ; B) avec une karyophérine. Pour progresser dans la translocation, le réseau de FG-Nups doit localement se défaire pour permettre le passage de cargos plus gros que la maille du réseau. En l'absence de karyophérine, les noeuds du réseau doivent s'ouvrir spontanément par fluctuations thermiques, ce qui représente une barrière enthalpique importante dans le cas où le réseau est très enchevêtré. En revanche, pour un cargo lié à une karyophérine, les récepteurs hydrophobes de la karyophérine (Nuclear Transports Receptors, NTR) peuvent se lier aux résidus hydrophobes des noeuds du réseau de FG-Nups et ainsi le déstabiliser, favorisant sa rupture locale. (Extrait de [222]).

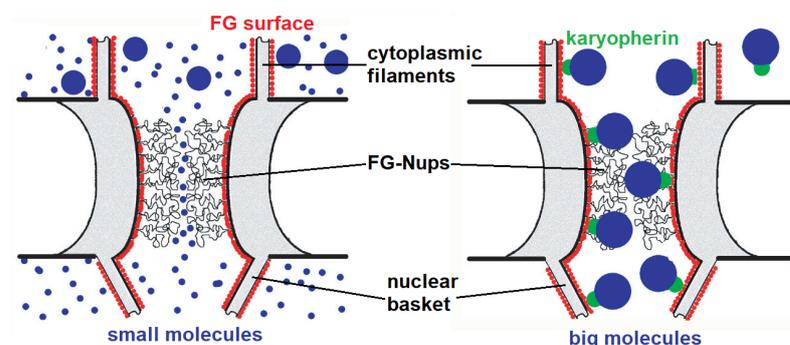


FIGURE 2.16 – Modèle de la réduction de dimension : (gauche) les petites molécules peuvent diffuser librement dans le canal central formé par le réseau de FG-Nups, tandis que les grosses molécules non-chaperonnées par une karyophérine sont bloquées à l'entrée ; (droite) les grosses molécules liées à une karyophérine sont captées par les filaments cytoplasmiques ou le panier nucléaire, recouverts de motifs FG. Cette surface s'étend sur toute la face interne du pore nucléaire. une fois liée à la surface FG, le cargo et sa karyophérine liée diffusent sur la face interne du pore nucléaire (diffusion à deux dimensions), jusqu'à atteindre l'extrémité du pore. (Adapté de [223]).

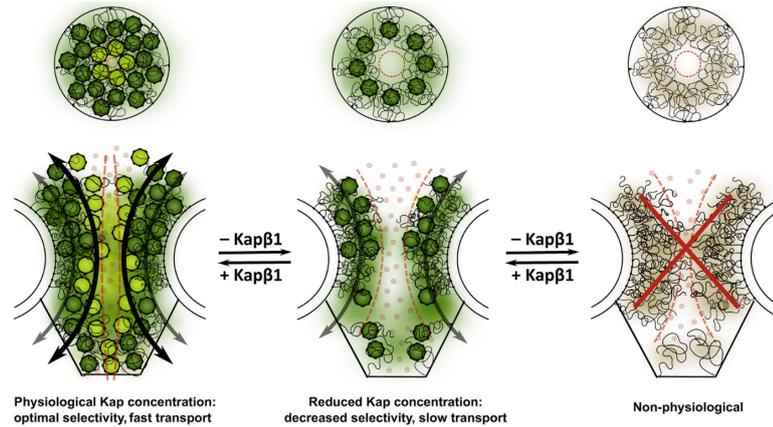


FIGURE 2.17 – Modèle Kap-centric : les karyophérines libres réticulent le réseau de FG-Nups du pore nucléaire et sa sélectivité augmente avec la densité en karyophérines, formant une phase lente et structurant le canal central du réseau. Les karyophérines liées à des cargos disposent d'une affinité réduite pour le réseau de FG-Nups, ce qui leur permet de transiter à travers le pore sans être piégées par le réseau. (Extrait de [224]).

Le modèle Brosse de polymères, proposé par Lim *et coll.*[225], considère le réseau de FG-Nups comme une brosse de polymères. Cette brosse s'effondre sur elle-même en présence d'une karyophérine, d'une manière semblable aux prédictions de l'étude de Opferman *et coll.*[227] pour des concentrations faibles en nanoparticules. Lorsqu'une karyophérine liée à un cargo s'approche du pore nucléaire, elle est captée par les FG-Nups, qui s'effondrent à son contact, tractant la karyophérine et son cargo vers le site d'ancrage des FG-Nups concernées. La translocation à travers le pore se fait par dissociations-associations et effondrements successifs du réseau de FG-Nups, jusqu'à l'action de la protéine Ran qui libère le cargo. Lim *et coll.* ont observé par mesure de forces à l'AFM l'effondrement d'une brosse de FG-Nups par ajout d'importine- $\beta 1$, passant de 30 nm à près de 11 nm. En revanche, après effondrement de la brosse de FG-Nups, l'ajout de protéines RanGTP a permis un retour réversible à la hauteur de brosse initiale, ce qui souligne l'importance de la protéine Ran dans le processus de translocation, négligé dans les modèles précédents.

Le modèle forêt, développé par Yamada *et coll.*[226], propose une organisation du réseau de FG-Nups selon les domaines structurant les FG-Nups. En particulier, les auteurs classent les types de FG-Nups selon la présence ou non d'un domaine étendu et non-cohésif, peu dense en résidus, ce qui permet le passage du cargo dans le réseau ; ces FG-Nups sont classés comme "arbres" ; au contraire, les FG-Nups ne disposant pas de tels domaines sont classés comme "arbustes" (à l'exception de la protéine Nup60) (Fig.2.19). Pour toutes ces protéines (sauf Nup60), l'extrémité du filament est composée d'un domaine effondré cohésif, capable de se lier à d'autres domaines du même genre. Ces domaines cohésifs sont denses en résidus, ce qui limite fortement la translocation des cargos. Avec ces deux types de FG-Nups, arbres et arbustes, le réseau de FG-Nups est structuré de manière à former deux canaux de translocation pour les complexes cargos-karyophérines, un canal central et un latéral, séparés par les domaines cohésifs des FG-Nups (Fig.2.19).

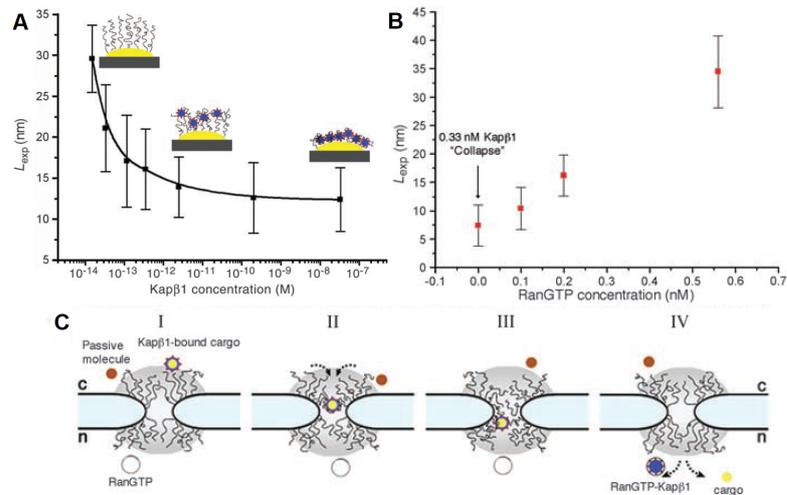


FIGURE 2.18 – Modèle de brosse de polymères : A) Epaisseur de la brosse en fonction de la concentration en importine-β1. B) Epaisseur de la brosse (initialement effondrée par ajout d’importine-β1) en fonction de la concentration en protéines RanGTP. C) Mécanisme du modèle de la brosse de polymère : le complexe cargo-karyophérine est capté par des FG-Nups (I) ce qui provoque l’effondrement de la brosse et la traction du complexe vers le centre du pore (II) ; par une succession de dissociations-associations entre le complexe et les FG-Nups, le cargo débouche à l’extrémité du pore nucléaire (III) puis est finalement dissocié de sa karyophérine sous l’action d’une protéine Ran (IV). (Extrait de [225]).

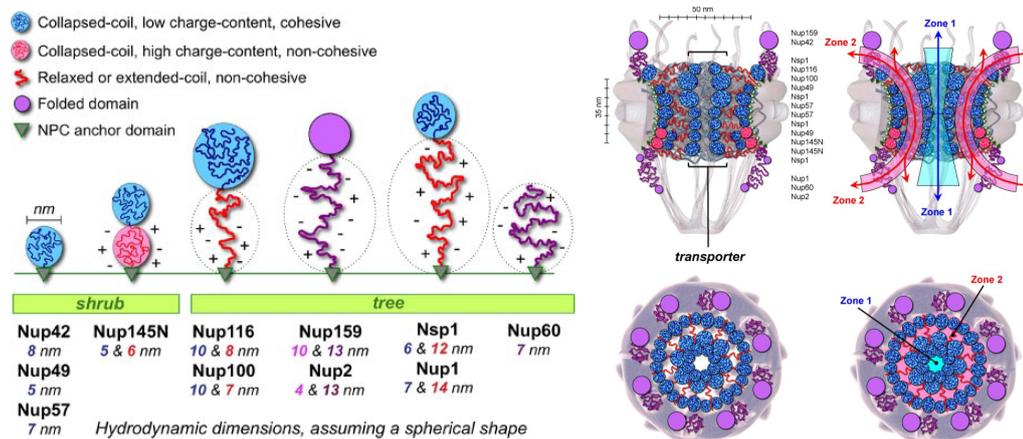


FIGURE 2.19 – Modèle forêt : (gauche) classement des types de FG-Nups selon l’existence d’un domaine étendu et non-cohésif (arbre) ou non (arbuste) ; (droite) structure du réseau de FG-Nups, laissant entrevoir l’existence de deux canaux pour la translocation, un canal central et un latéral, séparés par le domaine effondré et cohésif de FG-Nups. (Extrait de [226]).

2.5.5 Pore nucléaire et directionnalité

Que ce soit pour l'import ou pour l'export, on constate que la dissociation du cargo de la karyophérine par l'activité de la protéine Ran empêche la rétro-translocation du cargo à travers le pore nucléaire, car le cargo ne dispose pas, seul, d'une solubilité suffisante pour diffuser à travers le réseau de FG-Nups du pore nucléaire, il nécessite une association avec une karyophérine pour cela. En empêchant la rétro-translocation, le système couplé du pore nucléaire et des karyophérines/Ran agit comme un ratchet de translocation alternatif : dans ce cas, le ratchet n'est effectif qu'une fois la translocation terminée, contrairement aux translocases vues précédemment, où des agents de ratchet agissent continûment lors de la translocation. Il s'agit néanmoins bien d'un ratchet puisque la rétro-translocation est inhibée.

Export de l'ARNm

Plus précisément, le ratchet de translocation est un mécanisme ayant été proposé pour expliquer le transport de cargos moléculaires à travers le pore nucléaire.

M. Stewart a proposé un mécanisme de ratchet de translocation pour l'export d'ARNm hors du noyau[228, 229, 230] avec pour agent de ratchet le complexe protéique Mex67:Mtr2, un hétérodimère de 526 kDa (environ 5 nm) non-relié au gradient de RanGTP (contrairement aux karyophérines) mais disposant d'une forte affinité pour les FG-Nups et pouvant se lier à des ARNm de manière non-spécifique, avec une énergie de 14-16 $k_B T$. [231, 232, 233, 234].

Pour cela, des complexes Mex67:Mtr2 se lient à une molécule d'ARNm dans le noyau, ce qui lui permet de traverser le réseau de FG-Nups. Lorsque qu'un segment d'ARNm atteint le cytoplasme, la portion est remodelée par l'hélicase Dbp5 (enzyme ATPase), ce qui provoque la dissociation du complexe Mex67:Mtr2. Le segment d'ARN ayant perdu son transporteur, il ne peut plus rétro-diffuser à l'intérieur du réseau de FG-Nups et diffuse donc dans le cytoplasme en entraînant avec lui le reste de la molécule d'ARN à la manière d'un ratchet de translocation (Fig.2.20A-B).

Au regard de l'organisation de l'export de l'ARNm hors du noyau, une hypothèse plausible pour expliquer la directionnalité du transport serait le gradient de concentration de l'hélicase Dbp5, essentiellement localisée au niveau des filaments cytoplasmiques du pore nucléaire : Dbp5 interagit spécifiquement avec le β -propeller terminal de la nucléoporeine Nup159, ce qui la concentre dans le cytoplasme[235, 236, 237]. Le recyclage du complexe Mex67:Mtr2 se fait ensuite par simple ré-équilibre de sa concentration entre les deux côtés du pore nucléaire.

Simulation de Mincer et Simon

Le détail du mécanisme au coeur de la translocation de cargos à travers le pore nucléaire fait l'objet de recherches actives, tant du point de vue expérimental que des simulations. L'étude de Mincer et Simon[238] met en avant l'hypothétique existence de positions d'équilibre dans le réseau de FG-Nups, permettant au cargo de passer de l'une à l'autre par fluctuations, ce qui accélérerait le transport d'après les auteurs.

Pour aboutir à cette conclusion, les auteurs ont mis en oeuvre une simulation de dynamique moléculaire de l'import d'un cargo : le pore nucléaire est modélisé par un

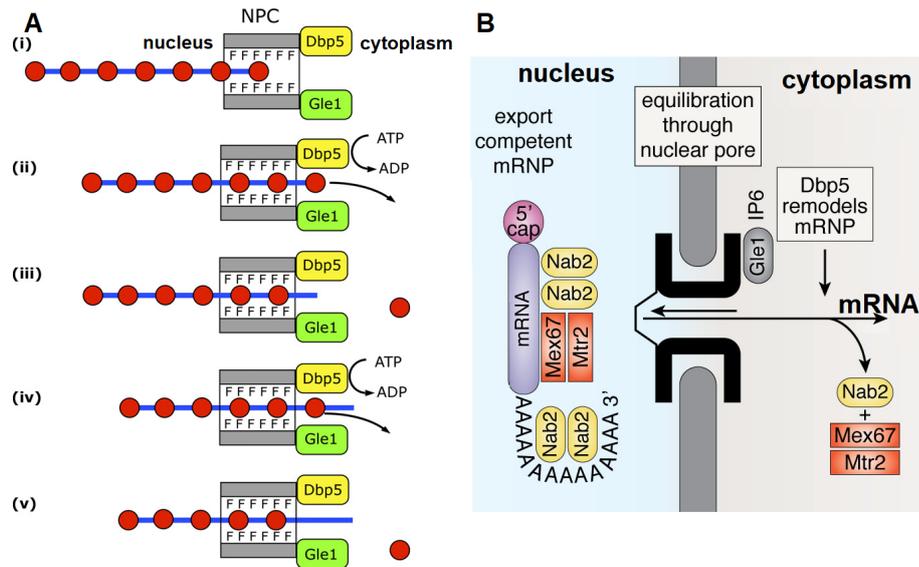


FIGURE 2.20 – Export d’ARNm par ratchet de translocation : A) mécanisme de ratchet de translocation pour l’export d’une molécule d’ARNm chaperonnée ; lorsqu’un segment d’ARNm chaperonné sort du pore nucléaire côté cytoplasme, sa chaperonne (le complexe protéique Mex67:Mtr2) est dissociée par l’activité ATPase de l’enzyme Dbp5, stimulée par Gle1. Le segment d’ARNm ne peut alors pas rétro-diffuser à l’intérieur du pore nucléaire, ce qui entraîne le reste de la molécule par mécanisme de ratchet de translocation. B) Schéma d’export d’une molécule d’ARNm. (A adapté de [228] et B adapté de [229]).

cylindre creux de longueur 30 nm et de diamètre 50 nm dont l’intérieur est couvert d’un nombre de FG-Nups variable allant de 8 à 80 (Fig.2.21A). Chaque FG-Nup est modélisé par un filament semi-flexible d’une longueur allant de de 150 à 1 800 acides aminés (environ 60 nm de longueur de contour en moyenne), avec un rayon variable entre 0,3 et 3 nm. Ces filaments disposent de sites d’adsorption de karyophérine (entre 13 et 26), pour 10 sites de liaisons FG par karyophérine. Les cargos sont modélisés par des sphères de diamètre variable (entre 6 et 48 nm), liées ou non à une ou plusieurs karyophérines. Enfin, un gradient de RanGTP a été généré entre l’intérieur du noyau et le cytoplasme, modélisé par un taux d’association de RanGTP avec la karyophérine décroissant de façon gaussienne entre l’intérieur et l’extérieur du noyau. Il est important de noter ici que les interactions entre FG-Nups ne sont pas prises en compte, ce qui constitue une limite de l’étude car nous avons vu précédemment que le réseau de FG-Nups est fortement connecté ; l’absence d’interactions au sein de ce réseau peut mener à une dynamique erronée par rapport au système biologique réel.

A partir de leur simulation, Mincer et Simon ont pu observer un transport directionnel des cargos liés à des karyophérines en présence d’un gradient de RanGTP selon un mécanisme de ratchet de translocation : le cargo se lie d’abord à un filament de FG-Nups à l’entrée du pore via les sites d’adsorption de sa karyophérine liée, puis le cargo est ramené par diffusion vers une position d’équilibre proche du centre du pore autour de laquelle il fluctue. Les autres filaments de FG-Nups se réorganisent alors autour du cargo par fluctuations, ce qui abaisse la barrière d’énergie pour la translocation du cargo. Le cargo peut alors diffuser plus facilement vers une seconde position symétrique de la première

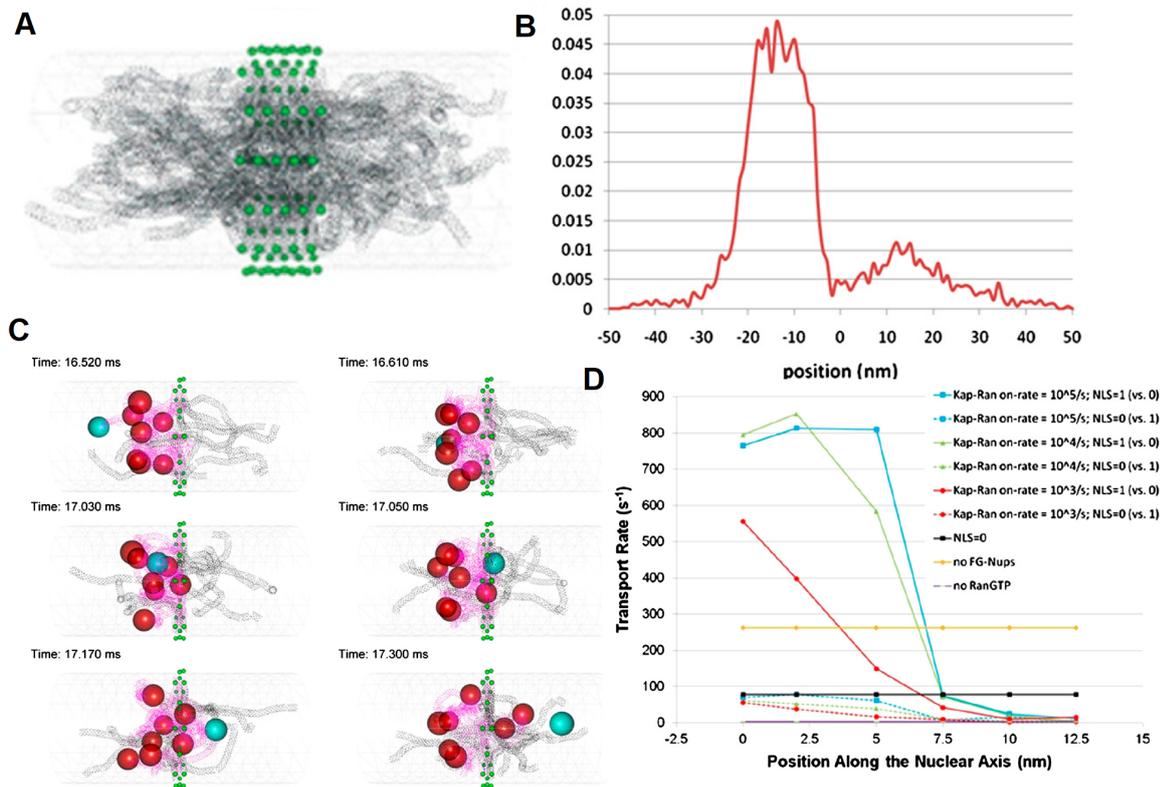


FIGURE 2.21 – Etude de Mincer et Simon : A) modélisation du pore nucléaire vu de côté; les points verts correspondent aux sites d’ancrage des filaments de FG-Nups (ici, 80 filaments). B) Distribution de la position d’un cargo sur la durée de sa translocation ; -15 nm correspond à l’entrée du réseau de FG-Nups côté cytoplasme, +15 nm la sortie côté noyau et 0 nm le centre du pore. C) Visualisation d’une translocation à différents instants. Les billes correspondent à des cargos liés à des filaments de FG-Nups via leur karyophérine ; nous suivons plus précisément la translocation du cargo en bleu. D) Taux de transport en fonction du gradient de RanGTP ; les abscisses correspondent à la position le long de l’axe du pore pour laquelle la concentration de RanGTP tombe à 10% de sa valeur initiale. (Extrait de [238]).

par rapport au centre du pore nucléaire, se rapprochant ainsi des molécules de RanGTP (Fig.2.21B-C). Si le cargo rencontre dans cette deuxième position d'équilibre une molécule de RanGTP, il est séparé de sa karyophérine et est éjecté hors du pore côté nucléaire par force entropique.

Pour appuyer cette hypothèse concernant l'existence de deux positions d'équilibre pour la translocation d'un cargo dans le pore nucléaire, plusieurs études indépendantes ont montré la pertinence de ce modèle : nous pouvons par exemple citer l'étude d'Atkinson *et coll.*[239], où les auteurs ont observé grâce à une expérience de microscopie à fluorescence polarisée sur des pores nucléaires *in vivo* une organisation des FG-Nups avec une orientation globale ordonnée très présente au centre du réseau de FG-Nups et plus libre sur ses extrémités. Ce type de structure est susceptible d'induire une transition rapide pour un filament de FG-Nup fluctuant vers l'intérieur du réseau, il est probable que ce filament s'aligne avec le reste du réseau et adopte une conformation étirée le long de l'axe du pore. Si ce filament est lié à un cargo, celui-ci sera transporté d'une extrémité du réseau de FG-Nups à l'autre en une étape discrète.

Une autre étude de Cardarelli *et coll.*[240] a détaillé l'observation d'une transition rapide (3-5 ms) de la position de la nucléoporeine Nup153 entre une conformation étendue et une autre compacte. Une étude de Lim *et coll.*[225] décrit cette longueur de compaction comme valant environ 100 nm, ce qui corrobore les observations de Cardarelli *et coll.* Cette transition rapide entre deux positions du pore nucléaire soutient l'hypothèse de l'existence de deux points d'équilibre pour la translocation d'un cargo à travers le réseau de FG-Nups.

Du point de vue énergétique, on peut estimer les tailles relatives de barrières d'enthalpie libre pour le transport à partir des taux de translocation via la relation d'Arrhenius :

$$k = k_0 \times e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}}, \quad (2.7)$$

où k est le taux de translocation (en s^{-1}), k_0 le taux d'essai en absence de barrière et ΔG est la hauteur de la barrière d'enthalpie libre.

En considérant des taux d'essai identiques pour deux conditions de translocation 1 et 2, on a la relation suivante :

$$\frac{\Delta \Delta G}{k_B T} = \frac{\Delta G_2 - \Delta G_1}{k_B T} = \ln \left(\frac{k_1}{k_2} \right). \quad (2.8)$$

A partir de la relation (2.8) et connaissant les valeurs numériques des taux de translocations de l'étude de Mincer et Simon (Fig.2.21D), on en déduit que le réseau de FG-Nups du pore nucléaire augmente d'environ $1,3 k_B T$ l'énergie nécessaire à un cargo seul pour traverser le pore nucléaire, ce qui limite les translocations parasites par simples fluctuations thermiques sans toutefois opposer trop de résistance aux cargos chaperonnés par des karyophérines.

Ensuite, la liaison du cargo avec une karyophérine diminue de près de $2,4 k_B T$ la barrière d'enthalpie libre pour la translocation. Lorsque le cargo perd sa karyophérine par liaison avec la protéine RanGTP, il subit alors une force entropique de près de 5 pN (en considérant un cargo d'une taille de 2 nm de diamètre) l'éjectant du réseau de FG-Nups vers l'intérieur du noyau. Cette force est quantitativement comparable à celles engendrées par les translocons discutés dans ce chapitre.

Enfin, en considérant la distribution de probabilité de présence du cargo le long de l'axe du pore nucléaire, bi-modale dont les pics sont situés sur les positions d'équilibre de la

translocation (-15 nm et +15 nm par rapport au centre du pore nucléaire), avec l'hypothèse que le rapport relatif d'amplitude des deux pics est similaire au rapport des taux de transition entre les deux positions (rapport de 5), on trouve que la barrière d'enthalpie libre pour qu'un cargo passe de la première moitié du pore à la seconde est d'environ $1,6 k_B T$. Cette énergie vient d'une contribution entropique de la densité du réseau de FG-Nups, forte au niveau du centre du pore. Le franchissement de cette barrière entropique ne nécessite pas d'apport d'énergie extérieure (ATP, gradient de proton...) car la probabilité de la franchir par simples fluctuations thermiques est de 20%. En revanche, le cargo doit rester lié à sa karyophérine, elle-même liée à un filament de FG-Nup, suffisamment longtemps (au moins 10 ms) pour permettre au cargo de passer cette barrière entropique, autrement le cargo serait éjecté avec une force de 5 pN vers le cytoplasme (le point de départ de la translocation).

Dans le cadre des résultats de l'étude de Mincer et Simon, une hypothèse envisageable est que le réseau de FG-Nups du pore nucléaire agit de concert avec l'activité de la protéine RanGTP pour former un mécanisme de ratchet de translocation dont la force effective est d'environ 5 pN. Dans ce schéma, le ratchet s'effectue entre les deux positions d'équilibre du réseau de FG-Nups ; la présence d'une faible barrière d'enthalpie libre entre les deux accélère la translocation du cargo dans le réseau de FG-Nups en tant que diffusion dans un potentiel à deux puits[241]. Lorsque le cargo est situé dans le second puits, l'association rapide entre la karyophérine et la protéine RanGTP empêche la rétro-diffusion du cargo dans le réseau de FG-Nups et provoque l'expulsion du cargo vers l'intérieur du noyau.

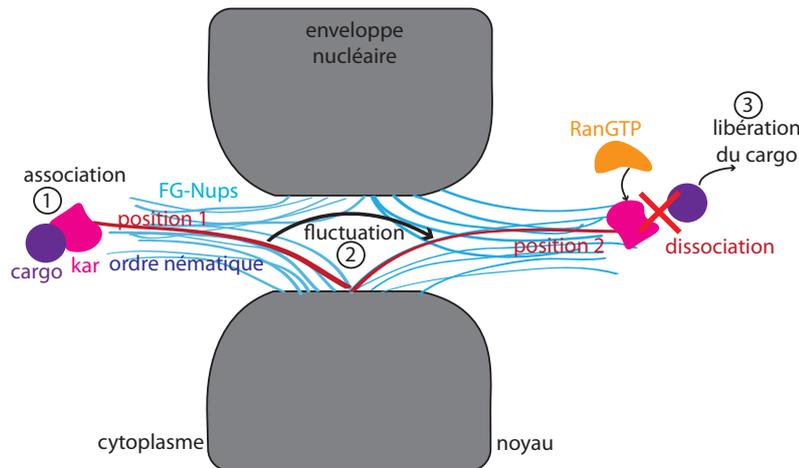


FIGURE 2.22 – Modèle de translocation d'un cargo à travers le pore nucléaire avec un ordre nématique pour le réseau de FG-Nups.

Pour nuancer ces observations, nous reviendrons sur le point évoqué au début de cette section, concernant l'absence de prise en compte dans la simulation des interactions entre FG-Nups. Dans ce cadre, il est probable d'envisager un ordre nématique dans l'organisation des FG-Nups, ces filaments étant, dans la simulation, des filaments semi-flexibles plongés dans un réseau dense sans association possible entre eux (Fig.2.22). Il est alors concevable qu'une fluctuation d'un filament puisse le conduire à renverser son alignement avec les filaments voisins pour venir s'ordonner de l'autre côté du pore, passant ainsi d'une position à l'autre. Or, nous avons vu dans ce chapitre que les FG-Nups sont liés

les uns aux autres à travers des interactions entre les parties hydrophobes et hydrophiles, avec une énergie d'association de l'ordre de $k_B T$, ce qui en fait un réseau très dynamique. L'hypothèse d'un ordre nématique dans le réseau de FG-Nups semble alors trop forte par rapport aux données expérimentales, c'est pourquoi les résultats de l'étude de Mincer et Simon sont à nuancer.

Expérience de Chupeau *et coll.* et réflexion personnelle

Dans cette section, je présente un développement de la translocation par le pore nucléaire selon un processus de franchissement de barrière par la théorie cinétique de Kramers. Cette théorie est décrite en détail dans la section 3.3.1 ; nous nous contenterons ici de ses résultats principaux. Le développement de cette section est basé sur une réflexion personnelle, elle-même issue d'une étude réalisée par Chupeau *et coll.*[241]. Elle part du postulat que le réseau de FG-Nups agit pour la translocation comme une barrière d'énergie dont le profil comprend des courbures à certaines positions spécifiques, en particulier à l'entrée du réseau et à sa sortie. Selon la théorie cinétique de Kramers, la courbure du potentiel joue un rôle important dans la durée de franchissement de la barrière : plus la courbure à l'entrée de la barrière est prononcée, plus la durée de translocation est courte.

Chupeau *et coll.*[241] ont apporté la preuve expérimentale que la présence d'une barrière d'énergie, même bien supérieure à l'énergie thermique $k_B T$, peut accélérer la diffusion d'une particule de l'autre côté de la barrière par rapport à la diffusion libre sur la même distance. Pour cela, il faut que la courbure ω du puits de potentiel au pied de la barrière soit suffisamment grande (Fig.2.23A-B). En effet, dans la théorie cinétique de Kramers (voir section 3.3.1), le temps $\tau_{kramers}$ pour franchir le col de la barrière d'énergie évolue de la manière suivante :

$$\tau_{kramers} \propto \frac{e^{\frac{\Delta G}{k_B T}}}{\omega}. \quad (2.9)$$

Ensuite, le temps τ_{slide} pour passer du col à la position d'équilibre en aval de la barrière d'énergie correspond à une simple diffusion dans un gradient de potentiel ΔG :

$$\tau_{slide} \propto \Delta G^{-1}. \quad (2.10)$$

En choisissant judicieusement les paramètres ΔG et ω , Chupeau *et coll.* ont montré que le temps total de traversée de la barrière $\tau_{kramers} + \tau_{slide}$ peut être inférieur à celui pour une diffusion libre sur la largeur de la barrière. Les auteurs ont apporté la preuve expérimentale de ce raisonnement théorique au moyen d'un système microfluidique couplé à une pince optique holographique (Fig.2.23C) : une particule colloïdale a été confinée à 1D dans un canal microfluidique au sein d'un potentiel en forme de N (soit avec une courbure quasi-infinie du puits de potentiel) créé par la pince optique holographique (Fig.2.23D). La hauteur de la barrière du potentiel était inférieure à $5 k_B T$. La présence du potentiel en N a diminué de moitié le temps de transport de la particule par rapport à sa diffusion libre sur la même distance, conformément à la théorie développée par les auteurs (Fig.2.23E).

Dans le cas du pore nucléaire, avec les énergies mesurées précédemment, on peut imaginer que le réseau de FG-Nups accélère le transport des cargos en se comportant en tant que faible barrière d'énergie ; l'association des NTFs (liés aux cargos) aux FG-Nups à l'entrée du pore nucléaire se comporte comme un puits attracteur à l'entrée de la barrière d'énergie, accentuant la courbure du potentiel. Cela pourrait expliquer l'efficacité du pore

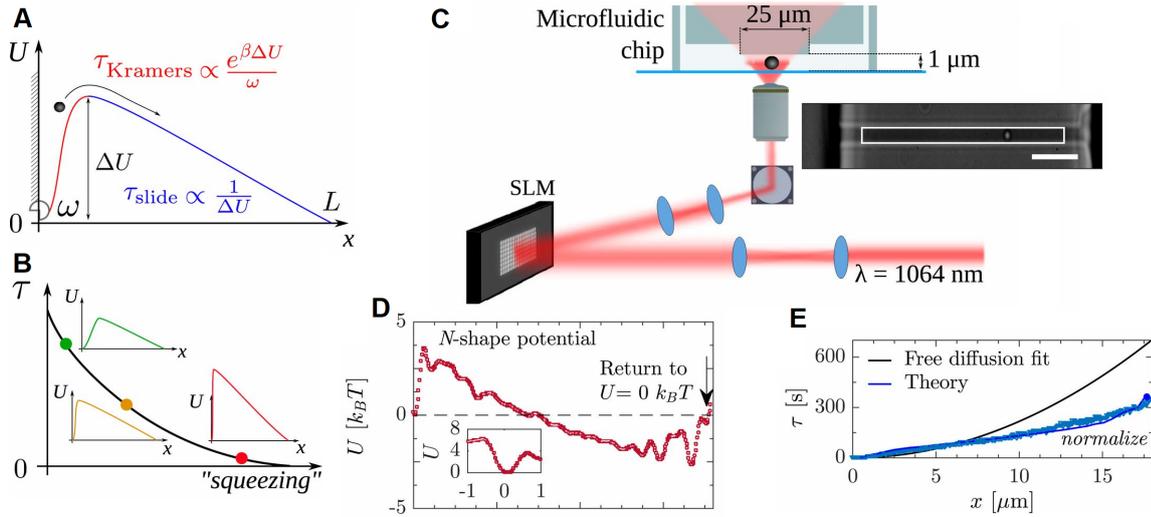


FIGURE 2.23 – Expérience de Chupeau *et coll.* : A) Décomposition des temps de traversée d'une barrière d'énergie dans la théorie cinétique de Kramers. B) Temps de traversée total selon la courbure du potentiel. C) Système expérimental : une particule colloïdale est confinée à 1D dans un canal microfluidique et est soumise à un potentiel en forme de N par l'intermédiaire d'une pince optique holographique. D) Potentiel en forme de N créé par la pince optique holographique. E) Temps de transport selon la distance sans potentiel en forme de N (en noir) et avec (en bleu). (Extrait de [241]).

nucléaire pour la translocation bi-directionnelle d'une multitude de molécules : la diffusion s'effectue entre deux positions d'équilibre de part et d'autre du centre du pore et le gradient de RanGTP donne la directionnalité en empêchant les cargos de rétro-diffuser vers l'autre position d'équilibre. Dans ce schéma, on peut considérer le pore nucléaire comme un mécanisme de ratchet de translocation amélioré, où la diffusion de chaque segment de la molécule (entre deux sites d'adsorption d'agent de ratchet) est accélérée par la présence d'une barrière d'énergie comme vue précédemment dans l'étude de Chupeau *et coll.*[241] et pour lequel chaque segment lié à un agent de ratchet (ici dissocié de sa karyophérine) subit une répulsion entropique de l'ordre de quelques pN le poussant hors du réseau de FG-Nups, en plus d'être empêché de rétro-diffuser.

Le modèle du ratchet de translocation pour le pore nucléaire est également compatible avec la plupart des modèles évoqués dans la section 2.5.4.

En effet, dans le modèle virtual gating, la hauteur de la barrière d'enthalpie libre pour les cargos dotés d'une karyophérine doit être de l'ordre de l'énergie thermique, ce que nous avons mis en avant à partir de l'étude de Mincer et Simon[238] que cette énergie vaut environ $1,6 k_B T$. Pour le modèle de phase sélective, la réorganisation du réseau de FG-Nups est déjà incluse dans le modèle du ratchet lors de la transition d'un point d'équilibre à l'autre. Le modèle de réduction se retrouve dans la diffusion entre deux points d'équilibre, qui peut se résumer à une diffusion 1D dans un potentiel à deux puits. Le modèle du ratchet reprend globalement le principe du modèle Brosse de polymère dans le sens où c'est l'effondrement du filament de FG-Nup lié au cargo qui amène celui-ci vers la position d'équilibre du pore nucléaire, avant de transiter vers le second par fluctuations thermiques. Dans le modèle forêt, on pourrait considérer que l'organisation des FG-Nups

en "arbres et arbustes" est à l'origine des deux positions d'équilibre du pore ; c'est un argument également valable pour le modèle Kap-centric, en remplaçant les "arbres et arbustes" par les karyophérines libres insérées dans le réseau de FG-Nups.

2.5.6 Applications technologiques

Au-delà de l'aspect fondamental de la compréhension du fonctionnement du pore nucléaire, son étude trouve des applications pratiques en tant que modèle de nanopompe bi-directionnelle et spécifique.

Par exemple, dans le domaine des filtres sélectifs passifs, Wang *et coll.*[242] ont montré, par l'intermédiaire d'une modélisation du pore nucléaire, qu'il existe une concentration intermédiaire en karyophérines maximisant la démixtion entre les cargos dans le noyau et dans le cytosol. Les auteurs ont également montré que cette concentration correspond en bonne approximation à celle minimisant la production d'entropie, donc la dissipation d'énergie lors du transport. Ces observations ouvrent des perspectives pour la conception de pores nucléaires artificiels utilisés comme filtres sélectifs passifs. A ce sujet, on peut citer l'étude récente de Fragasso *et coll.*[243], où les auteurs ont recréé un pore nucléaire artificiel à partir de nucléoporines synthétiques mimant la structure des FG-Nups, greffées dans des nanopores en silicium de diamètres compris entre 10 et 60 nm ; ces pores nucléaires artificiels ont permis la translocation de karyophérines tout en excluant le transport de molécules de BSA, à la manière d'un pore nucléaire ne permettant le passage qu'aux molécules associées à des transporteurs.

Physique des polymères confinés

Nous avons vu dans le chapitre précédent différents translocons capables de transporter des objets aussi complexes que des protéines et des acides nucléiques. Le mécanisme employé par ces systèmes protéiques pour la translocation est celui du ratchet de translocation, détaillé dans le chapitre 1 de ce manuscrit. Dans le modèle du ratchet de translocation développé par Peskin *et coll.*[60], le substrat considéré pour la translocation est une tige rigide. Or, dans les translocons étudiés auparavant, les substrats sont le plus souvent des protéines dénaturées ou des acides nucléiques. L'étape de confinement à l'intérieur du pore biologique nécessite une déformation du substrat et une rupture temporaire de ses structures secondaires éventuelles. Par conséquent, ces objets ne peuvent pas être assimilés correctement à une tige rigide en translocation et leur nature polymérique doit être prise en compte pour comprendre plus en détail le transport de ces molécules à travers les translocons.

Après un rappel des notions élémentaires de physique des polymères, nous passerons en revue dans ce chapitre les modèles clés pour la translocation des polymères à travers des nanopores, puis nous verrons l'apport de ces modèles pour la compréhension du ratchet de translocation à travers des simulations.

3.1 Généralités sur la physique des polymères

Il est généralement admis que l'étude des polymères du point de vue physique a débuté avec les travaux fondateurs de Paul John Flory[244], qui ont posé les bases du domaine. Les connaissances sur le comportement des polymères en solution se sont ensuite considérablement élargies en raison des nombreuses applications dans des domaines allant de la biologie à l'ingénierie. Le lecteur intéressé pourra consulter les auteurs suivants pour une vue complète du domaine : Pierre-Gilles de Gennes[65], Jacques des Cloizeaux et Gérard Jannink[245], Masao Doi et Samuel Frederick Edwards[246] et Alexei R. Khokhlov, Alexander Yu Grosberg et Vijay S. Pande[247].

La section suivante est un résumé des concepts fondamentaux de la physique des polymères, nécessaires pour une bonne compréhension des modèles de translocation qui suivront.

Avant d'entrer plus en détail dans les modèles de polymères isolés, il est utile de préciser le cadre de la modélisation.

Les polymères sont des macromolécules constituées d'unités appelées monomères, répétées à la manière d'une chaîne de perles. Lorsque tous les monomères sont identiques, on parle d'homopolymère, sinon de copolymère. Selon le motif de répétition des monomères d'un copolymère, on distingue les copolymères par blocs, alternés ou aléatoires.

Les polymères existent sous des formes très variées, qu'ils soient synthétiques, comme le polyéthylène, le polystyrène ou le polypropylène, ou naturels, comme le coton, la soie ou l'ADN. Le nombre de monomères constituant une chaîne de polymère est appelé degré de polymérisation ; pour les polymères synthétiques, il peut aller jusqu'à 10^6 , contre plus de 10^9 pour les polymères naturels.

3.1.1 Modèle de la chaîne idéale

En raison de la multiplicité des monomères et de leurs propriétés chimiques, il est nécessaire de simplifier leur description dans le but d'établir une théorie générale des polymères. Ainsi, dans le modèle de la chaîne idéale, on considère le polymère comme une chaîne de N segments rigides de longueur a et non-corrélés entre eux ; en particulier, les monomères n'interagissent pas entre eux et la chaîne peut librement se croiser elle-même.

Avec cette définition, le modèle de la chaîne idéale est équivalent à celui d'une marche aléatoire, où chaque pas constitue un monomère de longueur a (Fig.3.1). L'angle entre deux pas successifs n'est pas contraint, on dit alors que le polymère est flexible (absence de rigidité pour la chaîne).

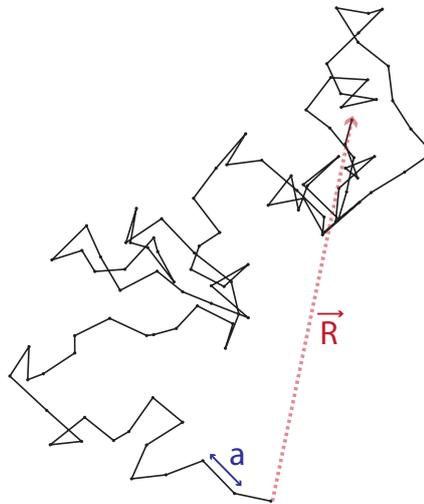


FIGURE 3.1 – Modèle de la chaîne idéale : la structure de la chaîne suit celle d'une marche aléatoire de pas a (ici $N = 100$ monomères).

La chaîne adoptant une conformation semblable à une marche aléatoire, la distance moyenne R_0 entre ses deux extrémités est donc :

$$R_0 = \sqrt{\langle \vec{R}^2 \rangle} \sim N^{1/2}a. \quad (3.1)$$

La distance R_0 est une mesure de l'extension latérale du polymère. On définit égale-

ment le rayon de giration R_g tel que :

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle (\vec{R}_i - \vec{R}_1)^2 \rangle = a \sqrt{\frac{N}{6}}, \quad (3.2)$$

où \vec{R}_i correspond à la position du i -ième monomère de la chaîne.

Il est possible de calculer la densité de probabilité des longueurs entre les deux extrémités de la chaîne d'après le théorème central limite : en effet, le vecteur \vec{R} reliant les deux extrémités de la chaîne correspond à une somme de vecteurs indépendants identiquement distribués (correspondant à l'orientation de chacun des monomères constituant la chaîne). Par conséquent, avec $\langle \vec{R} \rangle = 0$ et $\langle \vec{R}^2 \rangle = a^2 N$, on a la densité de probabilité $P(\vec{R})$ du vecteur \vec{R} suivante (à 3 dimensions) :

$$P(\vec{R}) = \left(\frac{3}{2\pi a^2 N} \right)^{3/2} \exp -\frac{3\vec{R}^2}{2a^2 N}. \quad (3.3)$$

A partir de l'équation (3.3) et de la formule de Boltzmann, on peut facilement montrer que l'entropie de la chaîne idéale évolue selon la relation suivante :

$$S(\vec{R}) = -\frac{3k_B \vec{R}^2}{2a^2 N} + S_0, \quad (3.4)$$

où S_0 est une constante ne dépendant pas de \vec{R} .

On a alors la formule suivante pour l'énergie libre de la chaîne idéale :

$$F(\vec{R}) = \frac{3k_B T \vec{R}^2}{2a^2 N} + F_0, \quad (3.5)$$

où F_0 est une constante ne dépendant pas de \vec{R} .

Enfin, on peut calculer la force nécessaire \vec{f} pour étirer une chaîne idéale selon la relation suivante :

$$\vec{f} = \frac{\partial F(\vec{R})}{\partial \vec{R}} = \frac{3k_B T}{a^2 N} \vec{R}. \quad (3.6)$$

Ainsi, la chaîne idéale se comporte comme un ressort de constante de raideur $\frac{3k_B T}{a^2 N}$ lorsqu'elle est étirée : on parle de ressort entropique.

3.1.2 Modèle Worm Like Chain

Le modèle de chaîne idéale est un modèle simple pour décrire la physique d'un polymère libre en solution. Cependant, il trouve rapidement ses limites pour rendre compte de la physique des polymères disposant d'une rigidité non-négligeable : dès lors que l'angle possible entre deux monomères successifs est contraint, le modèle de la chaîne idéale ne parvient pas à rendre compte des conformations adoptées par le polymère.

Le modèle Worm Like Chain a été développé pour introduire la notion de rigidité dans la description d'un polymère. Dans ce modèle, les croisements de la chaîne de monomères avec elle-même sont toujours permis ; en revanche, l'angle entre deux monomères successifs est contraint par la rigidité de la chaîne à travers le paramètre L_p , longueur de persistance.

Il existe différentes manières de définir la longueur de persistance d'un polymère; la plus intuitive serait de considérer cette longueur comme la longueur d'une portion du polymère en-dessous de laquelle les fluctuations thermiques ne suffisent pas pour la courber à plus de 68°. De manière plus formelle, on peut la définir de la façon suivante[2] :

$$\langle \mathbf{t}_i \cdot \mathbf{t}_j \rangle = \exp\left(-\frac{|i-j|}{L_p}\right), \quad (3.7)$$

où $t_i \cdot t_j$ correspond au produit scalaire des vecteurs unitaires tangents aux monomères i et j et $|i-j|$ la distance curviligne entre les deux monomères le long de la chaîne du polymère. Ainsi, lorsque $|i-j| = L_p$, on a $\langle \mathbf{t}_i \cdot \mathbf{t}_j \rangle = 0.37$, ce qui correspond à un angle de 68°. Avec cette définition, la longueur de persistance se présente comme la longueur caractéristique de corrélation orientationnelle des monomères entre eux.

Une autre manière de définir la longueur de persistance, plus énergétique, est de la définir à partir du module de courbure B du polymère :

$$L_p = \frac{B}{k_B T}. \quad (3.8)$$

Pour une tige élastique, on a $B = \frac{\pi}{4} r^4 Y$, avec Y le module de Young du polymère et r son rayon.

En sachant que le module de Young de l'ADN est de 0,3-1 GPa[248] et son rayon est d'environ 1 nm, le module de courbure de l'ADN est d'environ 2×10^{-28} J.m, ce qui correspond à 200 pN.m²; avec ce module de courbure, on peut estimer la longueur de persistance de l'ADN à 49 nm. Expérimentalement, cette longueur a été mesurée par Bustamante *et coll.*[249, 250] à partir d'une expérience de pinces magnétiques où un dimère d'ADN λ (97 kbp) a été étiré, ce qui a permis de mesurer la réponse élastique de la chaîne d'ADN; en particulier, par un ajustement des données avec le modèle Worm Like Chain, les auteurs ont déduit une longueur de persistance de (53.4 ± 2.3) nm (90%), ce qui est quantitativement en accord avec la prédiction théorique de la formule précédente.

Analytiquement, la relation entre la force de tension f exercée sur un polymère étiré et son énergie élastique dans le modèle Worm Like Chain peut être déduite de l'expression de l'énergie libre du polymère :

$$F_{WLC} = \frac{L_p k_B T}{2} \int_0^L \left| \frac{\partial \mathbf{t}(s)}{\partial s} \right|^2 ds - \int_0^L \mathbf{f} \cdot \mathbf{t}(s) ds. \quad (3.9)$$

La minimisation de l'équation (3.9) conduit à une solution pouvant être approchée par interpolation selon la formule simple suivante :

$$f = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1-z/L)^2} + \frac{z}{L} - \frac{1}{4} \right], \quad (3.10)$$

où z correspond à la longueur entre les deux extrémités du polymère (ou les deux points d'application de la force de tension).

En reprenant la définition (3.7) de la longueur de persistance, on sait qu'une longueur égale à $2 L_p$ permet aux fluctuations thermiques de courber le polymère à près de 82°. Avec

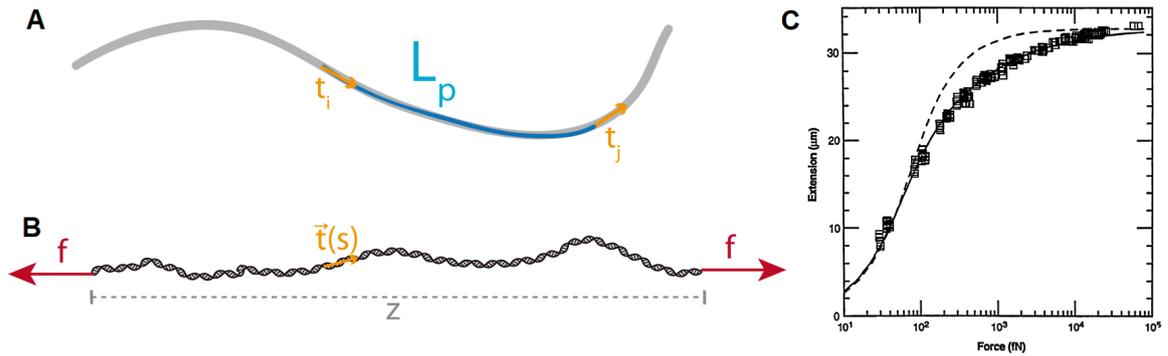


FIGURE 3.2 – Modèle Worm Like Chain : A) Représentation de la longueur de persistance. B) Représentation d'une molécule d'ADN sous tension d'une force f . C) Expérience de Bustamante *et coll.* : force de tension en fonction de l'élongation d'un dimère d'ADN λ (97 kbp); données ajustées par le modèle Worm Like Chain (3.10) (trait plein) ($L_c = 32.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ et $L_p = 53.4 \pm 2.3 \text{ nm}$) et par le modèle du polymère idéal sous tension (pointillés, voir [249] pour le développement de ce modèle). (C extrait de [250]).

cette courbure, on peut estimer que les orientations de deux monomères sont décorréliées dès lors que la distance curviligne les séparant est supérieure à deux fois la longueur de persistance. En redéfinissant des monomères fictifs, qu'on appelle monomères de Kuhn (en référence à Hans Kuhn, à l'origine de ce développement[251]), d'une taille égale à $2L_p$ du polymère réel, on peut assimiler ce polymère semi-flexible comme un polymère idéal constitué de $L_c/(2L_p)$ monomères de taille $2L_p$. Dans ce schéma, le rayon de giration du polymère est égal à $\sqrt{2L_p L_c}$.

Le tableau qui suit résume les longueurs de persistance de quelques polymères biologiques :

Polymères	L_p (nm)
DNA	50[252, 250, 249]
actine	$15 \cdot 10^3$ [253]
microtubule	$6 \cdot 10^6$ [254]
chaîne polypeptidique	0.4[255]
filament intermédiaire	1000 – 3000[256]
hélice α	100[257]

TABLE 3.1 – Longueurs de persistance de quelques polymères biologiques.

Pour les électrolytes, la présence d'ions en solution modifie leur longueur de persistance : plus les charges sont écrantées, plus la longueur de persistance diminue. On définit alors une longueur de persistance effective $L_{p,eff}$ correspondant à la somme de la longueur de persistance intrinsèque du polymère (c'est-à-dire indépendant du solvant) et d'une longueur de persistance électrostatique $L_{p,el}$. Cette longueur de persistance électrostatique s'exprime de la manière suivante[2] :

$$L_{p,el} = \frac{l_B \lambda_D^2}{4 l^2}, \quad (3.11)$$

où l_B est la longueur de Bjerrum, λ_D la longueur de Debye et l la longueur entre deux charges sur la chaîne (pour une molécule d'ADN, il s'agit de la longueur d'une base $a = 0.34$ nm). La longueur de Bjerrum est définie comme la longueur pour laquelle le potentiel électrostatique entre deux charges de même signe est égal à l'énergie thermique $k_B T$, soit $l_B = e^2 / (4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T)$, avec e la charge élémentaire et $\epsilon_0\epsilon_r$ la permittivité diélectrique du milieu. Dans le cas de l'eau à température ambiante, on peut estimer cette longueur à 0,7 nm.

La longueur de Debye donne la longueur d'écrantage d'une charge par les ions en solution. On la définit comme :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r k_B T}{\sum_i q_i^2 C_i}}, \quad (3.12)$$

où C_i est la concentration (en ions/ m^3) de l'ion i et q_i sa valence.

3.1.3 Modèles de chaîne à volume exclu

Dans les modèles précédents, le volume occupé par les monomères en solution n'est pas considéré, la chaîne est autorisée à se croiser elle-même sans coût énergétique supplémentaire. De même, l'interaction entre les monomères et les molécules du solvant n'est pas prise en compte.

Or, la conformation des polymères réels est régie par les interactions entre monomères eux-mêmes ou entre monomères et molécules de solvant. En raison de ces interactions, une partie de l'espace n'est pas accessible au polymère.

On peut estimer le volume exclu à partir du potentiel $V(\mathbf{r})$ d'interaction entre monomères. Ce potentiel dispose de composantes attractives à longue distance et répulsive à courte distance (Fig.3.3A). La description du profil de ce potentiel d'interaction fait l'objet de la théorie DLVO, qui prend en considération l'influence du solvant et des espèces ioniques en solution. Nous ne détaillerons pas ici cette théorie, mais le lecteur intéressé pourra trouver plus d'explications à ce sujet dans les revues suivantes[258, 259, 260].

De manière générale, nous pouvons calculer ce volume exclu v de la manière suivante :

Connaissant le potentiel d'interaction $V(\mathbf{r})$, la probabilité p de trouver un monomère à une distance r d'un autre monomère est donnée par le facteur de Boltzmann $\exp(-V(\mathbf{r})/k_B T)$ (normalisée par la fonction de partition Ω associée). La probabilité complémentaire de ne pas trouver le monomère à cette position est tout simplement $1 - \exp(-V(\mathbf{r})/k_B T)$. L'expression de cette probabilité complémentaire est également définie comme l'opposée de la fonction f de Mayer (Fig.3.3B). Pour connaître le volume v de l'espace non-accessible au monomère, il suffit d'intégrer cette probabilité complémentaire sur tout l'espace :

$$v = \frac{1}{\Omega} \int_{\mathcal{V}} \left(1 - e^{-\frac{V(\mathbf{r})}{k_B T}} \right) d\mathbf{r}. \quad (3.13)$$

Lorsque v est positif, cela signifie que la répulsion entre monomères est dominante, donc le polymère adopte une conformation étendue, appelée coil, en maximisant la surface de contact entre ses monomères et les molécules de solvant (réduisant ainsi les interactions entre monomères). On parle alors de bon solvant.

Dans le cas contraire, lorsque v est négatif, l'attraction entre monomères est dominante et le polymère adopte une conformation compacte, appelée globule, maximisant ainsi les interactions entre monomères. On parle de mauvais solvant.

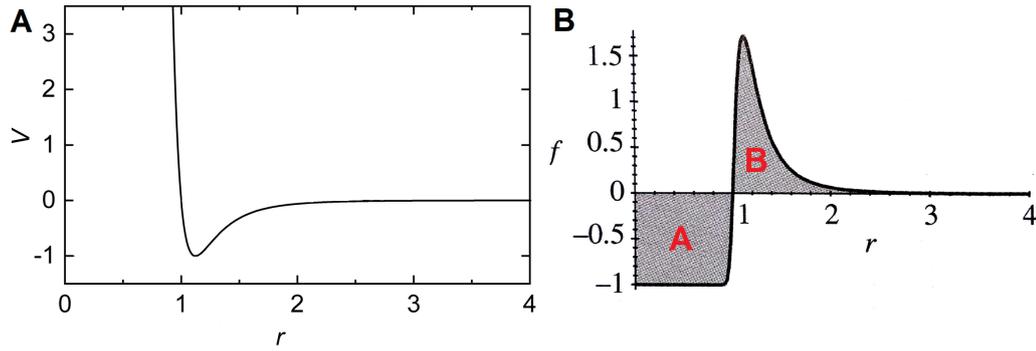


FIGURE 3.3 – A) Potentiel d’interaction entre deux monomères type Lennard-Jones. B) Fonction f de Mayer. La surface A correspond à la composante répulsive du volume exclu, la surface B à sa composante attractive. (A extrait de Wikipedia, créateur : TimeStep89; B extrait de [261]).

Enfin, il arrive que ce volume soit nul (ou quasi nul). Dans ce cas, l’attraction et la répulsion entre monomères sont équivalentes et le polymère se comporte comme s’il n’avait pas de volume exclu, c’est-à-dire comme un polymère idéal. On parle de solvant θ . Ce cas peut se produire pour des polymères en solution dans des solvants spécifiques ou par modification des propriétés physico-chimiques du solvant, comme en changeant la température; on définit dans ce cas la température θ , qui est la température à laquelle un polymère voit son volume exclu se réduire à zéro pour un solvant donné.

Pour calculer le rayon de giration d’un polymère à volume exclu, nous allons détailler son énergie libre, dont la minimisation conduira au rayon de giration à l’équilibre.

Pour cela, on reprend l’énergie libre calculée pour le polymère idéal dans la relation (3.5), à laquelle on ajoute un terme entropique correspondant au volume exclu pour chaque couple de monomère. Ce coût entropique dépend du nombre total d’interactions possibles entre couples de monomères, c’est-à-dire $\frac{N(N-1)}{2} \simeq \frac{N^2}{2}$ dans le cas où $N \gg 1$. Pour chacune de ces interactions, le coût entropique est proportionnel à la fraction du volume exclu par rapport au volume total occupé par le polymère, ce qui conduit à l’expression suivante pour l’énergie libre totale du polymère à volume exclu F_v [65, 2] :

$$\frac{F_v}{k_B T} = \underbrace{\frac{3R^2}{2a^2 N}}_{\text{coût entropique d'une chaîne idéale}} + \underbrace{\frac{N^2 v}{2R^3}}_{\text{coût entropique du volume exclu}}. \quad (3.14)$$

La minimisation de l’énergie libre de l’équation (3.14) par rapport au rayon de giration R conduit à l’expression suivante (en omettant les préfacteurs numériques et en redéfinissant v comme une fraction w de a^3 , dans le cas où v est positif, soit le polymère en bon solvant) :

$$R \sim w^{1/5} N^{3/5} a. \quad (3.15)$$

Le rayon de giration du polymère à volume exclu en bon solvant décrit une loi d’échelle par rapport au nombre N de monomères avec un exposant égal à $3/5$ (Fig.3.4). Cet exposant est appelé exposant de Flory, en référence à P. J. Flory à l’origine de ce formalisme, et est le plus souvent noté ν .

Le raisonnement précédent, avec la décomposition de l'énergie libre du polymère en un terme d'énergie élastique, provenant du modèle de la chaîne idéale, et un autre concernant le coût entropique du volume exclu, se décline sous le nom de méthode de Flory. Elle repose essentiellement sur deux hypothèses :

- les corrélations entre monomères sont négligées, ce qui permet le dénombrement du nombre d'interactions possibles comme proportionnel à N^2 . Il s'agit d'une hypothèse de type champ moyen ;
- l'énergie élastique de la chaîne est analogue à celle d'une chaîne idéale.

En dépit de la simplicité de ce raisonnement, qu'on pourrait même qualifier de simpliste, le résultat concernant l'exposant de Flory est très proche des observations expérimentales, de manière assez surprenante. Cette réussite provient de la surestimation de chacun des deux termes de l'énergie libre, qui se compensent tout à fait (le lecteur intéressé pourra consulter le livre de de Gennes[65] pour une discussion plus détaillée).

Dans le cas du solvant θ , avec un volume exclu nul, la résolution de l'équation (3.14) revient à résoudre celle pour le polymère idéal. Ainsi, l'exposant de Flory en solvant θ est égal à 1/2 (Fig.3.4).

Enfin, pour résoudre l'équation (3.14) en mauvais solvant (avec un volume exclu négatif), il est nécessaire d'introduire un terme supplémentaire dans l'expression de l'énergie libre du polymère, au troisième ordre en densité de monomères (c'est-à-dire évoluant en R^{-3}). Ce terme peut être compris comme un développement du viriel pour l'énergie libre du polymère ; dans ce schéma, ce troisième terme correspondrait à l'interaction entre trois monomères.

Nous ne détaillerons pas ici le développement de ce calcul ; le lecteur intéressé trouvera plus de détails la revue de P. G. de Gennes "Collapse of a polymer chain in poor solvents"[262]. La loi d'échelle entre le rayon de giration et le nombre de monomères est cependant relativement triviale : les interactions entre monomères étant favorisées au détriment de celles avec les molécules de solvant, le polymère adopte une structure compacte, minimisant sa surface de contact avec le solvant, à la manière d'une goutte d'huile dans un milieu aqueux réduisant sa tension de surface en adoptant une forme homogène et sphérique. Ainsi, le rayon de giration du polymère en mauvais solvant est celui d'une sphère compacte de monomères dont le volume $V = \frac{4}{3}\pi R^3$ est égal au volume occupé par les monomères, soit $V = a^3 N$. On a donc la loi d'échelle suivante (Fig.3.4) :

$$R \sim N^{1/3} a. \tag{3.16}$$

Comme dit précédemment, la qualité du solvant (bon, θ ou mauvais) dépend du signe du volume exclu v de l'équation (3.13), lui-même fonction du potentiel d'interaction V entre deux monomères. La modification d'un paramètre physique ou chimique du solvant, comme la température ou la force ionique, modifie le profil de ce potentiel d'interaction et peut changer le signe du volume exclu. Lorsque cela se produit, on parle de transition coil-globule, en référence au changement de conformation adoptée par le polymère entre sa conformation étendue en bon solvant (coil) et sa conformation globulaire compacte (globule).

Il a été montré que la transition coil-globule est une transition du premier ordre, impliquant un changement abrupte de la conformation sans étape transitoire ; en particulier, le polymère ne passe pas par une étape adoptant une conformation de polymère idéal.

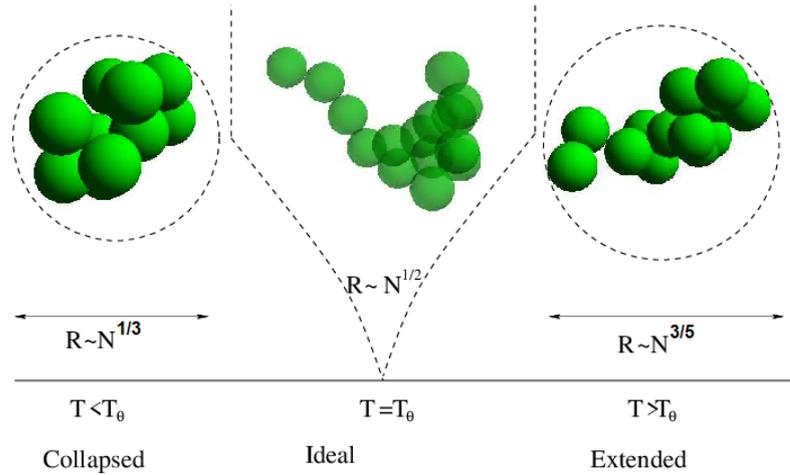


FIGURE 3.4 – Conformations du polymère selon la qualité du solvant. (Adapté de [263]).

L'ordre de la transition a pendant longtemps été débattu, faute d'observations expérimentales concluantes. La réalisation d'une telle observation relève d'un challenge expérimental ardu : en effet, l'observation de la transition coil-globule nécessite la mesure du rayon de giration (ou rayon hydrodynamique) des polymères en solution, souvent réalisée par la méthode de diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering, DLS). Pour observer la formation de globules isolés et pouvoir mesurer leur taille, il est nécessaire de procéder avec une faible concentration de polymères en solution (typiquement en-dessous du $\mu\text{g/mL}$) ; dans le cas contraire, les chaînes de polymères s'effondrent en s'emmêlant les unes aux autres, formant ainsi un agrégat de polymères au lieu de globules isolés (Fig.3.5A-B). Cependant, la précision des mesures de DLS est réduite lorsque la concentration en polymères est faible, c'est pourquoi son usage pour une mise en évidence de la transition coil-globule est délicate.

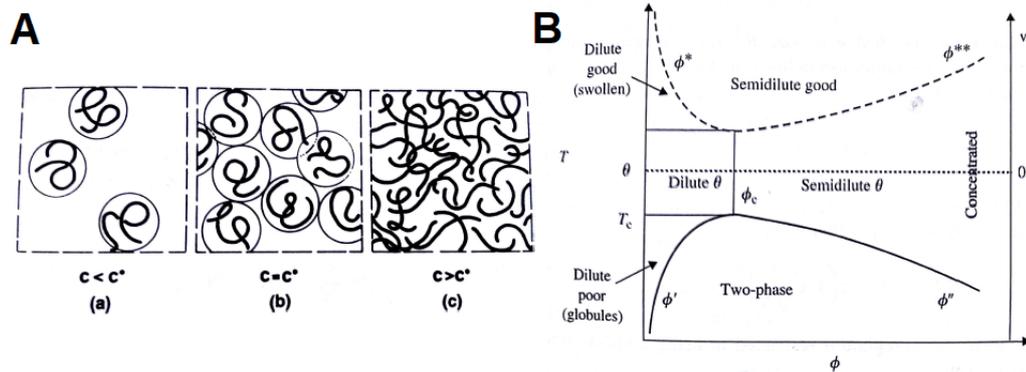


FIGURE 3.5 – Effets de concentration sur la transition coil-globule : A) illustration de la concentration critique c^* pour la formation de globules isolés. B) Diagramme de phase de la transition coil-globule en fonction de la température et la concentration du polymère. (A extrait de [262], B extrait de [261]).

La première observation de la transition coil-globule a été réalisée par Nishio *et*

coll.[264] en 1979 sur des molécules de polyacrylamide (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5-6 MDa) en solution dans un mélange d'eau et d'acétone à température ambiante. L'eau constitue un bon solvant pour le polyacrylamide, tandis que l'acétone est un mauvais solvant pour ce polymère. En augmentant progressivement la fraction volumique d'acétone du solvant, les auteurs ont mis en évidence par mesures de DLS une réduction brutale du rayon de giration des polymères en solution pour une fraction volumique en acétone de 39%, passant de 90 nm à 20 nm (Fig.3.6).

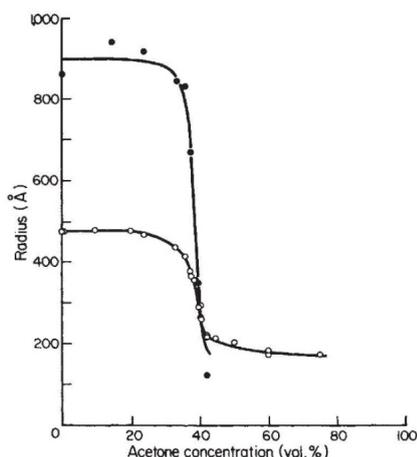


FIGURE 3.6 – Expérience de Nishio *et coll.* : rayon de giration de molécules de polyacrylamide en solution dans un mélange eau/acétone en proportions variables. Les points noirs correspondent aux mesures de disymétries de l'intensité de la lumière diffusée, les points blancs sont ceux obtenus par la mesure du coefficient de diffusion des molécules de polyacrylamide. (Extrait de [264]).

3.2 Physique des polymères confinés

Après avoir passé en détail les concepts clés de la physique des polymères à l'équilibre en solution, voyons à présent le cas des polymères confinés dans des pores. Ce problème trouve des applications assez diverses, allant de la biologie avec la translocation de biopolymères, que nous avons passée en revue dans le chapitre 2, jusqu'à l'extraction de pétrole (enhanced oil recovery)[265]. L'avenir étant du côté de la biologie, nous nous intéresserons exclusivement à la première application citée...

Dans ce qui suit, ainsi que le reste de ce manuscrit (sauf mention spéciale), le pore sera toujours considéré à géométrie cylindrique. C'est un élément important pour s'affranchir des effets de coins que pourrait induire un pore à section rectangulaire par exemple, et permet d'avoir une symétrie de révolution autour de l'axe du pore. De cette manière, le polymère confiné est libre d'adopter une conformation sphérique à l'intérieur du pore.

Pour étudier le comportement d'un polymère confiné dans un pore, il est essentiel de considérer avant tout le rapport de taille entre le diamètre du pore et la longueur de persistance du polymère. En effet, nous avons vu précédemment que la courbure d'un polymère sur une longueur plus faible que sa longueur de Kuhn L_k ($L_k = 2L_p$) nécessite

une énergie supérieure à celle fournie par le bain thermique. Par conséquent, il n'est pas possible que le polymère adopte une conformation de coil (étendue) si le pore possède un diamètre inférieur à la longueur de Kuhn du polymère. Dans ce cas, le polymère adopte une conformation linéaire avec des segments rectilignes par morceaux dans le pore. Ce régime de confinement est appelé régime de Odijk (Fig.3.7) ; il sera détaillé dans la suite de cette section.

A l'inverse, on considère que le polymère est confiné si le diamètre du pore est inférieur à la taille du polymère libre en solution, de manière assez évidente. Au-dessus de cette taille, la conformation du polymère n'est pas ou peu modifiée par rapport à sa conformation d'équilibre en solution. En-dessous, le polymère subit une déformation et doit s'adapter à la géométrie du pore, avec un coût entropique de confinement. Cependant, même s'il est déformé, le polymère conserve localement une conformation analogue à celle qu'elle avait libre en solution, typiquement sur une taille égale à celle du diamètre du pore, définissant le concept de blob que nous détaillerons dans la suite de ce chapitre. Ce régime porte le nom de régime de de Gennes (Fig.3.7).

Une dernière longueur caractéristique est à prendre en compte pour compléter les différents régimes de confinement : il s'agit du régime de de Gennes étendu. En effet, lorsque le diamètre du pore descend en-dessous d'une certaine longueur, la composante rendant compte du volume exclu dans l'expression de l'énergie libre du polymère devient inférieure à l'énergie thermique $k_B T$. Dans ce cas, le polymère adopte localement la conformation d'un polymère idéal, c'est-à-dire sans volume exclu. Cette longueur porte le nom de blob thermique et sera détaillée après avoir défini la notion de blob, auquel elle est indissociable. Le régime compris entre le régime de Odijk et celui de de Gennes porte le nom de régime de de Gennes étendu (Fig.3.7), car le polymère s'organise toujours sous forme de blobs. Ce régime a été évoqué pour la première fois par F. Brochard-Wyart et E. Raphael[266] sous la forme d'un régime de "saucisses idéales", renommé plus tard par Wang *et coll.* en "régime de de Gennes étendu"[267].

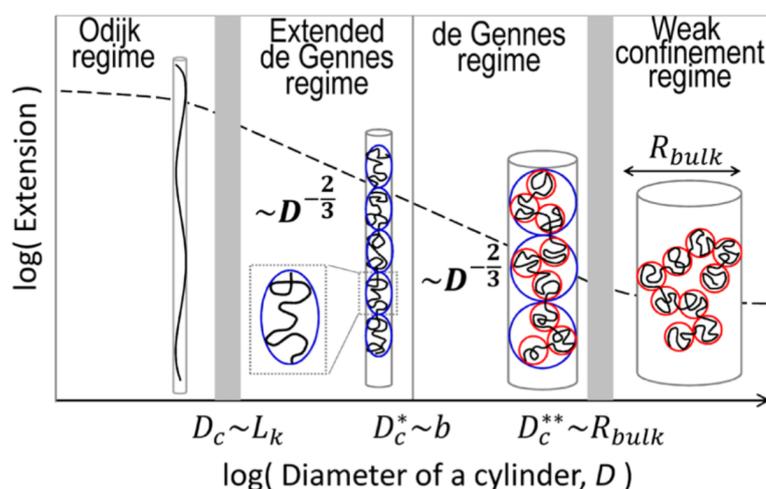


FIGURE 3.7 – Régimes d'extension du polymère confiné (avec volume exclu, bon solvant) en fonction du diamètre du pore (en échelle logarithmique). L_k correspond à la longueur de Kuhn ($L_k = 2L_p$), b la longueur d'un blob thermique (voir la description de b dans le texte) et R_{bulk} le rayon de giration du polymère libre en solution. (Extrait de [268])

3.2.1 Notion de blob

Pour étudier la physique des polymères confinés, il est utile d'introduire la notion de blob. Ce terme a été proposé par de Gennes comme outil pour décrire l'énergie libre d'un polymère contraint par un confinement [65, 269]. Nous détaillerons ici le cas du polymère idéal confiné, mais le raisonnement s'applique également dans le cas d'un polymère à volume exclu; nous détaillerons dans la suite les modifications pour en rendre compte.

Lorsque le diamètre D du pore dans lequel est confiné le polymère est très supérieur à sa longueur de persistance L_p ($D \gg L_p$), le polymère est libre de se réorganiser dans le pore de manière à diminuer le coût entropique de son confinement (par exemple en homogénéisant la densité en monomères le long du pore). Supposons que le polymère occupe une longueur L à l'intérieur du pore (qu'on considère de longueur infinie), alors ce système est équivalent du point de vue énergétique à un polymère non-confiné soumis à une force l'étirant sur une longueur L , correspondant à la longueur R entre ses deux extrémités. Cette force a été calculée pour une chaîne idéale dans l'équation (3.6). Le travail W exercé par cette force correspond à son produit par la longueur L , d'où la relation suivante (en omettant les préfacteurs numériques) :

$$W = f \times L = \frac{k_B T}{a^2 N} R \times L. \quad (3.17)$$

On redéfinit à présent la longueur L comme un multiple n du diamètre D du pore :

$$L = n \times D. \quad (3.18)$$

De la même manière, on peut définir un nombre de monomères g tel que ces g monomères adoptent dans l'espace une configuration de polymère idéal dont le diamètre est exactement celui du pore :

$$g^{1/2} a = \frac{D}{2}. \quad (3.19)$$

Dans le cas d'un polymère avec volume exclu, il faut remplacer l'exposant $1/2$ de g par l'exposant de Flory ν .

D'après la relation précédente, on peut définir le nombre de monomères N du polymère à partir de n et g via la relation suivante :

$$N = n \times g. \quad (3.20)$$

A partir des équations (3.18), (3.19), (3.20) et de l'équation (3.17), on peut estimer l'énergie libre du polymère confiné de la manière suivante :

$$F = \left(\frac{k_B T}{a^2 g} D^2 \right) \times n. \quad (3.21)$$

Par analogie avec l'expression de l'énergie libre d'un polymère idéal libre en solution (3.5), l'équation (3.21) est analogue à l'énergie libre d'un polymère idéal non-confiné avec une taille de g monomères pour un rayon de giration de $D/2$, multiplié par n . Le polymère confiné est donc analogue à une chaîne de n polymères indépendants dont la taille est définie par le diamètre du pore. De Gennes a nommé "blobs" ces polymères fictifs (Fig.3.8). D'après l'équation (3.21), chaque blob apporte une énergie de l'ordre de $k_B T$

au polymère. Dans ce schéma, il est facile d'évaluer l'énergie libre de confinement d'un polymère connaissant le diamètre du pore et sa longueur.

Il existe une loi d'échelle en $-2/3$ entre l'extension du polymère confiné L et le diamètre du pore D pour les régimes de de Gennes et de Gennes étendu (Fig.3.7). La démonstration dans le premier cas est triviale ; la seconde demande plus de développement, en raison de l'asymétrie présentée par les blobs dans le régime de de Gennes étendu. Nous détaillerons ici la démonstration dans le cas du régime de de Gennes ; nous invitons le lecteur à consulter l'article de L. Dai et P. S. Doyle[268] pour la seconde.

Dans le régime de de Gennes, chaque blob adopte une conformation analogue à celle d'un polymère de même taille libre en solution. Par conséquent, on a la relation suivante :

$$\frac{D}{2} = g^\nu a \Rightarrow g = \left(\frac{D}{2a} \right)^{1/\nu}. \quad (3.22)$$

On peut exprimer l'extension L du polymère confiné de la manière suivante :

$$L = \frac{N}{g} \times D. \quad (3.23)$$

Avec les équations (3.22) et (3.23), on déduit l'expression finale pour L :

$$L = N \times D^{1-\frac{1}{\nu}}. \quad (3.24)$$

Dans le cas d'un polymère en bon solvant $\nu = 3/5$, on retrouve la loi d'échelle attendue : $L \propto D^{-2/3}$.

Pour terminer cette section, nous allons développer l'expression de la taille du blob thermique, introduit précédemment pour décrire le régime de de Gennes étendu[268, 270]. Le blob thermique est défini par sa composante énergétique liée au volume exclu égale à l'énergie thermique $k_B T$. Cette composante a été détaillée dans la relation (3.14) et vaut $\frac{N^2 v}{R^3}$ (en unité de $k_B T$ et sans considérer les préfacteurs numériques). Le blob thermique adoptant une conformation idéale, son rayon de giration b peut être exprimé à partir du modèle Worm Like Chain de la manière suivante :

$$b = \sqrt{L_k L_c} \Rightarrow L_c = \frac{b^2}{L_k}, \quad (3.25)$$

où L_c représente la longueur de contour comprise dans le blob thermique et L_k la longueur de Kuhn.

On peut exprimer le nombre de monomères de Kuhn compris dans le blob thermique de la manière suivante :

$$N = \frac{L_c}{L_k} = \frac{b^2}{L_k^2}. \quad (3.26)$$

Ainsi, en reprenant l'expression du coût énergétique du volume exclu en l'égalisant à l'unité et en y injectant l'expression (3.26), on aboutit à la l'expression suivante pour la taille b d'un blob thermique :

$$b \simeq \frac{L_k^4}{v}. \quad (3.27)$$

A partir du résultat précédent, nous pouvons en déduire que l'observation d'un polymère en conformation idéale, difficile à réaliser avec un polymère libre en solution, est

réalisable plus simplement en confinant le polymère dans un nanopore (pore de taille nanométrique) dont le diamètre serait compris entre la longueur de Kuhn du polymère et la taille du blob thermique, soit dans le régime de de Gennes étendu. Il est possible d'augmenter la taille du blob thermique en réduisant la valeur du volume exclu v pour le rapprocher de 0. Malgré son expression, l'équation (3.27) ne diverge pas en 0 car le polymère devient idéal lorsque v vaut 0 (solvant θ); la taille du blob thermique est alors tout simplement celle du polymère libre en solution.

3.2.2 Régime de Odijk

En-dessous d'un diamètre égal à la longueur de Kuhn du polymère, les fluctuations thermiques ne permettent pas de courber la chaîne de monomères de manière à former des boucles dans le pore. Il n'est donc pas possible d'observer un régime de blobs pour des diamètres de pore aussi petits.

Dans cette géométrie, il est aisément concevable que le polymère forme des segments rectilignes dans le pore uniquement déviés par les parois du pore (Fig.3.8). Pour calculer la longueur de ces segments, il est nécessaire de repartir de l'équation (3.7) à la base de la définition de la longueur de persistance. En sommant cette équation sur toutes les paires (i,j) de monomères, on montre facilement la relation suivante entre le rayon de giration R du polymère dans le modèle Worm Like Chain et la longueur de contour s du polymère (le modèle Worm Like Chain est ici valide même s'il ne tient pas compte du volume exclu car la conformation du polymère est rectiligne par portions, sans croisements possibles) :

$$\langle R^2(s) \rangle = 2L_p s \left(1 - \frac{L_p}{s} + \frac{L_p}{s} e^{-\frac{s}{L_p}} \right). \quad (3.28)$$

Dans la limite où s est très inférieur à L_p , on peut développer l'équation précédente à l'ordre 2 pour aboutir à la relation simple suivante :

$$\langle R^2(s) \rangle \simeq \frac{s^3}{L_p}. \quad (3.29)$$

La portion du polymère s considérée étant une portion rectiligne contrainte par les parois du pore, on peut s'attendre à ce que le rayon de giration de cette portion soit de l'ordre du diamètre du pore D . A partir de là, nous pouvons établir la relation suivante :

$$s = \left(D^2 L_p \right)^{1/3}. \quad (3.30)$$

La longueur s définie dans l'équation (3.30) est connue comme la longueur de déviation de Odijk, du nom de Theo Odijk, à l'origine du développement de ce calcul; elle sera notée λ_d dans la suite de ce manuscrit. La longueur de Odijk définit la longueur de monomères entre deux déviations successives du polymère sur les parois du pore.

Pour calculer l'énergie libre du polymère, il suffit de compter le nombre de longueur de Odijk, soit L_c/λ_d . Un segment d'Odijk ne dispose que de deux degrés de liberté, à savoir ses deux axes de rotation. Selon le théorème d'équipartition de l'énergie, ces deux degrés de liberté confèrent à chaque segment d'Odijk une énergie de $k_B T$. Ainsi, l'énergie libre F_d associée au confinement d'un polymère dans le régime d'Odijk s'exprime selon la relation suivante :

$$F_d \simeq k_B T \frac{L_c}{\lambda_d} = k_B T \frac{L_c}{(D^2 L_p)^{1/3}}. \quad (3.31)$$

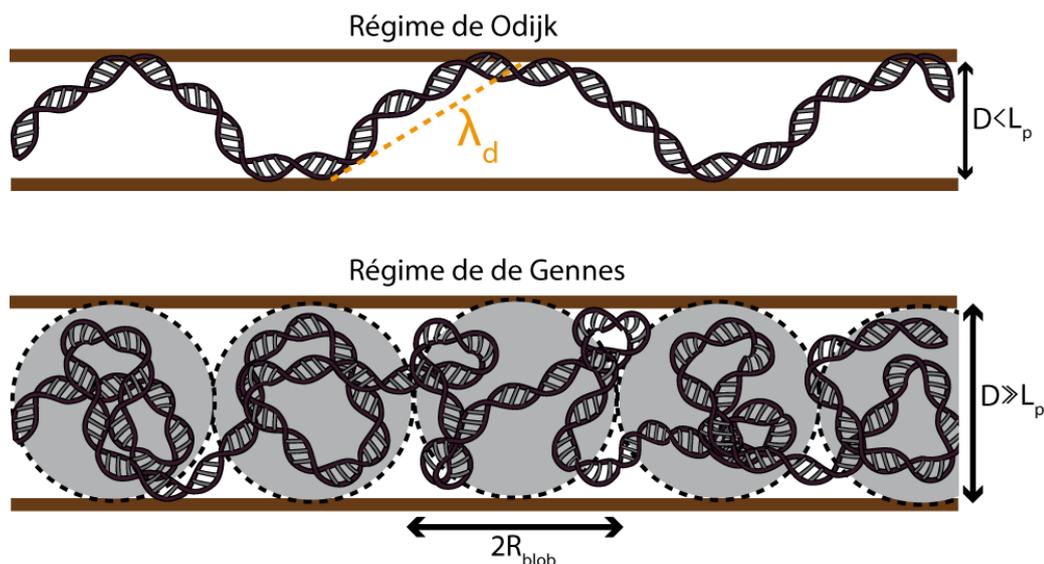


FIGURE 3.8 – Représentations du régime de Odijk (haut) et de de Gennes (bas).

3.2.3 Observations expérimentales

Expérimentalement, le régime de blobs de de Gennes a été observé au moyen de nano-canaux par Tegenfeld *et coll.*[271] : pour cela, des molécules d'ADN λ ont été marquées au TOTO-1 (48,5 kbp pour une longueur de contour de $16,3 \mu\text{m}$ sans marquage, contre $22 \mu\text{m}$ avec l'intercalant) ; ces molécules ont été injectées grâce à l'application d'un champ électrique dans des nano-canaux de silicium de 100 nm de largeur pour 200 nm de profondeur (Fig.3.9A-B-C). Avec ces dimensions, le régime de confinement attendu pour l'ADN est celui du régime de blobs de de Gennes ou de Gennes étendu. En mesurant l'extension de chaque molécule individuelle, les auteurs ont mis en évidence la relation linéaire attendue dans l'équation (3.24) entre cette extension et la longueur de contour de la molécule, apportant ainsi du crédit à ce formalisme (Fig.3.9D).

Reisner *et coll.*[272] ont également réalisé l'observation de molécules d'ADN λ confinées dans des nano-canaux de largeur variable entre 30 nm et 440 nm . Les auteurs ont mis en évidence la transition entre le régime de de Gennes (ou de Gennes étendu) et celui du régime d'Odijk pour un diamètre du pore de l'ordre de la longueur de Kuhn de l'ADN, soit 100 nm , selon la prédiction de la théorie d'Odijk (Fig.3.9E). En revanche, la loi d'échelle observée entre l'extension du polymère et le diamètre du pore n'est pas de $-2/3$ comme annoncé par la théorie de de Gennes, mais de $-0,85$. Dans leur étude, les auteurs ne présentent pas d'explication pour cette loi d'échelle. Depuis le développement théorique du régime de de Gennes étendu, il est possible que l'écart observé par l'exposant soit une conséquence de l'asymétrie des blobs en régime de de Gennes étendu, qui accentuerait l'extension du polymère à mesure que le diamètre du pore se rétrécit.

Dans une étude plus récente, Gupta *et coll.*[273] observent l'extension de molécules d'ADN T4 GT7 (166 kbp) confinées dans des nano-canaux de largeur dégressive entre 750 nm et 350 nm . Ces tailles de confinement placent le régime de confinement de l'ADN en régime de de Gennes étendu. Les auteurs observent un désaccord entre théorie et expérience pour la loi d'échelle entre la variance de l'extension du polymère et le diamètre

du pore, prédite par la théorie en $1/3$, contre 0 expérimentalement, soit une indépendance des deux paramètres. Au-delà du désaccord mis en évidence entre la théorie du régime de de Gennes étendu et les expériences, il est intéressant de noter que ce régime de confinement possède des caractéristiques bien distinctes du régime de Odijk et de celui de de Gennes. On peut dès lors s'attendre à voir des avancées à venir concernant ce régime de confinement.

Le lecteur intéressé par la technique d'injection de molécules d'ADN dans des nanocanaux par champ électrique trouvera une description détaillée de cette méthode dans la revue de Westerlund *et coll.* intitulée "Fluorescence Microscopy of Nanochannel-Confined DNA" [274].

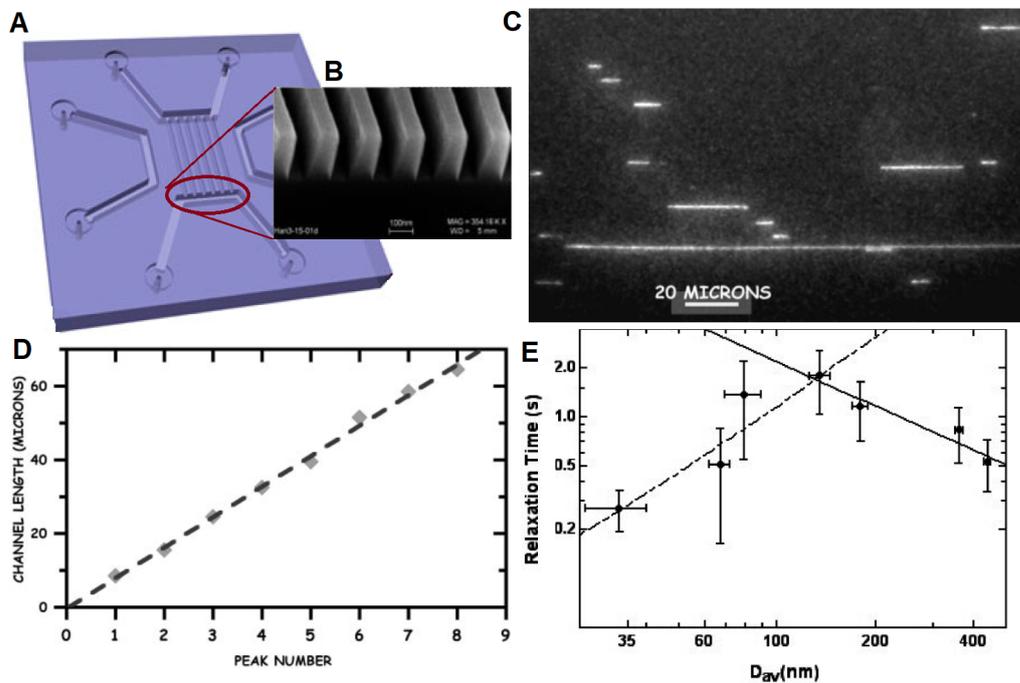


FIGURE 3.9 – Observations expérimentales des régimes de de Gennes et de Odijk : A) Représentation d'une puce nanofluidique typique. B) Image par microscopie électronique de nano-canaux de 100 nm de largeur pour 200 nm de profondeur. C) Observations de concatémères d'ADN λ confinés dans les nano-canaux de l'image B; les molécules sont marquées en fluorescence par l'intercalant TOTO-1. D) Extension des concatémères d'ADN de l'image C en fonction de la longueur de la molécule (en nombre de concatémères). E) Temps de relaxation des molécules d'ADN en fonction du diamètre du nanopore. Le temps de relaxation est obtenu d'après la fonction d'autocorrélation des fluctuations d'extension des molécules. (A extrait de [274], B-C-D extraits de [271] et E extrait de [272]).

3.3 Physique de la translocation de polymère dans des nanopores

3.3.1 Modèle de barrière de Kramers

Dans cette section, nous détaillerons le modèle de barrière de Kramers pour la translocation d'un polymère à travers un nanopore. Le raisonnement qui suit a été initialement proposé par Thomas Auger dans le cadre de son travail de thèse, sur la base de la théorie de Kramers pour le passage de barrière[275, 276].

Ce modèle considère la translocation à travers un nanopore comme le franchissement d'une barrière énergétique d'entrée dans le nanopore sous l'effet d'un potentiel attractif (force électrostatique, force hydrodynamique...). Le polymère est réduit à un point se déplaçant dans un paysage énergétique. Nous calculerons le courant de probabilité j qu'un point initialement au pied de la barrière d'énergie (point A) se rende au point d'équilibre après la barrière (point C) (Fig.3.10).

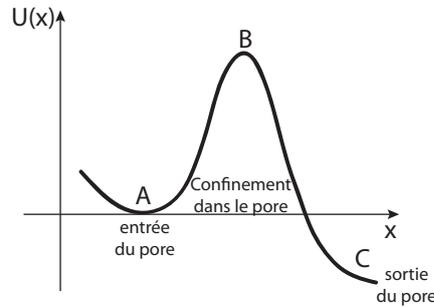


FIGURE 3.10 – Modèle de passage de barrière de Kramers.

Dans ce schéma, le flux de particules à l'entrée du pore s'exprime comme la somme du flux diffusif et du flux d'entraînement liée à la force potentielle à l'origine de la translocation :

$$j = -D \left(\frac{\partial C}{\partial x} + \frac{1}{k_B T} \frac{dU}{dx} C \right), \quad (3.32)$$

avec D le coefficient de diffusion, $C(x,t)$ la concentration en particules et $U(x)$ le potentiel. On notera dans la suite $\beta = 1/k_B T$.

Lorsque le système s'est équilibré, le flux de particule s'annule ; la résolution de l'équation (3.32) mène à la concentration d'équilibre $C(x)$ suivante :

$$C(x) = C_0 \times e^{-\beta U(x)}, \quad (3.33)$$

où C_0 représente la concentration du réservoir de particules.

L'expression 3.32 peut alors se réécrire de la manière suivante :

$$\frac{j}{D} e^{\beta U} = -\frac{\partial}{\partial x} (C e^{\beta U}). \quad (3.34)$$

L'intégration du membre de droite entre les positions A et C mène à l'expression $C(x_A) \exp(\beta U(x_A)) - C(x_C) \exp(\beta U(x_C))$, qu'on simplifie en $C(x_A) \exp(\beta U(x_A))$ en faisant

l'hypothèse que la concentration en particules à la sortie de la barrière est bien plus faible que celle à l'entrée (hypothèse de fuite des particules au point C).

Le membre de gauche s'intègre de la même manière au moyen d'une approximation du point de selle en B, où la barrière trouve son maximum. En notant K_B la courbure du potentiel au point B (soit sa dérivée seconde), nous obtenons alors l'intégration suivante :

$$\frac{j}{D} \int_{x_A}^{x_C} e^{\beta U} dx \simeq \frac{j}{D} e^{\beta U(x_B)} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{\beta}{2} K_B (x-x_B)^2} dx \simeq \frac{j}{D} e^{\beta U(x_B)} \sqrt{\frac{2\pi}{\beta K_B}}. \quad (3.35)$$

Pour calculer le courant de probabilité q_{A-B} qu'une particule passe du point A au point C, nous devons d'abord calculer le nombre de particules n_A au point A ; en divisant le flux de particules par n_A , nous obtenons le courant de probabilité q_{A-B} . Le nombre de particules au point A s'obtient en intégrant le profil de concentration entre les points A et B (d'après l'hypothèse d'une concentration en particules négligeable au point C), soit :

$$n_A = \int_{x_A}^{x_B} C(x) dx = \int_{x_A}^{x_B} C_0 e^{-\beta U(x)} dx \simeq \int_{-\infty}^{+\infty} C_0 e^{-\frac{\beta}{2} K_A (x-x_A)^2} dx \underset{x_A \equiv 0}{\simeq} C_0 \sqrt{\frac{2\pi}{\beta K_A}}, \quad (3.36)$$

en faisant à nouveau une approximation du point de selle au niveau du point A, avec K_A sa courbure associée et en prenant $x_A \equiv 0$ par convention. De même, nous prendrons comme convention une énergie potentielle nulle au point A, $U(x_A) \equiv 0$, ce qui mène à $C(x_A) = C_0$ d'après la relation (3.33).

Finalement, nous obtenons le courant de probabilité q_{A-B} en prenant le rapport entre le flux de particules j et le nombre de particules au point A, soit :

$$q_{A-B} = \frac{j}{n_A} \simeq D \frac{C_A}{C_0} \sqrt{\frac{\beta K_A}{2\pi}} \times \frac{\beta K_B}{2\pi} e^{-\beta U(x_B)} \simeq D \frac{\sqrt{K_A K_B}}{2\pi k_B T} e^{-\beta U(x_B)} \quad (3.37)$$

Ce modèle prédit donc un courant de probabilité de franchissement du nanopore relié de manière exponentielle à la hauteur de la barrière d'énergie d'entrée, mais aussi une loi d'échelle d'exposant 1/2 avec la courbure du potentiel à l'entrée du nanopore et au maximum de la barrière. Ainsi, même avec une barrière d'énergie élevée, ce modèle prédit une probabilité de translocation non-nulle à partir du moment où le potentiel induisant la translocation dispose de courbures fortes. Dans ce schéma, un pore biologique capable de capter et piéger fortement des cargos à son entrée est susceptible de les transporter efficacement d'un côté à l'autre de la membrane même avec un coût énergétique de confinement défavorable, comme nous l'avons évoqué dans la section 2.5.5 consacrée au transport de biomolécules à travers le pore nucléaire.

3.3.2 Modèle de translocation de Muthukumar

Nous avons vu dans la section précédente un modèle de translocation présenté comme une fuite d'une particule à travers une barrière d'énergie. La force de ce raisonnement repose sur sa description formelle du processus de diffusion dans un potentiel. Cependant, la nature de polymère du substrat en translocation n'est pas considérée. Or, nous avons vu à travers ce chapitre que les polymères disposent d'une mécanique propre. Ainsi, il est nécessaire de prendre en compte cet aspect dans un modèle de translocation de polymères.

Muthukumar a proposé un modèle simple pour la translocation d'un polymère semi-flexible à travers un pore infiniment fin (Fig.3.11).

Dans ce modèle, on considère un polymère semi-flexible de N segments de Kuhn initialement situé en amont du pore (côté cis) et on note m le nombre de monomères ayant traversé le pore et trouvant en aval (côté trans). Le pore ne permet le passage que d'un seul monomère à la fois et on considère qu'il n'a pas d'épaisseur : un monomère est soit côté cis, soit côté trans du pore.

Il a été montré que la fonction de partition dans l'ensemble grand canonique d'une chaîne de N monomères peut être écrite de la manière suivante :

$$Z_N = \exp\left(-\frac{\mu N}{k_B T}\right) N^{\gamma-1}, \quad (3.38)$$

où μ est le potentiel chimique d'un monomère et γ un exposant critique dépendant de la qualité du solvant. Dans le cas d'un polymère proche d'une surface, l'exposant γ vaut 0.5 pour un solvant θ , environ 0.69 pour un solvant avec une grande force ionique (assimilable à un bon solvant) et 1 pour un solvant avec une faible force ionique.

Le polymère est partagé entre les deux compartiments cis et trans, entre lesquels il n'y a pas d'interactions. Par conséquent, les monomères d'un compartiment sont indépendants de ceux de l'autre compartiment, ce qui permet d'écrire la fonction de partition du polymère comme le produit des fonctions de partition de la portion cis et de la portion trans :

$$Z_{tot} = Z_{cis}(N - m) \times Z_{trans}(m). \quad (3.39)$$

En injectant l'équation (3.38) dans (3.39), on obtient l'expression suivante pour la fonction de partition du polymère total :

$$Z_{tot} = (N - m)^{\gamma_{cis}-1} m^{\gamma_{trans}-1} e^{-m \frac{(\mu_{trans} - \mu_{cis})}{k_B T} - N \frac{\mu_{cis}}{k_B T}}, \quad (3.40)$$

où μ_{cis} et μ_{trans} sont les potentiels chimiques respectifs d'un monomère du côté cis et trans et γ_{cis} et γ_{trans} sont les exposants critiques pour ces mêmes côtés.

On en déduit l'expression de l'énergie libre $F(m)$ du polymère d'après la relation $F = -k_B T \ln(Z_{tot})$ (en omettant les termes constants non-dépendants de m) :

$$\frac{F(m)}{k_B T} = (1 - \gamma_{cis}) \ln(N - m) + (1 - \gamma_{trans}) \ln(m) - m \frac{\Delta\mu}{k_B T}, \quad (3.41)$$

avec $\Delta\mu = \mu_{cis} - \mu_{trans}$, tel que $\Delta\mu > 0$ lorsque la translocation est favorisée dans le sens direct (du côté cis vers le côté trans). Cette différence de potentiel peut provenir d'un gradient de concentration ou de l'application d'un champ électrique selon la relation de Nernst (1.1).

Il est possible de calculer la hauteur de la barrière énergétique pour le processus de translocation du polymère à travers le nanopore par résolution de l'équation $\frac{\partial F(m)}{\partial m} = 0$. On trouve aisément que la position du maximum de la hauteur de la barrière m^* est donnée par la relation suivante :

$$m^*(N) = \frac{(N\Delta\mu + 2 - \gamma_{cis} - \gamma_{trans}) - \left[(N\Delta\mu + 2 - \gamma_{cis} - \gamma_{trans})^2 - 4N\Delta\mu(1 - \gamma_{trans}) \right]^{1/2}}{2\Delta\mu}, \quad (3.42)$$

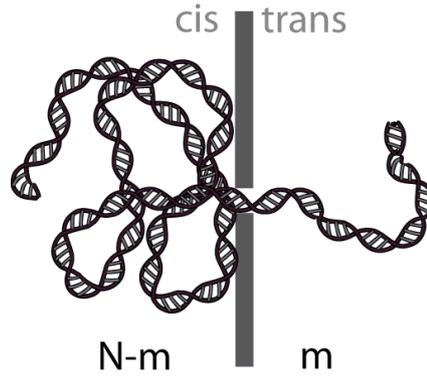


FIGURE 3.11 – Modèle de Muthukumar pour la translocation de polymère : un polymère semi-flexible de N segments de Kuhn est initialement localisé en amont (cis) d'un pore infiniment fin ne permettant le passage que d'un seul monomère à la fois. On note m le nombre de monomères en aval du pore (trans).

où $\Delta\mu$ est exprimé en unité de $k_B T$.

On définit alors la hauteur de la barrière ΔF^* telle que :

$$\Delta F^* = F[m^*(N)] - F_0(N) = F[m^*(N)] - (1 - \gamma_{cis}) \ln(N), \quad (3.43)$$

où $F_0(N) = (1 - \gamma_{cis}) \ln(N)$ est l'énergie libre initiale du polymère lorsque $m = 0$.

La figure 3.12 présente quelques profils types de l'énergie libre du polymère en translocation selon les paramètres libres de l'équation (3.41). Lorsque les solvants ont la même qualité des deux côtés de la membrane, l'énergie libre du polymère présente une barrière d'amplitude $\Delta F \simeq 1 k_B T$ en absence de gradient de potentiel chimique et pour $N = 100$ monomères, située à $m/N = 0.5$, c'est-à-dire lorsque le polymère est à moitié entre les côtés cis et trans (Fig.3.13A-B). L'application d'un gradient de potentiel chimique de $0.01 k_B T$ vers le côté trans réduit la hauteur de cette barrière de $0.3 k_B T$ ainsi que sa position à $m/N \simeq 0.2$. A l'inverse, l'application d'un gradient de potentiel chimique contre le sens direct de translocation (donc vers le côté cis) augmente la hauteur de la barrière de $0.6 k_B T$ et sa position à $m/N \simeq 0.8$ (Fig.3.13A-B).

L'augmentation du nombre de monomères augmente la hauteur de la barrière tout en réduisant sa position relative. Ce comportement est une conséquence directe de l'évolution logarithmique de l'énergie libre avec le nombre de monomères (Fig.3.13B-D-F).

Enfin, à potentiels chimiques fixés $\Delta\mu = 0.01 k_B T$ et nombre de monomères fixé $N = 100$, une disparité de qualité de solvant entre les deux côtés de la membrane modifie de façon drastique le profil d'énergie libre du polymère. Si le solvant cis est un bon solvant mais que celui côté trans dispose d'une faible force ionique, la barrière d'énergie s'effondre et la translocation s'effectue spontanément du côté cis vers le côté trans (Fig.3.13C-D). On peut expliquer facilement ce comportement par un effet entropique, la solution trans étant faiblement salée, les interactions entre monomères sont réduites, donc le polymère présente une conformation étendue, ce qui augmente son entropie par rapport au côté cis. A l'inverse, un solvant cis faiblement salé contre un autre bon solvant côté trans augmente la barrière d'énergie de près de $0.75 k_B T$ pour une position $m/N = 0.3$, pour les mêmes raisons (Fig.3.13E-F).

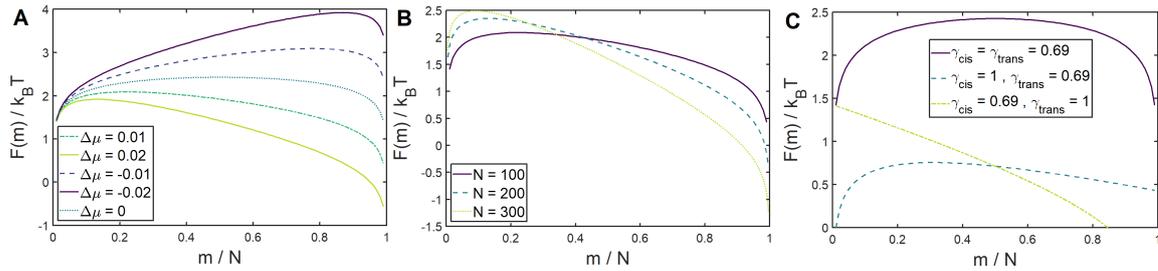


FIGURE 3.12 – Evolution du profil d'énergie libre : A) $N = 100$, $\gamma_{cis} = \gamma_{trans} = 0.69$, $\Delta\mu$ variable (en unité de $k_B T$); B) $\gamma_{cis} = \gamma_{trans} = 0.69$, $\Delta\mu = 0.01 k_B T$, N variable; C) $\Delta\mu = 0.01 k_B T$, $N = 100$, γ_{cis} et γ_{trans} variables.

3.3.3 Théorie de la propagation de tension

L'approche à l'équilibre du modèle de translocation proposée par Muthukumar a été remise en question par Kantor et Kardar, pour qui la translocation d'un polymère est une transformation hors-équilibre[277, 278]. L'approche énergétique est trop grossière pour décrire correctement les lois d'échelle entre le temps de translocation et les paramètres du problème; en particulier, la conformation du polymère ne peut pas être à l'équilibre en raison de la force de tension générée dans la chaîne de monomères par la translocation.

Plus précisément, selon le régime de force motrice pour la translocation, la conformation du polymère à l'entrée du nanopore peut se trouver à l'équilibre à faible force, sous forme "trompette" à force modérée ou sous forme "tige-fleur" à force élevée (Fig.3.14). Les forces caractéristiques séparant ces régimes sont données par les tailles des monomères a et du polymère à l'équilibre en solution $N^\nu a$. Sous l'effet d'une force extérieure f , le polymère s'organise en blobs dont la taille est liée à la force par la relation $R_{blob} = k_B T / f$ (voir 3.2.1). Si la taille d'un blob est supérieure à $N^\nu a$, alors le polymère garde sa conformation à l'équilibre avec un rayon de giration à l'entrée du pore en $N^\nu a$. Au contraire, si la taille du blob est de l'ordre de la taille d'un monomère a , alors le polymère adopte une conformation hors-équilibre de type "tige-fleur". Enfin, lorsque la taille du blob est intermédiaire entre ces deux valeurs, le polymère adopte une conformation hors-équilibre de type "trompette".

Les notions de "trompette" et "tige-fleur" ont été introduites par F. Brochard[280, 279] pour rendre compte des régimes de déformation d'un polymère fixé à une de ses extrémités et soumis à un écoulement ou bien tracté à une vitesse constante dans un fluide. Dans ce schéma, F. Brochard montre qu'un polymère fixé à une extrémité et soumis à un écoulement uniforme peut former une trompette de longueur L telle que $L = R_F (V \tau_z / k_B T)^2$, avec V la vitesse de l'écoulement, R_F le rayon de Flory du polymère et τ_z le temps de relaxation de la chaîne : $\tau_z = \eta R_F^3 / k_B T$ (Fig.3.14).

A partir des travaux fondateurs de Brochard[280, 279], Muthukumar[281, 2], Sung et Park[282] puis Kantor et Kardar[277, 278], T. Sakaue a développé la théorie de la propagation de tension pour la translocation d'une chaîne de polymère à travers un nanopore[283, 284, 285, 286]. Cette théorie rend compte des différents régimes de forçage pour une translocation hors-équilibre. Schématiquement, la durée de la translocation est séparée en deux phases distinctes : la phase de propagation de tension dans la chaîne de monomères et la phase de rétraction. La seconde débute lorsque le front de propagation

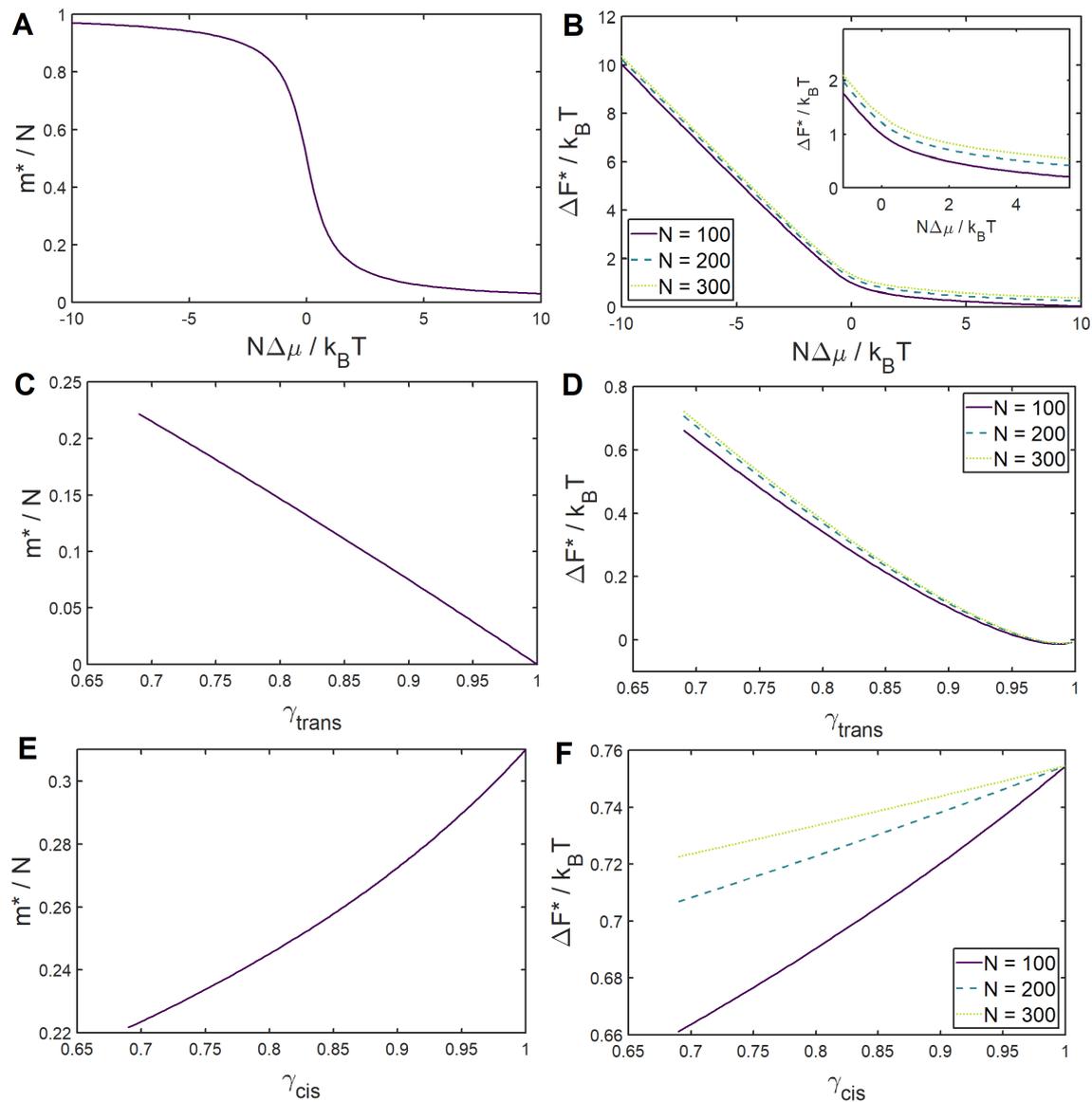


FIGURE 3.13 – Position de la barrière d’énergie et son amplitude : A-B) $\Delta\mu$ variable, $\gamma_{cis} = \gamma_{trans} = 0.69$; C-D) $\Delta\mu/k_B T = 0.01$, $\gamma_{cis} = 0.69$ et γ_{trans} variable; E-F) $\Delta\mu/k_B T = 0.01$, $\gamma_{trans} = 0.69$ et γ_{cis} variable.

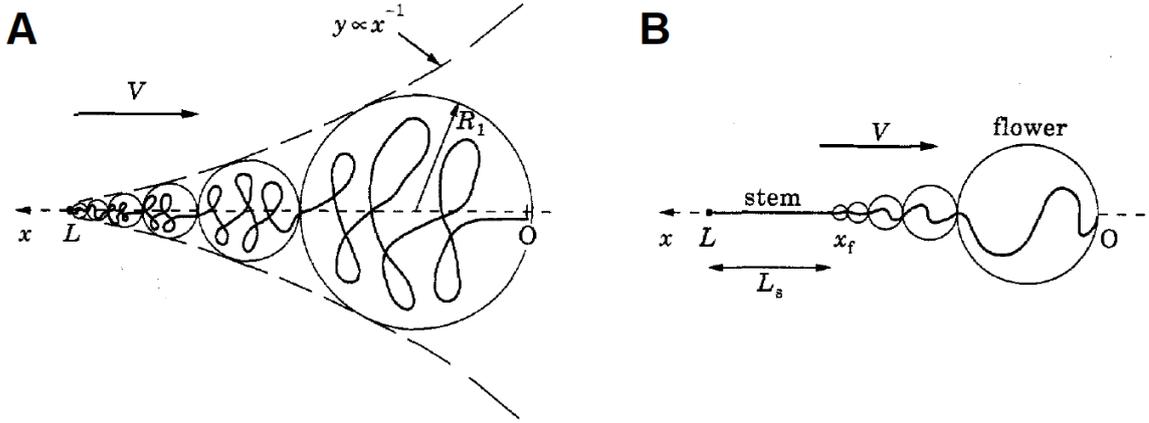


FIGURE 3.14 – Modèle de déformation de polymère à forçage élevé : A) type trompette ; B) type tige-fleur. (Extrait de [279]).

de la tension atteint l'extrémité du polymère du côté de l'entrée du nanopore. Dans le cas des régimes à forçage intermédiaire et fort (type trompette ou tige-fleur), la durée de la phase de rétraction est généralement considérée comme négligeable par rapport à la durée de la phase de propagation de tension. Ainsi, en calculant la durée pour que le front de tension parcourt l'entièreté du polymère, nous obtenons une estimation correcte de la durée totale de la translocation.

Rowghanian et Grosberg[287] ont par la suite ajouté à cette théorie l'hypothèse d'iso-flux, que nous détaillerons dans la suite, nécessaire pour imposer la conservation de la masse lors de la translocation. Cette théorie se résume alors actuellement en tant que théorie de la propagation de tension iso-flux.

Nous donnerons dans ce qui suit le développement de la théorie de la propagation de tension dans le régime "trompette", c'est-à-dire pour lequel la force motrice de la translocation f est telle que $a < k_B T / f < N^\nu a$; nous suivrons pour cela le raisonnement développé par Rowghanian et Grosberg[287] pour le cas d'un modèle de Zimm pour les interactions hydrodynamiques entre monomères.

Dans ce régime, le polymère s'organise à l'entrée du nanopore selon une conformation en forme de trompette, avec des blobs dont la taille s'agrandit avec la distance à l'entrée du pore. Cette conformation vient de la décroissance de la force de tension dans la chaîne de polymère avec la distance au pore. On peut exprimer le rayon de ces blobs $\xi(x, t)$ avec la force de tension $f(x, t)$ selon l'expression suivante :

$$\xi(x, t) = \frac{k_B T}{f(x, t)}, \quad (3.44)$$

où x représente la distance à l'entrée du pore et t le temps depuis le début de la translocation.

Dans la suite de ce raisonnement, nous travaillerons avec des variables adimensionnées. Ainsi, on notera les variables de la manière suivante : $x \leftarrow x/a$, $f \leftarrow (fa)/k_B T$ et $t \leftarrow t/[\eta a^3 (k_B T)^{-1}]$, où $\eta a^3 (k_B T)^{-1}$ représente le temps de relaxation d'un monomère.

On définit ensuite le nombre de monomères $g(x, t)$ dans un blob de la manière suivante :

$$\xi(x, t) = g^\nu(x, t)a \Rightarrow g(x, t) \propto \xi^{1/\nu}(x, t), \quad (3.45)$$

où ν est l'exposant de Flory caractérisant la qualité du solvant.

Enfin, on définit la densité linéaire $\rho(x, t)$ en monomères selon la relation suivante :

$$\rho(x, t) = \frac{g(x, t)}{\xi(x, t)} \propto f^{1-1/\nu}, \quad (3.46)$$

d'après les équations (3.44) et (3.45).

Dans la suite de ce raisonnement, nous considérerons un modèle de Zimm pour la dynamique des monomères, c'est-à-dire avec prise en compte des interactions hydrodynamiques entre monomères, par opposition au modèle de Rouse. Le développement dans le schéma de Rouse est très similaire à celui de Zimm ; nous donnerons le cas échéant les hypothèses séparant ces deux modèles dans notre développement.

Définissons à présent le flux de monomères $\Phi(x, t)$ selon la force de tension $f(x, t)$ et la vitesse des monomères $v(x, t)$:

$$\Phi(x, t) = \rho(x, t)v(x, t) \propto f^{1-1/\nu}(x, t)v(x, t), \quad (3.47)$$

selon l'équation (3.46).

Nous pouvons ensuite établir une relation entre la force de tension et le flux de monomères en considérant un bilan de force sur une tranche du polymère située entre les points x et $x+dx$; sur cette tranche, les forces de tension appliquées en x et $x+dx$ sont compensées par la force de friction du fluide sur le polymère. C'est précisément à cette étape du raisonnement que le modèle dynamique d'interaction des monomères avec le fluide a son importance. Dans le modèle de Zimm, la force de friction f_{fr} s'applique sur le blob entier selon l'expression $f_{fr} = -\gamma v$, où $\gamma \propto \xi$. Localement, on peut estimer la contribution d'une section dx du blob comme $f'_{fr} \propto -\xi g^{-1} dx.v$, ce qui donne finalement $f'_{fr} \propto -f^{1/\nu-1} dx.v$ selon les relations (3.44) et (3.45).

Ainsi, on peut exprimer le bilan de force sur cette tranche de polymère dans le modèle de Zimm selon l'expression suivante :

$$\frac{df(x, t)}{dx} = -\Phi(x, t)f^{1/\nu-1}(x, t), \quad (3.48)$$

avec $\Phi \propto v$.

Dans le modèle de Rouse, on trouve $df(x, t)/dx = -\Phi(x, t)$ car $f'_{fr} \propto -dx.v$, en négligeant les interactions hydrodynamiques entre monomères.

Pour résoudre l'équation (3.48), nous appliquons l'hypothèse d'iso-flux initialement introduite par Rowghanian et Grosberg[287] : cette hypothèse avance que le flux de monomères est le même partout dans la trompette, conformément à une hypothèse de conservation de masse. Selon cette hypothèse, nous avons donc $\Phi(x, t) = \Phi(t)$.

Ainsi, avec l'hypothèse d'iso-flux, l'équation (3.48) se résout simplement et nous obtenons l'expression suivante pour la force de tension :

$$f(x, t) = \left(f_0^{2-1/\nu} - \Phi(t)x \right)^{\frac{\nu}{2\nu-1}}, \quad (3.49)$$

où f_0 est la force à l'entrée du pore, imposée par le forçage.

Pour établir la condition à la limite en fin de trompette, nous considérerons que le dernier blob (le plus grand) n'est soumis qu'à une force de tension venant du reste de la

chaîne et à la force de friction du fluide sur ce blob ; on notant x^* la position du dernier blob, l'équilibre des deux forces mène au résultat suivant :

$$f(x^*, t) = \xi(x^*, t)v(x^*, t). \quad (3.50)$$

A partir des équations (3.44), (3.45), (3.47) et (3.50), on trouve aisément les deux conditions limites suivantes :

$$f(x^*, t) = \Phi^{\frac{\nu}{3\nu-1}}. \quad (3.51)$$

$$g(x^*, t) = \Phi^{-\frac{1}{3\nu-1}}. \quad (3.52)$$

En égalisant les équations (3.49) et (3.51) pour $x = x^*$, on trouve l'expression suivante pour la longueur x^* de la trompette :

$$x^*(t) = \frac{f_0^{(2\nu-1)/\nu}}{\Phi(t)} - \Phi^{-\nu/(3\nu-1)}(t) \simeq \frac{f_0^{(2\nu-1)/\nu}}{\Phi(t)}, \quad (3.53)$$

à l'ordre dominant en Φ .

Le nombre $n(t)$ de monomères contenus dans la trompette à un instant t est simplement obtenu par intégration de la densité linéaire ρ de monomères entre 0 et x^* d'après la relation (3.46) :

$$n(t) = \int_0^{x^*} f^{1-1/\nu}(x', t) dx' \simeq \Phi^{-\frac{1}{3\nu-1}}(t) - \frac{f_0^{3-2/\nu}}{\Phi(t)} \simeq \Phi^{-1/(3\nu-1)}(t), \quad (3.54)$$

à l'ordre dominant en Φ .

On constate d'après l'équation (3.54) que la majorité des monomères sont situés dans le dernier blob.

Nous pouvons à présent exprimer la longueur de la trompette en fonction du nombre de monomères qu'elle contient en combinant les relations (3.53) et (3.54) :

$$x^*(t) = f_0^{2-1/\nu} n^{3\nu-1}(t). \quad (3.55)$$

Introduisons à présent le taux de translocation $ds(t)/dt$, défini tel que $s(t)$ corresponde au nombre de monomères du côté trans du nanopore. L'hypothèse d'iso-flux impose une égalité entre le taux de translocation et le flux de monomères Φ , soit :

$$\frac{ds(t)}{dt} \sim \Phi(t). \quad (3.56)$$

Pour clôturer la description du système, nous établissons une relation entre x^* et $s(t)$. Pour cela, il suffit de se rappeler la définition de x^* : il s'agit de la longueur de la trompette, c'est-à-dire la longueur du polymère côté cis affectée par la force de tension ; tous les monomères distant de plus de x^* ne sont pas affectés par la force de tension. Ainsi, au temps t , le monomère $n(t)+s(t)$ depuis l'extrémité du polymère côté trans est le dernier monomère affecté par la force de tension, celui venant directement après lui ne l'étant pas encore. Ce monomère venant tout juste d'être affecté par la force de tension, on peut s'attendre à ce qu'il soit proche de sa position initiale au début de la translocation. Il y avait exactement $n(t)+s(t)$ monomères devant ce monomère au début de la translocation, ce qui correspond approximativement à une longueur x^* telle que :

$$x^*(t) \simeq (n(t) + s(t))^\nu. \quad (3.57)$$

A présent, en considérant les équations (3.53), (3.55), (3.56) et (3.57), on aboutit à l'équation différentielle suivante :

$$\left(x^{*1/\nu}(t) - f_0^{(1-2\nu)/[\nu(3\nu-1)]}x^{*1/(3\nu-1)}(t)\right) \frac{dx^*(t)}{dt} = f_0^{2-1/\nu}, \quad (3.58)$$

qui s'intègre ensuite entre 0 et t pour donner l'équation suivante :

$$x^{*1/\nu+1}(t) - f_0^{(1-2\nu)/[\nu(3\nu-1)]}x^{*3\nu/(3\nu-1)}(t) = f_0^{2-1/\nu}t. \quad (3.59)$$

A l'ordre dominant en x^* , d'après les équations (3.53), (3.56) et (3.59), on obtient finalement les relations explicites de $x^*(t)$ et $s(t)$:

$$x^*(t) \sim f_0^{(2\nu-1)/(1+\nu)}t^{\nu/(1+\nu)}. \quad (3.60)$$

$$s(t) \sim f_0^{(2\nu-1)/[\nu(1+\nu)]}t^{1/(1+\nu)}, \quad (3.61)$$

soit $x^*(t) \sim s^\nu(t)$.

Finalement, on obtient le résultat final de ce modèle, à savoir le temps de translocation τ_{tr} en considérant que la translocation est terminée lorsque N monomères ont traversé le nanopore, soit $s(\tau_{tr}) = N$ (Fig.3.15) :

$$\tau_{tr} \sim f_0^{1/\nu-2}N^{1+\nu}. \quad (3.62)$$

En considérant le modèle de Rouse pour les interactions hydrodynamiques entre monomères, on aboutit à une relation analogue où seule la loi de puissance pour la force de tension f_0 est modifiée :

$$\tau_{tr} \sim f_0^{-1}N^{1+\nu}. \quad (3.63)$$

Lorsque la force de tension est plus grande que $k_B T/a$, le polymère ne s'organise pas sous forme de blobs mais sous forme étirée proche de l'entrée du pore, avec une succession de monomères alignés avec l'axe du pore. La force de tension décroît linéairement avec la distance à l'entrée du pore, ce qui se vérifie facilement en reprenant l'équation (3.48) dans le cadre du modèle de Rouse, soit $df(x, t)/dx = -\Phi(t)$ (avec l'hypothèse d'iso-flux). Cette équation s'intègre facilement et on obtient un profil de décroissance linéaire de la force de tension. Ainsi, lorsque cette force de tension devient inférieure à $k_B T/a$, une trompette se forme de manière analogue à celle décrite précédemment. Le polymère revêt alors une conformation de type "tige-fleur", la tige correspondant à la partie étirée proche du pore et la fleur à la trompette. On peut montrer par un raisonnement semblable à celui développé auparavant que la durée de translocation τ_{tr} s'exprime d'une manière analogue à celle dans le régime de trompette dans le modèle de Rouse : $\tau_{tr} \sim f_0^{-1}N^{1+\nu}$ (Fig.3.15).

Enfin, lorsque la force de tension est inférieure à $k_B T/(N^\nu a)$, le polymère présente une conformation proche de celle à l'équilibre en solution, avec un seul blob de taille $N^\nu a$. Dans ce régime, T. Sakaue a montré que la durée de translocation τ_{tr} est telle que $\tau_{tr} \sim f_0^{-1}N^{1+\nu}$ dans le modèle de Rouse et $\tau_{tr} \sim f_0^{-1}N^{2\nu}$ dans le modèle de Zimm[286] (Fig.3.15).

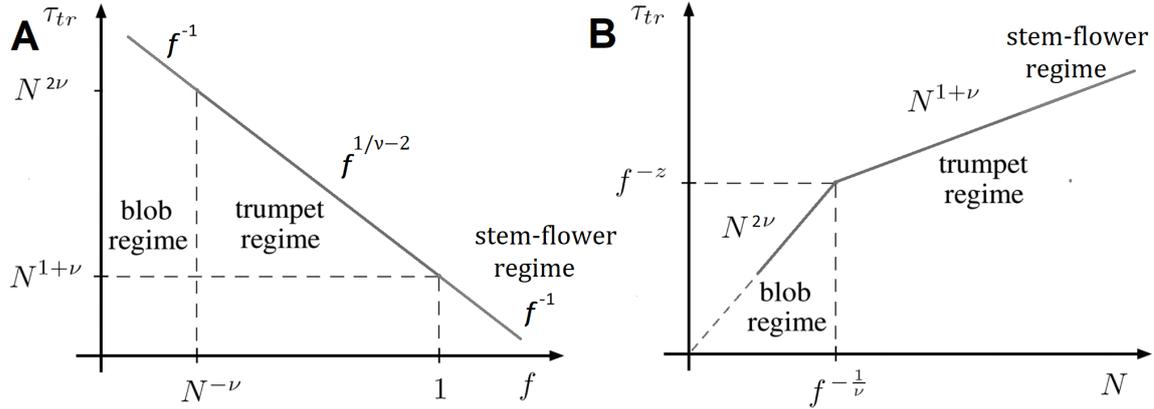


FIGURE 3.15 – Lois de puissance de la théorie de propagation de tension dans le modèle de Zimm - évolution de la durée de translocation τ_{tr} selon : A) la force de tension à l'entrée du nanopore ; B) la longueur du polymère. (Adapté de [287]).

Observations expérimentales

La quantification de la relation entre la durée de translocation d'un polymère à travers un nanopore et la longueur du polymère ou l'amplitude du forçage a été et est toujours un domaine de recherche très actif, en raison notamment de la difficulté d'observer le transport à l'échelle de la molécule unique de polymère à travers des nanopores. Pour réaliser ces expériences, il est nécessaire de contrôler à la fois le degré de polymérisation du polymère ainsi que la taille du nanopore, sans quoi aucune quantification ne peut être réalisée avec précision.

Concernant le contrôle de la taille du polymère, la solution la plus commode est d'utiliser des molécules d'ADN en raison de leur taille élevée, monodisperse pour un gène donné et doublée d'un contrôle parfait de la séquence. De plus, l'ADN est chargé négativement, avec deux charges négatives par base (pour une molécule d'ADN double brin, une seule charge si la molécule est simple brin) ; ceci permet l'emploi d'un forçage électrostatique pour assurer la translocation.

Ainsi, les premières mesures expérimentales de translocation de polymères ont été réalisées par Kasianowicz *et coll.*[288] en 1996. Les auteurs ont utilisé des pores de la bactérie *S. aureus*, l' α -hémolysine, insérés dans une membrane lipidique de manière à former des translocons pour la translocation de molécules d'ADN simple brin de 100, 120 et 150 nt ainsi que des molécules d'ARN de tailles allant de 150 à 450 nt (Fig.3.16A). Le forçage assurant la translocation était un forçage électrostatique, avec un potentiel membranaire de -120 mV (côté cis négatif). En raison des dimensions proches entre le diamètre des acides nucléiques ($\simeq 1nm$) et le diamètre du col de l' α -hémolysine (2.6nm)[9, 288], lorsque qu'une molécule d'ADN ou d'ARN traverse le pore, celle-ci diminue la conductivité ionique du pore par encombrement stérique. La mesure du courant ionique à travers le pore se présente ainsi comme une mesure indirecte du transport du polymère à travers le pore : lorsque qu'on détecte une chute brutale du courant, cela signifie qu'un polymère initie sa translocation à travers le pore ; celle-ci se termine lorsque le courant revient à sa valeur initiale, permettant ainsi la mesure du temps de translocation à l'échelle de la molécule unique (Fig.3.16B).

Grâce à cette méthode, Kasianowicz *et coll.* ont mis en lumière une dépendance linéaire entre la durée de translocation et la longueur des polymères, ainsi qu'une dépendance hyperbolique avec l'amplitude du forçage : $\tau_{tr} \propto f_0^{-1}N$ (Fig.3.16C-D). Cette évolution linéaire de la durée de translocation avec la longueur du polymère peut sembler à première vue en désaccord avec les prédictions de la théorie de la propagation de tension. Cependant, à régime de forçage faible ou modéré, la durée de translocation évolue comme $\tau_{tr} \propto N^{2\nu}$ d'après la théorie de propagation de tension. Selon la conformation de la molécule d'ADN à l'entrée du nanopore, un exposant 2ν peut se révéler proche de 1 (notamment si le polymère adopte une conformation idéale). Par conséquent, les observations de Kasianowicz *et coll.* ne sont pas contradictoires avec la théorie de la propagation de tension.

Cette dépendance peut se modéliser très simplement en considérant l'équilibre entre le forçage électrostatique auquel est soumis la molécule d'ADN et la force de traînée freinant sa translocation (en omettant les préfacteurs numériques) :

$$\eta r v = q \frac{\Delta V}{L_{pore}}, \quad (3.64)$$

où η est la viscosité dynamique du fluide, r le rayon d'un acide nucléique, v la vitesse de translocation, q la charge totale des monomères insérés dans le pore et $\Delta V/L_{pore}$ est le champ électrique à travers le pore. La figure 3.17C montre une mesure expérimentale de la vitesse de translocation en fonction du potentiel membranaire.

A partir de l'équation (3.64), on trouve facilement que la durée de translocation du polymère τ_{tr} s'exprime de la manière suivante :

$$\tau_{tr} = \frac{aN \times L_{pore}}{\mu \times \Delta V}, \quad (3.65)$$

où aN est la longueur de contour du polymère (longueur curviligne) et $\mu = q/(\eta r)$ la mobilité électrophorétique de la molécule d'ADN.

Ainsi, on retrouve très simplement les dépendances observées expérimentalement par Kasianowicz *et coll.*

D'autres études sur le même système expérimental par Meller *et coll.*[289, 290] et de Zoysa *et coll.*[291] ont retrouvé ces dépendances, confirmant ainsi la tendance observée par Kasianowicz *et coll.* (Fig.3.16E-F). Plus précisément, Meller *et coll.* ont observé une transition dans le régime de vitesse de translocation pour des molécules de plus de 12 bases, avec une vitesse de translocation constante pour des polymères plus grands. Les auteurs attribuent cette observation à la taille du nanopore : les grandes molécules dont l'extension est supérieure à la longueur du nanopore subissent une force constante au cours de leur translocation (correspondant à la force électrique ressentie par chaque monomère engagé dans le pore), alors que les petites molécules subissent une force proportionnelle à leur longueur, d'où la variabilité observée.

D'autres études expérimentales de translocation d'ADN ont été menées sur des nanopores artificiels ; c'est le cas notamment des études de Storm *et coll.*[292] et Carson *et coll.*[293]. Dans l'étude de Storm *et coll.*[292], les molécules d'ADN utilisées étaient des ADN double brin d'une taille allant de 6,5 kbp à 97 kbp pour des nanopores en dioxyde de silicium de 10 nm de diamètre. Contrairement aux études réalisées avec l' α -hémolysine,

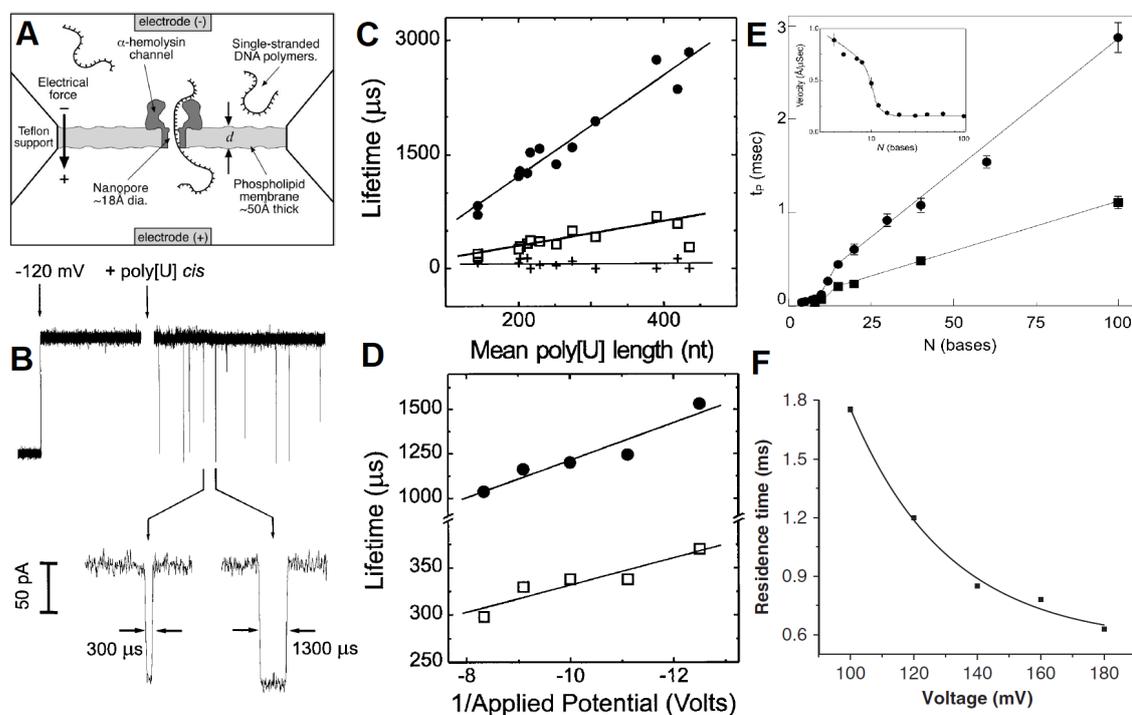


FIGURE 3.16 – Mesures expérimentales de la durée de translocation par forçage électrostatique : A) Système expérimental constitué d’une bicouche lipidique dans laquelle est inséré un pore bactérien (α -hémolysine) servant de translocon pour la translocation de molécules d’ADN ou d’ARN ; un potentiel membranaire est appliqué avec le côté cis négatif pour forcer la translocation. Le courant ionique est mesuré durant toute l’expérience. B) Lorsque qu’une molécule traverse le pore, la conductance de celui-ci diminue, ce qui provoque une chute abrupte du courant ionique. En mesurant la durée entre cette chute et le retour à la valeur initiale, il est possible de mesurer la durée de translocation d’un polymère à l’échelle de la molécule unique. C-D) Expérience de Kasianowicz *et coll.* : durée de la translocation en fonction de la longueur du polymère et du potentiel membranaire. E) Expérience de Meller *et coll.* F) Expérience de Zoysa *et coll.* (A extrait de [289], B-C-D extraits de [288], E extrait de [290] et F extrait de [291]).

les auteurs ont observé une dépendance en loi de puissance avec exposant 1,26 de la durée de translocation avec la longueur du polymère (Fig.3.17A).

Les auteurs ont développé un modèle simple permettant d'expliquer la loi d'échelle précédente : pour cela, il suffit de considérer que la force de friction s'opposant à la translocation s'exprime dans le modèle de Zimm comme la force de traînée sur le polymère tout entier à l'entrée du pore. La vitesse de déplacement de cette pelote s'exprime comme la dérivée temporelle de son rayon de giration. La force électrostatique assurant la translocation étant constante, on a l'équilibre des forces suivant :

$$\eta R_g \frac{dR_g}{dt} \simeq F_{el}, \quad (3.66)$$

où F_{el} est la force électrostatique (constante).

Cette équation s'intègre très simplement et donne la loi d'échelle $\tau_{tr} \propto N^{2\nu}$, qui donne $\tau_{tr} \propto N^{6/5}$ lorsque $\nu = 3/5$ (bon solvant), en bonne approximation avec les observations expérimentales de Storm *et coll.* (Fig.3.17B).

De la même manière, Carson *et coll.*[293] ont observé sur un système analogue à celui de Storm *et coll.* la translocation de molécules d'ADN double brin d'une taille allant de 35 bp à 20 kbp dans des pores de diamètre entre 3 nm et 6 nm. Les auteurs ont mis en lumière une loi d'échelle avec exposant 1,37 entre la durée de translocation et la longueur du polymère (Fig.3.17D), rejoignant Storm *et coll.* sur leur observation surlinéaire de cette relation dans les nanopores artificiels par rapport aux pores biologiques. Une plus forte friction du polymère dans les nanopores artificiels pourrait expliquer cette différence, comme l'ont montré à partir d'une simulation l'étude de Lehtola *et coll.*[294].

A propos de l'étude de Kasianowicz *et coll.*[288], celle-ci a marqué le domaine d'étude des polymères en mettant en lumière la possibilité de discriminer des bases d'ADN en translocation selon la baisse d'intensité du courant ionique qu'elles induisent lorsqu'elles sont à l'intérieur du pore (ce qu'on appelle un événement de *blockade*). En effet, en raison de la conformation de la base et son interaction avec le pore, l'intensité ionique change selon les bases. Ainsi, en mesurant les hauteurs successives de l'intensité au cours de la translocation, il est possible de déterminer la séquence de la molécule d'ADN[295] (Fig.3.18). Plus encore, il serait possible de séquencer des protéines avec ce type de dispositif, ouvrant des perspectives importantes pour le séquençage haut-débit de biomolécules. Le lecteur intéressé par ce sujet trouvera plus de détails dans les revues suivantes : Wanunu (2012)[296], Montel (2018)[297] et Kono et Arakawa (2019)[298].

3.3.4 Modèle de succion

Nous avons vu dans la section précédente un modèle hors-équilibre rendant compte de manière quantitative de la physique d'un polymère en translocation à travers un pore infiniment fin et ne permettant le passage que d'un seul monomère à la fois. Ces conditions peuvent se retrouver expérimentalement dans le cadre de la translocation de molécules d'ADN simple brin ou d'ARN à travers des pores bactériens très fins, comme l' α -hémolysine. En revanche, ces hypothèses tombent lorsqu'on considère la translocation de molécules d'ADN double brin à travers des pores plus larges, comme le pore nucléaire par exemple, où le polymère peut pénétrer à l'intérieur du pore non-déroulé, formant des blobs. De plus, Auger *et coll.*[299] ont apporté la preuve expérimentale de

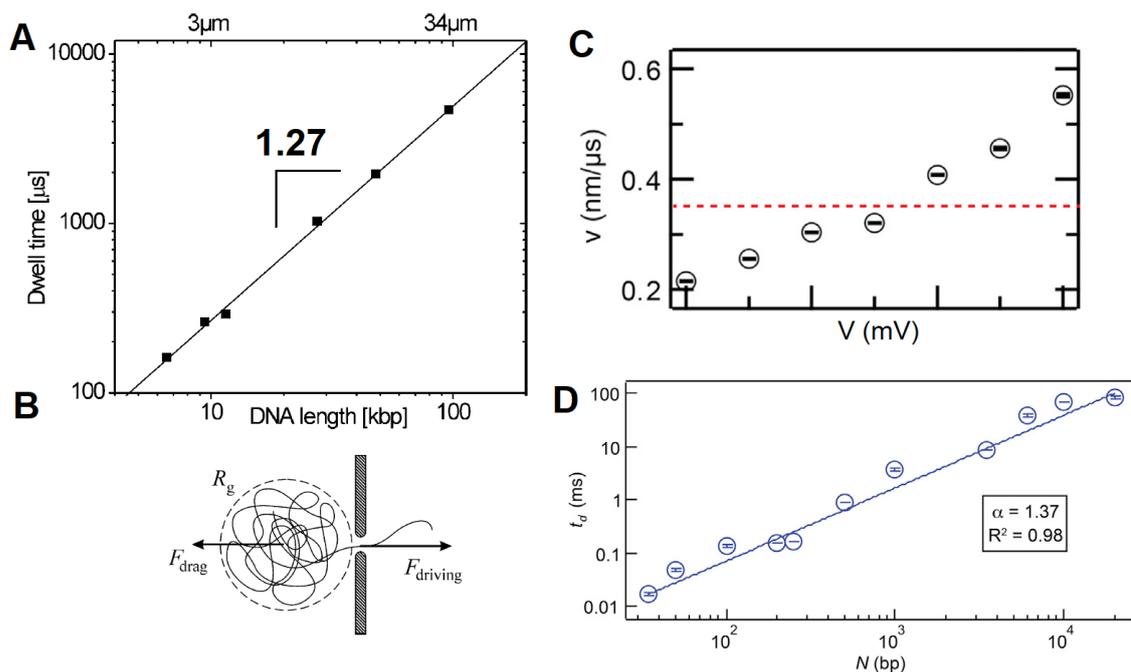


FIGURE 3.17 – Expériences de translocation avec nanopores artificiels - A) Expérience de Storm *et coll.* : mesure de la durée de translocation en fonction de la longueur des molécules d'ADN (double brin). B) Modèle de Storm *et coll.* avec une force de friction sur le blob à l'entrée du nanopore. C-D) Expérience de Carson *et coll.* : C) vitesse de translocation du polymère en fonction du potentiel membranaire; la ligne en pointillés rouge représente la vitesse $1 \text{ bp}/\mu\text{s}$; D) durée de translocation en fonction de la longueur de la molécule d'ADN double brin. (A-B extraits de [292] et C-D extraits de [293]).

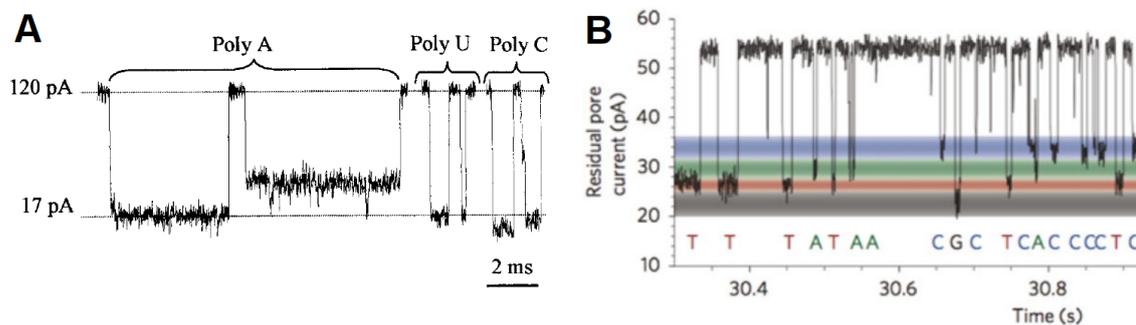


FIGURE 3.18 – Séquençage de polymères : A) homopolymères ; B) molécules d'ADN. La détermination du monomère dans le pore s'effectue selon la baisse de l'intensité du courant ionique. (A extrait de [295] et B extrait de [296]).

l'existence d'un flux critique régissant le transport d'un polymère à travers un nanopore : la translocation, même en présence d'un forçage (hydrodynamique ou électrique), n'est favorisée qu'au-delà de ce flux critique. La théorie de la propagation de tension ne décrit pas de flux semblable, qui, comme nous le verrons dans cette section, est une conséquence directe du coût énergétique de confinement.

De manière plus quantitative, le coût énergétique de confinement est donné par le nombre de blocs confinés, soit $k_B T \times L/(2R)$, avec L la longueur du nanopore et R son rayon. Dans le cas de nanopores réels, c'est-à-dire possédant une longueur non-nulle, le coût énergétique de confinement est d'autant plus élevé que le rapport d'asymétrie $L/(2R)$ est grand. Dans le cas des membranes nanoporeuses de type track-etched (utilisées dans notre étude, voir section 1.2.1), ce rapport vaut entre 25 et 600 selon les diamètres de nanopores utilisés. Avec un tel coût énergétique de confinement, il apparaît nécessaire de considérer la contribution entropique dans la physique de la translocation. C'est précisément l'apport du modèle de succion, que nous allons présenter dans ce qui suit.

C. Gay, P. G. de Gennes, E. Raphaël, and F. Brochard-Wyart[300, 301, 302, 303] ont proposé un modèle, appelé modèle de succion, pour rendre compte de l'import d'un polymère flexible dans un pore d'épaisseur non-nulle (par opposition au pore infiniment fin) dans le régime de blocs de de Gennes (c'est-à-dire avec un diamètre de pore très supérieur à la longueur de persistance du polymère). L'import du polymère dans le pore s'effectue avec l'aide d'un forçage hydrodynamique, qu'on peut obtenir expérimentalement par une différence de pression entre les deux côtés du pore (Fig.3.19A-B).

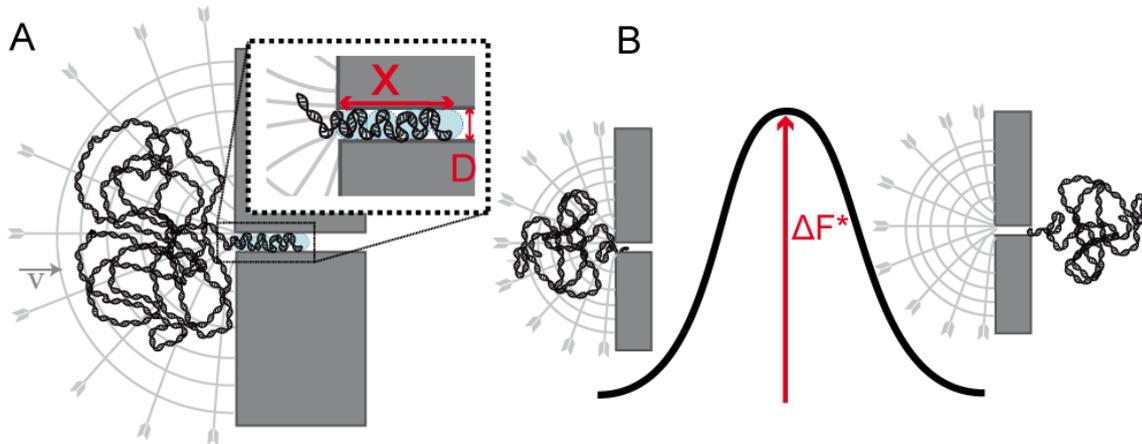


FIGURE 3.19 – Modèle de succion : A) Représentation de l'import d'un polymère dans un nanopore par forçage hydrodynamique selon le modèle de succion ; le polymère s'organise à l'intérieur du nanopore sur une longueur X en blocs dont la taille correspond au diamètre D du nanopore. B) Profil type de la translocation d'un polymère dans un nanopore par le modèle de succion ; la barrière d'énergie ΔF^* est régie par l'équilibre entre le forçage hydrodynamique et le coût entropique de confinement.

Le modèle de succion suppose les hypothèses suivantes :

- les interactions entre le pore et le polymère sont négligeables ; en particulier, on ne considère pas de friction du polymère sur les parois intérieures du pore lors de la translocation ;

- le polymère est flexible ou semi-flexible tel que sa longueur de persistance est très inférieure au diamètre du pore, ce qui place le confinement en régime de de Gennes ;
- le rayon de giration du polymère libre en solution est plus grand que la taille du pore, ce qui nécessite une déformation du polymère pour rentrer dans le nanopore ; cette hypothèse est à nouveau un prérequis du régime de blobs de de Gennes.

Comme nous l'avons vu précédemment dans la section 3.2.1, le confinement du polymère dans le nanopore et la formation des blobs entraîne un coût de confinement entropique de l'ordre de l'énergie thermique $k_B T$ par blob. Si on appelle X la longueur de pénétration du polymère dans le pore, on peut estimer ce coût entropique à $X/D \times k_B T$; avec le travail fourni par le forçage hydrodynamique, l'énergie libre du polymère pour le processus de translocation peut s'écrire de la manière suivante :

$$\Delta F(X) = \frac{X}{D} k_B T - 6\pi\eta \frac{D}{2} v \sum_{n_i=1}^{n_{blobs}} n_i \times D, \quad (3.67)$$

où η correspond à la viscosité du fluide, v la vitesse de l'écoulement dans le pore, D le diamètre du pore et n_{blobs} le nombre total de blobs dans le nanopore ; on a précisément la relation $n_{blobs} = X/D$.

L'expression du travail du forçage hydrodynamique sous forme de somme correspond à la somme du travail effectué par la force de friction du fluide sur chaque blob selon leur distance à l'entrée du pore ; cette distance est un multiple du diamètre du pore, par définition d'un blob. La force de friction est considérée dans un modèle hydrodynamique de Zimm, c'est-à-dire avec prise en compte des interactions hydrodynamiques entre monomères.

En développant les termes de la somme de la relation précédente et en omettant les préfacteurs numériques, on aboutit à l'équation suivante pour l'énergie libre du polymère confiné (Fig.3.20A) :

$$\Delta F(X) = \frac{X}{D} k_B T - \eta D^2 v \frac{X}{D} \left(\frac{X}{D} - 1 \right). \quad (3.68)$$

Dans le cas où la longueur de pénétration X du polymère dans le nanopore est très supérieure au diamètre du pore, le second terme de l'équation (3.68) se simplifie en $-\eta D^2 v \left(\frac{X}{D} \right)^2$, ce qui correspond à l'expression d'origine du modèle de succion. Néanmoins, dans un souci de généralité, nous garderons l'expression de l'équation (3.68) pour la suite de cette section. Nous reviendrons sur ce résultat à la fin de la section.

L'expression de l'énergie libre présente une barrière d'énergie venant le l'équilibre entre le forçage hydrodynamique et la coût entropique de confinement. La position de cette barrière d'énergie, c'est-à-dire la longueur de pénétration du polymère dans le pore pour passer cette barrière d'énergie X_{max} se calcule simplement et s'exprime de la manière suivante :

$$X_{max} = \frac{k_B T}{D\eta v} + D. \quad (3.69)$$

En injectant la relation (3.69) dans l'expression de l'énergie libre (3.68), on peut exprimer la hauteur de la barrière d'énergie ΔF^* de la manière suivante :

$$\frac{\Delta F^*}{k_B T} = \frac{v_c}{v} + \frac{v}{v'_c}, \quad (3.70)$$

où v_c et v'_c sont deux vitesses d'écoulement critique que nous allons détailler dans ce qui suit.

Par définition du flux J , on peut relier le flux à la vitesse d'écoulement du fluide v par la relation suivante :

$$J = \pi R^2 v, \quad (3.71)$$

où R est le rayon du pore.

A partir de l'expression du flux en fonction de la vitesse d'écoulement, on peut ré-écrire la hauteur de la barrière d'énergie libre pour la translocation de la manière suivante :

$$\frac{\Delta F^*}{k_B T} = \frac{J_c}{J} + \frac{J}{J'_c}. \quad (3.72)$$

On montre facilement que le flux critique J_c s'exprime uniquement en fonction de l'énergie thermique et de la viscosité comme $J_c \propto \frac{k_B T}{\eta}$; de même, on montre facilement que le second flux critique J'_c est simplement un multiple du flux critique J_c : $J'_c \simeq 16J_c$. Plus particulièrement, le second flux critique J'_c ne devient pertinent que pour un flux J supérieur à 16 fois le flux critique J_c . De même, l'équation 3.72 n'admet de barrière que pour $J < 4J_c$; au-delà, la barrière d'énergie s'effondre et la translocation s'effectue sans contrainte sous le forçage hydrodynamique. Dans ce schéma, nous omettrons le second flux critique J'_c dans la suite de ce manuscrit, sauf mention spéciale; ce terme peut être considéré comme un terme d'ordre supérieur pour l'expression de l'énergie libre de translocation.

Reprenons à présent l'expression du flux critique J_c : $J_c \propto \frac{k_B T}{\eta}$. Dans le cadre des hypothèses du modèle de succion, il apparaît que la probabilité de translocation d'un polymère à travers un nanopore, exprimée comme le facteur de Boltzmann $\exp(-\Delta F^*/k_B T) = \exp(-J_c/J)$ (Fig.3.20B) ne dépend que de l'énergie thermique et la viscosité du milieu. En particulier, ce flux ne dépend pas de la longueur du polymère ou du diamètre du pore. Cette universalité du flux critique J_c n'est cependant pas surprenante lorsque qu'on la soumet au regard des hypothèses du modèle : le régime de blobs de de Gennes confère à la formation de chaque blob une énergie de confinement de l'ordre de $k_B T$, indépendamment du diamètre du blob ou de la longueur du polymère. L'expression du flux critique est donc une conséquence directe des hypothèses du régime de de Gennes.

Le résultat $\Delta F^*/k_B T = J_c/J$ pour les polymères flexibles en régime de de Gennes peut être étendu au régime de confinement de Odijk lorsque la longueur de persistance L_p est de l'ordre du diamètre du nanopore ou supérieure. En effet, Auger *et coll.*[304] ont montré que ce résultat se retrouve dans le régime de Odijk tel que :

$$\frac{\Delta F^*}{k_B T} = \frac{1}{3} \ln \left(\frac{L_p}{D} \right) \times \frac{J_c}{J}. \quad (3.73)$$

En revanche, lorsque $L_p \gg D$, les auteurs ont montré que le flux critique J_c évolue comme $J_c \propto (D/L_p)^{2/3}$. Ainsi, lorsque la longueur de persistance devient considérablement plus grande que le diamètre du pore, la barrière d'énergie libre diminue selon une loi de puissance en $-2/3$. Les auteurs font l'analogie avec des spaghetti dans une passoire : il est plus facile de faire passer des spaghetti non-cuits à travers les trous de la passoire que des spaghetti cuits car ils tombent facilement à travers les trous dès lors qu'une de leur extrémité est insérée dans le trou¹ (Fig.3.21).

1. La passoire à spaghetti cuits est donc une passoire complexe alors que la passoire à spaghetti non-cuits est une passoire du second ordre, selon la terminologie Shadoks.

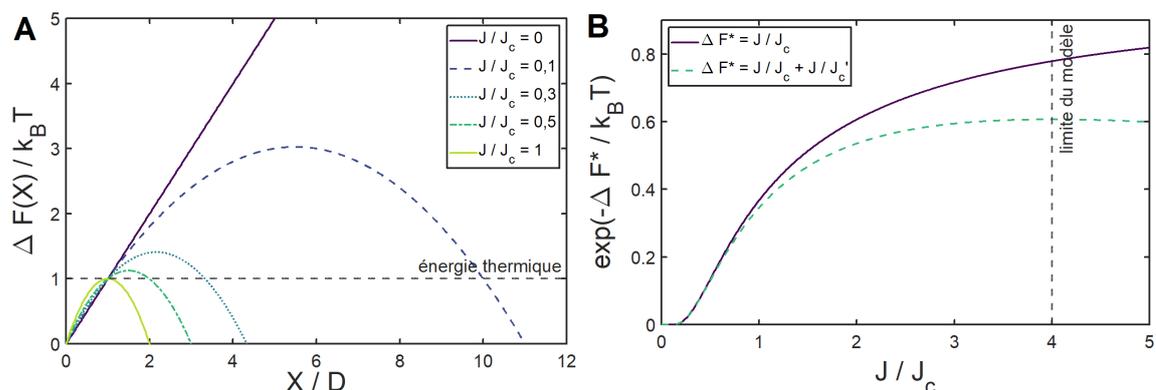


FIGURE 3.20 – A) Profil d'énergie libre du polymère en translocation en fonction du nombre de blobs confinés dans le nanopore, pour différentes valeurs J de flux du forçage hydrodynamique (exprimé en fraction du flux critique J_c). B) Probabilité de translocation du polymère à travers un nanopore dans le cadre du modèle de suction, exprimée comme le facteur de Boltzmann avec la hauteur de la barrière d'énergie libre ΔF^* ; la courbe en pointillés tient compte du terme d'ordre supérieur J/J'_c avec $J'_c = 16J_c$. Ce modèle de barrière est valide jusqu'à $J = 4J_c$, la barrière s'effondre au-delà.

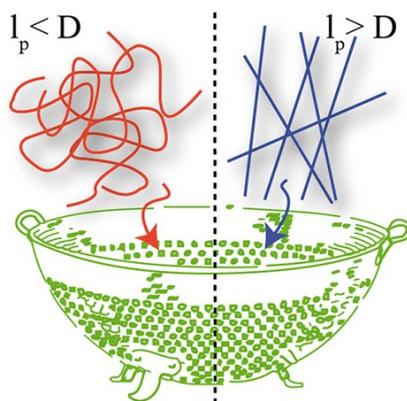


FIGURE 3.21 – Passoire à spaghetti : (gauche) spaghetti cuits dont la longueur de persistance est plus faible que le diamètre des trous de la passoire ; (droite) spaghetti non-cuits, avec une longueur de persistance plus grande que le diamètre des trous. Les spaghetti traverseront les trous plus facilement s'ils ne sont pas cuits. (Extrait de [304]).

Expérimentalement, le modèle de succion a été appliqué avec succès à des expériences de translocation de polymères de natures diverses.

La première vérification de ce modèle a été réalisée par Béguin *et coll.*[303] en 2010. Cette expérience fait notamment suite aux études de Guillot *et coll.*[305], Long et Anderson[306] et Jin *et coll.*[307], où la translocation de polymères a été quantifiée par la mesure du coefficient de rejet σ d'une membrane nanoporeuse entre deux compartiments dont l'un est un réservoir à une concentration C_0 en polymères et où le flux de solvant par nanopore est contrôlé. On définit le coefficient de rejet σ comme l'écart à la concentration initiale en polymères C_0 du compartiment trans, soit $\sigma = 1 - C/C_0$. Plus le coefficient de rejet est proche de 0, plus la translocation vers le côté trans est favorisée ; à l'inverse, un coefficient de rejet proche de 1 indique une faible probabilité de translocation. La mesure de la concentration en polymère dans le compartiment trans peut par exemple s'effectuer par réfractométrie ou par chromatographie d'exclusion de taille couplée à une technique de diffusion de la lumière multi-angle (SEC-MALS)[303, 305, 308, 309].

Ces mesures ont été motivées par les prédictions théoriques de Daoudi et Brochard[310] sur l'existence d'un flux critique en-dessous duquel un polymère ne peut pas pénétrer dans un nanopore ; au-dessus de ce seuil, la translocation s'effectue à la vitesse du flux hydrodynamique. Ce modèle porte le nom de modèle de déformation affine.

Dans le modèle de déformation affine[310], on considère que le polymère peut pénétrer dans le pore à la condition qu'il puisse être déformé par le cisaillement du flux à proximité de l'entrée du pore. Cela se traduit par un taux de cisaillement plus grand que le taux de relaxation du polymère au niveau du pore. Dans le modèle hydrodynamique de Zimm (avec prise en compte des interactions hydrodynamiques entre monomères), le taux de relaxation τ^{-1} d'un polymère s'exprime de la manière suivante (en omettant les préfacteurs numériques) :

$$\tau^{-1} = \frac{k_B T}{\eta R_h^3}, \quad (3.74)$$

avec R_h le rayon hydrodynamique du polymère libre en solution.

En supposant un écoulement radial convergent vers le pore, avec l'hypothèse d'incompressibilité du fluide et l'équation de conservation de masse, on peut exprimer la vitesse du fluide $v(r)$ à une distance r du pore comme $v(r) = J/r^2$. On en déduit alors le taux de cisaillement s du fluide comme :

$$s = \frac{dv(r)}{dr} = \frac{J}{r^3}. \quad (3.75)$$

En combinant les équations (3.74) et (3.75), on peut estimer que le flux critique J_c à partir duquel le cisaillement de l'écoulement est plus rapide que la relaxation du polymère est donné par la relation suivante :

$$s(J_c, r = R_h) = \tau^{-1} \Leftrightarrow J_c = \frac{k_B T}{\eta}. \quad (3.76)$$

Nous retrouvons à nouveau le flux critique déjà calculé pour le modèle de succion. On peut voir ce résultat général comme la conséquence d'un équilibre entre le forçage hydrodynamique, induisant une force de traînée sur le polymère et l'énergie thermique du bain permettant les fluctuations de conformation du polymère.

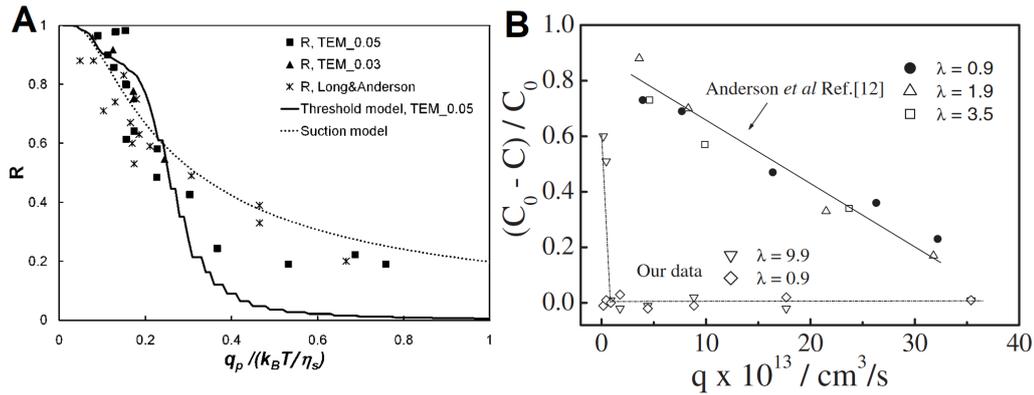


FIGURE 3.22 – A) Expérience de Béguin *et coll.* : coefficient de rejet R en fonction du flux q_p normalisé par le flux critique $k_B T / \eta$. Le coefficient de rejet R se définit par : $R = 1 - C_{trans} / C_{cis}$, où C_{trans} et C_{cis} sont respectivement les concentrations en polymère du côté trans (basse pression) et ci (haute pression). B) Expérience de Jin et Wu : coefficient de rejet en fonction du flux. (A extrait de [303] et B extrait de [307]).

Long et Anderson[306] ont observé la translocation de polymères de polystyrène par forçage hydrodynamique. Les auteurs ont décrit une absence d'effet de la taille des nanopores et de la masse molaire des polymères sur le transport de ces molécules, ce qui a été également constaté dans des études similaires de Guillot *et coll.*[305] et Jin et Wu[307] (Fig.3.22). Cependant, à l'exception de l'étude de Jin et Wu[307], les auteurs n'ont pas observé de transition brutale du coefficient de rejet (qui quantifie les molécules transportées) pour un flux critique donné, laissant voir à la place une transition douce. Béguin *et coll.* ont par la suite attribué le résultat de Jin et Wu à une sédimentation des polymères à l'entrée des nanopores, créant ainsi un bouchon se disloquant par la suite à un flux donné ; ce processus a été limité dans les autres études au moyen de l'agitation du milieu. Ces observations expérimentales ont contribué à la vérification du modèle de suction détaillé précédemment par Gay *et coll.*[300], mais il faudra attendre l'étude de Auger *et coll.*[299] pour la preuve expérimentale de l'existence d'un flux critique indépendant de la taille du nanopore ou de la longueur du polymère en translocation (Fig.3.23).

Le modèle de suction a été appliqué avec succès dans l'étude de Auger *et coll.*[299] pour décrire la translocation de molécules d'ADN λ à travers des pores de diamètres entre 50 nm et 200 nm, ce qui a permis la preuve expérimentale de la validité du modèle de suction. Le forçage hydrodynamique a été réalisé par un contrôleur de pression, la pression et le flux étant reliés via la loi de Hagen-Poiseuille (en considérant une géométrie cylindrique pour le pore) :

$$\Delta P = P_{cis} - P_{trans} = \frac{8\eta L}{\pi R^4} \times J, \quad (3.77)$$

où P_{cis} et P_{trans} sont les pressions du côté cis et trans, η la viscosité dynamique du fluide, L la longueur du pore, R son rayon et J le flux.

Les auteurs ont observé grâce à une technique de molécules uniques en champ proche, nommée *Zero Mode Waveguide for nanopores*, la translocation de molécules d'ADN λ à l'échelle de la molécule unique. Nous ne détaillerons pas cette technique dans cette section ; le lecteur intéressé pourra consulter le chapitre 1 entièrement dédié à sa description.

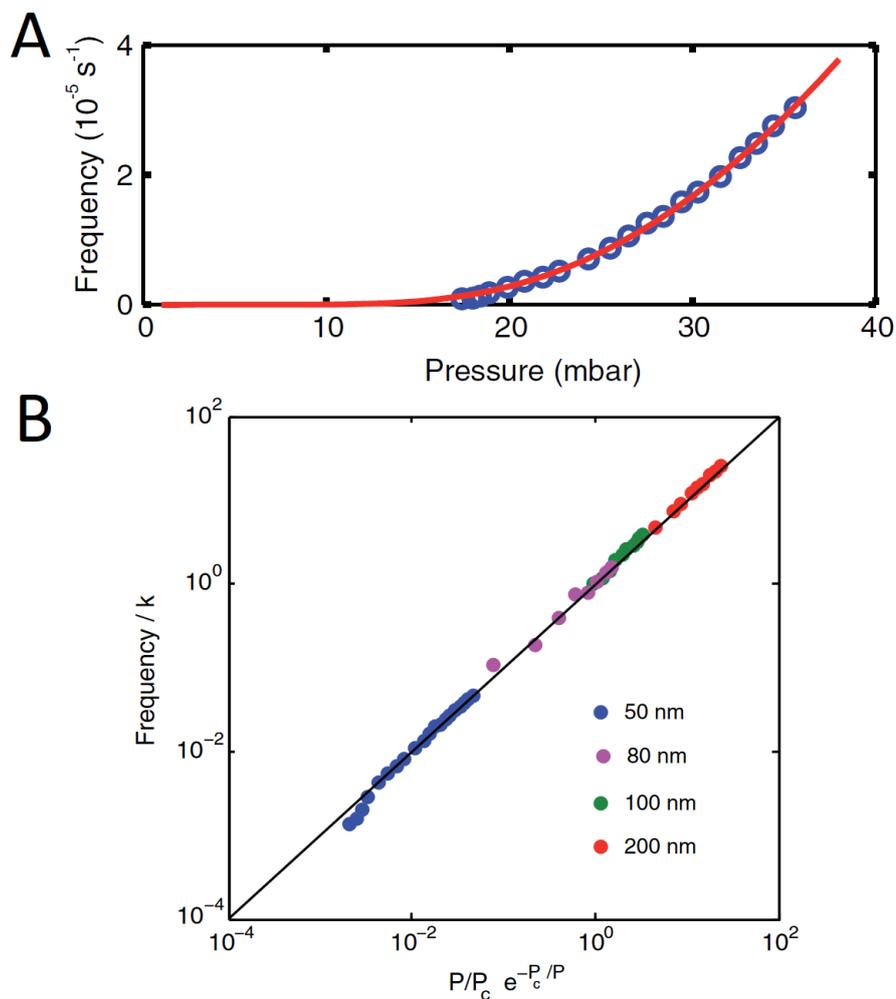


FIGURE 3.23 – Validation expérimentale du modèle de succion - Expérience de Auger *et coll.* : A) Fréquence de translocation de molécules d'ADN λ en fonction de la pression imposée. B) Fréquence de translocation (normalisée par une constante k) en fonction de la pression P sous forme d'une courbe maîtresse, pour différentes tailles de nanopores. (Extraits de [299]).

Auger *et coll.* ont mesuré la fréquence de translocation des molécules d'ADN en fonction du gradient de pression imposé entre les deux côtés cis et trans de la membrane nanoporeuse pour des diamètres de pores variables (Fig.3.23B). Les auteurs ont mis en évidence l'indépendance du flux critique J_c avec la longueur du polymère et la taille du nanopore, apportant ainsi la première preuve expérimentale de l'existence de ce flux critique.

Pour décrire l'évolution de la fréquence de translocation, les auteurs ont repris le modèle de succion pour la probabilité de translocation p telle que $p = \exp(-P_c/P)$, où P et P_c sont les pressions analogues aux flux J et J_c via la relation de Hagen-Poiseuille (3.77). Enfin, pour exprimer le taux de transition de passage de la barrière d'énergie libre dans la théorie cinétique de Kramers, les auteurs ont pris comme taux d'incidence sur la barrière f_c le taux de cisaillement de l'écoulement à l'entrée du nanopore $f_c = J/R^3$. Ainsi, les données expérimentales ont été ajustées avec succès d'après la relation suivante (Fig.3.23) :

$$f(P) = f_c \times e^{-\frac{P_c}{P}} = k \frac{P}{P_c} e^{-\frac{P_c}{P}}, \quad (3.78)$$

où $k = J_c/R^3$ le taux de cisaillement lorsque $J = J_c$.

Dans la suite de cette étude, nous utiliserons cette formule comme référence pour nos mesures de fréquence de translocation, que nous nommerons "modèle de succion" par extension du modèle sur lequel elle est basée.

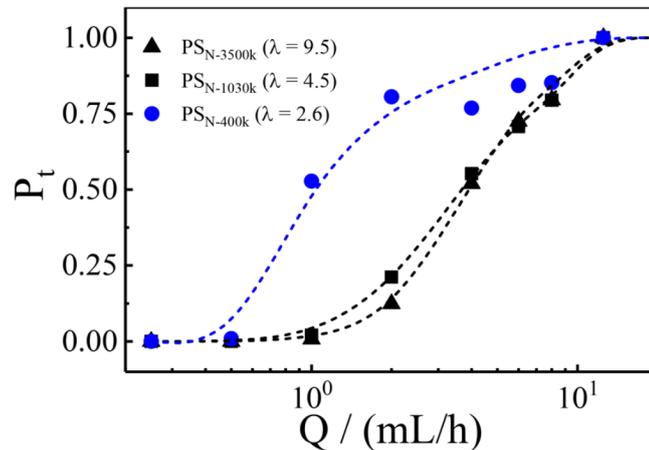


FIGURE 3.24 – Expérience de Zheng *et coll.* : probabilité de translocation en fonction du flux pour des polymères de différentes tailles; λ correspond au ratio entre le rayon de giration du polymère et le rayon du pore. (Extrait de [311]).

Pour terminer cette section sur les mesures expérimentales du modèle de succion, nous citerons l'étude plus récente de Zheng *et coll.*[311], où les auteurs ont mesuré par chromatographie d'exclusion de taille la translocation de molécules de polystyrène de tailles variables à travers des nanopores de 20 nm de diamètre, sous un forçage hydrodynamique contrôlé en flux. Les auteurs ont ajusté avec succès leurs données expérimentales avec le modèle de succion (Fig.3.24). En revanche, ils ont pu observer une variation du flux critique avec la taille du polymère, séparant ainsi deux régimes de translocation : un premier régime de confinement fort, avec un rapport λ entre la taille du polymère en solution et

le rayon du nanopore supérieur à $\lambda^* = 3,5 - 4$, où le flux critique est indépendant de la taille du polymère ; et un second régime de confinement modéré, soit $\lambda < \lambda^*$, où le flux critique diminue lorsque la taille du polymère diminue. Les auteurs établissent la relation suivante pour l'évolution du flux critique avec la taille du polymère :

$$\frac{J_c(\lambda < \lambda^*)}{J_c(\lambda > \lambda^*)} = \frac{2 \left(\frac{\lambda}{\lambda^*}\right)^{5/3} - \alpha}{\left(\frac{\lambda}{\lambda^*}\right)^{10/3}}, \quad (3.79)$$

où α vaut 1 si $0.8 < \lambda/\lambda^* < 1$ et $\frac{11}{8}\lambda/\lambda^* - \frac{1}{10}$ si $0.4 < \lambda/\lambda^* < 0.8$.

A partir de leurs observations, les auteurs suggèrent la possibilité de filtrer des polymères de tailles variables en se servant du régime de confinement modéré où le flux critique dépend de la taille du polymère[311].

3.4 Simulations de ratchet de translocation

Le mécanisme du ratchet de translocation a été essentiellement étudié par simulations, les seules études expérimentales étant celles détaillées dans le chapitre 2.

On peut classer ces simulations selon qu'elles relèvent d'une méthode de Monte Carlo ou d'une dynamique de Langevin. Dans les deux cas, il est important de noter que le résultat de ces simulations est toujours biaisé par la méthode numérique, d'autant plus lorsqu'il s'agit d'étudier un processus hors-équilibre, comme le rappellent Lehtola *et coll.*[312].

3.4.1 Étude d'Elston

La première simulation de ratchet de translocation remonte à l'étude d'Elston[125] en 2002, déjà évoquée dans la section 2.2.2 à propos de l'expérience de Matlack *et coll.*[126] sur le translocon Sec61.

Elston a développé un modèle mathématique proche de celui de Simon, Peskin, Odell et Oster pour rendre compte de la dynamique de translocation de la protéine prepro- α factor à travers le translocon Sec61 en présence (côté trans) de protéines BiP.

L'auteur détaille dans un modèle cinétique les probabilité d'association/dissociation des protéines BiP sur les sites d'adsorption disponibles sur la molécule en translocation. L'auteur définit également deux modes d'action des protéines BiP pour assurer le transport du substrat : un mécanisme de ratchet de translocation et un mécanisme de type power stroke. Dans le second cas, l'association d'une protéine BiP sur le substrat génère une force de traction sur celui-ci, entraînant alors le reste de la molécule.

A partir des données expérimentales de l'étude de Matlack *et coll.*[126], Elston a ajusté avec succès les courbes expérimentales à partir de ces deux modèles (ratchet de translocation et power stroke) (Fig.3.25). L'auteur a également développé une simulation Monte Carlo reprenant les éléments de l'expérience de Matlack *et coll.*, pour servir de comparaison aux paramètres des ajustements. Les simulations ont mené à des estimations de paramètres physiques, tels que l'énergie d'association entre BiP et la protéine en translocation ou sa constante de diffusion, analogues à ceux estimés par l'ajustement, validant ainsi l'approche d'Elston. Finalement, l'auteur conclut que les deux modèles, ratchet de translocation et power stroke, mènent à des résultats similaires et que les deux sont suffisants pour expliquer le succès des expériences de Matlack *et coll.*

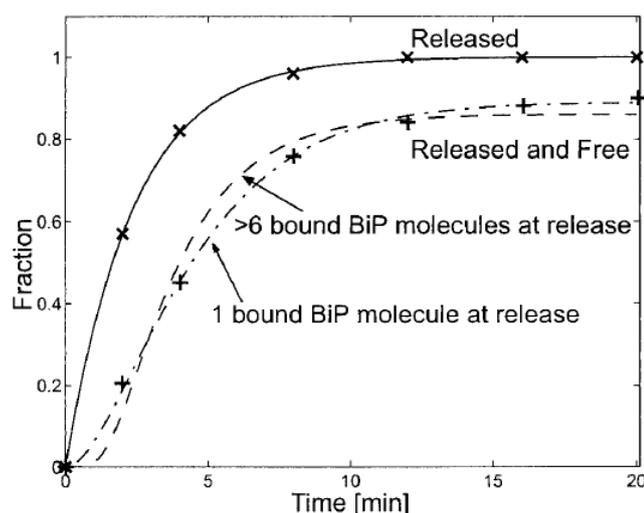


FIGURE 3.25 – Étude d’Elston : évolution temporelle de la fraction de protéines BiP liées au substrat, ajustée par le modèle d’Elston. (Extrait de [125]).

3.4.2 Étude de Zandi *et coll.*

Voyons ensuite l’étude de Zandi *et coll.*[313]. Dans cette étude, les auteurs développent une simulation de dynamique moléculaire pour la translocation d’un polymère rigide en présence d’agents de ratchet, modélisés par des particules sphériques interagissant avec le polymère selon un potentiel de Lennard Jones.

Les auteurs observent une réduction conséquente de la durée de translocation lorsque la concentration en agents de ratchet augmente (Fig.3.26A). La mesure de la force de tension ressentie par la chaîne de monomères montre une force quasiment constante à partir d’une certaine longueur de polymère déjà transportée (de l’ordre de 2-3 monomères) (Fig.3.26B).

Les auteurs développent ensuite un modèle statistique basé sur la résolution de l’équation de Fokker-Planck, en prenant dans le profil d’énergie libre du polymère un gain par association avec des agents de ratchet, à la manière d’un modèle d’isotherme d’adsorption de Langmuir. Avec ce modèle, les auteurs retrouvent en très bonne approximation leurs résultats obtenus par simulation.

A partir de ce constat, Zandi *et coll.* suggèrent que l’effet observé de ratchet de translocation est une conséquence de l’association entre le polymère et une autre molécule, permettant un gain d’énergie et favorisant la translocation, à la place du mécanisme de ratchet de translocation.

Les conclusions de cette étude sont toutefois à nuancer, car il s’agit d’une simulation par dynamique moléculaire d’un processus hors-équilibre, donc probablement biaisée[312]. Ensuite, le polymère est modélisé comme un polymère rigide (soit une tige) dans une simulation à deux dimensions, ce qui s’éloigne de la réalité des expériences. Enfin, et comme l’avait déjà suggéré dans son étude Elston[125], le mécanisme de ratchet de translocation n’est pas incompatible avec d’autres mécanismes pour accélérer le transport d’une molécule à travers un nanopore. Ainsi, un gain d’énergie par association avec l’agent de ratchet peut tout à fait contribuer à la translocation sans annuler l’inhibition de la rétro-translocation.

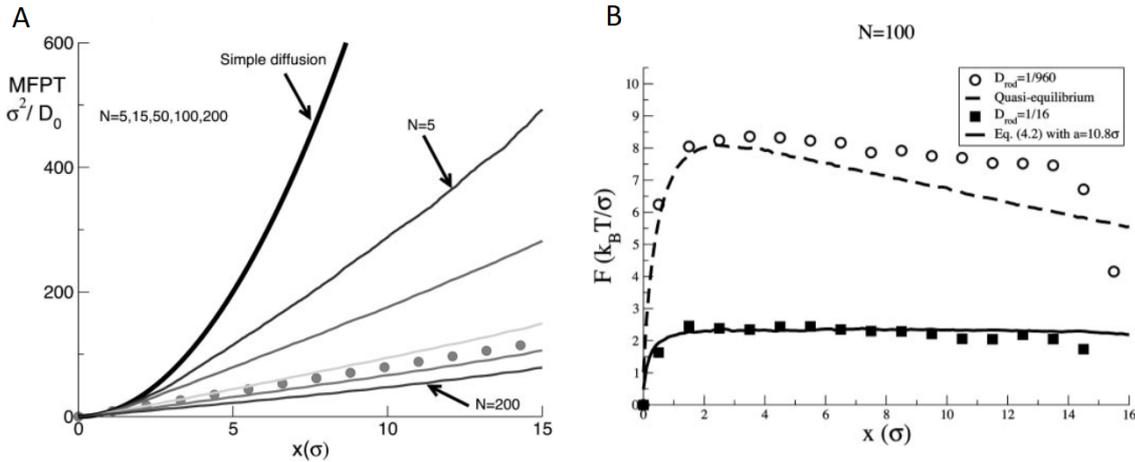


FIGURE 3.26 – Etude de Zandi *et coll.* : A) Durée de la translocation en fonction du nombre de monomères pour différentes concentrations N en agents de ratchet. B) Force de tension dans la chaîne de monomères en fonction du nombre de monomères. (Extraits de [313]).

3.4.3 Étude de Suhonen et Linna

Pour terminer cette section, nous citerons l'étude de Suhonen et Linna[314], où les auteurs développent une simulation par dynamique de Langevin de la translocation d'un polymère en présence d'agents de ratchet à la sortie des nanopores, avec comme particularité d'être une simulation à trois dimensions (Fig.3.27A).

Dans cette simulation, les auteurs comparent les durées moyennes de translocation en présence d'agents de ratchet selon la longueur du polymère mais également selon la concentration en agents de ratchet ou le mode d'association entre celui-ci et le polymère. Plus précisément, les auteurs envisagent un cas où les agents de ratchet, modélisés comme des particules interagissant avec les monomères selon un profil de Lennard-Jones, ne peuvent se lier aux monomères qu'un à un, sans pouvoir créer de liaisons multiples entre un agent de ratchet et plusieurs monomères ; ce cas est désigné comme One-To-One (OTO). Dans le second cas, All-To-All (ATA), les agents de ratchet sont libres de s'associer à plusieurs monomères en même temps.

A partir de leur simulation, les auteurs observent pour le cas OTO une dynamique de translocation proche de celle d'une translocation sous forçage constant. Dans ce régime, la durée de la translocation évolue avec la longueur du polymère selon une loi d'échelle d'exposant 1,26, contre $1 + \nu = 1,6$ selon la théorie de la propagation de tension (voir section 3.3.3) (Fig.3.27B). Les auteurs attribuent cette faible valeur d'exposant comme une conséquence de la friction engendrée par la présence des agents de ratchet associés au polymère.

Dans le régime ATA, l'exposant obtenu pour cette loi d'échelle est de 1,36 (Fig.3.27B). Les auteurs justifient cette valeur au moyen d'un modèle de durée de translocation calculée sur la durée de formation d'un globule à la sortie du nanopore : dans ce schéma, la présence des agents de ratchet en régime ATA provoque la formation d'un globule compact alimenté par le polymère extrudé. Avec l'hypothèse d'une quantité de mouvement constante au

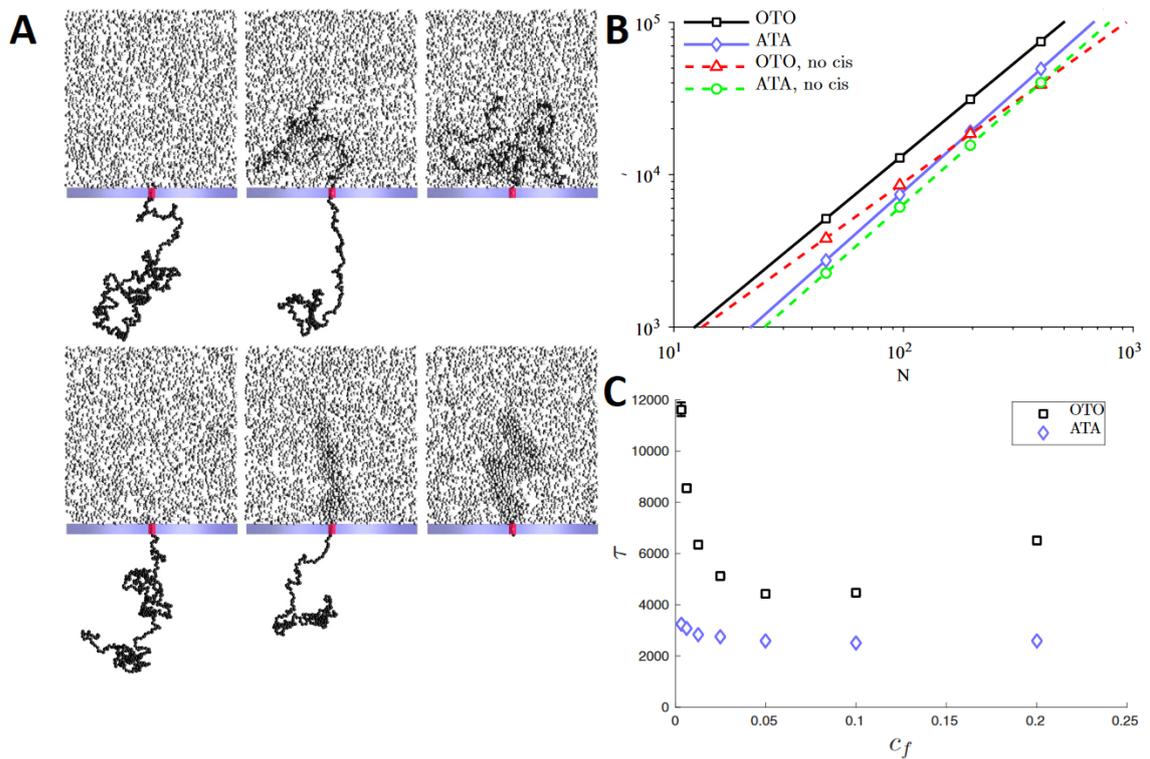


FIGURE 3.27 – Etude de Suhonen et Linna : A) Instantanés représentant les différentes étapes clés de la translocation d'un polymère en présence d'agents de ratchet. B) Durée de la translocation en fonction de la longueur du polymère dans les régimes OTO et ATA (no cis correspond à une condition sans monomères du côté cis du pore). C) Durée de la translocation en fonction de la concentration en agents de ratchet. (Extraits de [314]).

cours du temps, nous obtenons une vitesse de translocation v qui évolue avec $1/N$ (le nombre de monomères). La translocation est considérée comme terminée lorsque le globule atteint une taille de $N^{1/3}$, ce qui conduit à une durée de translocation τ évoluant comme $\tau \propto N^{1/3}/v \propto N^{4/3}$.

Bien que ce modèle rende compte de l'exposant observé dans la simulation, l'hypothèse d'une quantité de mouvement constante semble malgré tout assez grossière, d'autant plus que la translocation est un processus hors-équilibre, comme en témoignent les expériences de translocation présentées dans la section 3.3.3.

Enfin, les auteurs observent l'existence d'un minimum pour la durée de translocation en fonction de la concentration en agents de ratchet en régime OTO (Fig.3.27C); ce minimum n'est pas observé pour le régime ATA, où la durée de translocation décroît avec la concentration jusqu'à atteindre rapidement un plateau. Les auteurs attribuent l'existence du minimum pour le régime OTO à l'augmentation de la friction du polymère côté trans du nanopore par association avec les agents de ratchet. Avec cette explication, il est cependant curieux de ne pas observer un comportement similaire pour le régime ATA, la condition d'association permettant de former des globules compacts également soumis à la friction du fluide. Une précédente étude par Yu et Luo[315], analogue à celle de Suhonen et Linna mais à deux dimensions, présente un minimum pour la durée de translocation en fonction de la concentration en agents de ratchet pour le régime ATA, contrairement aux observations de Suhonen et Linna à trois dimensions. Il apparaît donc que la dimension considérée pour les simulations induise des comportements assez variables pour des systèmes pourtant analogues.

3.4.4 En résumé

Nous avons vu dans cette section un panorama des études présentant des simulations de ratchet de translocation. Nous avons pu constater une grande variabilité des résultats obtenus, très dépendants de la méthode mise en place pour la simulation, dynamique moléculaire ou dynamique de Langevin, ou des choix de modélisation : règles d'association de l'agent de ratchet avec le polymère, dimension du système, rigidité du polymère...

A partir de ce constat, des expériences pour tester la validité du mécanisme de ratchet de translocation semblent de rigueur pour faire avancer les connaissances à son sujet. Les simulations n'étant pas satisfaisantes, il est nécessaire de développer un système expérimental reproduisant le mécanisme du ratchet de translocation au sein d'un système parfaitement contrôlé.

Projet de thèse

Nous avons vu que le mécanisme du ratchet de translocation est au coeur d'un grand nombre de processus biologiques impliquant le transport de macromolécules à travers des membranes biologiques. Les études précurseurs de Matlack *et coll.*[126] sur le complexe Sec61 et celle de Hepp *et coll.*[191] sur le pilus type IV ont mis en évidence des mécanismes de ratchet de translocation dans des systèmes biologiques. Cependant, du point de vue physique, aucune étude expérimentale sur les paramètres clés du ratchet de translocation n'a été jusqu'ici réalisée. Il existe un certain nombre de modèles statistiques pour rendre compte de la translocation de polymères dans des milieux confinés, comme nous l'avons vu dans le chapitre 3; mais pour le cas du ratchet de translocation, le seul modèle dont nous disposons est celui développé par Simon, Peskin, Odell et Oster (voir section 1.3.2).

Plus précisément, le modèle de Simon *et coll.* fait ressortir le rapport L/δ pour le gain temporel du ratchet de translocation sur la diffusion libre, avec L la longueur du substrat en translocation et δ le pas du ratchet, à savoir la taille de l'agent de ratchet. Cependant, cette approche est valide dans le cadre d'un pore infiniment fin et de la taille exactement du substrat en translocation. Cette hypothèse de travail n'est plus possible lorsqu'il s'agit de se comparer à un système réel, où le substrat rencontre un coût énergétique inhérent au confinement à l'intérieur du pore. De même, le modèle de Simon *et coll.* suppose un contrôle thermodynamique pour la dynamique d'association entre l'agent de ratchet et le substrat. Comme nous l'avons vu dans la section 3.3.3, la translocation d'un polymère est un processus hors-équilibre. De ce fait, un contrôle thermodynamique pour la dynamique d'association entre l'agent de ratchet et le substrat, gouvernant alors le succès du mécanisme de ratchet de translocation, semble une hypothèse trop forte pour être confrontée avec succès aux expériences.

Du point de vue biologique, la description physique d'un ratchet de translocation permettrait une meilleure compréhension des interactions entre protéines interagissant au sein des translocons ainsi que leur rôle dans le transport de biomolécules. La description de ces systèmes biologiques en tant que machines thermodynamiques permettrait un gain de généralité, d'autant plus que nous avons vu que ces systèmes sont généralement complexes, avec de nombreuses protéines intervenant de concert pour des mécanismes de transport variés au sein d'un même translocon (comme c'est le cas par exemple pour les complexes TIM/TOM et TIC/TOC).

A partir de ce constat, il apparaît nécessaire de tester la validité du modèle du ratchet de translocation au sein d'un système physique expérimental dont tous les paramètres seraient contrôlés. En particulier, une telle expérience permettrait de mettre en lumière

les dépendances à la fois cinétiques et géométriques expliquant le fonctionnement du ratchet de translocation.

La caractérisation de ce système en tant que nanopompe avec la mesure du rendement énergétique pourrait ouvrir des perspectives dans le domaine de la nanofluidique. A l'échelle nanométrique, le transport d'une espèce chimique à l'encontre de son gradient de concentration relève du défi technologique ; le ratchet de translocation se présente comme un système prometteur pour développer des systèmes nanofluidiques contrôlés.

A travers cette thèse, j'ai donc développé un système artificiel reproduisant à l'échelle de l'ADN un mécanisme de ratchet de translocation. A partir de ce système, j'ai étudié les dépendances du ratchet de translocation avec les paramètres cinétiques et géométriques du problème. J'ai alors pu établir un modèle phénoménologique du fonctionnement du ratchet de translocation expérimental.

La suite de ce manuscrit est construite de manière à suivre le cheminement que nous avons eu lors de nos expériences. Notre approche se veut didactique, en procédant d'abord à la preuve de principe du fonctionnement de notre ratchet de translocation, puis une description quantitative de ses dépendances avec les paramètres cinétiques et géométriques du problème. Les modèles que nous avons développés sont phénoménologiques et trouvent leur place dans l'approche descriptive du ratchet de translocation que nous avons suivie depuis le début.

Plus précisément, les chapitres II.1 et II.2 forment une partie entièrement consacrée aux méthodes expérimentales. Le lecteur intéressé y trouvera une description complète pour chaque technique expérimentale utilisée dans notre étude. Nous détaillerons dans le chapitre II.1 la technique expérimentale au coeur de ce projet, à savoir la microscopie à effet Zero-Mode Waveguide. Cette technique a été développée au sein de l'équipe et à notamment fait l'objet du travail de thèse de Thomas Auger, sur lequel s'est basé mon propre travail. Nous verrons dans le chapitre II.2 une seconde méthode utilisée dans cette étude pour mesurer des constantes de dissociations entre molécules : la thermophorèse à micro-échelle (Microscale Thermophoresis).

Les chapitres III.1 et III.2 rassemblent les principaux résultats tirés de notre étude. En particulier, le chapitre III.1 présente la preuve de principe du mécanisme de ratchet de translocation de notre système expérimental. Nous y présentons ensuite l'étude des dépendances du ratchet de translocation avec les paramètres cinétiques et géométriques ; pour cela, nous avons notamment introduit la notion de rendement de ratchet Y , qui reviendra dans toute la suite de notre travail. Pour finir ce chapitre, nous présentons un ratchet de translocation à effet "mauvais solvant", ne nécessitant pas d'agents de ratchet pour fonctionner. Le chapitre III.2 est consacré à la translocation de molécules d'ADN présentant des structures secondaires. Nous verrons comment ces structures modifient le fonctionnement du ratchet de translocation.

Nous présenterons finalement en annexe 2.5.4 une étude à laquelle j'ai participé, en collaboration avec le groupe de Jens-Uwe Sommer (Institute Theory of Polymers at the Leibniz Institute of Polymer Research Dresden), portant sur des nanopores greffés dont le rayon est modifié selon la composition du solvant (mélange eau-éthanol). Nous nous sommes servis de la microscopie à effet Zero-Mode Waveguide pour quantifier le changement de rayon effectif de ces nanopores. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Macromolecules*.

Deuxième partie

Méthodes

Microscopie à effet Zero-Mode Waveguide pour nanopores

La microscopie à effet Zero-Mode Waveguide a été développée initialement par Levene *et coll.*[316] pour l'observation de l'activité enzymatique de polymerases piégées dans des nanopores. Cette technique permet de réduire considérablement le volume d'illumination dans le cas d'une microscopie à fluorescence, permettant ainsi l'observation en fluorescence de molécules uniques.

Dans ce chapitre, nous détaillerons les principes de la microscopie à effet Zero-Mode Waveguide, puis sa transposition à l'observation de la translocation de molécules d'ADN ; cette technique a été largement employée pour les travaux présentés dans ce manuscrit, d'où sa présence dans cette section. Le lecteur intéressé par la microscopie à effet Zero-Mode Waveguide trouvera plus de détails dans les revues suivantes : Punj *et coll.*[317], Zhu et Craighead[318], Moran-Mirabal et Craighead[319].

1.1 Effet Zero-Mode Waveguide

1.1.1 Principes généraux de l'effet Zero-Mode Waveguide

Considérons un guide d'onde métallique (considéré comme conducteur parfait) de forme cylindrique dans lequel se propage une onde électro-magnétique. La propagation de ce champ dans le guide d'onde est régie par l'équation de Helmholtz[320] :

$$\left(\nabla^2 + \mu\epsilon\frac{\omega^2}{c^2}\right)\mathbf{E} = 0, \quad (1.1)$$

avec μ la perméabilité du milieu, ϵ sa permittivité, ω la pulsation, c la célérité de la lumière dans le vide et \mathbf{E} la composante électrique du champ. Nous ne nous intéresserons ici qu'au champ électrique, car la fluorescence est sensible au champ électrique et non au champ magnétique (plus particulièrement à son intensité) et nous développons la description de cet effet dans le but de l'utiliser pour des applications en microscopie de fluorescence.

Nous définissons alors le champ électrique \mathbf{E} comme se propageant selon la direction z avec un vecteur d'onde k_z et transverse pour les directions x et y ; de plus, elle est

périodique de pulsation ω :

$$\mathbf{E}(x, y, z, t) = \mathbf{E}(x, y)e^{\pm k_z z - i\omega t}. \quad (1.2)$$

Avec cette expression pour le champ électrique, nous pouvons ré-écrire l'équation de Helmholtz de la manière suivante :

$$\left[\nabla_t^2 + \left(\mu\epsilon \frac{\omega^2}{c^2} - k_z^2 \right) \right] \mathbf{E} = 0, \quad (1.3)$$

où ∇_t^2 est la composante transverse de l'opérateur laplacien.

Par résolution de l'équation de Helmholtz, on peut montrer que le mode principal en champ électrique transverse (TE, soit $E_z = 0$) présente une longueur de coupure λ_c en-dessous de laquelle le champ électrique est évanescent[320, 316, 321]. Pour un guide d'onde à géométrie cylindrique, cette longueur de coupure s'exprime comme $\lambda_c = 1,7d$, où d est le diamètre du guide d'onde. Lorsque la longueur d'onde λ_m du champ électrique est supérieure à λ_c , le champ électrique ne se propage pas dans le guide d'onde (d'où l'appellation *Zero-Mode Waveguide*) et l'intensité décroît exponentiellement avec la longueur de pénétration z selon la longueur caractéristique Λ :

$$\Lambda = 2\sqrt{\frac{1}{\lambda_c^2} - \frac{1}{\lambda_m^2}}. \quad (1.4)$$

On a ainsi $I(z) = |\mathbf{E}(z)|^2 \propto e^{-z/\Lambda}$.

Dans nos expériences, nous utiliserons un laser dont la longueur d'onde est de 488 nm ; en considérant un nanopore de forme circulaire dont le diamètre vaut 50 nm, on trouve une longueur d'onde de coupure de 85 nm et une longueur caractéristique de décroissance de l'intensité lumineuse d'environ 43,2 nm. Ainsi, tout matériau métallique nanoporeux, dont le diamètre des nanopores est de 50 nm, éclairé par un laser à 488 nm est opaque si son épaisseur est supérieure à 43,2 nm environ. Dans le cadre de nos expériences, nous utiliserons toujours des guides d'onde métalliques d'une épaisseur de 50 nm, les rendant ainsi opaques dans les conditions décrites ici.

On peut estimer grossièrement le volume d'illumination de l'onde évanescente dans le pore comme $\Lambda \times \pi R^2$, où R est le rayon du pore. Avec $R = 25$ nm et un laser à 488 nm, ce volume d'illumination est de l'ordre de 10-100 zL (zeptolitre, soit 10^{-21} L). De manière plus précise, le volume d'observation, c'est-à-dire le volume dans lequel un fluorophore sera excité par l'onde incidente, dépend également du rendement quantique $Q(z)$ et de l'efficacité de couplage dipolaire $p(z)$. L'efficacité de couplage dipolaire $p(z)$ rend compte de la probabilité d'absorption d'un photon incident par le fluorophore, tandis que le rendement quantique $Q(z)$ quantifie la part des émissions radiatives par le fluorophore excité par rapport à ses émissions totales (radiatives et non-radiatives). Levene *et coll.*[316] ont montré par des simulations par éléments finis que ces grandeurs varient avec la profondeur dans le guide d'onde selon une décroissance exponentielle. On définit alors la profondeur d'excitation, soit la zone effective où il est probable d'observer un signal fluorescent, comme $S(z) = I(z)p(z)Q(z)$ [316, 321]. En faisant l'approximation que l'efficacité de couplage dipolaire et le rendement quantique varient tous deux selon l'intensité lumineuse $I(z)$ [321], on peut établir que $S(z) \simeq e^{-3z/\Lambda}$. Le volume d'observation

V_{obs} s'exprime alors de la manière suivante[322, 323, 316, 321] :

$$V_{obs} = \frac{\pi d^2}{4} \frac{(\int S(z)dz)^2}{\int S^2(z)dz} \simeq \frac{\pi d^2 \Lambda}{24}, \quad (1.5)$$

ce qui donne environ 14 zL avec les valeurs numériques précédentes ; on retrouve un résultat proche de l'estimation grossière établie précédemment en considérant seulement la longueur caractéristique de décroissance de l'intensité lumineuse.

L'intérêt derrière ce volume d'observation réduit est de pouvoir observer des molécules uniques par fluorescence. En règle générale, l'observation de molécules uniques par fluorescence est limitée par la diffraction, qui ne permet pas de distinguer deux particules distantes de moins de 200 nm environ. Il faut alors travailler en régime ultra-dilué pour avoir des molécules distantes de plus de 200 nm en moyenne. Cette condition est difficile à réaliser du point de vue expérimental, en raison de l'agitation thermique il est peu probable qu'une molécule puisse être isolée à ce point en solution. De plus, le rapport signal/bruit risque d'être proche de l'unité, notamment à cause du bruit de fond causé par les émissions des molécules fluorescentes en dehors du plan focal.

Au contraire, avec l'effet Zero-Mode Waveguide, il est possible d'isoler une molécule unique dans un nanopore servant de guide d'onde et d'induire son émission fluorescente localisée grâce au volume d'observation réduit. Ainsi, il est possible de travailler avec des concentrations en soluté bien plus élevées qu'en microscopie confocale classique. Par exemple, en reprenant l'exemple précédent des nanopores de 50 nm de diamètre, la concentration maximale $C_{1,ZMW}$ pour avoir en moyenne une seule molécule dans le volume d'observation se calcule comme l'inverse du volume d'observation, soit $C_{1,ZMW} \simeq 120 \mu\text{M}$, contre $C_{1,class} \simeq 0,2 \mu\text{M}$ pour cette concentration maximale dans le cas de la microscopie confocale classique, soit 1000 fois moins concentré. $C_{1,ZMW}$ est de l'ordre des concentrations physiologiques de biomolécules ; à partir de ce constat, il est possible de réaliser des observations en molécules uniques par fluorescence de biomolécules en conditions physiologiques, comme par exemple des mesures d'activité enzymatiques (Fig.1.1). En comparaison à d'autres techniques de molécules uniques, comme l'AFM ou les pinces optiques, la microscopie à effet Zero-Mode Waveguide ne nécessite que peu de modifications des molécules ciblées (un simple marquage fluorescent) et permet d'observer la dynamique de ces molécules, ce qui fera l'objet de nos mesures concernant la translocation de molécules d'ADN à travers des nanopores.

1.1.2 Expérience de Levene *et coll.*

Pour en revenir à l'étude fondatrice de Levene *et coll.*[316], les auteurs ont utilisé l'effet Zero-Mode Waveguide pour observer par FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) l'activité de molécules d'ADN polymérasés piégées sur une surface de verre au sein de nanopores de silice recouverte par un film nanométrique d'aluminium (89 nm) (Fig.1.2A). Ces nanopores font un diamètre variable entre 43 nm et 66 nm (Fig.1.2B).

Une simulation par éléments finis basée sur les équations de Maxwell a été réalisée en considérant la géométrie du guide d'onde circulaire formant un puits creusé dans une couche nanométrique d'aluminium déposée sur un substrat de silice. Le résultat de cette simulation, présenté dans la figure Fig.1.2C, met en lumière l'effet Zero-Mode Waveguide avec une longueur de décroissance caractéristique pour l'intensité lumineuse de l'ordre de

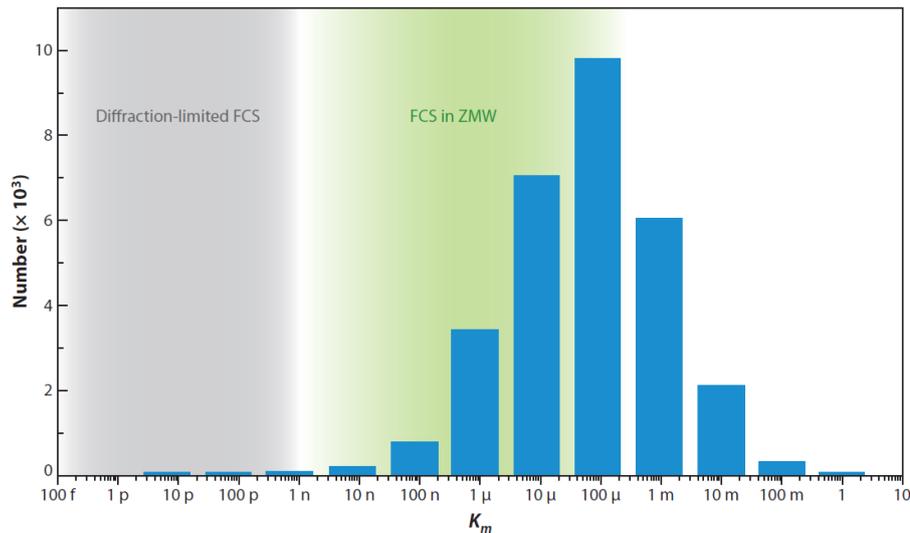


FIGURE 1.1 – Histogramme de répartition de 30 000 enzymes selon leur constante de Michaelis. On constate que la plupart de ces enzymes requièrent pour leur étude des concentrations hors d’atteinte pour des techniques classiques de FCS, rendues possibles par FCS couplée à un effet Zero-Mode Waveguide. (Extrait de [318]).

50 nm, en très bonne adéquation avec les prédictions théoriques détaillées précédemment. La profondeur d’excitation $S(z)$ est également représentée dans la figure Fig.1.2D pour différents diamètres du guide d’onde, montrant un profil exponentiel avec la profondeur dans le guide d’onde. Enfin, le volume d’observation et la concentration en soluté associée, pour lesquels on compte en moyenne une seule molécule dans le volume d’observation est présenté dans la figure Fig.1.2E, avec un volume d’observation compris entre 10 et 100 zL et des concentrations en soluté de l’ordre de 100 μ M.

A partir de leurs observations expérimentales, les auteurs ont apporté la preuve de principe du fonctionnement de la microscopie à effet Zero-Mode Waveguide, qui leur a permis d’effectuer des mesures de FCS à concentration mille fois supérieure à celles habituellement utilisées pour des mesures de FCS en microscopie à fluorescence classiques.

1.1.3 Développement

Depuis l’étude de Levene *et coll.*[316] de 2003, le développement de la microscopie à effet Zero-Mode Waveguide (qu’on abrégera en microscopie ZMW) a fait l’objet d’intenses recherches, avec deux axes principaux : l’amélioration des performances de ce type de microscopie, en réduisant le volume d’observation et en améliorant l’émission de fluorescence ; et un second axe de développement autour des applications de la microscopie ZMW.

Géométrie du guide d’onde

L’effet Zero-Mode Waveguide est un phénomène optique dépendant de la géométrie du guide d’onde. En modifiant la forme du guide d’onde ainsi que son état de surface,

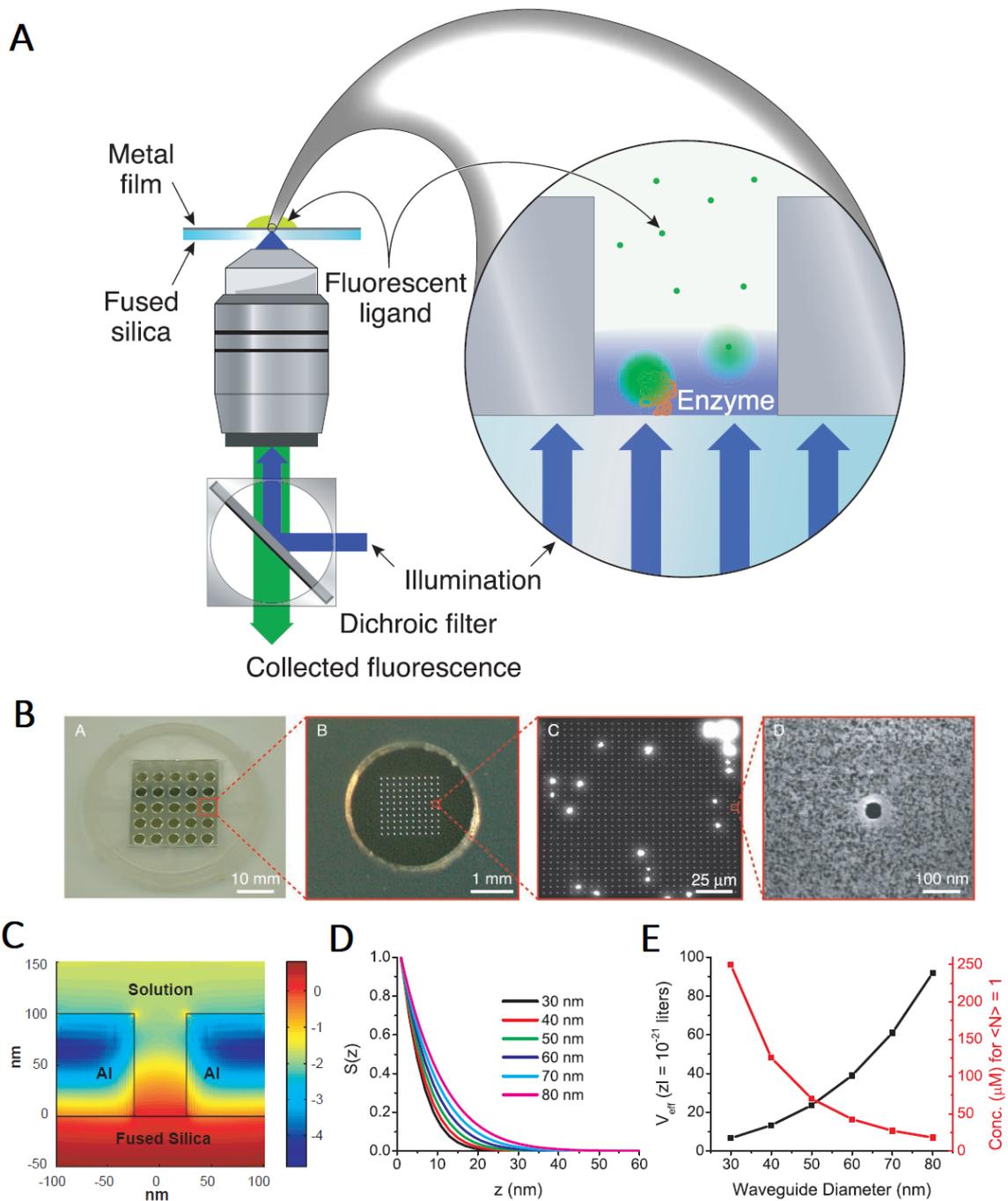


FIGURE 1.2 – Expérience de Levene *et coll.* - A) Système expérimental avec microscopie à effet Zero-Mode Waveguide. L'activité enzymatique de polymérases est observée par FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) avec le volume d'observation défini par l'effet Zero-Mode Waveguide dans des nanopores de silice. B) Puce nanofluidique en silice recouverte d'un film nanométrique d'aluminium (89 nm) comportant des nanopores de 43 nm de diamètre, observée à différentes échelles. C) Résultat de simulation par éléments finis de l'intensité lumineuse dans un nanopore de 50 nm de diamètre et 100 nm de profondeur avec mise en évidence de l'effet Zero-Mode Waveguide sur la décroissance d'intensité dans le nanopore. D) Profondeur d'excitation $S(z)$ en fonction de la position par rapport à l'entrée du pore ($z=0$), pour différents diamètres de pore. E) Volume d'observation et concentration en solution pour lesquels on compte en moyenne une seule molécule dans le volume d'observation, en fonction du diamètre du nanopore. (Extrait de [316]).

il est possible d'améliorer l'émission de fluorescence d'un fluorophore piégé dans le guide d'onde.

Par exemple, Baibakov *et coll.*[324] ont quantifié l'amélioration des performances d'un guide d'onde par effet ZMW en modifiant la forme du guide d'onde, à savoir passer d'une forme circulaire à une forme rectangulaire. L'idée derrière ce changement est d'optimiser les dimensions du guide d'onde pour maximiser l'amélioration de fluorescence induite par le Zero-mode Waveguide. En effet la création d'un plasmon de surface dans la couche métallique vient renforcer le champ électrique à l'intérieur du nanopore[325, 326]. De plus, le guide d'onde se comporte comme une antenne pour le champ électrique, ce qui contribue au renforcement opéré par le plasmon de surface[327]. Ces deux effets combinés permettent d'expliquer le renforcement de l'émission de fluorescence par un fluorophore confiné dans le pore, allant de 6.5 fois[328] à près de 120 fois[329, 330] pour des guides d'onde circulaires gravés sur leur surface métallique par des anneaux concentriques permettant de focaliser le plasmon de surface à l'intérieur du pore (Fig.1.3C-F). En modifiant la géométrie du guide d'onde, il est même possible d'atteindre des facteurs d'amplification de l'ordre de 1 100, comme cela a été réalisé expérimentalement par Punj *et coll.*[331] grâce à un dimère d'antennes en or inséré à l'intérieur d'une cavité nanométrique rectangulaire (Fig.1.3A-B).

On observe également un effet de quenching du pore dans le cas où le fluorophore est proche des parois, il y a alors un transfert non-radiatif d'énergie entre le fluorophore excité et la couche métallique, conduisant à une réduction globale de l'émission de fluorescence du dispositif. La longueur en-dessous de laquelle le quenching devient significatif est estimé à environ 110 nm en lumière visible, contre 60-70 nm pour les UV[324, 332, 333, 334].

A partir des considérations précédentes, Baibakov *et coll.*[324] ont développé des guides d'onde en aluminium de forme rectangulaire de 100 nm de longueur pour 30 nm de largeur (Fig.1.4A). L'onde incidente dispose d'une polarisation TE avec le champ électrique orienté selon la largeur du guide d'onde. La longueur est choisie de telle sorte que le quenching du fluorophore par les parois est réduit au maximum, maximisant l'amplification du champ dans le nanopore (Fig.1.4B). De même, la largeur du guide d'onde maximise la focalisation du plasmon de surface généré par l'onde incidente. Cette géométrie permet d'amplifier l'émission de photons par fluorescence de près de 50% par rapport à une géométrie circulaire tout en réduisant de près de 4 fois la durée de vie de la fluorescence émise (Fig.1.4C). Ces propriétés se révèlent essentielles dans le cas d'une microscopie de fluorescence avec pour objet d'étude la dynamique d'objets biologiques complexes.

Nature de la couche métallique

La nature du métal utilisé pour la couche conductrice à l'origine de l'onde évanescente de l'effet Zero-Mode Waveguide fait également l'objet de nombreuses recherches pour augmenter les performances de cette technique. En particulier, les métaux utilisés sont le plus souvent l'or et l'aluminium, plus rarement le palladium[335].

Le choix de l'or vient de sa bande de résonance de plasmon de surface autour de 520 nm[336, 337], ce qui en fait un candidat idéal pour favoriser l'amplification de la fluorescence en effet Zero-Mode Waveguide. De plus, l'or est neutre du point de vue chimique et il est bio-compatibilité, qui sont des propriétés essentielles pour des applications en biologie. L'aluminium est également un candidat de choix, en raison de sa grande disponibilité et de sa résonance de plasmon de surface comprise entre 400 nm et 500 nm

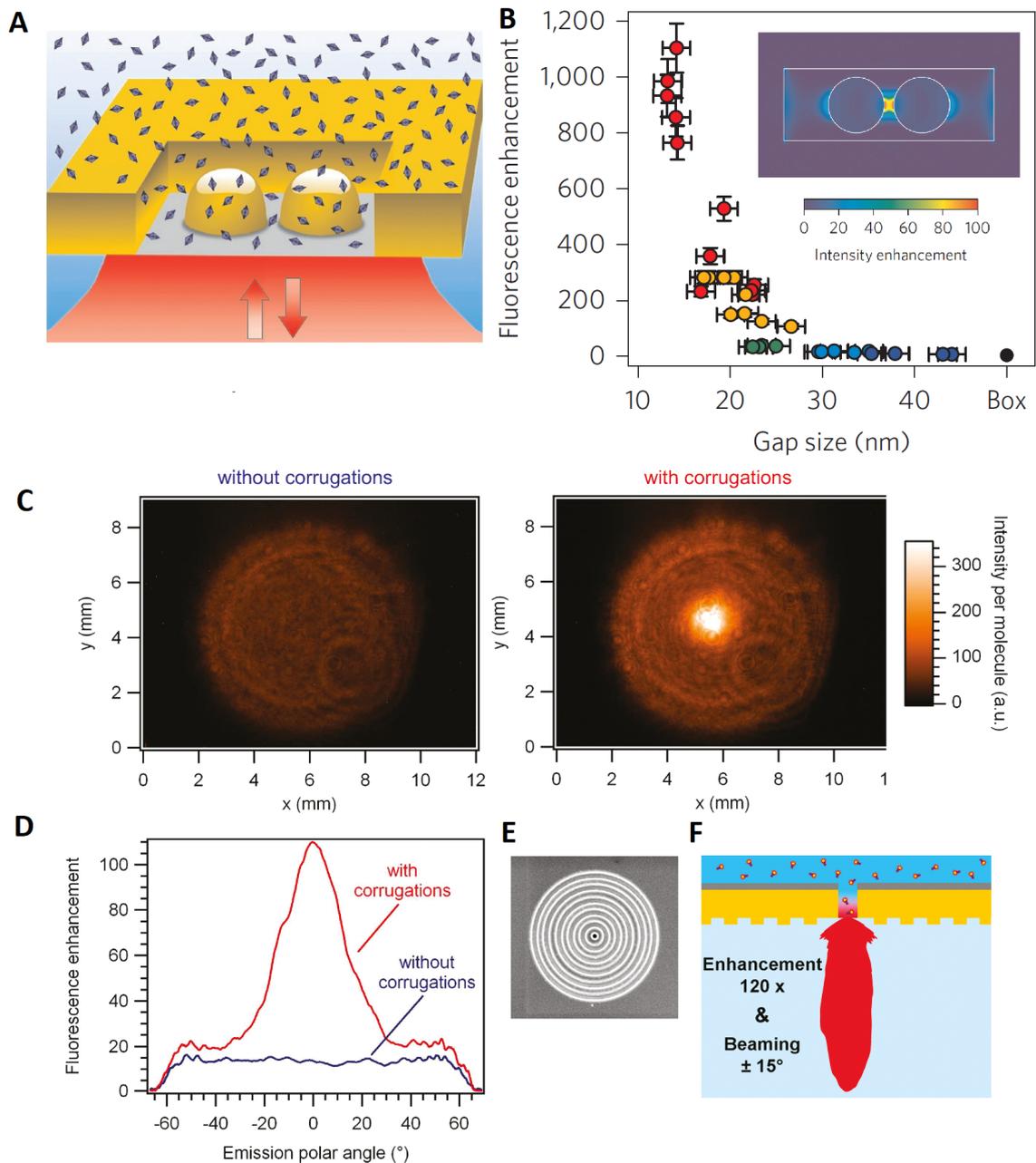


FIGURE 1.3 – Exemples d’amplification de la fluorescence par modification du guide d’onde - A-B) Expérience de Punj *et coll.*; C-F) Expérience de Aouani *et coll.* A) Guide d’onde de Punj *et coll.* B) Facteur d’amplification de la fluorescence en fonction de la distance entre les deux antennes; (insert) simulation du facteur d’amplification. C) Images en microscopie à fluorescence de l’émission de fluorescence selon la gravure ou non du guide d’onde. D) Facteur d’amplification de la fluorescence en fonction de l’angle d’émission. E) Image SEM de la surface gravée du guide d’onde. F) Schéma d’émission de la fluorescence dans un guide d’onde gravé. (A-B extraits de [331] et C-F extraits de [329]).

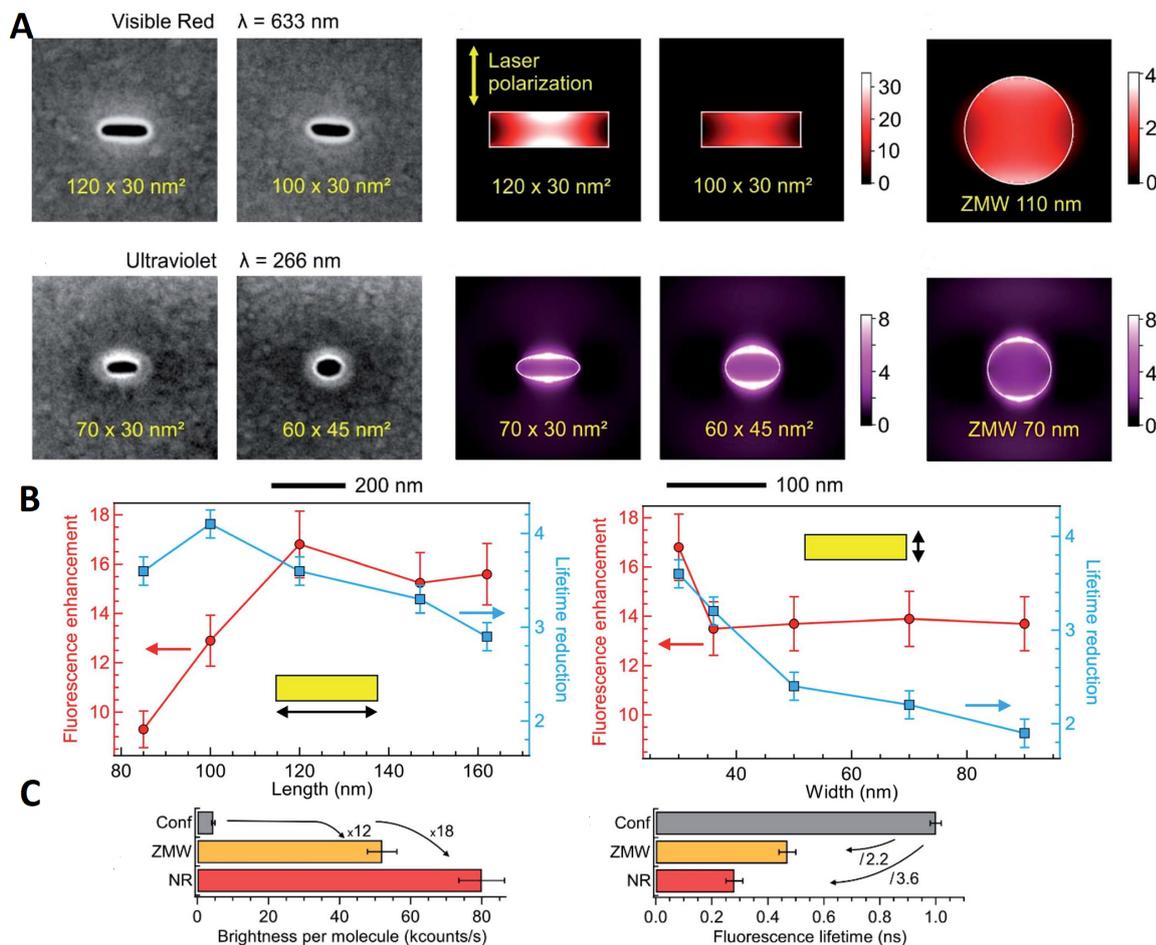


FIGURE 1.4 – Expérience de Baibakov *et coll.* - A) Images SEM des guides d’ondes et visualisation de l’intensité du champ électrique par simulation. B) Amplification d’intensité et durée de vie de la fluorescence émise en fonction de la longueur et largeur du guide d’onde rectangulaire. C) Comparaison de la fluorescence émise et de sa durée de vie selon la méthode utilisée : (Conf) microscopie confocale ; (ZMW) Zero-Mode Waveguide avec guide d’onde circulaire ; (NR) Zero-Mode Waveguide avec guide d’onde rectangulaire. (Extrait de [324]).

(selon la taille de la couche métallique)[338].

Plus récemment, des études ont comparé les efficacités relatives de l'or et de l'aluminium pour l'effet Zero-Mode Waveguide. De Torres *et coll.*[339] ont quantifié l'efficacité du transfert d'énergie entre un donneur et un receveur dans le cadre de la microscopie FRET (*Förster resonance energy transfer*) avec effet Zero-Mode Waveguide. Les auteurs ont observé qu'un guide d'onde en aluminium présente un facteur d'amplification de fluorescence supérieur à celui d'un guide d'onde de même dimension en or dans le spectre vert (facteur 3 pour l'aluminium contre 2,5 pour l'or avec un guide d'onde de 190 nm) (Fig.1.5). Cette observation a été également décrite dans l'étude de Martin *et coll.*[340], où les auteurs décrivent un facteur d'amplification de 2,5 pour l'aluminium contre 1,4 pour l'or. En revanche, l'étude montre que l'aluminium n'amplifie pas la fluorescence dans le spectre rouge, alors que l'or dispose d'un facteur d'amplification de 2.

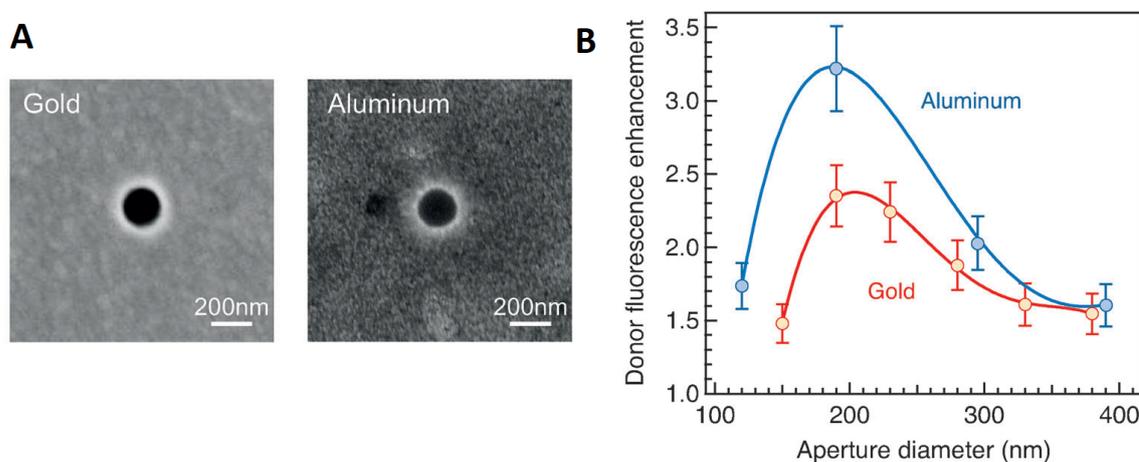


FIGURE 1.5 – Expérience de de Torres *et coll.* - A) Images SEM des guides d'onde de diamètre 190 nm en or (gauche) et aluminium (droite). B) Facteur d'amplification de fluorescence selon le diamètre du nanopore pour l'or et l'aluminium. (Extrait de [339]).

1.1.4 Applications

Au-delà des recherches menées pour améliorer toujours plus les performances en terme d'amplification de l'effet Zero-Mode Waveguide, ses applications sont nombreuses. Samiee *et coll.*[321] ont utilisé la microscopie ZMW pour étudier le processus d'oligomérisation de la protéine répresseur du bactériophage λ , qui régule la production du matériel viral dans les cellules infectées[341]. Grâce à leurs observations les auteurs ont mesuré une enthalpie libre de réaction de $12 k_B T$ pour cette réaction, validant ainsi la technique pour des mesures thermodynamiques en conditions physiologiques. Sameshima *et coll.*[342] ont quantifié par microscopie ZMW l'association des protéines GroEL et GroES, des chaperonines procaryotes homologues des protéines Hsp60 et Hsp10 chez les eucaryotes[343]. Ces molécules s'associent pour former une structure en forme de ballon de football et nécessitent pour cela une concentration de l'ordre du micromolaire; avec cette condition, la microscopie ZMW se présentait comme un outil de choix pour réaliser des mesures de

molécules uniques à concentrations physiologiques. Edell *et coll.*[344] ont employé la microscopie ZMW pour l'observation de la dynamique de lipides, leur permettant de mesurer des coefficients de diffusion de l'ordre de $100 \mu^2/s$. Les études de Uemura *et coll.*[345] et Vilfan *et coll.*[346] ont quant à elles utilisé de la microscopie ZMW pour l'observation de la dynamique de d'association d'ARNt et du ribosome lors de la traduction à l'échelle de la molécule unique et pour quantifier l'activité d'une rétrotranscriptase (enzyme permettant de synthétiser un fragment d'ADN à partir d'une molécule d'ARN, notamment utilisée par les rétro-virus). Nous citerons également l'étude de Eid *et coll.*[347, 348] établissant les bases de la technique de séquençage SMRT (*Single Molecule, Real Time* : pour cela, les auteurs piègent une ADN polymérase dans une cavité de Zero-Mode Waveguide et suivent son activité tout au long de la réplication d'une molécule d'ADN. Chaque nucléotide en solution est lié à un fluorophore selon le type de base (soit 4 types de fluorophore au total). Lorsque qu'un nucléotide est ajouté au brin d'ADN naissant, il perd son fluorophore. Ainsi, en suivant la fluorescence émise dans la cavité au cours du temps, il est possible de déterminer la séquence des bases du brin d'ADN répliqué (Fig.1.6). Cette technique est aujourd'hui exploitée par la société PacBio[349].

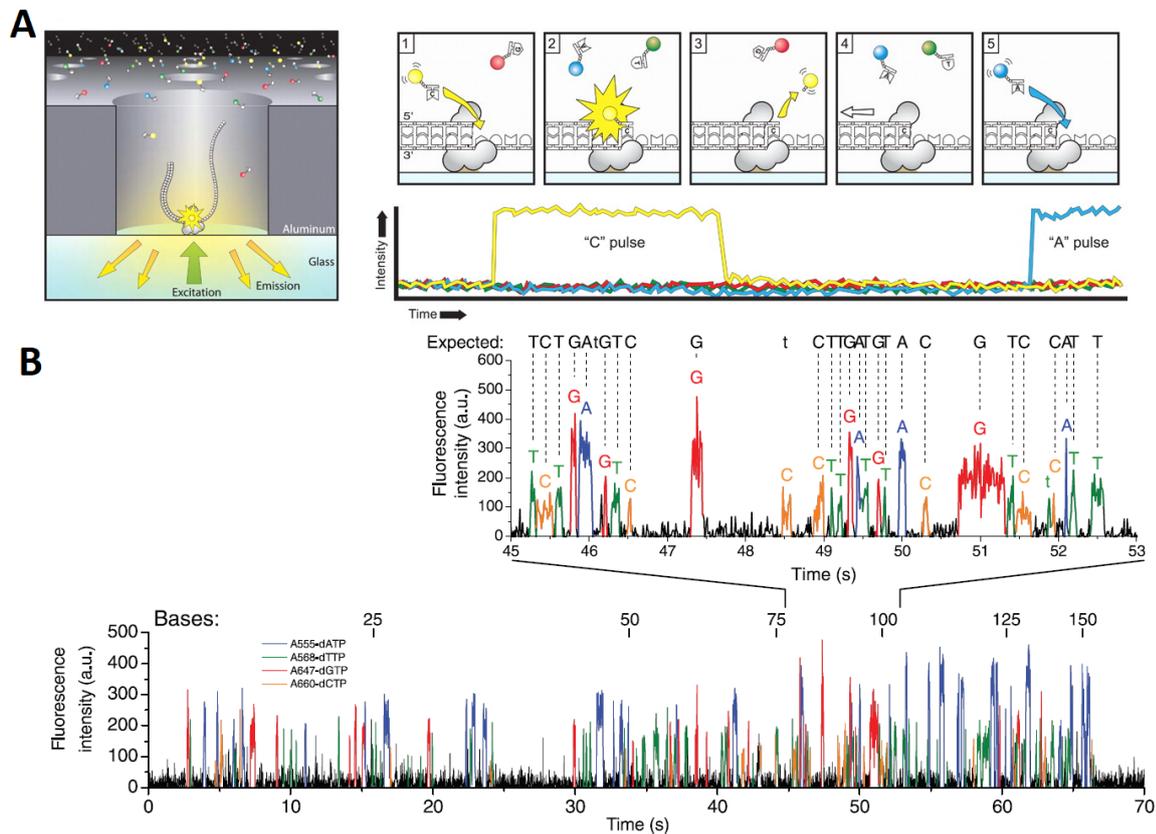


FIGURE 1.6 – Technique de séquençage SMRT : A) Principe de la technique. B) Exemple de séquençage d'un fragment d'ADN par SMRT, où la fluorescence des quatre types de fluorophores est suivie au cours du temps. (Extrait de [347]).

D'autres études par Larkin *et coll.*[350, 351] et Jadhav *et coll.*[352] ont montré la possibilité de coupler la microscopie ZMW avec des puits poreux permettant une capture

améliorée de molécules d'ADN à l'intérieur des nanopores grâce à l'application d'un champ électrique à travers le pore. Les auteurs ont notamment montré que cette technique permet d'augmenter le taux de remplissage du pore de près d'un facteur 100.

Nous citerons ici une dernière application de la microscopie ZMW, qui nous intéressera tout particulièrement pour la suite de ce manuscrit car il s'agit de la technique employée dans notre travail. Il s'agit de la microscopie Zero-Mode Waveguide pour la translocation de polymères développée par Auger *et coll.*[299]. Le détail technique de ce dispositif sera décrit dans la section suivante. Les auteurs ont employé l'effet Zero-Mode Waveguide pour observer en temps réel la translocation de molécules d'ADN λ à travers des nanopores de diamètres variables entre 50 nm et 200 nm, à l'aide d'un forçage hydrodynamique (Fig.1.7A). Grâce à leur dispositif expérimental, les auteurs ont mesuré la relation entre la fréquence de translocation des molécules d'ADN et la pression hydrodynamique imposée, retrouvant les prédictions théoriques du modèle de succion, en particulier l'indépendance du flux critique J_c avec la taille du nanopore et la longueur du polymère (Fig.1.7B). Les auteurs ont également mis en évidence la réduction du rayon effectif de nanopores possédant des molécules de PEG thiol greffées sur ses parois à travers l'élévation de la pression critique induite par le greffage (Fig.1.7C). Cette mesure leur a permis de retrouver la hauteur de la brosse de polymères greffés, technique réutilisée dans l'étude de Yong *et coll.*[353] à laquelle j'ai collaboré pour mesurer l'effondrement d'une brosse de polymères greffés dans un nanopore par ajout d'éthanol en co-solvant avec l'eau (Fig.1.8A). La présence d'éthanol en solution avec l'eau provoque l'effondrement du polymère PNiPAAm, maximale pour une fraction volumique de l'ordre de 5%, qui revient ensuite à son extension initiale pour des fractions volumiques supérieures. Il s'agit d'un effet de co-solvant provoqué par la présence de deux bons solvants pour le PNiPAAm. En greffant ces polymères dans des nanopores, il est possible d'observer l'effondrement de la brosse de polymère par la mesure de la pression critique associée à la translocation de molécules d'ADN λ à travers ces pores greffés (Fig.1.8B). La pression critique étant reliée au rayon du nanopore selon une loi d'échelle avec exposant -4, il est possible d'en déduire une estimation de la hauteur de la brosse de polymères (Fig.1.8C). Cette étude a donné lieu à une publication en avril 2021 dans le journal *Macromolecules*. Le lecteur intéressé trouvera l'article intégral en annexe 2.5.4.

La méthode de microscopie ZMW pour la translocation de polymère a été reprise par la suite dans l'étude de Klughammer et Dekker[335] pour l'observation de la translocation de molécules d'ADN et de protéines BSA à travers des nanopores en palladium sous forçage électrostatique pour l'ADN et diffusion simple pour la BSA.

1.2 Mise en place expérimentale d'un ratchet de translocation artificiel

Dans cette section, nous décrirons le montage expérimental que nous avons utilisé pour réaliser notre ratchet de translocation expérimental. Nous détaillerons ensuite le processus d'acquisition des données et leur traitement.

Pour construire un ratchet de translocation, il est essentiel de disposer de trois éléments clés : le nanopore, le substrat pour la translocation et l'agent de ratchet.

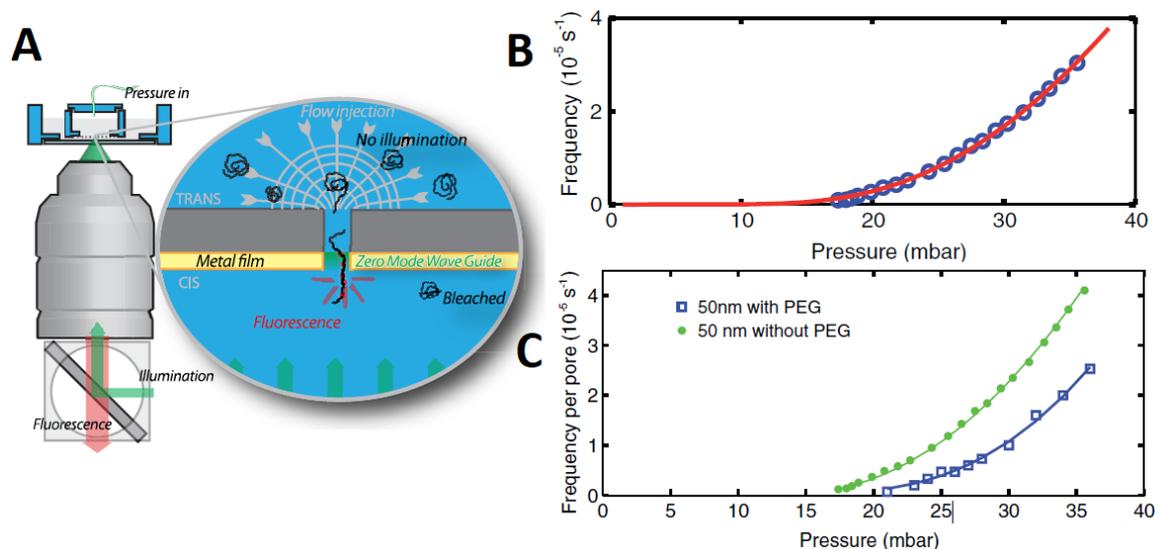


FIGURE 1.7 – Microscopie ZMW pour la translocation de polymères - Expérience de Auget *et coll.* : A) Dispositif expérimental de la microscopie ZMW pour la translocation de molécules d'ADN. B) Fréquence de translocation en fonction de la pression hydrodynamique imposée pour une molécule d'ADN λ dans un nanopore de 50 nm de diamètre. C) fréquence de translocation en fonction de la pression hydrodynamique imposée pour des molécules d'ADN λ dans des nanopores de 50 nm de diamètre avec ou sans greffage de PEG thiol. (Extraits de [299]).

1.2.1 Membranes track-etched et métallisation

La première partie nécessaire pour constituer notre ratchet de translocation nanométrique est le nanopore, mimant le fonctionnement d'un translocon pour la translocation des molécules d'ADN. Le choix du matériau nanoporeux doit être compatible avec la microscopie ZMW de manière à pouvoir observer la translocation des molécules d'ADN à travers les nanopores, tout en constituant une barrière physique pour les polycations situés du côté trans de la membrane (en aval de la translocation). Pour répondre à ces contraintes, nous avons choisi d'utiliser des membranes track-etched métallisées sur une de leurs faces avec une couche nanométrique d'or. Les sections suivantes détaillent le fonctionnement de ces membranes et leur intérêt pour notre étude.

Membranes track-etched

Les membranes track-etched sont des membranes de polymère (polycarbonate, polyester, PET, polyimide, PVDF ou polypropylène)[354, 355, 356, 357, 358], d'une épaisseur micrométrique et recouvertes de nanopores à des densités élevées pouvant aller jusqu'à 10^8 pores/cm². Le diamètre de ces nanopores s'étend de 10 nm à plus de 10 μm , couvrant ainsi une gamme sur près de 3 ordres de grandeurs.

Les membranes track-etched sont fabriquées à partir de films de polymères exposés à un bombardement d'ions lourds au sein d'un accélérateur de particules (Fig.1.9A-B). Ces ions lourds, le plus souvent des noyaux d'atomes d'or, de plomb ou d'uranium, sont accélérés à des énergies de l'ordre de 1-10 MeV/u. Lorsqu'ils traversent le film de polymères,

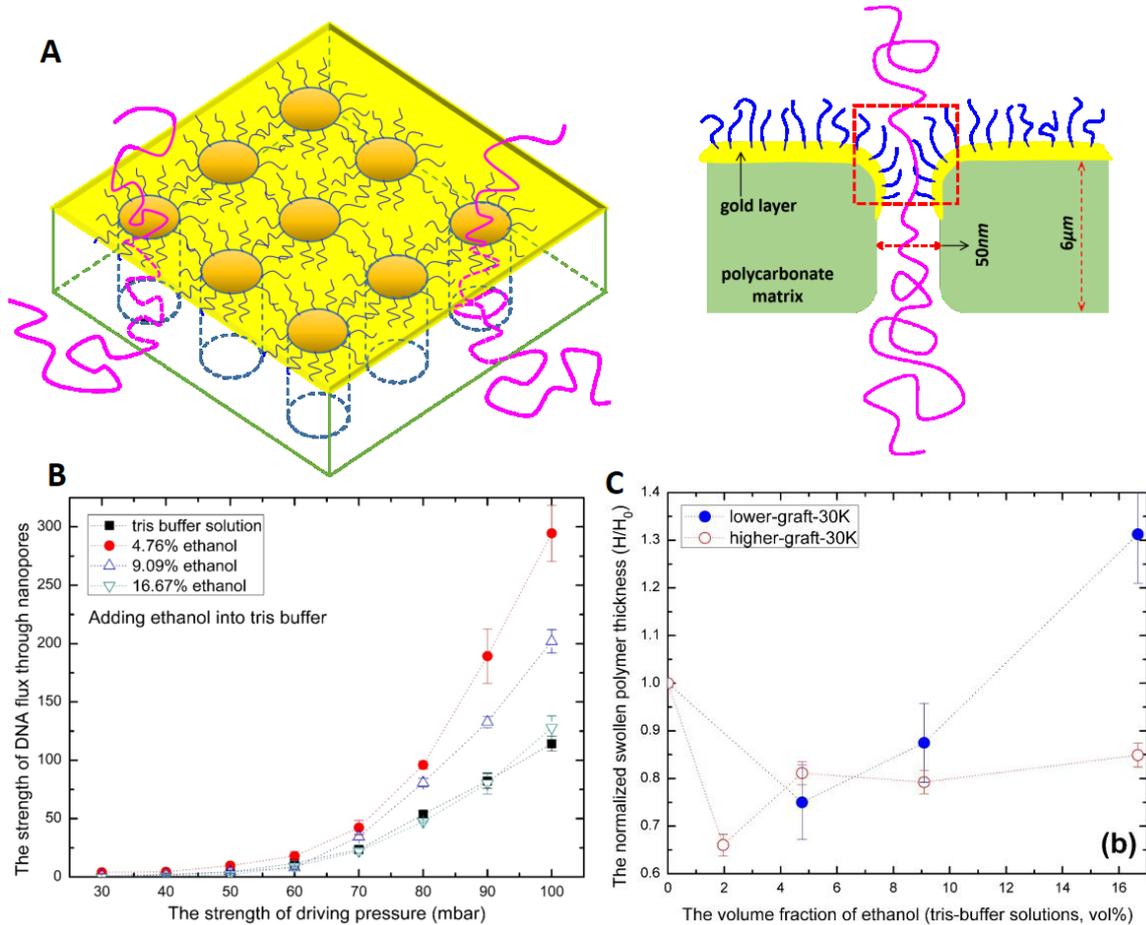


FIGURE 1.8 – Effondrement d'une brosse de polymères par effet de co-solvant - Expérience de Yong *et coll.* : A) Dispositif expérimental. B) Fréquence de translocation (en u.a.) en fonction de la pression imposée pour des molécules d'ADN λ avec des nanopores de 50 nm greffés au PNIPAAm et un co-solvant eau/éthanol à différentes fractions volumiques. C) Épaisseur relative de la brosse de polymères greffés en fonction de la fraction du solvant en éthanol. (Extraits de [353]).

ces ions perdent de l'énergie via différents processus dont l'excitation et l'ionisation du nuage électronique des atomes cibles ou des projectiles générés par l'impact dans le matériau, des échanges électroniques entre l'ion lourd et les atomes du matériau, des collisions élastiques ou des radiations électromagnétiques[359]. Ces pertes suivent la trajectoire de l'ion dans le matériau, menant à des géométries cylindriques d'ionisation dans le matériau, qu'on appelle des traces. Dans un matériau polymère, l'ionisation des atomes le constituant conduit à une rupture des liaisons covalentes, des créations de liaisons saturées ou une structure locale amorphe pour les matériaux polycristallins[360, 361]. Pour obtenir une trace homogène sur toute l'épaisseur du matériau, les pertes d'énergie de l'ion lourd doivent excéder 5 keV/nm[362]; en-dessous de cette valeur, la trace n'est pas homogène, ce qui peut conduire à une inhomogénéité dans le nanopore issu de cette trace.

Une fois la trace créée, le nanopore est produit par application d'un agent corrosif sur le matériau (Fig.1.9A-B). Plus précisément, l'agent corrosif (selon le matériau à traiter : soude, hypochlorite de sodium, potasse caustique...) dispose d'une vitesse de gravure plus élevée pour les atomes ionisés de la trace que pour le reste du matériau. Par conséquent, la trace sera gravée plus rapidement que le reste du matériau, menant ainsi à la gravure d'un nanopore. Ce nanopore peut être cylindrique si la vitesse de gravure est beaucoup plus élevée que celle du matériau non-irradié, sinon il est de forme conique. L'angle d'ouverture de ce cône est défini par le rapport de ces deux vitesses[363] (Fig.1.9C). Le diamètre du nanopore est mesuré au cours de la réaction par mesure conductimétrique (Fig.1.9D). Une différence de potentiel est appliquée de part et d'autre du matériau; le nanopore se comporte alors comme une résistance dont l'impédance est fonction de son rayon, infinie lorsque le nanopore n'est pas complètement gravé (c'est-à-dire que les deux faces de la gravure ne se sont pas encore rejointes), finie lorsque le nanopore n'est plus bouché. La relation entre la résistance électrique R_{el} du nanopore et sa géométrie est donnée par la relation suivante :

$$R_{el} = \frac{1}{K} \int_0^L \frac{1}{A(x)} dx, \quad (1.6)$$

où K est la conductivité de la solution, $A(x)$ la section du pore pour la coordonnée x et L l'épaisseur du matériau. Pour un pore cylindrique de rayon r , on a la relation $R_{el} = L/(K\pi r^2)$. Le suivi du courant électrique à travers le pore permet donc d'estimer le rayon du nanopore gravé (Fig.1.9E).

Dans le cas des membranes track-etched, le matériau est bombardé avec des milliards d'ions lourds, donc les nanopores sont gravés en parallèle par l'action de l'agent corrosif. La mesure du courant électrique est donc une valeur moyenne du courant dans tous les nanopores, d'où la variabilité observée pour le rayon des nanopores, estimée à -20% - 0% pour les membranes que nous avons utilisées dans notre étude (Whatman Nucleopore).

Un autre facteur important pour ces membranes est la densité en nanopores. En effet, cette densité est issue de la valeur du flux d'ions lourds lors du bombardement initial. Cependant, la superposition de traces est à proscrire pour éviter une détérioration des nanopores lors de la gravure. Pour les membranes de notre étude, les densités en nanopores sont comprises entre 3.10^8 et 6.10^8 nanopores/cm².

Pour réaliser nos expériences de translocation, nous avons choisi d'utiliser les membranes track-etched de la marque Whatman Nucleopore. Ces membranes sont en polycarbonate, qui dispose d'une faible affinité pour les molécules d'ADN[367, 368]; il s'agit d'un critère essentiel pour la réalisation d'une expérience de translocation de molécules

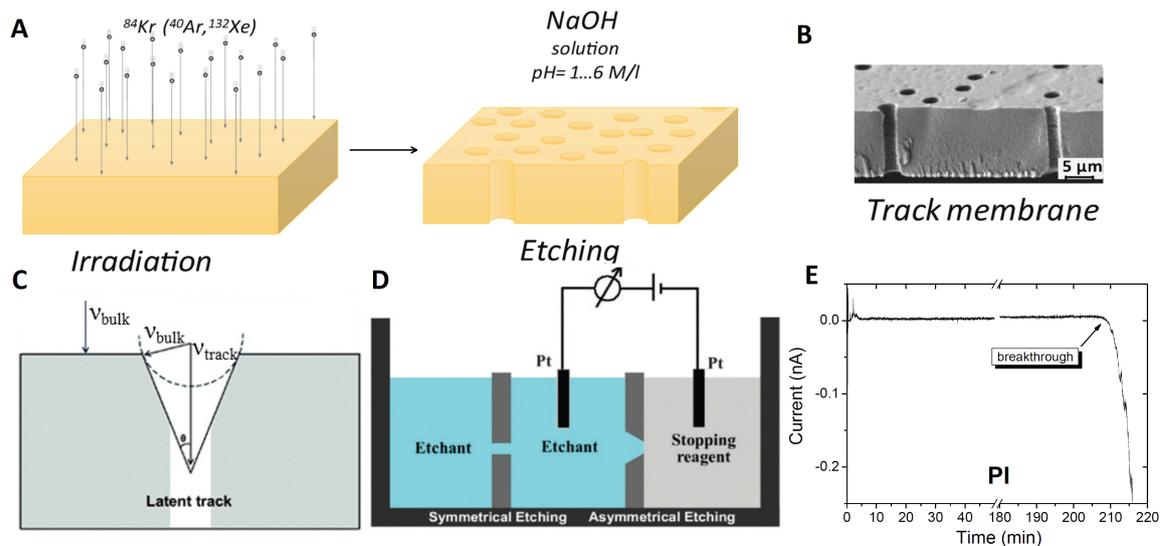


FIGURE 1.9 – Méthode de fabrication d'une membrane track-etched - A) Bombardement d'une membrane en polymères par des ions lourds à haute énergie, puis gravure chimique des traces d'atomes ionisés du matériau par un agent corrosif. B) Image SEM de la tranche d'une membrane track-etched. C) Schéma de l'angle d'ouverture du cône de gravure en fonction des vitesses de corrosion de l'agent chimique pour la trace et pour le matériau non-ionisé. D) Dispositif de gravure et mesure simultanée du courant ionique pour en déduire le rayon du pore; (gauche) gravure d'un nanopore cylindrique, avec agent corrosif des deux côtés de la membrane; (droite) gravure d'un nanopore conique, avec agent corrosif d'un seul côté de la membrane. E) Mesure du courant ionique à travers un nanopore en cours de gravure en fonction du temps; la chute brutale du courant ionique correspond à l'événement d'ouverture du nanopore. (A-B extraits de [364], C-D extraits de [365] et E extrait de [366]).

d'ADN, car nous souhaitons limiter au maximum les interactions entre le polymère et les parois des nanopores, qui pourraient parasiter l'expérience. De plus, la surface des membranes est traitée au PVP (polyvinylpyrrolidone), connu pour ses propriétés hydrophiles et biocompatibles[369, 370].

Les caractéristiques principales de ces membranes sont résumées dans le tableau 1.1 :

Rayon des pores (nm) (-20%,+0%)	25	40	50	100
Densité de pores (pores/cm ²) ($\pm 15\%$)	$6 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
Épaisseur de la membrane (μm) ($\pm 10\%$)	6	6	6	10

TABLE 1.1 – Caractéristiques principales des membranes track-etched utilisées dans notre étude (d'après fabricant).

Métallisation des membranes track-etched

Pour détecter la translocation des molécules d'ADN à travers les nanopores de la membrane track-etched, nous avons déposé sur une face des membranes un film métallique de taille nanométrique dans le but de générer un effet Zero-Mode Waveguide dans les nanopores. Nous avons choisi d'employer de l'or en raison de sa biocompatibilité et sa neutralité chimique.

Pour induire un effet Zero-Mode Waveguide et empêcher l'onde incidente d'atteindre le côté opposé de la membrane, il suffit que l'épaisseur de la couche métallique soit supérieure à 43 nm (pour des nanopores de 50 nm de diamètre), comme montré précédemment dans la section 1.1.1. Il n'est pas nécessaire d'avoir une couche métallique beaucoup plus épaisse que cela, car l'onde incidente est complètement atténuée au-delà de 43 nm et qu'une plus grosse épaisseur risquerait de boucher, au moins partiellement les nanopores, réduisant ainsi leur rayon, ce qui perturberait l'interprétation des résultats qui en découleraient.

La méthode la plus adaptée pour produire cette couche métallique est l'évaporation d'atomes d'or au sein d'un évaporateur dédié à cette fonction (Fig.1.10). Pour cela, un creuset contenant de l'or est chauffé par un faisceau d'électrons accélérés à une tension de plusieurs kV. Lorsque le creuset atteint la température d'ébullition de l'or, des atomes d'or sont évaporés au sein de l'enceinte de l'évaporateur en direction des membranes track-etched, préalablement fixées sur un support faisant face au creuset au moyen d'anneaux les maintenant à plat. L'évaporation s'effectue à une pression de l'ordre de 10^{-6} Pa, de manière à limiter le risque de pollution de la couche métallique par des particules en suspension dans l'air et pour diminuer le point d'ébullition du métal à évaporer. Les atomes d'or se condensent alors sur les membranes et s'organisent en une couche nanométrique grossissant à une vitesse de 0,1 nm/s. L'épaisseur de la couche est mesurée au moyen d'une microbalance à quartz et l'évaporation est stoppée lorsque la couche atteint une épaisseur de 50 nm (par déploiement d'un cache).

Cette méthode a été précédemment employée avec succès par T. Auger *et coll.*[299], c'est pourquoi nous l'avons reprise pour notre étude.

L'évaporateur que nous avons utilisé est un modèle EVA 300 Alliance Concept, se trouvant dans la salle blanche de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) et les dépôts ont été effectués en collaboration avec Nicolas Terrier (assistant ingénieur à l'INL).

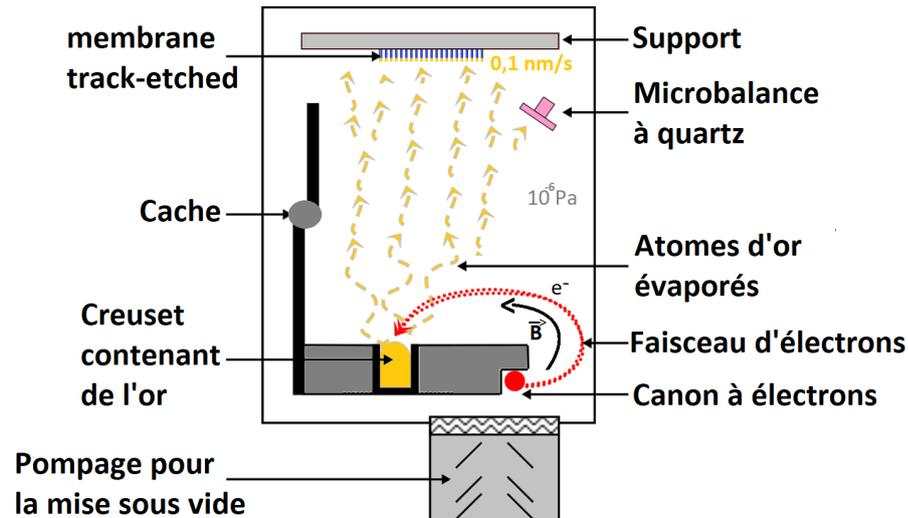


FIGURE 1.10 – Schéma simplifié du fonctionnement d'un évaporateur. (Adapté de [371]).

Une fois les membranes track-etched métallisées, nous les stockons dans un dessiccateur jusqu'à leur utilisation.

1.2.2 Molécules d'ADN

Le choix du substrat pour la translocation est un point essentiel pour la réussite du mécanisme de ratchet de translocation. Le choix des molécules d'ADN est motivé par sa robustesse, sa facilité de production, le contrôle de sa longueur au monomère près et sa charge négative. De plus, les propriétés mécaniques de la molécule d'ADN constituent un vaste champ de recherche depuis sa découverte au siècle dernier. Aussi il s'agit d'une molécule bien connue, même si sa structure en fait une molécule complexe. En tant que double hélice, l'ADN peut se trouver sous forme simple ou double brin ; lorsque qu'elle est simple brin, la molécule peut adopter spontanément des conformations présentant des appariements de bases sur la même chaîne, créant ainsi des structures rigides en forme d'épines appelées structures secondaires ou hairpin.

Ainsi, nous disposons de deux paramètres pour le choix des molécules d'ADN à utiliser : la longueur de la séquence et sa nature simple ou double brin. La liste ci-dessous récapitule l'ensemble des molécules d'ADN que nous avons utilisées :

- ADN λ (ThermoFisher ScientificTM) : ADN linéaire double brin (48 502 bp) issu du bactériophage lambda (infectieux pour la bactérie *Escherichia coli*, inoffensif pour l'humain). L'ADN λ dispose d'extrémités 5' simples brins complémentaires sur une longueur de 12 bp, ce qui lui permet une cyclisation spontanée.
- ADN λ /HindIII (New England Biolabs) : ADN λ digéré par l'enzyme de restriction HindIII en 8 fragments de tailles comprises entre 125 bp et 23 130 bp. La moyenne pondérée des fragments est de 14 300 bp ; c'est cette valeur que l'on considère dans cette étude lorsque l'ADN λ /HindIII est utilisé.
- ADN T4 GT7 (NIPPON GENE) : ADN linéaire double brin (166 kbp) issu du bactériophage T4 GT7. Il s'agit de l'ADN de plus haut poids moléculaire utilisé dans cette étude.

- ADN Φ X174 RF II (New England Biolabs) : ADN linéaire double brin (5 386 bp).
- ADN pNEB206A (New England Biolabs) : ADN linéaire double brin (2 706 bp).
- ADN pCLIP_f-H2B (New England Biolabs) : ADN circulaire double brin (6 249 bp).
- ADN pKLAC2 (New England Biolabs) : ADN circulaire double brin (9 107 bp).
- échelle d'ADN (New England Biolabs) : ADN linéaires double brins (100 bp jusqu'à 1 517 bp - moyenne à 710 bp).

Dans notre étude, nous considérerons la longueur de contour pour les molécules d'ADN. Pour les molécules linéaires, la longueur de contour correspond simplement au nombre de monomères multiplié par leur taille; en revanche, pour les molécules circulaires, cette longueur est à diviser par deux, pour rendre compte de la conformation linéaire. La longueur de contour peut être vue comme la longueur maximale que peut occuper la molécule. Ce choix est justifié par le processus de translocation à l'étude ici; le régime de confinement étant celui de de Gennes, les contraintes topologiques induites par la conformation circulaire de la molécule d'ADN n'ont que peu d'influence sur la formation des blobs, c'est pourquoi nous pouvons les inclure dans l'étude au même titre que les molécules linéaires[372, 373, 374].

Concernant le solvant, nous avons employé un solvant TE classique pour les manipulations d'ADN : ce solvant TE (Tris-EDTA) contient du tris à 10 mM, de l'EDTA à 1 mM et du sel KCl dissout à 10 mM, le tout à un pH physiologique de 7,6 à 25°C. Le tris est le nom abrégé du 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol; il s'agit d'un tampon classiquement utilisé en biochimie pour des manipulations d'acides nucléiques (ADN ou ARN) à des pH physiologiques; son pKa vaut 8,3 à 20°C[375]. L'EDTA ou éthylènediaminététraacétique est un acide utilisé en biochimie pour séquestrer les cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+} ...) pouvant perturber la conformation des molécules d'ADN (en créant des liaisons intramoléculaires par exemple) ou catalysant l'activité de nucléases (des enzymes digérant les acides nucléiques)[376]. Enfin, les sels KCl sont utilisés pour diminuer la répulsion des bases d'ADN entre elles et constituer un bon solvant pour l'ADN.

Pour observer la translocation des molécules d'ADN, nous les marquons en fluorescence à l'aide d'un intercalant, le YOYO-1. Le YOYO-1 est un intercalant de l'ADN de la famille des cyanines. Le YOYO-1 dispose d'un très faible rendement quantique lorsqu'il est libre en solution, mais il augmente de trois ordres de grandeur lorsque la molécule s'intercale dans la double hélice de l'ADN[377, 378, 379]. Sa longueur d'onde d'adsorption est à 491 nm pour une émission à 509 nm. L'ajout de YOYO-1 dans la double hélice de l'ADN ne modifie pas sa longueur de persistance; en revanche, la longueur de contour de l'ADN augmente d'environ 38% dans le cas où la chaîne est saturée en YOYO-1 (soit un intercalant pour 4 bases d'ADN), ce qui donne une longueur d'environ 0,47 nm pour une base en moyenne[380, 381, 382]. La constante de dissociation de l'équilibre entre le YOYO-1 et l'ADN a été mesurée entre 700 pM et 12 nM, soit une enthalpie libre de réaction d'environ 18-21 $k_B T$ [380, 381].

Nous avons utilisé du YOYO-1 provenant de Molecular Probes, vendu en solution de 200 μ L à 1 mM dans du DMSO. Afin d'obtenir une émission de fluorescence la plus forte possible, nous avons saturé les molécules d'ADN en YOYO-1; au maximum, il est possible d'intercaler une molécule de YOYO-1 pour 4 bases d'ADN, soit un taux de couverture maximal de 25%[382].

Dans toute notre étude, nous donnerons les concentrations des espèces polymériques

en nombre de charges (négatives pour l'ADN, positives pour les polycations). Ce choix est justifié par la nature du mécanisme d'intérêt pour l'étude, à savoir le ratchet de translocation. On considère qu'une charge négative interagit avec une seule charge positive. Avec cette définition, la longueur des polymères n'est pas considérée, seule la densité de charge du milieu est prise en compte. Il s'agit d'une approximation de champ moyen, que l'on justifie par le fait que le mécanisme de ratchet est un mécanisme local (à la sortie des nanopores) et que ce mécanisme reste inchangé si deux sites d'adsorption consécutifs sur l'ADN sont liés à deux polymères distincts au lieu d'un seul.

En revanche, la définition de la concentration en charges négative de l'ADN est plus complexe. En effet, le mécanisme de ratchet de translocation étant un mécanisme local, son effet ne doit pas dépendre de la concentration en ADN en amont du nanopore car les polycations n'ont accès qu'à l'ADN situé du côté trans de la membrane. Pour cette raison, nous considérerons que la concentration en charges négatives pour l'ADN pertinente pour notre étude correspond à la densité de charges négatives au sein d'une pelote d'ADN formée à la sortie du nanopore. Nous considérons la conformation de cette pelote comme celle à l'équilibre, en supposant que sa conformation hors-équilibre est proche de celle à l'équilibre, soit une sphère dont le rayon est donnée par le modèle Worm Like Chain comme $R_g \simeq \sqrt{L_K L_c}$, où $L_K = 100$ nm et $L_c = N \times a$, avec N le nombre de bases d'ADN et a leur longueur. Dans le cas de l'ADN λ , on compte 48 502 bp, soit 96 980 charges négatives (deux charges négatives par base, venant des groupements phosphates du squelette carboné; et en prenant en compte les bases simple brin situées aux extrémités), que nous arrondissons à 97 000 pour des raisons de commodités. A partir de ces considérations, nous pouvons estimer une densité de charges négatives d'environ 10 μ M pour l'ADN à la sortie des nanopores (en prenant en compte l'élongation de la longueur de contour due aux molécules de YOYO-1 intercalées dans le double hélice). Dans toute la suite de cette étude, c'est cette valeur que nous considérerons pour la concentration de l'ADN à la sortie des nanopores (Fig.1.12).

1.2.3 Polycations

Pour assurer le mécanisme de ratchet de translocation, nous utilisons des polycations à la sortie des nanopores (côté trans de la membrane). Les polycations choisis pour cette étude sont les suivants (Fig.1.11) :

- Polyéthylèneimine (PEI) : M.n. 60,000 g/mol (ACROS Organics™).
- Poly-L-lysine (PLL) : M.w. 150,000-300,000 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Poly-L-ornithine (PLO) : M.w. 147,000 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Poly-L-arginine (PLR) : M.w. 146,000 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Spermidine (SPD) : 145,25 g/mol (Sigma-Aldrich).

Comme dit précédemment, nous ferons l'hypothèse d'une concentration en charges positives homogène dans la solution côté trans de la membrane. Cette hypothèse est valide lorsque la concentration en polycations est telle qu'on compte, en moyenne, plus d'une charge négative dans le volume occupé par la pelote d'ADN, ce qui donne environ 100 pM. Lors de nos expériences, nous utilisons généralement des concentrations de polycations en charges positives de l'ordre du micromolaire, ce qui nous place bien au-dessus de cette concentration critique. Avec ces concentrations, nous avons statistiquement au moins une

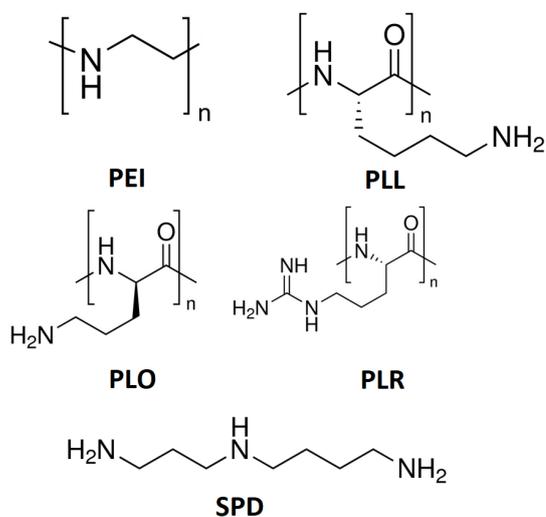


FIGURE 1.11 – Polycations utilisés dans notre étude : (PEI) polyéthylèneimine ; (PLL) poly-L-lysine ; (PLO) poly-L-ornithine ; (PLR) poly-L-arginine ; (SPD) spermidine.

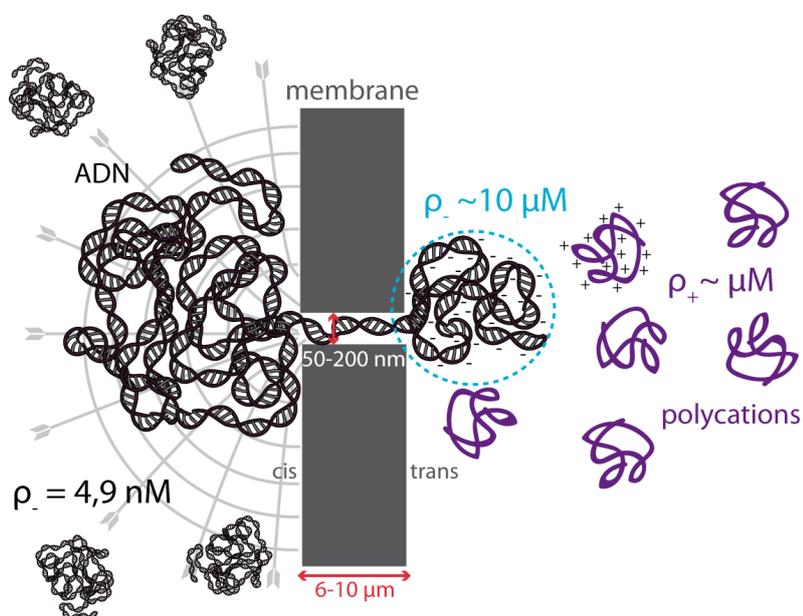


FIGURE 1.12 – Tailles et concentrations caractéristiques de notre dispositif expérimental.

charge positive des polycations (via leurs groupements amines protonés) en relation avec une charge négative de l'ADN. De plus, ce ratio vaut lorsque l'ADN a terminé sa translocation et que toutes ses charges négatives sont situées du côté trans de la membrane ; il y a donc nettement plus de charges positives que de charges négatives durant la translocation. Ainsi, nous pourrions nous placer dans l'hypothèse d'une disponibilité immédiate des agents de ratchet pour le substrat en translocation, ce qui favorise le mécanisme de ratchet de translocation (Fig.1.12).

1.2.4 Fabrication des bouchons pour la translocation

Pour réaliser les expériences de translocation de molécules d'ADN, nous lavons d'abord les membranes métallisées dans une solution de HCl à 0,1 M pendant une heure ; cette étape a pour but d'éliminer les impuretés qui auraient pu polluer les nanopores durant leur stockage. Au bout d'une heure, la membrane est rincée à l'eau millipore, puis elle est séchée sur tissus absorbant avant d'être découpée en pastilles de 3 mm de diamètre. Ces pastilles sont alors collées sur des bouchons Nanion percés en leur centre par un trou de 2 mm de diamètre. Les bouchons Nanion sont des bouchons en plastique à visser dotés d'une face en verre pré-percée d'un trou de 0.1 mm. C'est ce trou que nous agrandissons à 2 mm pour nos expériences. Ces bouchons ont des avantages pour des applications en microscopie : il est facile de les coupler à des systèmes microfluidiques en raison de leur pas de vissage et leur surface de verre permet une observation en microscopie du volume interne au bouchon sans introduction d'aberrations optiques.

Pour coller les pastilles de membranes sur les bouchons, nous utilisons une colle silicone *Silcomet JS 533 Rouge Loctite*, bio-compatible et ne relarguant pas d'espèces chimiques en solution. Nous veillons spécialement à coller la pastille de manière plate, en évitant de la faire gondoler, ce qui poserait des soucis de mise au point lors de l'observation au microscope.

Les bouchons sont ensuite stockés dans un dessiccateur au moins une nuit pour laisser la colle durcir. Ils peuvent être conservés de cette façon sur une durée de plusieurs mois sans subir d'altération de la membrane.

1.2.5 Montage expérimental pour la microscopie ZMW

Pour réaliser l'observation de la translocation des molécules d'ADN à travers les nanopores, nous avons utilisé un microscope à épifluorescence (Zeiss Axiovert 200) avec un objectif à eau x63 Zeiss (modèle C-Apochromat" 63x/1,20 W Korr M27) doté d'une correction chromatique essentielle pour des applications en microscopie à fluorescence. Le choix de ce grossissement permet d'obtenir un champ d'observation sur la membrane nanoporeuse de $125 \times 125 \mu m^2$ (mesuré au moyen d'une règle micrométrique Thorlabs modèle R1L3S2P) ; pour une densité de nanopores entre $3 \cdot 10^8$ et $6 \cdot 10^8$ nanopores par cm^2 (suivant les tailles de nanopores utilisées), on peut estimer une observation simultanée de 50 000 à 100 000 nanopores en parallèle au sein du champ d'observation avec notre équipement. Cette statistique élevée permet une grande sensibilité sur la mesure de fréquence de translocation moyenne des molécules d'ADN à travers les nanopores, qui constituent des événements rares ; cette mesure nécessite un traitement statistique, dans notre cas un grand nombre de nanopores en parallèle, qui se présenterait très coûteux en terme de

durée si l'expérience était réalisée sur un nanopore unique (en moyenne, la fréquence de translocation est d'environ 10^{-4} s^{-1} , d'après nos mesures).

Le bouchon est rempli de $100 \mu\text{M}$ d'une solution d'ADN marqué au YOYO-1 à la concentration de travail désirée, puis il est déposé face à l'objectif dans une chambre formée d'un anneau de téflon sur lequel est collé une lamelle circulaire de verre de $0,17 \text{ mm}$ d'épaisseur, qu'on appellera chambre inférieure et servant comme réservoir côté trans de la membrane; cette chambre inférieure est elle-même déposée sur la platine du microscope, contrôlée par une interface Micromanager, elle sert à faire le contact optique entre l'objectif et l'échantillon (Fig.1.14). Le bouchon est connecté à la sortie d'un contrôleur de pression MFCS-Flex de la marque Fluigent, disposant de 4 sorties de pression dont trois allant de 0 à 1 bar (1 mbar de précision) et une de 0 à 69 mbar (0,1 mbar de précision). Ce contrôleur de pression permet d'imposer une pression en entrée des nanopores, la sortie étant libre (Fig.1.13). Le choix de contrôler la pression à la place du flux à travers les nanopores est nécessaire pour conserver un écoulement constant malgré le bouchage accidentel de nanopores durant la translocation (suite à un collage d'une espèce en solution à l'intérieur du nanopore).

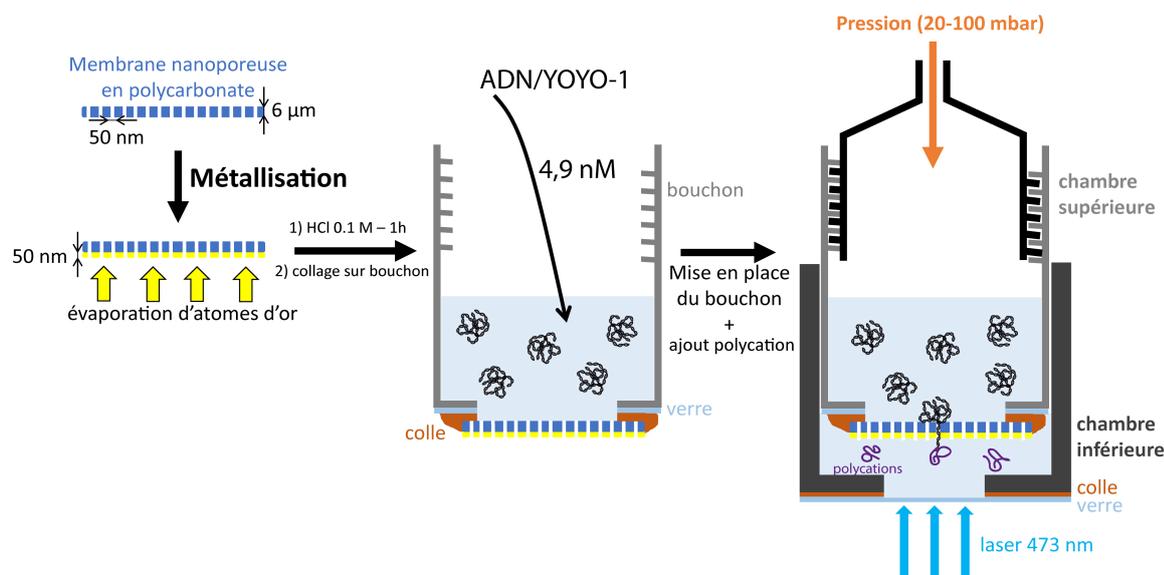


FIGURE 1.13 – Méthode de préparation des échantillons et des bouchons.

Pour la fluorescence, nous avons utilisé deux sources lumineuses distinctes, pour deux usages différents :

- une lampe de fluorescence à 488 nm (modèle Uvico Optoelectronics GmbH), couplée au microscope par fibre optique. Cette lampe de fluorescence permet une visualisation de la rugosité de la membrane par simple réflexion, ce qui facilite la mise au point de l'objectif sur la surface de la membrane et, ainsi, la détection des molécules d'ADN en sortie de nanopores. Cette lampe n'est cependant pas utilisée pour la visualisation des molécules d'ADN en raison du bruit lumineux qu'elle génère par réflexion sur la surface métallique.
- un laser continu à 473 nm (modèle Cobolt Blues 50) couplé au microscope par une série de lentilles et miroirs assurant le parallélisme du faisceau et son élargissement ;

ce laser est utilisé pour la visualisation des molécules d'ADN en sortie des nanopores après mise au point de l'objectif grâce à la lampe de fluorescence. Il dispose d'une puissance de 0,05 W, ce qui en fait un laser adapté pour des applications en microscopie de fluorescence sur des biomolécules.

L'acquisition s'effectue au moyen d'une caméra EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) modèle Ixon+ de la marque Andor. Cette caméra dispose d'une résolution de 512x512 pixels (32 bits) et une fréquence maximale de rafraîchissement de 60 Hz. Afin d'assurer la stabilité de l'image, la caméra est refroidie à -60°C lors des acquisitions.

Ce dispositif expérimental, précédemment développé au sein de l'équipe, nous a servi de base pour étudier notre ratchet de translocation nanométrique. Pour cela, nous avons ajouté à la sortie des nanopores (côté trans) des polycations agissant comme des agents de ratchet (Fig.1.14). Ce dispositif est permis car le forçage employé pour la translocation est un forçage hydrodynamique, donc indépendant de la charge des espèces en translocation. Dans la plupart des études expérimentales sur la translocation de molécules d'ADN, le forçage est électrostatique, avec le pôle positif du côté trans de la membrane (donnant ainsi le sens de translocation pour les molécules d'ADN). Or, dans notre dispositif, on trouve des polycations côté trans ; si nous appliquons un champ électrique comme forçage, les polycations migreraient vers le côté cis de la membrane, rendant caduque le mécanisme de ratchet de translocation. Pour cette raison, il est essentiel de procéder sous forçage hydrodynamique.

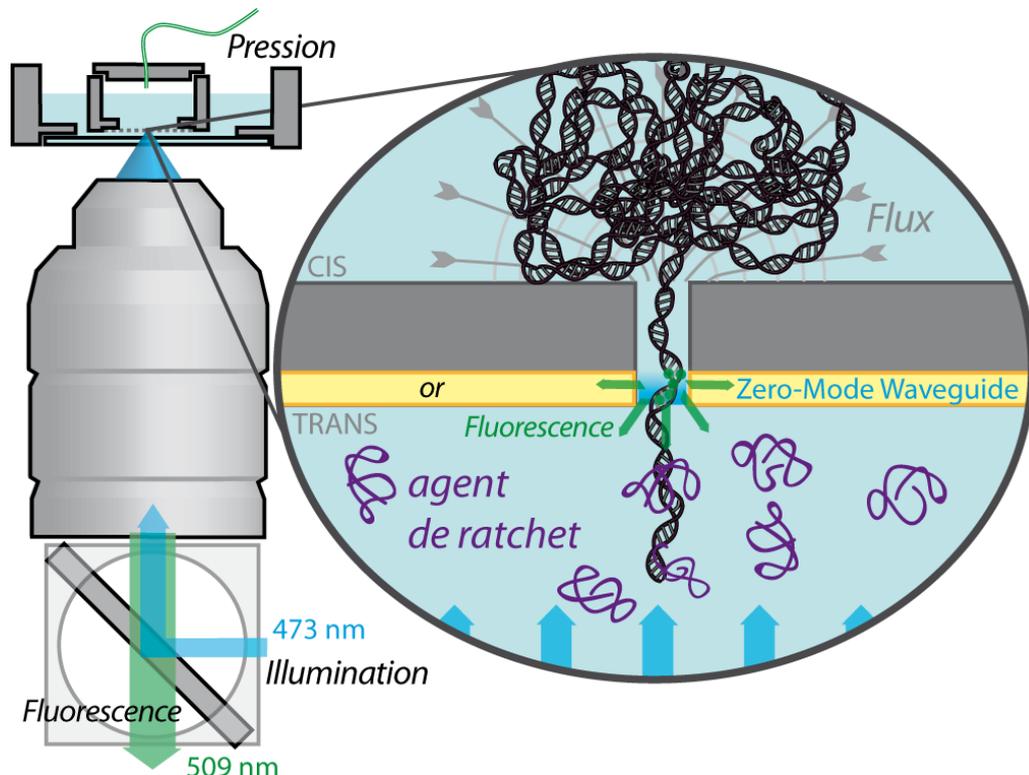


FIGURE 1.14 – Schéma du dispositif expérimental pour le ratchet de translocation observé par microscopie Zero-Mode Waveguide. (Adapté de [299]).

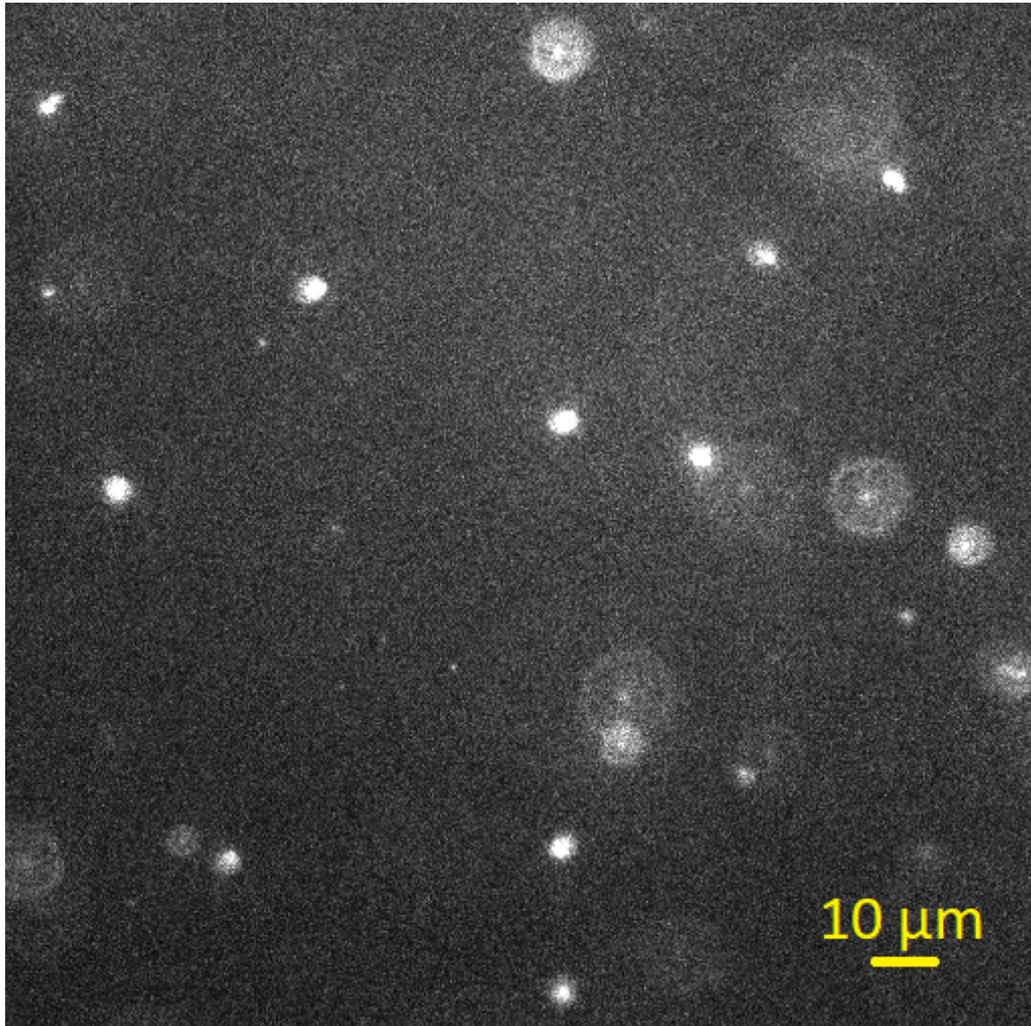


FIGURE 1.15 – Image typique de microscopie à effet Zero-Mode Waveguide pour des nanopores de 50 nm. Les points lumineux visibles correspondent à des molécules d'ADN λ marquées au YOYO-1 en cours de translocation. Le fond de l'image a d'abord été corrigé selon la méthode décrite dans la section 1.2.6.

1.2.6 Analyse des données

Notre dispositif expérimental nous permet de réaliser des vidéos de la translocation des molécules d'ADN à travers les nanopores, en visualisant les flashes lumineux émis par les molécules d'ADN marquées en fluorescence par le YOYO-1 lorsqu'elles traversent la zone d'illumination dans la couche d'or (Fig.1.16)¹. Ces flashes ont une durée moyenne allant de quelques centaines de millisecondes à quelques secondes, selon la pression hydrodynamique appliquée.

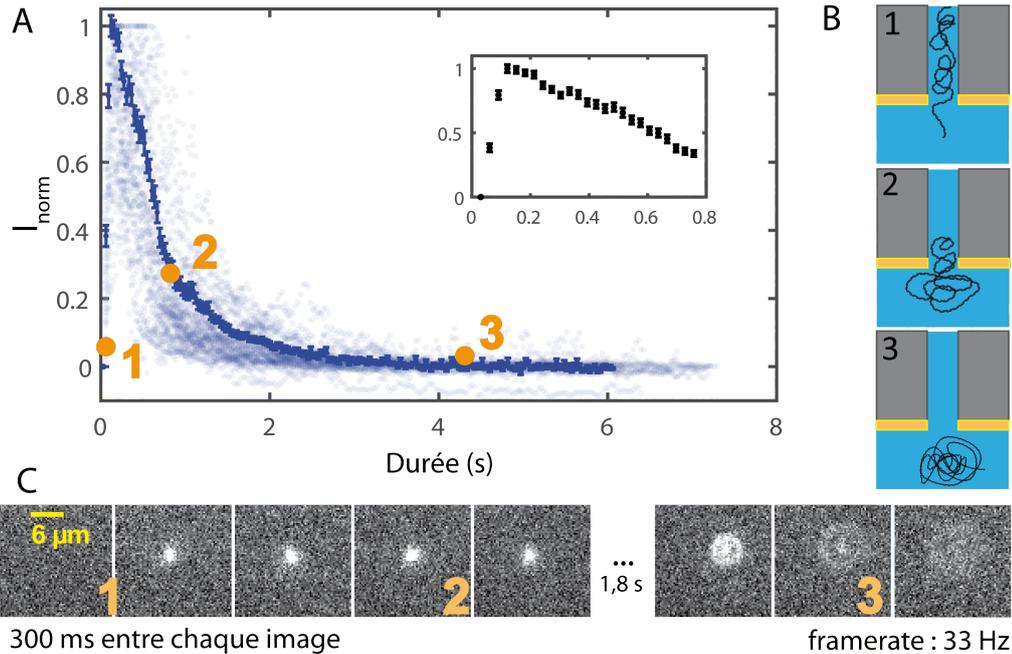


FIGURE 1.16 – A) Profil moyen d'intensité normalisée des flashes lumineux au cours du temps. (insert) Détail de la courbe au niveau du maximum d'intensité. B) Schéma des principales étapes de la translocation. C) Evolution temporelle d'un flash lumineux au cours du temps par microscopie ZMW. Les chiffres correspondent aux étapes décrites en B.

Traitement des images

Le traitement des données débute avec un traitement d'images des vidéos réalisées avec l'aide du logiciel ImageJ. Pour faciliter la détection des flashes lumineux, nous soustrayons tout d'abord le fond de l'image à chaque frame de la vidéo. Le fond de l'image est obtenu en calculant la moyenne $\langle I(x, y) \rangle$ de l'intensité pour chaque pixel (x,y) au cours du temps. On obtient l'image sans le fond en retranchant à chaque pixel (x,y,t) sa valeur

1. J'invite le lecteur intéressé à aller voir un exemple de vidéo de translocation d'ADN λ disponible sur Youtube à l'adresse suivante : <https://www.youtube.com/watch?v=t08mv4eWZ4E>. Pour les lecteurs les plus motivés, je vous invite à compter le nombre de flashes lumineux et à le poster en commentaire de la vidéo!

$I(x,y)$ correspondante, soit :

$$I(x, y, t) \leftarrow I(x, y, t) - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I(x, y, i), \quad (1.7)$$

où N représente le nombre de frames de la vidéo, généralement 250.

Cette étape permet de supprimer le bruit de fond de la vidéo, provenant par exemple du collage sur la membrane d'une molécule d'ADN fluorescente ou les défauts de la membrane, mais également d'égaliser les inhomogénéités spatiales de fluorescence dues à une légère non-planéité de la membrane par rapport à l'objectif. Cette non-planéité peut provenir d'un défaut lors du collage de la membrane sur le bouchon ou de la pression exercée par le contrôleur de pression sur la membrane, qui courbe la membrane.

Après la soustraction du bruit de fond, le contraste de la vidéo est ajusté grâce à la commande *Adjust Contrast* d'imageJ.

Comptage des événements de translocation

Une fois ce traitement d'image réalisé, le nombre de flashes lumineux est compté à la main pour chaque vidéo et constitue l'observable principale de notre étude². Le choix d'un comptage manuel du nombre de flashes lumineux repose sur la complexité des événements à détecter. En effet, l'évènement à mesurer est un objet dynamique à la fois dans l'espace et dans le temps : l'espace car la molécule d'ADN est soumise à des fluctuations lorsqu'elle s'éloigne du pore et le temps car sa fluorescence est activée lorsqu'elle traverse la zone d'illumination de l'effet Zero-Mode Waveguide et est rapidement photo-blanchie (quelques secondes en moyenne) par l'intensité lumineuse du laser côté trans de la membrane. L'oeil humain est très efficace pour déceler des variations, même subtiles, dans son environnement et peut suivre la trajectoire d'un point lumineux dans l'espace et le temps même si celle-ci fluctue en intensité ; l'oeil interprète les variations successives comme des fluctuations d'un même objet. Pour un programme d'analyse, cette détection est nettement plus pathologique, car l'objet de détection est mal-défini, que ce soit son intensité, des déplacements ou sa durée. Il est donc difficile de lui spécifier des critères précis pour réaliser cette détection, car le programme ne disposera d'aucune flexibilité dans sa détection lui permettant de gérer les cas limites (flash peu intense, doublons, flash apparaissant dans le sillage d'un flash précédent...), ce que l'oeil humain fait naturellement. Pour ces raisons et malgré l'évident labeur que représente un tel traitement, l'analyse des vidéos à la main a été privilégiée pour notre étude.

Analyse des résultats

Enfin, pour l'analyse des résultats de comptage, nous avons utilisé Matlab à cette fin, en développant nos propres scripts d'analyse et en se servant des outils intégrés tels que l'outil Curve Fitting Tool.

2. Au total, cela représente environ 4,5 millions de flashes lumineux comptés à la main depuis le début de ma thèse... ("Vous voyez ce que ça fait déjà un million, Larmina?")

Microscale Thermophoresis

2.1 Généralités sur la thermophorèse

Considérons un soluté à une concentration C dans un solvant à une température T_0 à l'équilibre. On applique localement un chauffage (au moyen d'un laser IR par exemple) de manière à chauffer un volume du solvant à une température $T_0 + \Delta T$. Sous l'effet du gradient de température généré par ce chauffage local, la concentration du soluté s'organise spatialement en réponse à cette perturbation selon la loi de Fick :

$$\mathbf{J} = -D\nabla C - D_T C \nabla T, \quad (2.1)$$

où \mathbf{J} est le courant de particule du soluté, D son coefficient de diffusion, D_T son coefficient de diffusion thermique et T la température.

A l'état stationnaire, le courant de particule \mathbf{J} s'annule. On peut alors exprimer la concentration dans la zone chauffée C_T par rapport à la concentration C_0 loin de cette zone, à la température d'équilibre T_0 , de la manière suivante :

$$C_T = C_0 e^{-S_T \Delta T}, \quad (2.2)$$

où $S_T = D_T/D$ est appelé coefficient de Soret (de dimension inverse à celle d'une température).

On constate que le signe du coefficient de Soret définit le sens du transport de soluté en réponse au gradient de température :

- Si $S_T > 0$, alors le soluté est transporté hors de la zone chauffée.
- Si $S_T < 0$, alors le soluté est transporté vers la zone chauffée.

Il est généralement admis que la thermophorèse est un processus hors-équilibre local, en raison du forçage thermique à l'origine de cet effet. Cependant, il a été montré qu'on peut considérer un état de quasi-équilibre thermodynamique pour les concentrations en soluté lorsque le gradient de température est inférieur à $(S_T a)^{-1}$, où a est le rayon hydrodynamique de la particule de soluté [383, 384]. Le raisonnement qui suit est tiré de l'étude de S. Duhr and D. Braun [384], où les auteurs dérivent une expression analytique pour le coefficient de Soret en fonction de la température et des paramètres physico-chimiques de la particule de soluté (charge surfacique, taille, longueur de Debye, solvation...).

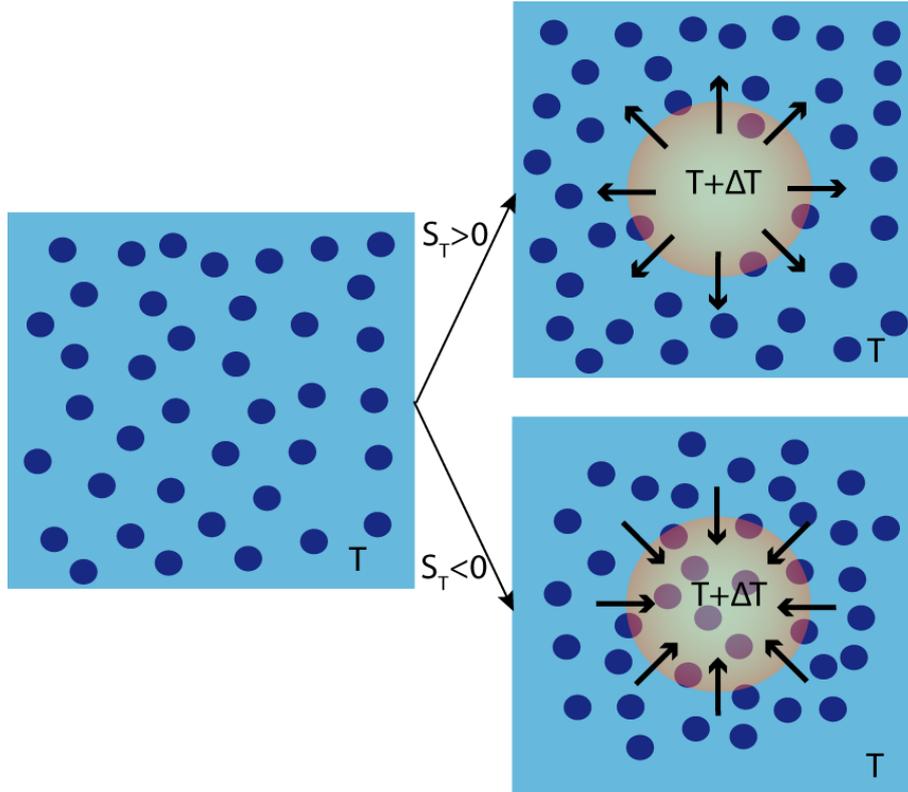


FIGURE 2.1 – Principe de la thermophorèse.

Dans cette approche, on peut considérer que le rapport des concentrations C_T/C_0 s'exprime d'après le facteur de Boltzmann $\exp(-\Delta G/k_B T)$, où ΔG est l'enthalpie libre de la transformation. A partir de cette relation, on dérive l'expression suivante entre une variation infinitésimale de concentration δC et sa variation d'enthalpie libre associée δG :

$$\frac{\delta C}{C} = -\frac{\delta G}{k_B T}. \quad (2.3)$$

En reprenant l'équation (2.2), on établit une relation semblable entre la concentration C et le coefficient de Soret :

$$\frac{\delta C}{C} = -S_T \delta T. \quad (2.4)$$

On peut alors exprimer le coefficient de Soret en fonction de l'enthalpie libre tel que :

$$S_T = \frac{1}{k_B T} \frac{\partial G}{\partial T}. \quad (2.5)$$

Pour une particule seule et en considérant la transformation comme étant isobare, on peut exprimer le coefficient de Soret comme linéairement relié à l'entropie S de la particule dans son solvant :

$$S_T = -\frac{S}{k_B T}. \quad (2.6)$$

Ainsi, dans le cadre d'une approximation de quasi-équilibre thermodynamique (soit un gradient de température modéré), la mesure du coefficient de Soret est une mesure directe

de l'entropie de la particule dans son solvant. Nous avons vu grâce à la relation (2.2) que cette mesure est réalisable à travers la mesure de la concentration locale en soluté dans la zone chauffée.

L'entropie de la particule est dominée par deux composantes principales, qui sont l'entropie d'écrantage de la particule par les ions du solvant S_{ionic} et l'entropie liée à l'hydratation de la particule par les molécules du solvant S_{hyd} . La contribution entropique liée au mouvement brownien est considérée négligeable au regard de sa faible valeur : avec $G = k_B T$, la contribution du mouvement brownien au coefficient de Soret évolue comme $1/T$, soit environ $0.0034/K$ à température ambiante.

En détaillant la contribution ionique du coefficient de Soret comme l'énergie électrostatique stockée dans un condensateur sphérique formé par la particule et séparée du milieu extérieur par sa couche d'ions, S. Duhr and D. Braun[384] ont proposé l'expression suivante pour le coefficient de Soret :

$$S_T = \frac{A}{k_B T} \left(-s_{hyd} + \frac{\beta \sigma_{eff}^2}{4\epsilon\epsilon_0 T} \times \lambda_D \right), \quad (2.7)$$

où A est la surface de la particule, s_{hyd} la contribution de l'hydratation de la particule à l'entropie par unité de surface, σ_{eff} la densité de charge surfacique, $\epsilon\epsilon_0$ la permittivité totale du milieu et $\beta = 1 - (T/\epsilon)\partial\epsilon/\partial T$ un facteur adimensionné.

Avec la définition (2.7), on constate que le coefficient de Soret évolue linéairement avec la surface de la particule. De même, selon la température, le signe du coefficient de Soret peut s'inverser, ce qui change le sens de migration de la particule le long du gradient de température.

Les auteurs ont confirmé la validité de leur formule sur plusieurs ordres de grandeur et sans paramètres ajustables au moyen d'une expérience de thermophorèse impliquant des micro-billes de polystyrène et des molécules d'ADN (Fig.2.2). En particulier, l'expression explicite du coefficient de Soret avec la température permet une meilleure compréhension du comportement d'une molécule d'ADN soumise à un gradient de température, où la molécule migre vers le point chaud à basse température (3°C , $S_T < 0$) et s'en éloigne à température ambiante (20°C , $S_T > 0$).

Les observations de S. Duhr and D. Braun[384] ont par la suite été confirmées sur des molécules d'ADN simple brin allant de 5 à 50 bases de longueur[385]. Maeda *et coll.*[386] ont observé que la présence de PEG10k de haut poids moléculaire en solution avec des molécules d'ADN T4 double brin ou des molécules d'ARN formant des structures secondaires inverse le signe du coefficient de Soret, ce qui conduit à une migration des molécules d'ADN ou d'ARN vers la zone chauffée. Les auteurs attribuent ce comportement à une pression osmotique exercée par les molécules de PEG venant compenser le gradient thermique. Ce résultat a également été observé par Reichl *et coll.*[387] dans des conditions expérimentales similaires. Les auteurs ont montré que ce comportement peut être décrit par le modèle du condensateur pour l'expression de la composante ionique de l'entropie de la particule en considérant l'effet Soret simultanément pour les molécules d'ADN et pour les molécules de PEG, les deux étant sensibles au gradient thermique.

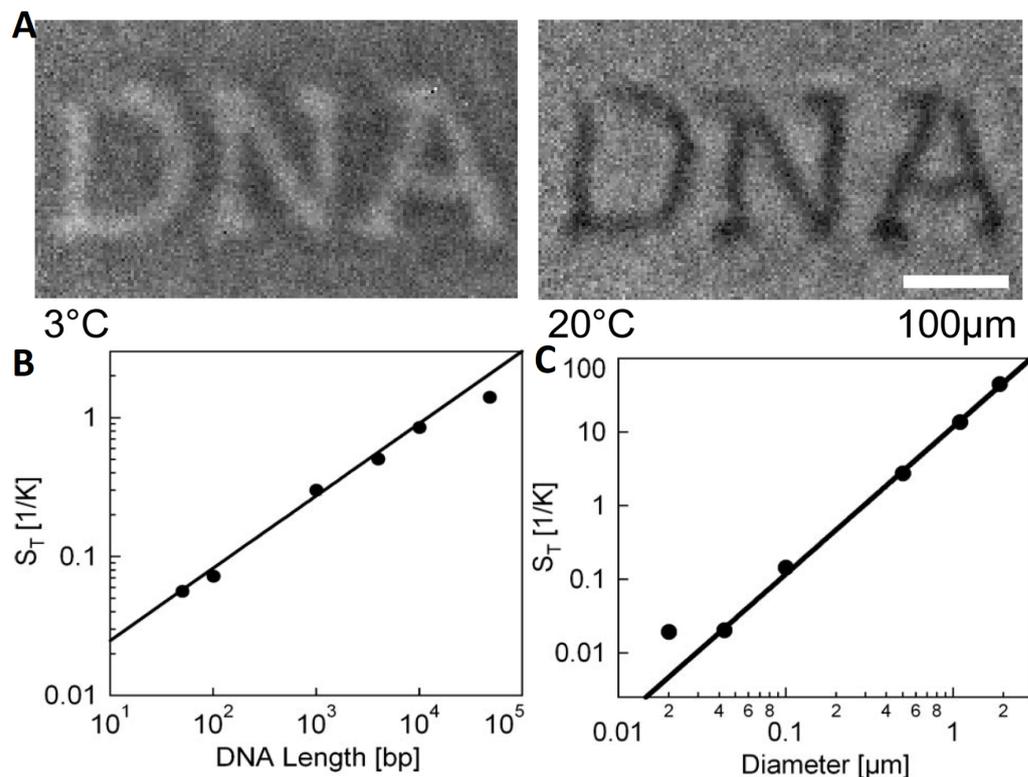


FIGURE 2.2 – Expérience de Duhr et Braun - A) Images de microscopie de fluorescence d'une solution de molécules d'ADN (1 kb) marquées en fluorescence au TOTO-1 ou niveau d'une zone chauffée par laser IR ($\Delta T = 2$ K) formant les lettres "DNA" pour un milieu thermalisé à 3°C (gauche) et 20°C (droite). B) Coefficient de Soret expérimental en fonction de la longueur des molécules d'ADN. C) Coefficient de Soret en fonction du diamètre de microbilles de polystyrène. (Extraits de [384]).

2.2 Microscale Thermophoresis

La technique expérimentale de la microscale thermophoresis (MST) consiste à exploiter la définition entropique du coefficient de Soret pour mesurer la constante de dissociation entre une espèce en solution et un ligand. Nous avons vu dans l'équation (2.6) que le coefficient de Soret est lié à l'entropie de l'espèce en solution. Or, une liaison de cette espèce avec un ligand modifie l'entropie de la particule, ce qui conduit à un coefficient de Soret différent. Ainsi, en mesurant la réponse du système à un gradient thermique en fonction de la concentration en ligand, il est possible d'estimer la constante de dissociation de l'équilibre d'association entre l'espèce et son ligand.

Nous avons vu au début de ce chapitre dans la relation (2.2) que la concentration du soluté dans la zone chauffée s'exprime selon sa concentration à l'équilibre en absence de forçage thermique et du coefficient de Soret associé à l'espèce chimique. A partir de cela, il est possible de mesurer le coefficient de Soret en mesurant la concentration de l'espèce au niveau de la zone chauffée.

C'est cette technique qu'exploite la technologie Monolith (Nanotemper) et que nous avons utilisée pour mesurer des constantes de dissociation entre des molécules d'ADN et des polycations. Nous détaillerons donc son principe général dans la suite de cette section.

Le principe à la base de cette technologie est le suivant : en marquant en fluorescence l'espèce chimique dont on cherche à mesurer la constante de dissociation avec un ligand donné, on peut estimer sa concentration localement à travers l'intensité de fluorescence émise au niveau de la zone d'illumination du laser. Dans ce schéma, on néglige les interactions des fluorophores entre eux et l'intensité de fluorescence totale est prise comme la somme des intensités des fluorophores individuels.

Comme dit précédemment, les coefficients de Soret pour l'espèce seule et cette espèce liée à un ligand ne sont pas les mêmes. Par conséquent, la concentration de l'espèce dans la zone chauffée est différente selon la quantité de ligands présents en solutions. En transposant ces concentrations en intensité de fluorescence, l'intensité totale au niveau de la zone chauffée est comprise entre deux valeurs limites : une première correspondant à une solution de l'espèce cible seule et une seconde avec le ligand saturant le milieu (et donc toutes les espèces chimiques liées à un ligand). La constante de dissociation est alors obtenue comme la concentration en ligand pour laquelle l'intensité de fluorescence de la zone chauffée est égale à la valeur médiane entre les deux intensités limites décrites précédemment.

Plus formellement, on peut décrire l'intensité de fluorescence I_{to} de la zone chauffée comme la somme de l'intensité I_A émise par l'espèce cible A seule en solution et celle émise par l'espèce A liée à un ligand L, pondérées par leurs concentrations respectives :

$$I_{tot} = I_A \times \frac{C_A}{C_{A,0}} + I_{AL} \times \frac{C_{AL}}{C_{A,0}}, \quad (2.8)$$

avec la concentration initiale $C_{A,0}$ de l'espèce A avant association avec le ligand.

On a la relation de conservation $C_{A,0} = C_A + C_{AL}$, ce qui permet d'introduire la fraction molaire x de l'espèce A liée telle que $x = C_{AL}/C_{A,0}$, d'où l'équation :

$$I_{tot} = I_A \times (1 - x) + I_{AL}x. \quad (2.9)$$

La constante de dissociation de l'équilibre d'association entre l'espèce A et le ligand

L s'exprime de la manière suivante :

$$K_d = \frac{C_A \times C_L}{C_{AL}}. \quad (2.10)$$

Avec $C_{L,0}$ la concentration initiale en ligand telle que $C_{L,0} = C_L + C_{AL}$ et à partir de la définition de la constante de dissociation (2.10), on peut facilement exprimer la concentration en espèces A liées à partir des constantes du problème :

$$C_{AL} = \frac{1}{2} \left((C_{A,0} + C_{L,0} + K_d) - \left((C_{A,0} + C_{L,0} + K_d)^2 - 4C_{A,0}C_{L,0} \right)^{1/2} \right), \quad (2.11)$$

soit la fraction molaire associée :

$$x = \frac{1}{2} \left(\left(1 + \frac{(C_{L,0} + K_d)}{C_{A,0}} \right) - \left(\left(1 + \frac{(C_{L,0} + K_d)}{C_{A,0}} \right)^2 - 4 \frac{C_{L,0}}{C_{A,0}} \right)^{1/2} \right). \quad (2.12)$$

En injectant l'expression de la fraction molaire (2.12) dans l'expression de l'intensité (2.9), on obtient l'expression de l'intensité totale de la zone chauffée en fonction de la concentration initiale en ligand, avec la constante de dissociation K_d comme paramètre ajustable. A partir de cette relation simple, en mesurant l'intensité de fluorescence de la zone chauffée pour une échelle de concentrations en ligand, il est possible de déterminer la constante de dissociation de l'équilibre.

Pour réaliser ces mesures, nous avons utilisé l'outil de MST Monolith NT.115, développé par Nanotemper. Cet outil combine un laser IR (1475 nm pour une puissance allant jusqu'à 120 mW), utilisé pour imposer le gradient thermique (2-6 K), une LED pour l'excitation fluorescente (dans nos expériences, il s'agit d'une LED bleue d'émission comprise entre 480 nm et 500 nm) et une photodiode servant à la mesure de l'intensité de fluorescence de la zone chauffée. Avec cet outil, il est possible de mesurer des constantes de dissociation allant de 1 nM à 500 mM, pour des espèces d'une taille comprise entre 40 Da à plus de 1 MDa (d'après le fabricant). Les solutions contenant l'espèce cible et le ligand à concentrations variables sont introduites par capillarité dans des capillaires en verre MO-K002 (Nanotemper), de 5 cm de long pour un rayon interne de 250 μm , ce qui équivaut à un volume de remplissage de 10 μL environ. Il est possible d'insérer jusqu'à 16 capillaires différents lors d'une même expérience. Le laser IR chauffe le milieu du capillaire sur un volume de 2 nL avec un diamètre de 100 μm .

Lors d'une mesure, on mesure d'abord l'homogénéité de la fluorescence entre les différents capillaires ainsi que la valeur de leur intensité (qui doit être au-dessus du seuil de détection et en-dessous du seuil de saturation de la photodiode). Il est possible de modifier l'intensité de fluorescence en changeant le taux de couverture du fluorophore ou en diluant l'espèce cible. Il arrive que la fluorescence ne soit pas homogène pour tous les capillaires ; cela peut provenir d'une mauvaise préparation de la solution dans un ou plusieurs capillaires ou d'un effet de quenching (réduction de la fluorescence) du fluorophore par le ligand après liaison de celui-ci avec l'espèce cible. Ce deuxième cas fera l'objet d'une discussion détaillée dans la section 1.4.1, en raison de la possibilité de se servir du quenching comme d'un marqueur de l'association entre l'espèce cible et le ligand.

Après cette vérification, le laser IR chauffe successivement tous les capillaires pour initier le processus de thermophorèse et l'intensité de fluorescence émise est enregistrée

au cours du temps, quelques secondes avant le chauffage du laser IR jusqu'à quelques secondes après son arrêt. Les courbes obtenues (qu'on appellera traces MST) sont ensuite exportés en format Matlab pour être analysées à l'aide d'un script développé au sein de l'équipe.

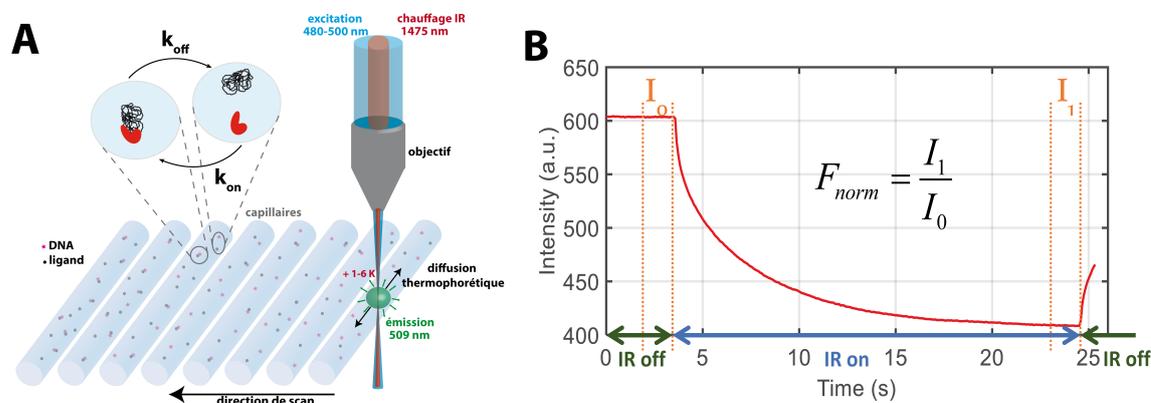


FIGURE 2.3 – Technique de la microscale thermophoresis (MST) - A) Schéma de principe du fonctionnement de la MST. B) Trace de MST typique, représentant l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps.

L'ensemble de l'expérience sur l'outil Monolith NT.115 est opéré grâce au logiciel propriétaire NT Control (Nanotemper). Ces mesures ont été réalisées en collaboration avec Céline Fréton (ingénieur d'études, CNRS, Institut de Biologie et Chimie des Protéines - MMSB).

2.3 Comparaison de la MST avec les autres techniques de mesure de K_d

Dans cette section, nous comparons les avantages et inconvénients de la MST comparée aux principales autres méthodes pour la mesure d'une constante de dissociation. Plus précisément, nous considérerons les techniques suivantes :

- Isothermal Titration Calorimetry (ITC) : le principe de l'ITC repose sur la mesure de la chaleur échangée lors de l'association entre une espèce et un ligand, qui correspond à l'enthalpie de la réaction. Cette mesure s'effectue par l'intermédiaire de la chaleur échangée avec le milieu pour le maintenir à température constante entre la cellule de réaction et une cellule de référence.
- Biolayer Interferometry (BLI) : la BLI consiste à observer en temps réel la modification d'une figure d'interférence projetée sur une fibre optique dont la surface au dioptre est recouverte de l'espèce cible. Des ligands sont présents en solution à une concentration donnée et leur association avec l'espèce cible modifie la figure d'interférence, ce qui permet un suivi en temps réel de la dynamique d'association du ligand avec l'espèce cible.
- Surface Plasmon Resonance (SPR) : la SPR repose sur la mesure du pic de résonance d'un plasmon de surface dans un film nanométrique d'un métal donné (typiquement

de l'or) ; des molécules de l'espèce cible sont adsorbées sur ce film métallique et leur association avec un ligand modifie la fréquence de résonance du plasmon de surface, ce qui permet de suivre la dynamique d'association entre les deux espèces en temps réel.

Le tableau 2.1 présente une comparaison des avantages et inconvénients de ces différentes méthodes :

Technique	Avantages	Inconvénients
MST	<ul style="list-style-type: none"> — Mesure du K_d ; — nM-mM ; — Mesure en milieux complexes (sérum, lysés cellulaires...); — Immobilisation de la molécule cible non-nécessaire ; — Faible volume de réactifs requis ($\sim 200 \mu\text{L}$) ; — Large gamme de poids moléculaire pour le complexe formé (ions jusqu'au MDa) ; — Mise en oeuvre simple et rapide (environ 20 min). 	<ul style="list-style-type: none"> — k_{on} et k_{off} non-mesurables ; — Nécessité d'un marquage fluorescent, pouvant entraîner des problèmes de quenching ou de spécificité de l'interaction entre le fluorophore et le ligand.
ITC	<ul style="list-style-type: none"> — Mesure du K_d, ΔH, ΔS et n (nombre de ligands) ; — nM-μM ; — Immobilisation de la molécule cible non-nécessaire ; — Pas de modifications de la molécule cible à réaliser (pas de marquage requis...). 	<ul style="list-style-type: none"> — k_{on} et k_{off} non-mesurables ; — Nécessite un volume de solution important pour obtenir un dégagement de chaleur suffisant pour être mesuré ($\sim 500 \mu\text{L}$) ; les liaisons non-covalentes dégagent également une chaleur plus faible et donc moins détectable ; — Durée de mesure longue ($\sim 2\text{h}$), car les mesures s'effectuent à l'équilibre.
BLI	<ul style="list-style-type: none"> — Mesure du K_d, k_{on} et k_{off} ; — nM-mM ; — Mesure en temps réel ; — Faible volume de solution nécessaire ($100\text{-}200 \mu\text{L}$) ; — Pas de modifications de la molécule cible à réaliser (pas de marquage requis...). 	<ul style="list-style-type: none"> — Immobilisation de la molécule cible nécessaire ; — Moins sensible que la SPR.
SPR	<ul style="list-style-type: none"> — Mesure du K_d, k_{on} et k_{off} ; — nM-mM ; — Mesure en temps réel ; — Grande précision des mesures ; — Pas de modifications de la molécule cible à réaliser (pas de marquage requis...). 	<ul style="list-style-type: none"> — Immobilisation de la molécule cible nécessaire ; — Volume de solution requis important ($\sim 500 \mu\text{L}$) ; — Nécessite un opérateur expérimenté.

TABLE 2.1 – Comparaison des principales méthodes de mesures de K_d (d'après [388, 389]).

Pour nos expériences, nous avons choisi d'employer la technique de la MST car les molécules d'ADN que nous utilisons durant nos expériences de translocation sont déjà marquées en fluorescence. De plus, les mesures de MST sont faciles à réaliser, rapides et

peu coûteuses en matériel. Il n'y a pas de contraintes sur le solvant utilisé et il n'est pas nécessaire d'immobiliser les molécules d'ADN, nous pouvons donc réaliser des mesures dans les mêmes conditions que celles lors des expériences de translocation. Nous verrons également dans la section 1.4.1 qu'un effet de quenching de la fluorescence des molécules d'ADN induit par la liaison avec un polycation permet une mesure précise de la constante de dissociation K_d ; cette seconde mesure s'effectue à partir des mesures de traces MST, au niveau de l'intensité de fluorescence initiale, ce qui permet une double mesure de la constante de dissociation à partir d'une seule et même mesure.

Troisième partie

Résultats

Translocation d'ADN par mécanisme de ratchet de translocation

1.1 Preuve de principe du ratchet de translocation

Pour réaliser le mécanisme de ratchet de translocation dans notre système expérimental, nous avons d'abord choisi d'utiliser un polycation de fort poids moléculaire, le polyéthylèneimine (PEI, M.n. 60 000, ACROS OrganicsTM). Ce polycation est connu pour disposer d'une forte affinité pour les molécules d'ADN, il se fixe à la chaîne carbonée par interaction électrostatique avec les groupements phosphates des bases (2 phosphates par base d'ADN) ; le PEI connaît de nombreuses applications en biologie, en particulier pour la transfection de gènes, le polycation servant de vecteur pour le transport du matériel génétique tout en disposant d'une toxicité limitée pour la cellule. Le monomère constitutif du PEI est composé d'un groupement amine (secondaire dans le cas d'un polymère linéaire ; dans le cas d'un polymère ramifié, comme c'est le cas pour le PEI utilisé ici, on peut trouver des amines primaires, secondaires ou tertiaires) relié à deux atomes de carbone aliphatiques (M.w. 43,07 g/mol) ; ce groupement amine est nucléophile, ce qui le rend facilement protonable à pH physiologique. Suivant la force ionique de la solution et la taille et ramification du polymère, le pKa du PEI est variable et il a été précédemment mesuré que le taux de protonation du polymère à pH physiologique est de 44% [390].

Pour rendre compte des concentrations de polycation utilisées dans cette étude, nous avons choisi de considérer le ratio entre les charges positives des polycations et les charges négatives du squelette carboné des molécules d'ADN. Ce paramètre est alors indépendant de la longueur du polycation considéré et permet des comparaisons entre mesures réalisées avec des polycations de natures et tailles différentes. Ce choix est justifié par la nature électrostatique de l'interaction entre les groupements amines et phosphates et prend son sens dans le cadre d'une approche en champ moyen, comme nous le verrons dans la partie 1.3.

1.1.1 Protocole expérimental

- Injecter dans la chambre supérieure (en amont de la membrane) 100 μ L d'une solution d'ADN λ à une concentration de 4,9 nM (en équivalent de groupements

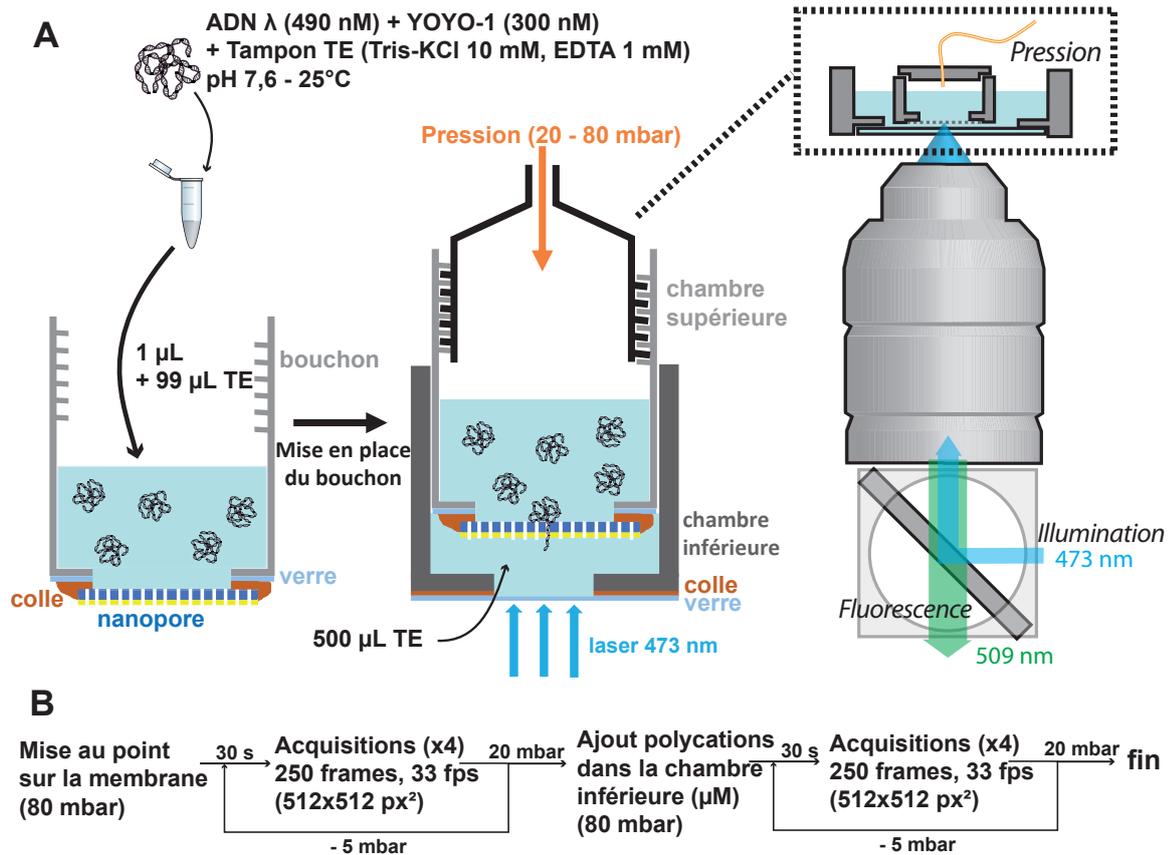


FIGURE 1.1 – Protocole de l'expérience de translocation à concentration en polycations fixe et pression variable - A) Mise en place du bouchon contenant la solution d'ADN et la membrane nanoporeuse. B) Protocole d'acquisition des données de translocation.

phosphates) dans un mélange Tris-KCl (10 mM) et EDTA (1 mM) à pH 7,6; l'ADN λ est marqué au YOYO-1 (3,0 nM, soit une couverture moyenne de 60% des bases) (Fig.1.1A).

- Injecter 500 μ L de solution Tris-KCl (10 mM) et EDTA (1 mM) dans la chambre inférieure, puis déposer la chambre supérieure sur la chambre inférieure afin d'assurer le mouillage des nanopores (Fig.1.1A).
- Appliquer une pression de 80 mbar en entrée des nanopores grâce au contrôleur de pression, ce qui a pour effet l'apparition d'événements de translocation, visibles sur la caméra sous forme de flashes lumineux. Faire la mise au point de l'objectif sur la surface métallique de la membrane grâce à la lampe de fluorescence, puis passer au laser 473 nm. Il est important de noter qu'il faut privilégier la mise au point sur une surface homogène de la membrane, que nous cherchons homogène à la fois en contraste (planéité de la membrane par rapport au champ incident) et homogène en densité d'événements de translocation : en effet, on constate parfois des défauts locaux de la membrane, provenant d'un défaut d'usine de la membrane ou d'une altération de sa surface lors d'une manipulation, qui peuvent biaiser la mesure de la fréquence de translocation des molécules d'ADN (augmentation si les pores sont partiellement dilatés ou diminution s'ils sont partiellement obstrués). Dans tous les cas, nous cherchons à éviter ces zones hétérogènes, c'est pourquoi l'expérience se déroule en diminuant progressivement la pression appliquée en entrée des nanopores, les zones hétérogènes étant plus faciles à identifier à forte densité en événements de translocation (Fig.1.1B).
- Une fois la mise au point effectuée, réaliser des séries d'acquisitions (en général 4 acquisitions de 250 frames à 33 fps) pour chaque point de pression (généralement tous les 5 mbar, en partant de 80 mbar et en descendant jusqu'à 20 mbar, pour des nanopores de 50 nm de diamètre). Veiller à respecter un temps de relaxation du contrôleur de pression entre chaque nouvelle consigne (au moins 30 s) (Fig.1.1B).
- Une fois la série d'acquisitions terminée, imposer une pression de 80 mbar (la plus haute de la série) et injecter dans la chambre inférieure (en aval des nanopores) une solution de PEI dans le même solvant que celui de l'ADN λ à la concentration de travail voulue (en général, il s'agit de quelques μ M, en équivalent de groupements amines); bien homogénéiser la solution dans la chambre inférieure par pipetage (Fig.1.1B).
- Appliquer de nouveau le protocole d'acquisition précédent, cette fois-ci en présence de PEI à la sortie des nanopores (Fig.1.1B).

La mesure "à blanc" (sans polycations) avant celle avec le PEI permet de limiter les fluctuations de mesures de fréquence de translocation liées à l'état de surface de la membrane, qui peut varier d'une membrane à l'autre; ainsi, en comparant l'évolution de la fréquence de translocation avant et après ajout de PEI, nous pouvons mettre en lumière l'influence du polycation à la sortie du nanopore sur la translocation de la molécule d'ADN, ce qui permet de quantifier l'efficacité du système comme ratchet de translocation.

1.1.2 Résultats préliminaires

Nous avons réalisé l'expérience de translocation à pression variable dans deux conditions : avec PEI en sortie des nanopores (ratchet +) et sans (ratchet -). Pour chaque condition, l'expérience a été répétée un grand nombre de fois (respectivement 107 et 47 pour les conditions ratchet - et ratchet +) afin de limiter l'impact du bruit statistique sur les mesures. Les mesures expérimentales ont ensuite été moyennées sur l'axe des pressions afin d'obtenir les courbes moyennes, puis ces courbes ont été ajustées avec le modèle de succion développé par Auger *et coll.*[299] (voir section 3.3.4) :

$$f(P) = f_c \frac{P}{P_c} e^{-\frac{P_c}{P}}, \quad (1.1)$$

où f est la fréquence de translocation des molécules d'ADN, P la pression hydrodynamique imposée, P_c la pression critique et f_c la fréquence à la pression critique. La figure 1.2 présente les résultats obtenus.

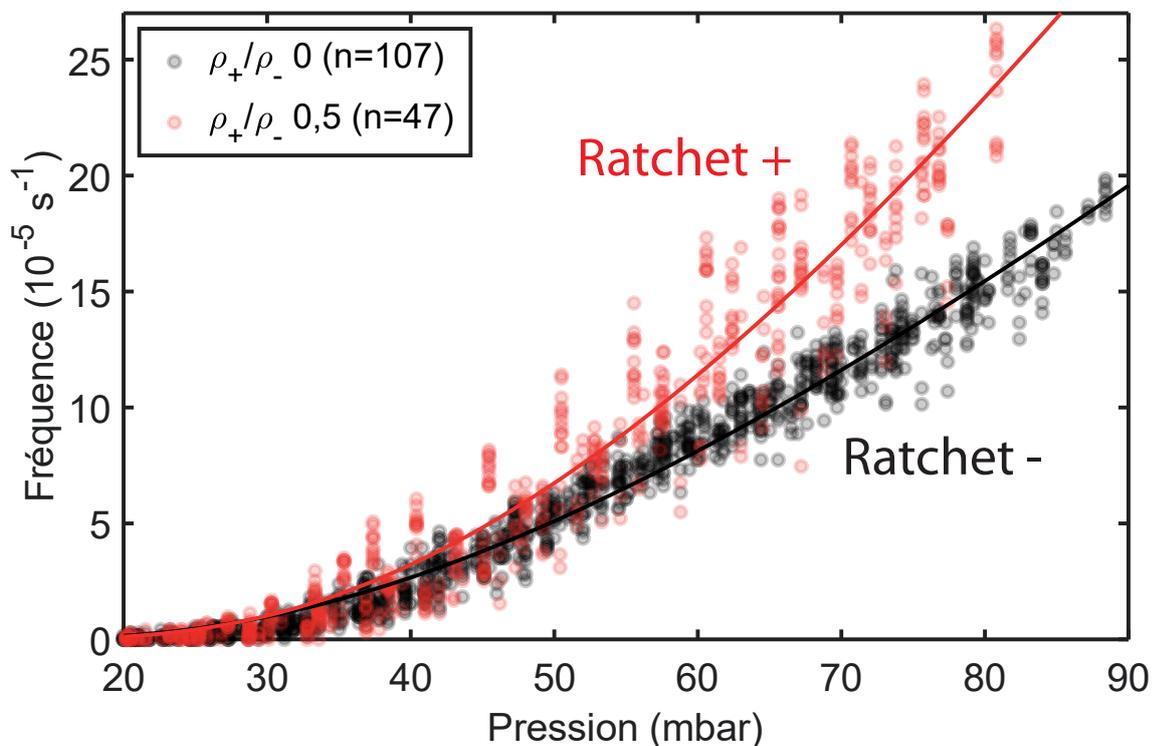


FIGURE 1.2 – Fréquence de translocation des molécules d'ADN λ à travers des nanopores de 50 nm de diamètre en fonction de la pression appliquée, dans deux conditions : (noir, ratchet -) sans PEI en sortie (ratio de charge $\rho_+/\rho_- = 0$) ; (rouge, ratchet +) avec un excès de PEI en sortie ($\rho_+/\rho_- = 0,5$). Chaque point représenté sur ce graphique correspond à une mesure expérimentale unique. Les deux ensembles de points sont ensuite moyennés en abscisse pour conduire aux courbes moyennes et nous ajustons ces courbes par le modèle de succion ; ces ajustements sont représentés sur ce graphique en traits pleins.

Nous pouvons observer une nette augmentation de la fréquence de translocation à pression donnée par ajout de PEI à la sortie des nanopores, comme il est attendu pour

un mécanisme de ratchet de translocation. Le modèle de succion semble parfaitement ajuster les données dans les deux conditions; nous pouvons en extraire des estimations pour les paramètres du modèle (voir 1.1). La précision de ces mesures est évaluée par la méthode du jackknife, qui permet d'évaluer la valeur d'un paramètre (ici un paramètre ajustable d'un modèle donné) à partir d'un nombre restreint de points[391, 392]. Pour cela, nous mesurons la valeur du paramètre ajustable en enlevant un point de la courbe à ajuster, puis nous répétons l'opération pour chaque point de cette courbe. L'estimation du paramètre ajustable est alors donnée par la moyenne des mesures précédentes. Ainsi, au lieu d'estimer un paramètre ajustable à partir d'une seule mesure sur N points, nous estimons ce paramètre à partir d'une moyenne de N mesures sur N-1 points, ce qui permet une meilleure précision sur l'estimation du paramètre.

	P_c (mbar)	f_c ($10^{-5} s^{-1}$)
ratchet -	$85,1 \pm 1,1$	$47,6 \pm 1,4$
ratchet +	$103,1 \pm 0,6$	$109,4 \pm 1,7$

TABLE 1.1 – Paramètres d'ajustement des données expérimentales par le modèle de succion sans PEI (ratchet -) et avec (ratchet +). Les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife sur les données expérimentales (95%).

D'après ces mesures, nous constatons une augmentation d'environ 20% de sa valeur nominale pour la pression critique après ajout de PEI à la sortie des nanopores. Nous pensons qu'il s'agit d'un effet d'adsorption partielle des molécules de PEI dans le nanopore au voisinage de sa sortie, qui réduirait le rayon effectif du pore et augmenterait ainsi sa pression critique associée, suivant la relation de Hagen-Poiseuille :

$$P_c = \frac{8Lk_B T}{\pi R^4}, \quad (1.2)$$

avec L la longueur du nanopore (soit l'épaisseur de la membrane) et R son rayon.

Selon la relation 1.2, avec les valeurs de pression critique mesurées précédemment (voir le tableau de valeurs 1.1), nous estimons une réduction de 5% de sa valeur nominale pour le rayon effectif du pore après ajout de PEI, ce qui correspond à une épaisseur d'adsorption d'environ 1 nm; cette taille est comparable à celle de quelques monomères seulement de PEI, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'adsorption du PEI sur la surface interne du nanopore. Cette adsorption est favorisée par la forte concentration en PEI à la sortie du nanopore, nous verrons avec la figure 1.4 que la pression critique reste inchangée lorsque le PEI est ajouté en concentrations plus faibles.

Concernant l'évolution de la fréquence à la pression critique f_c , l'augmentation est conséquente puisque la valeur de ce paramètre a plus que doublé après ajout du PEI. Dans le cadre du modèle de succion, la valeur inchangée de la pression critique (en négligeant l'effet de l'adsorption du PEI dans le pore, qui n'est pas à l'origine du mécanisme de ratchet de translocation visé dans cette étude) indique que la hauteur de la barrière d'énergie à franchir pour confiner l'ADN à l'intérieur du pore n'est pas modifiée par la présence du PEI à sa sortie, mais que ce dernier modifie le taux d'incidence sur la barrière f_c , lui-même relié à la courbure du potentiel dans le cadre de la théorie de Kramers (voir section 3.3.1).

A partir de ces observations, on peut conclure que l'ajout de PEI à la sortie des nanopores provoque une augmentation globale de la fréquence de translocation des molécules d'ADN. Il y a donc un mécanisme sous-jacent à l'origine de cette accélération du transport, nous proposons deux pistes possibles :

- soit un effet osmotique en raison de l'introduction dans le système d'un gradient de concentration de PEI (uniquement en aval des nanopores), donc entraînant une pression osmotique supplémentaire qui vient s'ajouter à la pression imposée par le contrôleur de pression. Dans ce cas, l'interaction spécifique entre l'ADN et le PEI n'est pas à l'origine de l'accélération du transport, qui peut être provoquée par un gradient d'une espèce chimique quelconque.
- soit un mécanisme de ratchet de translocation, qui est le but visé de cette étude. Dans ce cas, c'est l'interaction spécifique entre le PEI et l'ADN qui est à l'origine de l'accélération du transport ; toute rupture de cette interaction entraînerait la perte du mécanisme et un retour à la situation initiale sans PEI.

De manière plus quantitative, nous pouvons estimer la contribution osmotique à la pression dans les nanopores à partir de la loi de van't Hoff[393] :

$$\Pi = k_B T \times C_n, \quad (1.3)$$

où Π est la pression osmotique (en Pa) et C_n la concentration volumique en soluté (en nombre de particules par m^3).

La loi de van't Hoff constitue une approximation d'une équation du viriel pour la pression osmotique à l'ordre 1 pour la concentration ; de manière plus générale, la pression osmotique s'exprime de la manière suivante[393] :

$$\Pi = k_B T \times (C_n + B_2 C_n^2 + B_3 C_n^3 + \dots), \quad (1.4)$$

où B_2 et B_3 sont les 2ème et 3ème coefficients du viriel, correspondant respectivement aux interactions à 2 et 3 particules.

En régime dilué, il est possible de négliger les termes d'ordre 2 et supérieurs pour se ramener à la relation de van't Hoff. La concentration critique délimitant ce régime correspond à la concentration des monomères d'une molécule dans le volume occupé par ce polymère, soit $C^* = N/R_g^3$, où N est le degré de polymérisation du polymère et R_g son rayon de giration[65]. Dans le cas du polycation utilisé ici, à savoir un PEI d'un poids moléculaire de 60 kDa, son degré de polymérisation est de 1 393 (la masse molaire d'un monomère de PEI est de 43,07 g/mol). Son rayon de giration peut être estimé en considérant un modèle Worm Like Chain (décrit dans la section 3.1.2) en prenant une longueur de persistance égale à 0,5 nm et une taille de monomère égale à 0,3 nm[394]. Dans ce modèle, le rayon de giration du PEI vaut $R_g = \sqrt{2L_p L_c} \simeq 20$ nm. La concentration critique C^* délimitant le régime dilué du régime semi-dilué est alors environ égale à 69 mM (en moles de groupes amines). Les concentrations en polycations que nous utilisons dans nos expériences sont de l'ordre du μM , donc très inférieures à cette concentration critique C^* . Nous pouvons par conséquent supposer une loi de van't Hoff pour la pression osmotique générée par le gradient de polycations.

Ainsi, avec une concentration en polycations de l'ordre du μM , on obtient d'après la loi de van't Hoff une pression osmotique d'environ 2 Pa, soit 0,02 mbar, ce qui correspond à

une pression inférieure à la précision du contrôleur de pression utilisé dans nos expériences (0,1 mbar de précision au mieux). Cette estimation est en très bonne adéquation avec les valeurs de pression osmotique mesurées par Curtis *et coll.*[390], où les auteurs ont mesuré à l'aide d'un osmomètre des pressions de l'ordre de 1-10 kPa pour des concentrations en PEI de 1-10 mM, soit mille fois plus concentrées.

D'après ces estimations, il est raisonnable de penser que la pression osmotique induite par le gradient de polycations est bien trop faible pour expliquer l'augmentation de la fréquence de translocation observée dans nos expériences. Néanmoins, nous avons souhaité apporter une preuve expérimentale à cette hypothèse en introduisant un compétiteur à l'ADN pour la liaison avec les polycations.

1.1.3 Rejet de l'hypothèse osmotique

Pour tester les deux hypothèses sur l'origine de l'augmentation de la fréquence de translocation, nous avons réalisé des expériences de translocation à pression variable dans les conditions suivantes :

- ADN λ seul ;
- ADN λ et PEI en excès à la sortie des nanopores ;
- ADN λ et PEI en excès à la sortie des nanopores en mélange équimolaire (en ratio de charges) avec de l'héparine.

Le choix d'une condition avec un mélange PEI et héparine vient du fait que l'héparine, un glycosaminoglycane utilisé en médecine pour ses propriétés anticoagulantes, possède une forte affinité pour les polycations en raison de ses nombreux groupements sulfates, avec par exemple une constante de dissociation pour le polycation PEAD (*polyethylene argininylaspartate diglyceride*) d'environ 200 pM[395, 396]. L'héparine agit en tant que compétiteur de l'ADN pour l'association avec le PEI, ce qui permet de trancher entre les deux hypothèses sur l'origine de l'augmentation de fréquence de translocation :

- si l'effet est d'origine osmotique, alors l'ajout d'héparine en aval du pore va accentuer l'effet par l'introduction d'un nouveau gradient de concentration ;
- si l'effet est celui d'un ratchet de translocation, alors l'ajout d'héparine va annuler l'augmentation de fréquence de translocation en supprimant l'interaction entre l'ADN et le PEI.

Nous avons donc réalisé des expériences de translocation à pression variable selon les trois conditions décrites ci-dessus ; les résultats obtenus sont présentés dans la figure 1.3.

D'après la figure 1.3, nous pouvons observer que l'ajout d'héparine avec le PEI a annulé l'augmentation précédente de la fréquence de translocation pour conduire en très bonne approximation à la courbe obtenue en absence de PEI. Cette observation semble indiquer que le mécanisme à l'origine de l'accélération du transport de l'ADN à travers les nanopores est bien celui d'un ratchet de translocation et non pas un simple effet osmotique ; l'effet est seulement possible en raison de la spécificité de l'interaction entre l'ADN et le PEI. Il s'agit d'une preuve de principe du ratchet de translocation artificiel visé par notre étude.

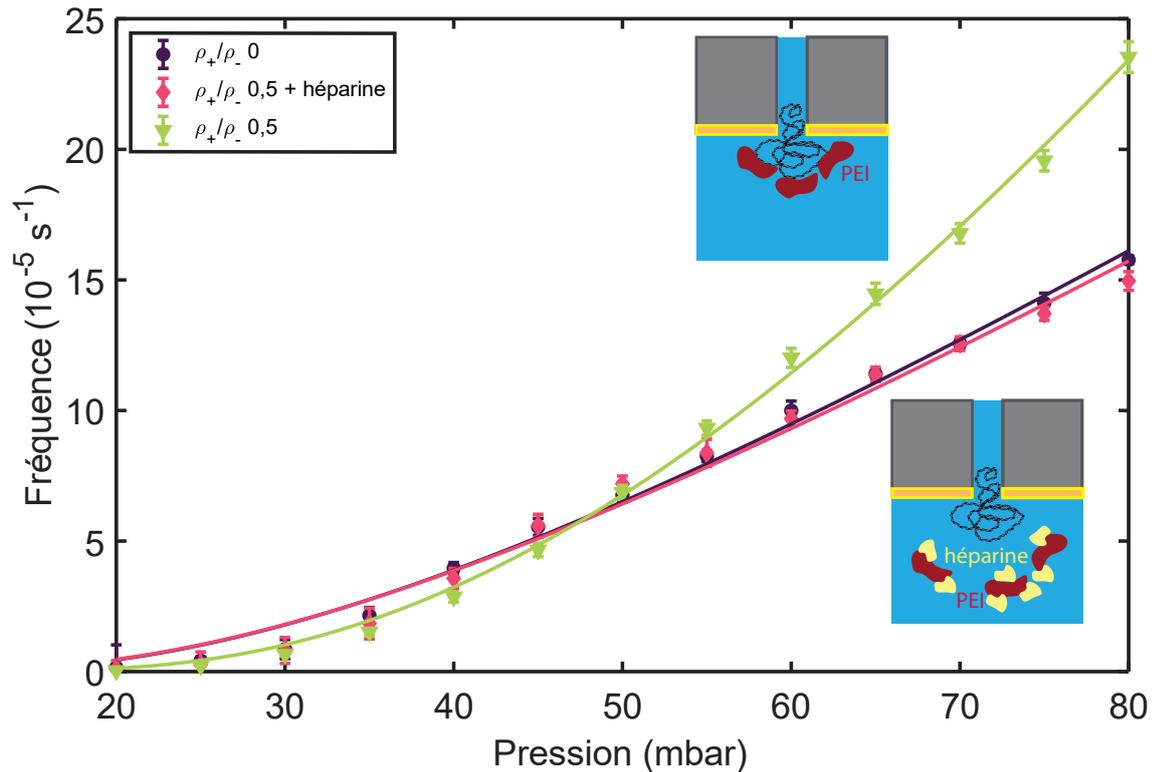


FIGURE 1.3 – Fréquence de translocation d'ADN λ à travers des pores de 50 nm de diamètre en fonction de la pression appliquée en absence de PEI ($\rho_+/\rho_- = 0$), en présence d'un excès de PEI ($\rho_+/\rho_- = 0,5$ et en présence d'un excès de PEI et d'héparine en mélange équimolaire ($\rho_+/\rho_- = 0,5 + \text{héparine}$). Les données expérimentales ont été ajustées par le modèle de succion (en traits pleins); l'incertitude sur les données expérimentales a été prise comme l'erreur standard (95%) et les expériences ont été répétées entre 8 et 39 fois.

1.2 Relation entre la fréquence de translocation et la concentration en agents de ratchet

1.2.1 Cas du PEI

Nous avons réalisé des expériences de translocation à pression variable pour une gamme de concentration en PEI allant de 0 à 0,6 (en ratio de charges). L'objectif de cette étude est de quantifier la dépendance du paramètre f_c , la fréquence à la pression critique du modèle de suction, avec la concentration en polycations à la sortie des nanopores.

Pour réaliser cette expérience, nous avons repris le protocole décrit précédemment dans la partie 1.1.1, avec des concentrations en PEI variables allant de 0 à 0,6 (en ratio de charges). Pour chaque condition, l'expérience est répétée au moins 8 fois (jusqu'à 107 fois pour la condition "témoin" sans PEI). Une courbe moyenne est ensuite calculée d'après les données expérimentales, puis elle est ajustée par le modèle de suction sur lequel nous mesurons ses paramètres clés (P_c et f_c); l'incertitude sur ces mesures est évaluée par une méthode du jackknife. Le résultat de ces mesures est présenté dans la figure 1.4A. Nous avons également représenté dans la figure 1.4B. ces mêmes résultats avec l'axe des pressions normalisé par la pression critique associée à chaque série de mesures, afin de nous affranchir des fluctuations de pression critique liées au collage des molécules de PEI à l'intérieur des nanopores (comme discuté dans la partie 1.1.2).

Le tableau présente l'estimation numérique des paramètres d'ajustement des données expérimentales par le modèle de suction (P_c et f_c) pour chaque condition de concentration en PEI. Les mesures de P_c sont celles utilisées pour normaliser l'axe des pressions de la figure 1.4A. et obtenir ainsi la figure 1.4B.

ρ_+/ρ_-	P_c (mbar)	f_c ($10^{-5} s^{-1}$)
0	85 ± 1	$47,6 \pm 1,4$
0,005	87 ± 1	$50,6 \pm 1,2$
0,05	82 ± 1	$52,0 \pm 1,0$
0,2	88 ± 4	$65,3 \pm 3,1$
0,5	103 ± 1	$109,1 \pm 2,0$
0,6	107 ± 6	$121,5 \pm 5,3$

TABLE 1.2 – Paramètres d'ajustement des données expérimentales par le modèle de suction. Les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife sur les données expérimentales (95%).

Nous observons sur les figures 1.4A. et 1.4B. que la fréquence de translocation des molécules d'ADN λ augmente proportionnellement à la concentration en PEI à la sortie des nanopores. Les mesures présentées dans le tableau 1.2 semblent indiquer que la pression critique n'est pas modifiée pour des ratios de charges inférieurs ou égaux à 0,2 et qu'elle augmente d'environ 20% de sa valeur initiale au-delà d'un ratio de charge d'au plus 0,5. La pression critique semble évoluer avec la concentration en polycations selon un processus de seuil, avec un seuil compris entre 0,2 et 0,5 (en ratio de charge); ces observations corroborent celles réalisées précédemment dans la partie 1.1.2 et semblent favoriser l'hypothèse de collage du PEI dans les nanopores au-delà d'une certaine concentration. En augmentant la pression critique du nanopore, ce processus de collage limite la

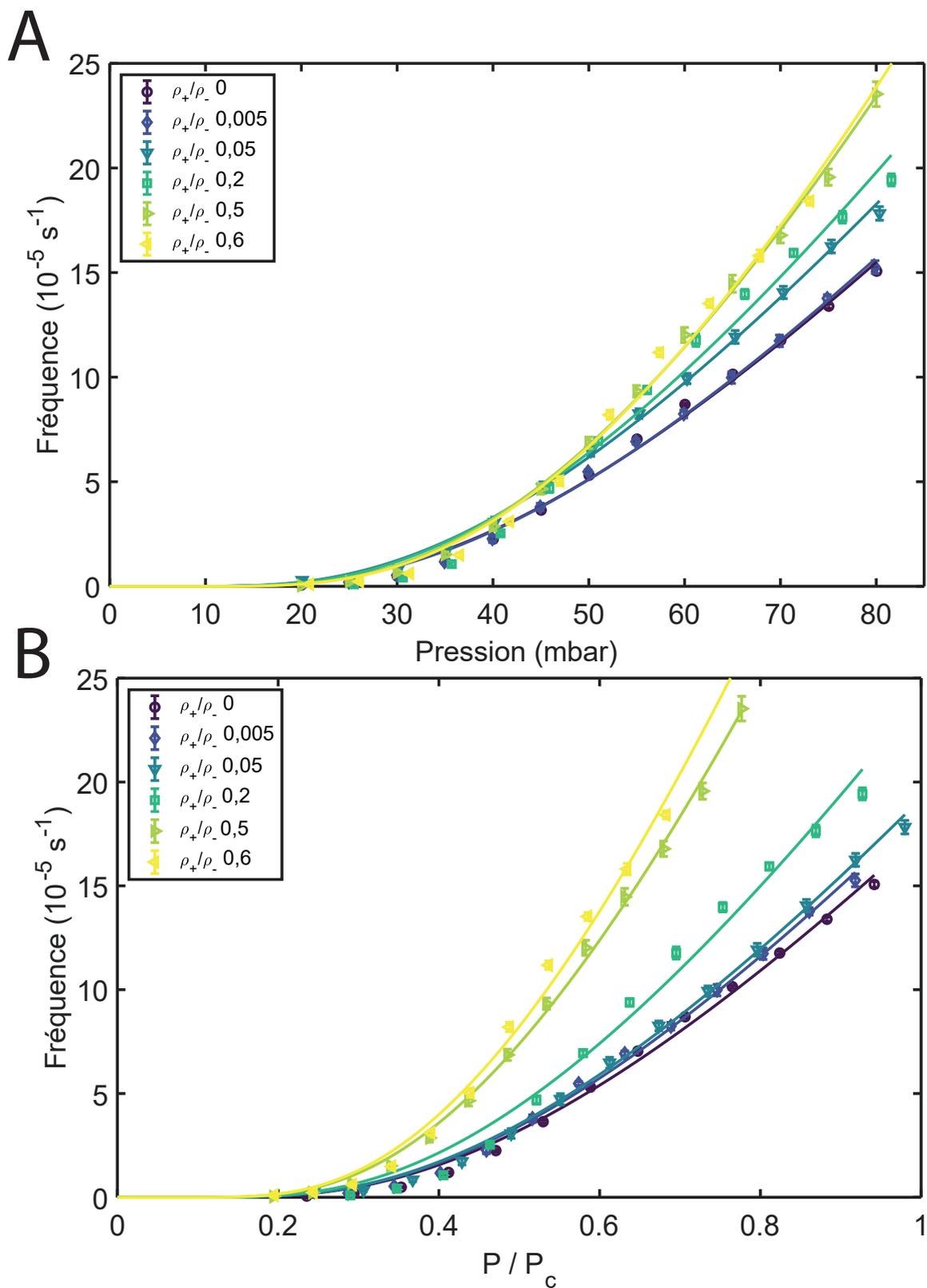


FIGURE 1.4 – A) Fréquence de translocation en fonction de la pression appliquée en entrée des nanopores, pour des ratios de charges variables. Les données expérimentales sont ajustées par le modèle de suction (en traits pleins). L'incertitude sur les données expérimentales a été prise comme l'erreur standard (95%) et les expériences ont été répétées entre 8 et 107 fois. B) idem que A, avec la pression normalisée par les pressions critiques (mesurées pour chaque série de données d'après l'ajustement par le modèle de suction; voir le tableau 1.2).

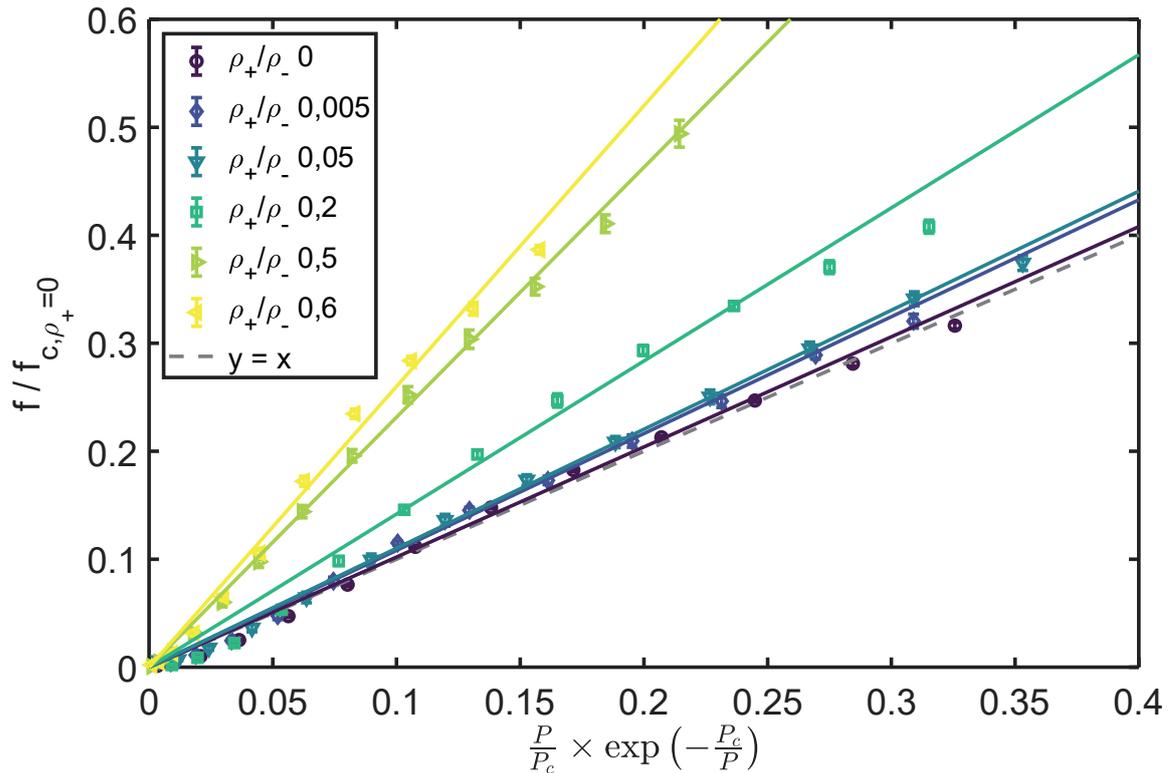


FIGURE 1.5 – Fréquence de translocation en fonction de la pression appliquée en entrée des nanopores, pour des ratios de charges variables. Les abscisses sont normalisées en fonction de l'expression $(P/P_c) \times \exp(-P_c/P)$. Les ordonnées sont normalisées par la fréquence à la pression critique f_c mesurée pour la courbe $\rho_+ = 0$. L'incertitude sur les données expérimentales a été prise comme l'erreur standard (95%) et les expériences ont été répétées entre 8 et 107 fois.

translocation de l'ADN ; les fluctuations de pression critique ne peuvent pas être à l'origine de l'augmentation de la fréquence de translocation, nous pouvons donc découpler cet effet du mécanisme de ratchet de translocation en normalisant les pressions par la pression critique pour chaque série de mesure ; ainsi, l'effet du ratchet de translocation peut être observé à travers la mesure de la fréquence à la pression critique f_c (présentée dans le tableau 1.2). Nous observons sur la figure 1.5 que l'ajout de PEI à la sortie des nanopores provoque une homothétie de la courbe : plus le polycation est concentré à la sortie des nanopores, plus la fréquence de translocation des molécules d'ADN augmente. Nous n'avons pas observé de saturation de cette augmentation dans la gamme de concentrations en polycations utilisées dans cette étude. Nous n'avons pas de résultats avec des concentrations plus élevées que 0,6 (en ratio de charges) en raison d'un collage important des molécules de PEI sur la surface métallique de la membrane et qui empêchent les molécules d'ADN de sortir des nanopores (événements visibles sur les vidéos à travers des points lumineux persistants et figés sur l'image, correspondant à la fluorescence émise par les molécules d'ADN coincées à la sortie des nanopores au niveau de la zone d'excitation de l'effet Zero-Mode Waveguide).

1.2.2 Introduction du rendement du ratchet Y

L'étude de l'évolution de f_c en fonction du ratio de charges, présentée dans la figure 1.6 montre que la fréquence à la pression critique évolue de manière linéaire avec la concentration en polycations (coefficient de corrélation $r = 0.98$).

Avec une relation linéaire entre le paramètre f_c et le ratio de charges ρ_+/ρ_- , l'effet du ratchet de translocation induit par la présence de polycations à la sortie des nanopores modifie l'expression du modèle de succion pour la fréquence de translocation en ajoutant un pré-facteur au modèle ; ce pré-facteur est indépendant de la pression appliquée à l'entrée des nanopores, d'après l'homothétie observée pour la courbe $f(P)$ par ajout de PEI (voir figure 1.4). Ainsi, au premier ordre en ρ_+/ρ_- (les ordres supérieurs étant négligeables, d'après l'observation de la figure 1.6), nous pouvons intégrer la présence du ratchet de translocation de la manière suivante, en introduisant un nouveau paramètre, Y, que nous qualifierons comme le rendement du ratchet de translocation :

$$f = \left(1 + Y \times \frac{\rho_+}{\rho_-}\right) \times f_c \frac{P}{P_c} e^{-\frac{P_c}{P}}, \quad (1.5)$$

où f_c et P_c restent inchangés par rapport au modèle de succion.

Le rendement du ratchet, Y, peut être défini comme le gain de fréquence de translocation spécifique à l'ajout d'une certaine quantité de polycations à la sortie des nanopores. Plus le rendement du ratchet est élevé, plus la présence de polycations à la sortie des nanopores accélère la translocation des molécules d'ADN ; nous dirons alors que le paramètre Y quantifie la qualité de l'agent de ratchet. Nous donnerons dans la partie 1.4.3 une définition plus formelle de ce paramètre Y.

D'après l'équation 1.5, nous pouvons mesurer le rendement du ratchet Y en mesurant f_{c,ρ_+} pour un ratio de charges connu en considérant le modèle de succion strict (sans introduire Y) et en comparant le résultat à celui en absence de polycation $f_{c,0}$:

$$Y = \frac{f_{c,\rho_+} - f_{c,0}}{f_{c,0}} \times \frac{\rho_-}{\rho_+}. \quad (1.6)$$

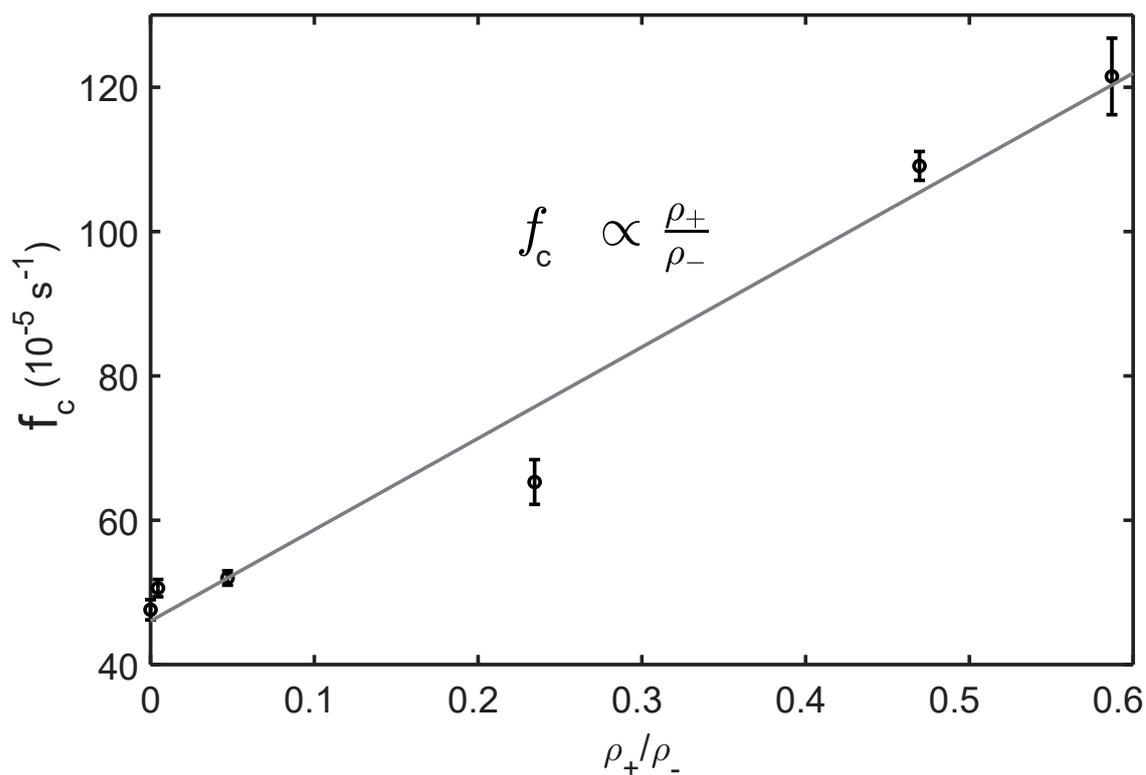


FIGURE 1.6 – Fréquence à la pression critique en fonction de la concentration en PEI à la sortie des nanopores (exprimée en ratio de charges). Les données expérimentales ont été ajustées avec succès par une régression linéaire ($R^2 = 0.97$). Les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife sur les données expérimentales (95%). Les valeurs numériques de f_c sont données dans la figure 1.2.

Pour mesurer Y via la relation 1.6, il est nécessaire d'avoir une précision importante pour les mesures de f_{c,ρ_+} et $f_{c,0}$; ces paramètres sont mesurés via un ajustement des données expérimentales de fréquence de translocation en fonction de la pression imposée par le modèle de succion; avec la variabilité issue de l'état de surface local de la membrane, nous devons effectuer un grand nombre de mesures pour que la statistique compense ces fluctuations inhérentes aux expériences de molécules uniques. Le processus de mesure et de traitement des données de microscopie étant assez chronophage (traitement manuel décrit dans la section 1.2.6), il est intéressant d'observer que le rendement Y est indépendant de la pression imposée à l'entrée des nanopores. Par conséquent, il est possible de réaliser les expériences de translocation à pression constante, avec cette fois-ci la concentration en polycations comme paramètre de contrôle de l'expérience. Avec cette méthode, nous traçons directement la relation linéaire entre la fréquence de translocation f et le ratio de charges ρ_+/ρ_- :

$$Y = \frac{f_{\rho_+} - f_0}{f_0} \times \frac{\rho_-}{\rho_+}, \quad (1.7)$$

où f_{ρ_+} et f_0 sont respectivement les fréquences de translocation à une pression donnée en présence de polycations et en leur absence. Le choix de la pression n'a pas d'importance pour la mesure de Y , donc elle est choisie de manière à avoir un nombre suffisant d'événements de translocation (flashes lumineux sur les vidéos de microscopie) pour pouvoir les distinguer nettement (typiquement une centaine par vidéo); la pression reste la même pour toute la durée de l'expérience.

Bien que très semblables en apparence, les relations 1.6 et 1.7 diffèrent par le fait que la première utilise des paramètres estimés par ajustement avec le modèle de succion, alors que la seconde se base sur des mesures expérimentales sans recours à un ajustement des données. Par conséquent, il est possible de mesurer avec une bonne précision le rendement du ratchet Y en une seule et même expérience grâce à la relation 1.7 : le premier point (sans polycations) sert de référence et les points suivants (avec polycations en concentration variable) se comparent à ce point de référence. De cette manière, les mesures s'émancipent de l'état local de la membrane puisque toutes les mesures sont réalisées sur le même échantillon. Le seul paramètre variable de l'expérience est la concentration en polycations, donc toute évolution de la fréquence de translocation peut-être imputée au mécanisme du ratchet.

1.2.3 Protocole expérience à pression fixe

Nous avons employé le protocole suivant pour la réalisation de l'expérience de translocation à pression fixe et concentration en polycations variable :

- Injecter 100 μL d'une solution d'ADN λ à une concentration de 4,9 nM (en équivalent phosphates) dans un mélange Tris-KCl (10 mM) et EDTA (1 mM) à pH 7,6. L'ADN λ a été préalablement marqué au YOYO-1 (3,0 nM) (Fig.1.1A).
- Injecter 500 μL de solution Tris-KCl (10 mM) et EDTA (1 mM) dans la chambre inférieure, puis déposer la chambre supérieure sur la chambre inférieure afin d'assurer le mouillage des nanopores (Fig.1.1A).
- Appliquer une pression "médiane" avec le contrôleur de pression (de l'ordre de la moitié de la pression critique; avec des nanopores de 50 nm de diamètre, nous

appliquons en général une pression de 50 mbar). Comme nous l'avons détaillé précédemment, la pression choisie ici n'a pas d'influence sur la mesure de Y , il faut simplement la choisir de manière à avoir une statistique suffisante d'événements de translocation (généralement une centaine de flashes lumineux par vidéo) (Fig.1.7).

- Faire la mise au point de l'objectif sur la surface métallique de la membrane à l'aide de la lampe de fluorescence ; une fois cette étape réalisée, passer au laser 473 nm (Fig.1.7).
- Réaliser quelques acquisitions de vidéos (au moins 4 de 250 frames à 33 fps, de manière à limiter les fluctuations statistiques sur la mesure de la fréquence de translocation) (Fig.1.7).
- Couper le laser 473 nm, défocaliser l'objectif pour l'éloigner de la lamelle de verre (afin d'éviter d'endommager l'objectif durant les manipulations qui vont suivre dans la chambre inférieure). Ne pas couper la pression. Sortir la chambre supérieure de son support sur la chambre inférieure tout en la maintenant à sa verticale (pour éviter les pertes de solution hors de la chambre inférieure en cas de gouttes de solution restées sur la chambre supérieure) (Fig.1.7).
- Injecter dans la chambre inférieure quelques μL de solution de polycations (ici du PEI) à une concentration donnée ; nous prenons en général un volume d'injection de 1 μL . Homogénéiser la solution dans la chambre inférieure par pipetage. Re-positionner la chambre supérieure sur son support dans la chambre inférieure. Patienter au moins 30 s avant de réaliser des acquisitions pour laisser au système le temps de se relaxer (Fig.1.7).
- Répéter le processus d'acquisition pour chaque concentration en polycations désirée (Fig.1.7).

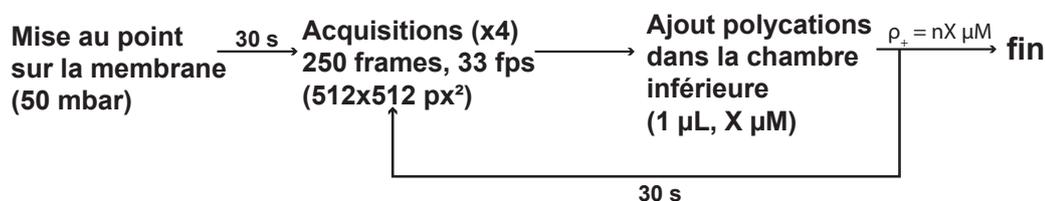


FIGURE 1.7 – Protocole de l'expérience de translocation à concentration en polycations variable et pression fixe. La mise en place du bouchon contenant la solution d'ADN et la membrane nanoporeuse est similaire à celle de l'expérience de translocation à pression variable décrite dans la figure 1.1A.

1.2.4 Résultats

Nous avons donc employé le protocole précédent pour réaliser la mesure de la fréquence de translocation en fonction de la concentration en polycations à pression fixe, nous permettant d'obtenir une estimation du rendement du ratchet Y par la relation 1.7. Les résultats de ces mesures sont présentées dans la figure 1.8.

La figure présente une comparaison des deux méthodes d'évaluation du rendement du ratchet Y : 1) mesure de la fréquence de translocation en fonction de la pression à

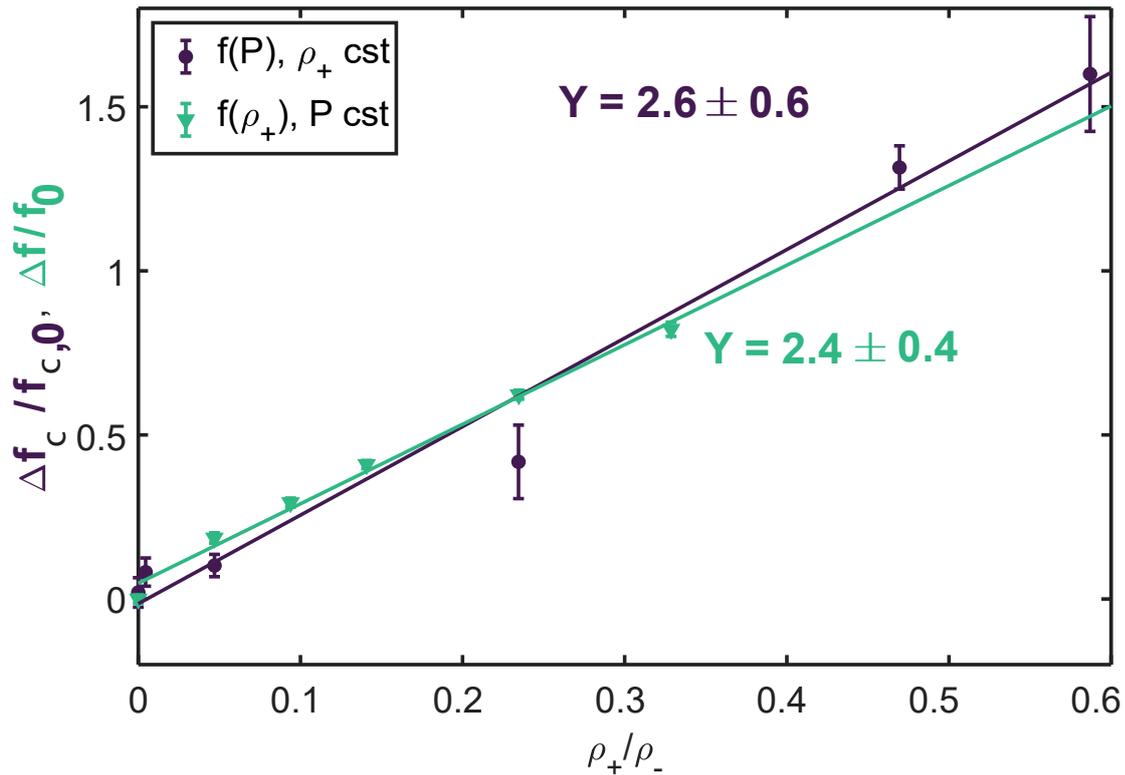


FIGURE 1.8 – Gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet en fonction du ratio de charges par deux méthodes : 1) pression variable, concentration en PEI fixe ; 2) concentration en PEI variable, pression fixe. Les données expérimentales sont ajustées par une régression linéaire et le rendement de ratchet Y est ensuite mesuré comme la pente de la droite. L'incertitude sur les données expérimentales est prise comme l'erreur standard (95%) et celle sur Y est mesurée par une méthode du jackknife (95%).

concentration en polycations fixe, puis mesure de l'évolution du paramètre de modèle f_c en fonction de ρ_+/ρ_- d'après la relation 1.6; 2) mesure de la fréquence de translocation en fonction de la concentration en polycations à pression fixe, puis mesure directe de Y d'après la relation 1.7. Nous définissons les notations suivantes : $\Delta f_c/f_{c,0} = (f_{c,\rho_+} - f_{c,0})/f_{c,0}$ et $\Delta f/f_0 = (f_{\rho_+} - f_0)/f_0$, en reprenant les notations des équations 1.6 et 1.7. $\Delta f_c/f_{c,0}$ et $\Delta f/f_0$ représentent tous deux le gain de fréquence de translocation apporté par le mécanisme de ratchet ; ce paramètre est linéaire avec le ratio de charges ρ_+/ρ_- , avec Y comme coefficient de proportionnalité. D'après la figure 1.8, nous observons une très bonne similitude dans les résultats obtenus pour la mesure de Y par les deux méthodes : respectivement $Y = 2,6 \pm 0,6$ et $Y = 2,4 \pm 0,4$. Comme nous l'avions anticipé, la méthode de mesure de Y par l'expérience de translocation à concentration de polycations variable et pression fixe est la plus précise, car toutes les mesures s'effectuent sur le même échantillon de membrane, ce qui limite les fluctuations liées à l'état de surface de la membrane. De plus, cette méthode est beaucoup plus rapide à mettre en oeuvre car il n'est pas nécessaire de tracer la courbe de fréquence de translocation en fonction de la pression. Dans la suite de cette étude, nous emploierons par défaut cette méthode pour mesurer Y (sauf exceptions, qui seront alors clairement précisées).

1.3 Rendement de ratchet Y selon l'agent de ratchet

Après avoir établi la relation linéaire entre le gain en fréquence de translocation par mécanisme de ratchet et la concentration en polycations via le rendement de ratchet Y, nous avons étudié l'influence de l'espèce chimique choisie comme agent de ratchet sur Y. A travers cette étude, nous avons souhaité mettre en lumière la spécificité de l'agent de ratchet sur la réussite du mécanisme de ratchet de translocation.

Pour cela, nous avons réalisé des expériences de translocation à pression fixe et concentrations en polycations variables, afin de mesurer le rendement de ratchet Y pour différents agents de ratchet. Nous avons sélectionné les espèces chimiques suivantes comme agents de ratchet :

- polyéthylèneimine (PEI), M. w. 60 000 g/mol (déjà utilisé dans les expériences précédentes) ;
- poly-L-ornithine (PLO), M. w. 147 000 g/mol ;
- poly-L-arginine (PLR), M. w. 146 000 g/mol ;
- poly-L-lysine (PLL), M. w. (150 000-300 000) g/mol ;
- spermidine (SPD).

Parmi ces espèces, seule la spermidine n'est pas un polymère ; nous l'avons choisie pour cette étude car cette molécule est connue pour sa capacité à condenser l'ADN, par conséquent elle dispose d'une forte affinité pour l'ADN ($K_d \simeq 7 \mu\text{M}$)[397, 398, 399]. La spermidine dispose de 3 charges positives à pH physiologique, contre une par monomère pour les autres espèces chimiques. Les structures moléculaires de ces agents de ratchet sont présentées dans la figure 1.11.

Les expériences ont été réalisées avec le protocole décrit dans la partie 1.2.3. Il est important de noter que l'utilisation du ratio de charges ρ_+/ρ_- permet de s'affranchir de la contrainte liée aux nombres de charges variables selon les molécules en raison de leurs degrés de polymérisation différents. Avec le ratio de charges, nous comparons uniquement le

nombre de charges en solution avec une approximation de champ moyen (nous négligeons le caractère polymérique des espèces). Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 1.9.

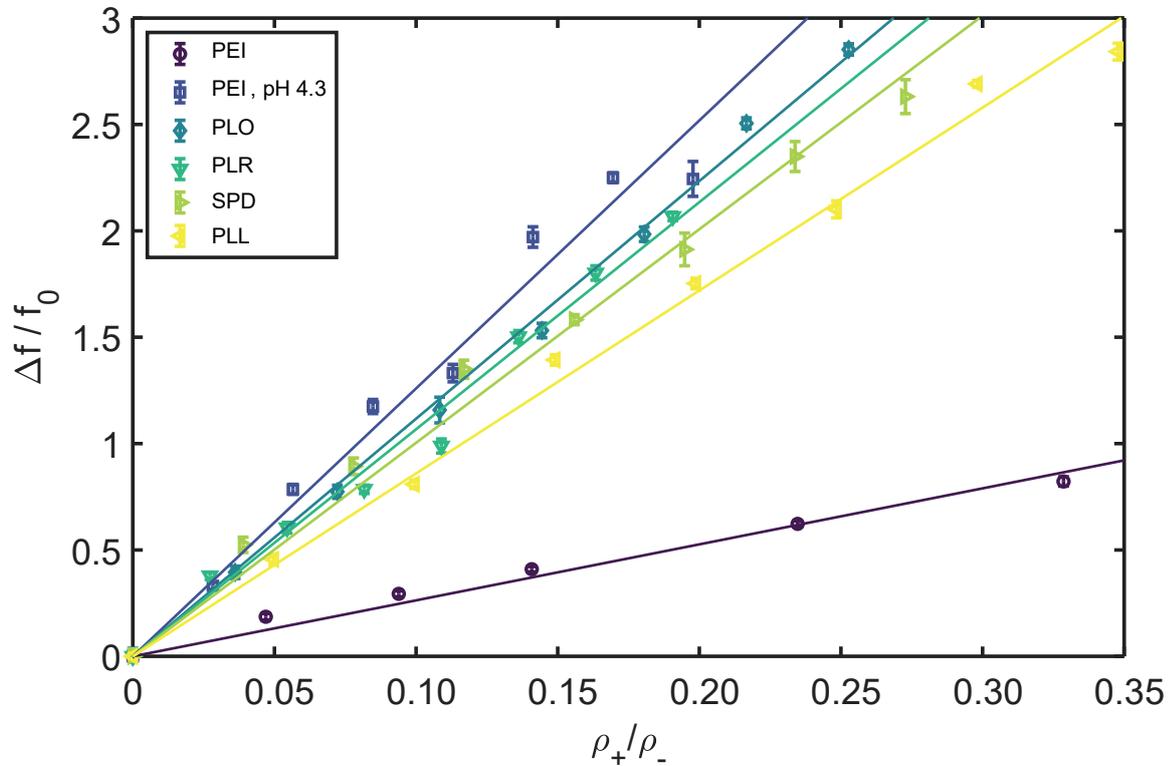


FIGURE 1.9 – Gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet en fonction du ratio de charges pour différents agents de ratchet. Les données sont ajustées par régression linéaire pour mesurer Y (pente) pour chaque agent de ratchet. L'incertitude sur les données est prise comme l'erreur standard (95%). Pour chaque condition, l'expérience est répétée au minimum 4 fois.

A partir des résultats de la figure 1.9, nous mesurons pour chaque agent de ratchet le rendement de ratchet Y qui lui est associé ; ces mesures sont résumées dans le tableau 1.3.

D'après les résultats présentés dans la figure 1.9, nous observons que la relation linéaire entre le gain de fréquence par mécanisme de ratchet $\Delta f / f_0$ et le ratio de charges se vérifie pour tous les polycations testés : pour chaque série de données, l'ajustement par régression linéaire est quantitatif. Ainsi, il apparaît que le rendement de ratchet Y est un paramètre essentiel du mécanisme de ratchet de translocation. Ensuite, lorsque nous mesurons Y pour chaque polycation (voir tableau 1.3), nous pouvons observer un fort regroupement des valeurs expérimentales, à l'exception du PEI à pH 7,6 ; pour ce dernier, nous expliquons l'écart par la protonation partielle du polymère à pH physiologique. Il a été montré [390] que 44% seulement des monomères du PEI sont chargés à pH physiologique ; ce ratio est dépendant de la force ionique de la solution ainsi que de la ramification du polymère. Pour le calcul du ratio de charges expérimental, nous avons considéré une protonation complète, c'est pourquoi nous pensons que l'estimation du ratio de charge pour le PEI à

Agent de ratchet	Y (95%)
PEI	$2,4 \pm 0,4$
PEI (pH 4,3)	$8,6 \pm 1,0$
PLO	$12,4 \pm 0,6$
PLR	$11,6 \pm 1,4$
SPD	$10,2 \pm 0,8$
PLL	$9,2 \pm 0,8$

TABLE 1.3 – Rendement du ratchet Y pour différents agents de ratchet. Ces mesures proviennent des régressions linéaires présentées dans la figure 1.9 et les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife (95%).

pH physiologique est incorrecte et pourrait expliquer l'écart que nous observons pour la mesure de Y par rapport aux autres polycations. Pour nous en assurer, nous avons réalisé l'expérience de translocation à pression fixe et concentration de PEI variable en acidifiant le pH de la solution (4,3 au lieu de 7,6 précédemment). Le résultat de cette expérience est observable sur la figure 1.9B. Avec un pH acide, nous retrouvons pour le PEI une valeur de Y proche de celles mesurées sur les autres polycations, ce qui semble confirmer l'hypothèse précédente sur la protonation partielle du PEI à pH physiologique.

Le cas spécial du PEI étant clarifié, nous pouvons conclure que la mesure de Y pour les différents polycations testés dans cette étude nous amène à penser que le rendement de ratchet est non-spécifique (ou faiblement) de l'espèce chimique considérée pour l'agent de ratchet. La relation de proportionnalité observée entre $\Delta f/f_0$ et ρ_+/ρ_- semble indiquer que le mécanisme de ratchet de translocation est seulement sensible à la charge de l'agent de ratchet et que c'est l'attraction électrostatique entre les charges positives du polycation et les groupements phosphates du squelette carboné de l'ADN qui produit l'effet de ratchet, indépendamment de la nature chimique des monomères. Cette interaction électrostatique est non-spécifique, ce qui expliquerait la non-spécificité de la valeur du rendement de ratchet Y. Ce paramètre apparaît comme une caractéristique générale du mécanisme de ratchet de translocation. Nous pouvons donc étudier les dépendances du processus de ratchet de translocation avec les différents paramètres cinétiques et géométriques par simple observation de leurs relation avec le rendement de ratchet Y.

1.4 Relation entre le rendement de ratchet Y et la constante de dissociation K_d

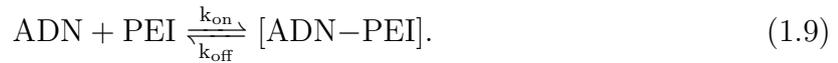
Après avoir établi la pertinence de la mesure du rendement de ratchet Y pour l'étude des caractéristiques du ratchet de translocation, nous avons étudié sa dépendance avec la constante de dissociation K_d entre l'ADN λ et les différents polycations utilisés dans cette étude comme agents de ratchet. La constante de dissociation constitue un paramètre cinétique essentiel pour décrire la dynamique d'interaction entre l'ADN et son agent de ratchet. Dans le modèle du ratchet de translocation développé par Simon, Peskin, Odell et Oster[59, 60] (détaillé dans la section 1.3.2), la vitesse de translocation induite par le

mécanisme de ratchet évolue avec la constante de dissociation de la manière suivante :

$$v_{rat} = \frac{2D}{\delta} \times \frac{1}{1 + 2K_d} \quad (1.8)$$

Nous pouvons relier la vitesse du ratchet à la fréquence de translocation mesurée expérimentalement dans nos expériences par une simple relation linéaire, $f \propto v_{rat}$, d'où nous pouvons tirer la relation $f \propto (1 + 2K_d)^{-1}$.

K_d est une mesure à l'équilibre de la répartition entre les espèces liées et non-liées (à savoir les complexes [ADN-PEI] et les ADNs libres en solution) ; K_d dépend de l'équilibre entre les deux formes (liée et non-liée), gouvernées par les taux de transitions k_{on} et k_{off} passant de l'une à l'autre :



A partir de l'équation 1.9, nous définissons la constante de dissociation K_d de la manière suivante :

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[ADN]_{eq} \cdot [PEI]_{eq}}{[[ADN - PEI]]_{eq}}, \quad (1.10)$$

en considérant les concentrations à l'équilibre thermodynamique.

A l'équilibre thermodynamique, nous pouvons exprimer la proportion de molécules d'ADN liées à celles de PEI à partir des concentrations initiales en ADN et PEI $[ADN]_0$ et $[PEI]_0$ et de la constante de dissociation K_d :

$$[[ADN - PEI]]_{eq} = \frac{1}{2} \left(([ADN]_0 + [PEI]_0 + K_d) - \left(([ADN]_0 + [PEI]_0 + K_d)^2 - 4 \times [ADN]_0 \cdot [PEI]_0 \right)^{1/2} \right) \quad (1.11)$$

D'après la relation 1.11, en titrant le complexe $[ADN - PEI]$ à plusieurs concentrations initiales en PEI et à concentration en ADN fixe, il est possible d'en extraire une estimation de la constante de dissociation. Pour cela, diverses techniques sont employées, comme le titrage calorimétrique isotherme (isothermal titration calorimetry, ITC) ou la thermophorèse à micro-échelle (microscale thermophoresis, MST). C'est cette dernière que nous avons choisie pour mesurer les constantes de dissociation entre l'ADN λ et les divers polycations utilisés comme agents de ratchet. Une description complète de cette technique est développée dans la partie 2.

Dans le cas d'un agent de ratchet, il est raisonnable de penser que la constante de dissociation est faible (de l'ordre du nM- μ M), l'association entre l'agent de ratchet et le substrat en translocation étant favorisée pour induire un effet de ratchet.

Dans ce schéma, si la durée de la translocation est du même ordre de grandeur que les durées d'association/dissociation du complexe [ADN-PEI] k_{on}^{-1} et k_{off}^{-1} , il est possible que la dépendance de la fréquence de translocation avec la constante de dissociation n'apparaisse pas dans nos mesures en raison du caractère hors-équilibre de notre système. En effet, dans une telle situation, la liaison entre l'agent de ratchet et le substrat atteint l'équilibre thermodynamique bien après la fin de la translocation, lorsque le substrat est déjà loin de la sortie des nanopores. Dans ces conditions, le ratchet de translocation se comporte comme un ratchet parfait, c'est-à-dire avec un liaison irréversible de l'agent de ratchet sur le substrat telle que $K_d = 0$.

Dans un régime limite où la durée de translocation serait très inférieure aux temps caractéristiques k_{on}^{-1} et k_{off}^{-1} , l'agent de ratchet n'aurait en moyenne pas le temps de se lier au substrat avant que celui-ci ne termine sa translocation, rendant caduque un mécanisme de ratchet brownien. Nous pouvons supposer qu'un tel régime se présente avec un forçage important, lorsque l'advection du polymère par le forçage est très supérieure à sa diffusion, soit $P \gg P_c$ dans le cas d'un forçage hydrodynamique. Ce régime ne nous permettant pas d'observer le mécanisme de ratchet de translocation, nous nous placerons dans nos expériences à des pressions inférieures à la pression critique.

Enfin, dans le cas inverse, lorsque la durée de translocation est très supérieure à celle des temps caractéristiques k_{on}^{-1} et k_{off}^{-1} , la liaison entre l'agent de ratchet et le substrat atteint l'équilibre thermodynamique bien avant la fin de la translocation. Ainsi, l'effet de la constante de dissociation sur la fréquence de translocation est observable et devrait évoluer selon la relation $f \propto (1 + 2K_d)^{-1}$, conformément au modèle du ratchet de translocation imparfait. L'observation de ce régime nécessite une dynamique d'association et dissociation très rapide entre l'agent de ratchet et le substrat ou un forçage faible. Le premier cas dépend exclusivement du couple agent de ratchet/substrat. Dans le second cas, un forçage faible ($P \ll P_c$) voit la probabilité du substrat de pénétrer dans le nanopore diminuer exponentiellement selon la relation $f \propto \exp(-P_c/P)$ (voir section 3.3.4). L'observation de ce régime devient alors limitée expérimentalement par une statistique réduite des événements de translocation.

Après discussion de ces différents régimes, il apparaît qu'un régime de forçage modéré, où la pression hydrodynamique est de l'ordre de la pression critique ($P \simeq P_c$), semble optimal pour l'observation du mécanisme de ratchet de translocation et de la dépendance de la fréquence de translocation avec la constante de dissociation K_d .

1.4.1 Mesures de K_d par MST

Pour comparer les évolutions relatives du rendement du ratchet Y et de la constante de dissociation K_d entre l'ADN λ et les différents polycations, nous avons utilisé une technique de MST. Voici le protocole pour ces expériences (Fig.1.10) :

- Préparer une solution d'ADN λ à une concentration de 2 μM (en équivalent phosphates) dans une solution de Tris-KCl (10 mM) et EDTA (1 mM) à pH 7,6 (25°C) ; ajouter du YOYO-1 en solution avec l'ADN λ de manière à avoir une concentration en YOYO-1 de 2 μM . Laisser incuber sur glace au moins 20 minutes de manière à établir un équilibre pour l'association du YOYO-1 dans la double hélice d'ADN.
- Avec la solution d'ADN, préparer des solutions mélanges d'ADN et de polycations, avec une concentration de 1 μM en ADN et des concentrations variables en polycations. Remplir les capillaires de MST avec ces solutions. Laisser incuber la solution dans les capillaires à température ambiante au moins 5 minutes, de manière à atteindre une concentration homogène en solution le long du capillaire.
- Démarrer les mesures de MST (voir la partie 2 pour les détails de ces mesures).

La figure 1.11 présente les résultats de ces mesures.

Lors de ces expériences, nous avons observé un phénomène de quenching de la fluorescence par ajout de polycations en solution, à l'exception de la spermidine. Il semblerait que la liaison des polymères sur l'ADN entre en compétition avec l'association du YOYO-1

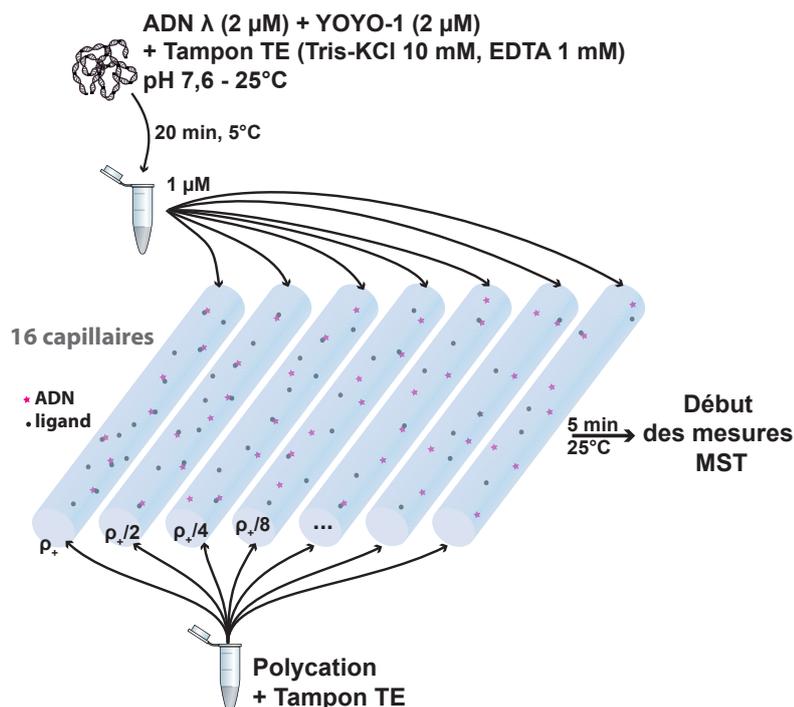


FIGURE 1.10 – Protocole des mesures de MST - préparatifs des expériences.

dans la double hélice, provoquant ainsi une réduction de la fluorescence. Ce phénomène a déjà été observé lors de précédentes études [400, 401, 402, 403, 404]. Nous pouvons cependant nous servir de cette baisse d'intensité pour titrer les complexes $[\text{ADN} - \text{polycation}]$ et ainsi accéder à une mesure de la constante de dissociation K_d , la réduction d'intensité lumineuse pouvant être directement reliée à la proportion de molécules d'ADN associées à des polymères. Nous mesurons donc la fluorescence initiale, c'est-à-dire avant l'application du laser IR et le processus de thermophorèse associé, en fonction de la concentration en polycations (exprimée en ratio de charges). Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 1.11A. Pour une meilleure lisibilité, nous avons normalisé l'intensité par sa valeur maximale (en absence de polycations). Avec cette normalisation, la mesure de la constante de dissociation K_d correspond simplement au ratio de charges pour lequel l'intensité vaut la moitié de sa valeur maximale.

Comme dit précédemment, nous avons observé cette réduction d'intensité lumineuse pour tous les polycations à l'exception de la spermidine. En effet, pour cette espèce chimique, l'intensité lumineuse initiale n'est pas affectée par la présence ou non de spermidine en solution, dans la gamme de concentrations utilisée dans cette étude. Nous proposons deux hypothèses pour expliquer cette différence par rapport aux autres polycations :

- la gamme de concentration est trop basse par rapport à la valeur du K_d , donc aucune liaison entre ADN et spermidine n'est observée. Cette hypothèse semble néanmoins peu probable puisque nous avons réussi à mesurer correctement une valeur de K_d par la technique de MST, comme nous le verrons un peu plus bas.
- la spermidine n'est pas un polymère, contrairement aux autres espèces chimiques utilisées dans cette étude comme agents de ratchet. L'association entre un polymère et une molécule d'ADN entraîne des contraintes mécaniques sur la chaîne carbonée

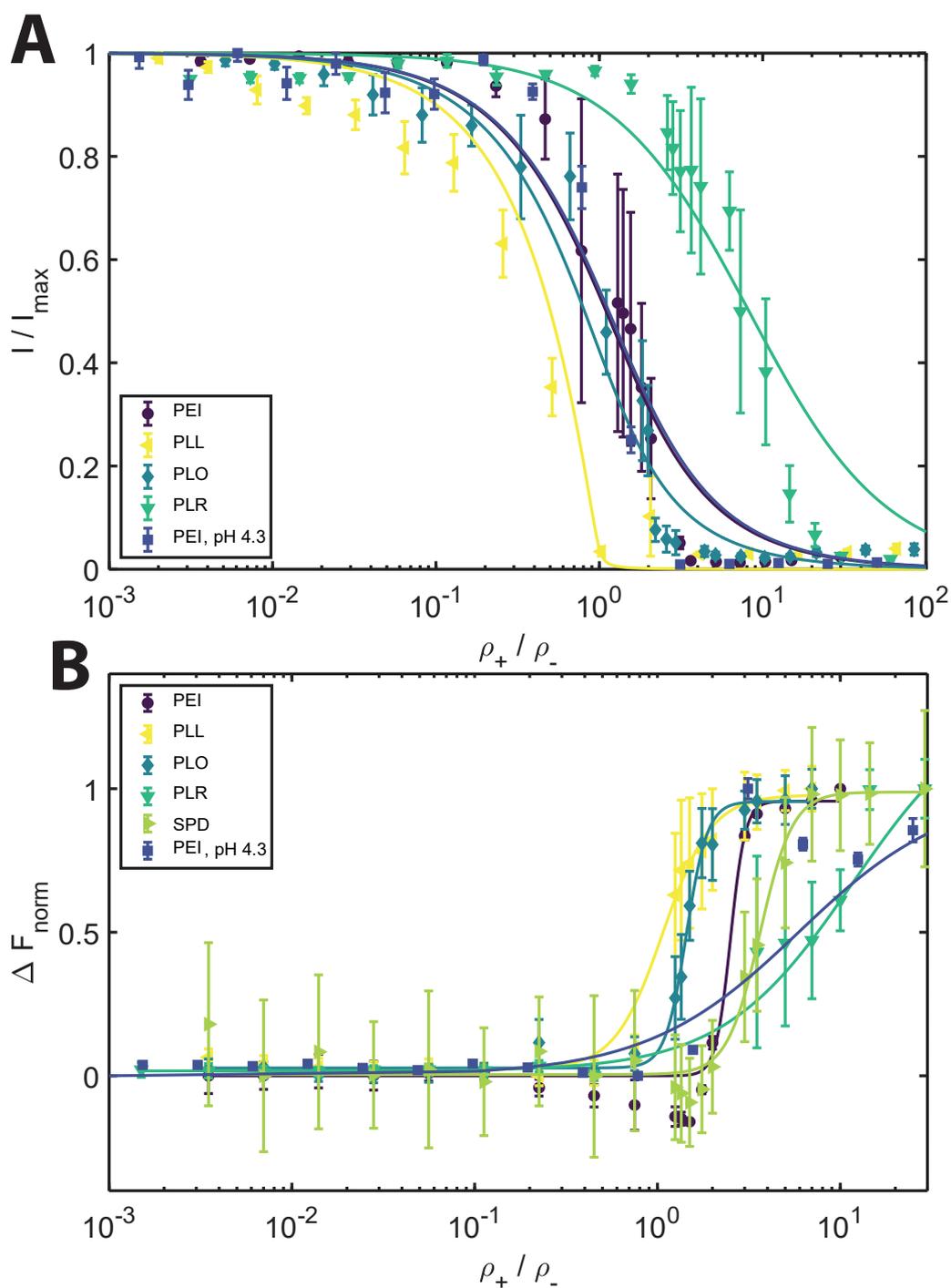


FIGURE 1.11 – A. Intensité de fluorescence initiale (avant thermophorèse) normalisée par sa valeur maximale en fonction du ratio de charge pour différents polycations. B. Perte relative de fluorescence après thermophorèse normalisée par sa valeur maximale pour différents polycations. Les données expérimentales sont ajustées (en traits pleins) selon les relations (2.9) et (2.12), puis nous mesurons la constante de dissociation K_d à partir de ces ajustements. L'incertitude sur les données expérimentales est prise comme l'erreur standard (95%) et les expériences sont répétées au moins 4 fois.

de l'ADN du fait de la nature polymérique du ligand ; ces contraintes peuvent entraîner la désorption du YOYO-1 intercalé dans la double hélice et très sensible à la conformation de la molécule d'ADN, provoquant ainsi la réduction de la fluorescence[405, 406]. Cet effet ne se retrouve pas avec la spermidine du fait de sa taille comparable à celle d'une base d'ADN, entraînant donc des contraintes mécaniques moins fortes par adsorption.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 1.11A., la fluorescence est très sensible à la présence de polycations en solution, ce qui permet une mesure précise de la constante de dissociation K_d . Le tableau 1.4 présente les mesures de K_d par réduction de fluorescence d'après un ajustement des courbes présentées dans la figure 1.11A.

Agent de ratchet	K_d (μM) (95%)	
	par quenching	par MST
PEI	$1,5 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,8$
PEI (pH 4,3)	$0,6 \pm 0,2$	$11,8 \pm 1,5$
PLO	$0,5 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,4$
PLR	$7,4 \pm 2,1$	$14,8 \pm 3,2$
SPD	-	$7,3 \pm 0,8$
PLL	$0,4 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,4$

TABLE 1.4 – Constantes de dissociation pour l'ADN λ et les différents polycations utilisés dans l'étude comme agents de ratchet, par deux méthodes de détermination : 1) par quenching de la fluorescence initiale (sauf pour la spermidine) ; 2) par MST. Les incertitudes sont obtenues par méthode du jackknife sur les ajustements des données expérimentales (95%).

Nous constatons que les valeurs de K_d mesurées sont très proches de l'unité (en ratio de charges), à l'exception de la poly-L-arginine (PLR). De plus, ces mesures sont faiblement dispersées. Ces deux observations nous laissent penser que l'interaction entre une molécule d'ADN et un polycation est peu-spécifique de la nature chimique du polycation et se fait essentiellement par interaction électrostatique (en raison du ratio de charges proche de l'unité pour la valeur de K_d). Cette hypothèse est cohérente avec les observations réalisées pour les mesures du rendement de ratchet γ peu spécifiques de la nature chimique de l'agent de ratchet considéré. Concernant la poly-L-arginine, nous n'avons pas d'explication satisfaisante pour la variation de son K_d vis-à-vis des autres espèces ; cela pourrait peut-être venir de l'encombrement stérique plus important au niveau de son groupement amine protoné (voir la figure 1.9A.) et qui limiterait l'adsorption du monomère sur la chaîne carbonée de l'ADN.

Après avoir observé l'évolution de la fluorescence initiale, nous pouvons étudier la réduction de fluorescence par effet thermophorétique après application du laser IR (effet MST). Ici, nous comparons les variations relatives de fluorescence ΔF à l'état stationnaire pendant l'irradiation IR par rapport à la fluorescence initiale, ces variations étant dues à l'établissement d'un gradient de concentration dans la zone d'irradiation IR par thermophorèse (effet décrit dans la section 2). Nous mesurons cette variation relative ΔF à différentes concentrations en polycation, puis ces mesures sont normalisées d'après leurs valeurs maximales et minimales de manière à être comprises entre 0 et 1 (0 correspondant

à une absence de variation par rapport à la condition sans polycations, 1 à une variation maximale). Les résultats de ces mesures sont présentées dans la figure 1.11B.

Du fait de la réduction de fluorescence initiale (quasi nulle en excès de polycations) décrite précédemment, nous n'avons qu'une faible précision sur la mesure de variation de la fluorescence par thermophorèse ΔF pour les mesures avec polymères (c'est-à-dire toutes sauf pour la spermidine). Ainsi, les mesures de K_d par MST pour les polymères ne nous semblent pas les plus pertinentes, bien que nous retrouvions, en ordre de grandeur, les valeurs de K_d précédemment mesurées par réduction de la fluorescence initiale (voir tableau 1.4). Par conséquent, dans la suite de cette étude, nous considérerons pour les polymères leur constante de dissociation mesurée par réduction de la fluorescence initiale.

En ce qui concerne la spermidine (SPD), nous pouvons observer sur la figure 1.11B. une courbe suffisamment détaillée pour pouvoir mesurer en bonne approximation une valeur de K_d de $(7,3 \pm 0,8) \mu\text{M}$ (95%); cette valeur est comparable à celle pour la poly-L-arginine et légèrement plus haute que celles pour les autres polycations. Comme pour la poly-L-arginine, nous n'avons pas d'explication claire pour justifier cette différence; il est néanmoins possible que la trivalence de la spermidine pour une molécule d'une taille comparable à celle d'une base d'ADN modifie la stabilité de l'interaction électrostatique entre la spermidine et l'ADN, conduisant à une valeur légèrement plus haute pour la constante de dissociation. Pour la suite de cette étude, nous considérerons pour la spermidine la valeur de constante de dissociation mesurée par MST (étant la seule disponible).

1.4.2 Rendement de ratchet Y en fonction de K_d

Après avoir mesuré les constantes de dissociation K_d entre l'ADN λ et les polycations utilisés comme agents de ratchet, nous pouvons comparer leurs évolutions relatives avec le rendement du ratchet Y. La figure 1.12 présente les résultats de ces mesures.

Nous pouvons observer sur la figure 1.12 que le rendement du ratchet Y ne semble pas (ou peu) dépendant de la constante de dissociation K_d . Il faut toutefois noter que les gammes de variation à la fois pour Y et K_d sont assez faibles, donc nos observations sont valides pour la gamme de K_d présentée ici. Cette absence apparente de relation entre Y et K_d laisse supposer que le mécanisme de ratchet s'effectue sous contrôle cinétique et non pas thermodynamique : l'accélération de la fréquence de translocation par mécanisme de ratchet se produit dès l'association du polycation sur la molécule d'ADN sortant du nanopore sans attendre un équilibre pour cette association. La constante de dissociation K_d , comme explicité dans la relation 1.10, est une valeur prenant son sens à l'équilibre thermodynamique. Nous avons vu précédemment que le rendement du ratchet Y est une caractéristique essentielle du mécanisme de ratchet de translocation; par conséquent, si Y n'a pas de dépendance avec K_d , cela signifie que le ratchet de translocation s'effectue sous contrôle cinétique, et doit donc dépendre du taux d'association k_{on} entre la molécule d'ADN et le polycation (voir équation 1.9). Cette observation semble assez intuitive : les ratchets de translocation biologiques sont des exemples canoniques de systèmes hors-équilibre; il est donc assez logique que le ratchet de translocation artificiel créé dans cette étude suive des lois similaires, l'équilibre thermodynamique n'est jamais atteint, par définition même des systèmes hors-équilibre.

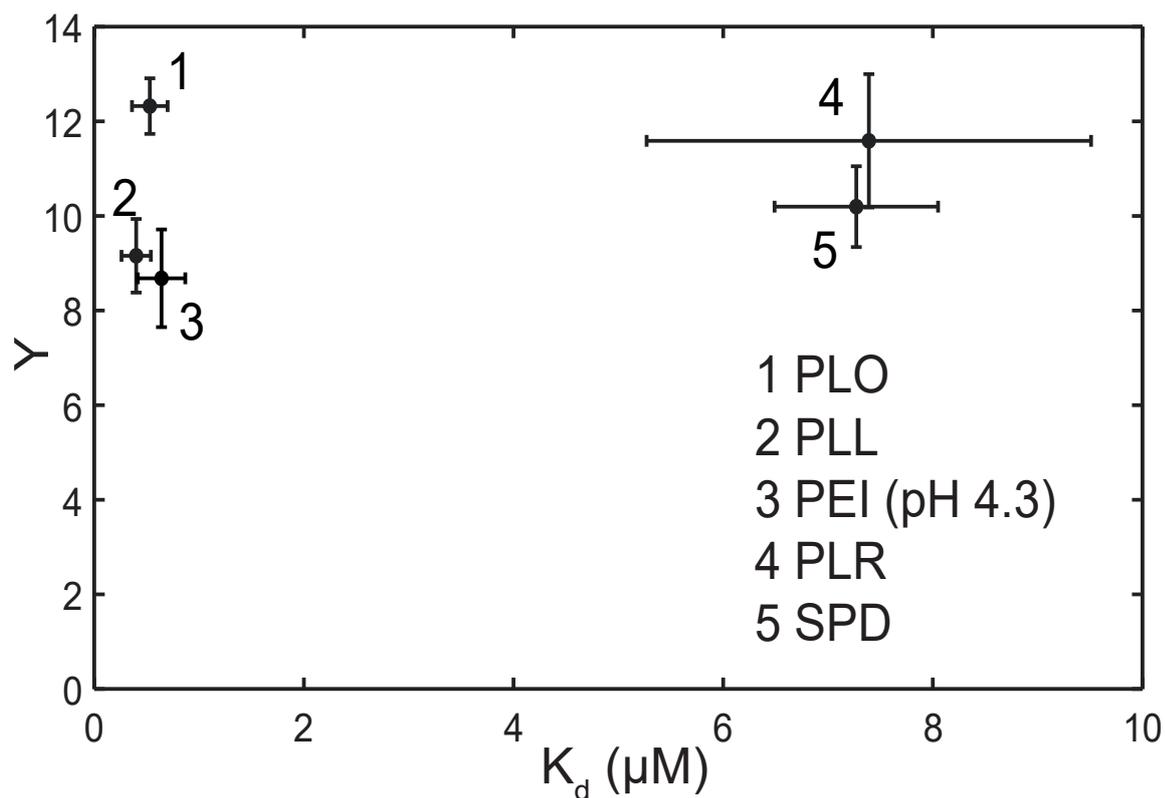


FIGURE 1.12 – Rendement du ratchet Y en fonction de la constante de dissociation K_d entre l'ADN λ et les différents polycations utilisés comme agents de ratchet. K_d est exprimée en μM (en équivalent de groupements amines). Les mesures de K_d ont été réalisées par une technique de Microscale Thermophoresis (MST), décrites dans la partie 2. Les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife (95%) sur les ajustements de la figure 1.9 pour les ordonnées et le tableau 1.4 pour les abscisses.

1.4.3 Modèle cinétique du ratchet de translocation

Pour décrire un mécanisme cinétique du ratchet de translocation basé sur nos observations précédentes, nous proposons de scinder le processus de translocation en deux étapes consécutives :

- La première étape consiste dans le confinement de la molécule d'ADN à l'entrée du nanopore. Cette étape s'effectue selon le modèle de succion décrit dans la partie 3.3.4 et il n'est pas nécessaire de prendre en compte la présence des polycations à la sortie des nanopores. En effet, à ce stade de la translocation, la molécule d'ADN est majoritairement située à l'entrée du nanopore où elle est déformée par le cisaillement de l'écoulement. Le modèle de succion donne la fréquence de réussite de passage de la barrière d'entrée du nanopore mais il reste encore à l'ADN à traverser intégralement le nanopore.
- La deuxième étape correspond à la traversée de l'ADN à travers le nanopore une fois la barrière d'entrée passée. La vitesse à laquelle la translocation s'effectue dépend de la présence ou non d'un polycation à la sortie induisant le mécanisme de ratchet : dans le cas où une portion d'ADN tout juste sortie du nanopore rencontre un polycation (probabilité p_{rat}), celui-ci va se lier à l'ADN par interaction électrostatique avec un taux d'association k_{on} (voir équation 1.9) et ainsi produire un mécanisme de ratchet accélérant la translocation du reste de la molécule d'ADN à une fréquence k_{rat} . Dans le cas inverse, où aucun polycation n'est présent à la sortie du nanopore (probabilité $p_{\overline{rat}} = 1 - p_{rat}$), l'ADN termine sa translocation sans mécanisme de ratchet à une fréquence $k_{\overline{rat}}$. Le mécanisme de ratchet accélérant la translocation, donc $k_{\overline{rat}} < k_{rat}$.

La figure 1.13 résume notre modèle cinétique en deux étapes.

Les deux étapes de notre modèle sont indépendantes l'une de l'autre, par conséquent, nous pouvons établir la fréquence de translocation de la manière suivante :

$$\begin{aligned}
 f &\propto f_{suc} \times (p_{\overline{rat}} \cdot k_{\overline{rat}} + p_{rat} \cdot k_{rat}) \\
 &\propto f_{suc} \times (k_{\overline{rat}} + p_{rat} (k_{rat} - k_{\overline{rat}})) \\
 &\propto f_{suc} \times k_{\overline{rat}} \times \left(1 + p_{rat} \left(\frac{k_{rat}}{k_{\overline{rat}}} - 1 \right) \right)
 \end{aligned} \tag{1.12}$$

Nous faisons l'hypothèse que la probabilité p_{rat} de trouver un polycation à la sortie des nanopores dépend linéairement de la concentration en polycation dans la chambre inférieure (dans la limite du régime dilué) ; cette hypothèse est étayée par nos observations expérimentales décrites à partir de la partie 1.2.4. Dans le cadre d'un contrôle cinétique de l'interaction entre l'ADN et le polycation, la probabilité pour l'ADN de trouver un polycation et de s'y lier dépend directement du nombre de polycations se trouvant à proximité de la sortie des nanopores, d'où la relation $p_{rat} \propto \rho_+$. De plus, toujours dans l'hypothèse d'un contrôle cinétique, p_{rat} doit s'exprimer en fonction du taux d'association k_{on} entre l'ADN et le polycation : plus ce taux est élevé, plus la liaison entre les deux espèces se forme rapidement, donc elle est plus probable. Nous ne détaillerons pas cette dépendance ici, n'ayant pas de données expérimentales pour tester cette dépendance. Ainsi, à partir des éléments précédents, nous pouvons établir l'expression suivante pour p_{rat} :

$$p_{rat} = p_{rat}^* (k_{on}) \times \frac{\rho_+}{\rho_-}, \tag{1.13}$$

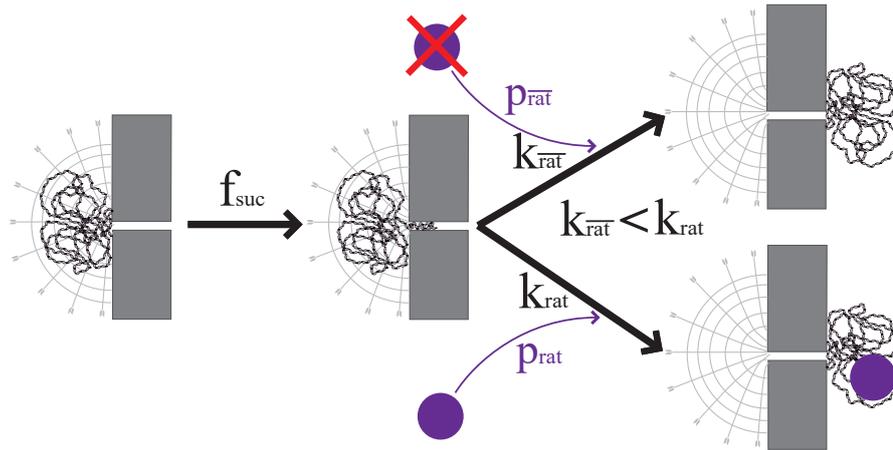


FIGURE 1.13 – Mécanisme cinétique pour le ratchet de translocation. Nous proposons un mécanisme en deux étapes successives : 1) La molécule d'ADN est capturée par le nanopore et est confinée à l'intérieur suivant le modèle de succion avec une fréquence f_{suc} . 2) Dès qu'une portion de la molécule d'ADN sort du nanopore, elle a une probabilité p_{rat} de rencontrer un polycation dans son environnement proche, auquel cas les deux espèces se lient par interaction électrostatique avec un taux d'association k_{on} , ce qui accélère la translocation du reste de la molécule d'ADN encore confinée dans le nanopore avec une fréquence k_{rat} . Dans le cas où la portion d'ADN ne rencontre pas de polycation à la sortie du nanopore (probabilité $p_{\overline{rat}} = 1 - p_{rat}$), la translocation du reste de la molécule d'ADN n'est pas accélérée et elle s'effectue avec une fréquence $k_{\overline{rat}}$. La probabilité p_{rat} de trouver un polycation à la sortie du nanopore est directement liée à la concentration en polycation : plus cette concentration est élevée, plus la densité de polycations à la sortie des nanopores est grande et par extension la probabilité de rencontre entre une portion de la molécule d'ADN et le polycation.

avec $p_{rat}^*(k_{on})$ une fonction de k_{on} et ρ_+/ρ_- le ratio de charges.

En injectant l'expression 1.13 dans l'équation 1.12, nous obtenons alors l'expression suivante pour la fréquence de translocation :

$$f \propto f_0 \times \left(1 + Y \times \frac{\rho_+}{\rho_-} \right), \quad (1.14)$$

avec f_0 la fréquence de translocation en absence de polycations à la sortie des nanopores et Y le rendement du ratchet précédemment introduit dans la partie 1.2.2, pour lequel nous pouvons donner une expression plus détaillée selon l'équation précédente :

$$Y = p_{rat}^*(k_{on}) \times \left(\frac{k_{rat}}{k_{rat}^-} - 1 \right). \quad (1.15)$$

La relation 1.14 nous permet de retrouver analytiquement la relation de proportionnalité entre le gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet et le ratio de charges, mise en évidence dans la figure 1.8. De plus, avec l'expression 1.15 pour le rendement du ratchet Y, nous avons mis en lumière l'influence du ratchet de translocation sur l'étape de traversée et sortie de l'ADN déjà confiné dans le nanopore ; le mécanisme de ratchet n'abaisse pas la barrière d'entrée du nanopore (d'où les effets négligeables observés sur la pression critique), mais il accélère le transport de l'ADN dans le nanopore. Le rendement du ratchet, d'après son expression 1.15, correspond alors au ratio des fréquences de traversée de l'ADN à travers le nanopore respectivement en présence et absence de polycations à la sortie des nanopores.

1.5 Rendement de ratchet Y en fonction de la taille du nanopore

Le premier paramètre géométrique d'intérêt pour notre étude est le rayon du nanopore. Celui-ci définit le régime de confinement du polymère (voir section 3.2) ; en particulier, si le diamètre est inférieur à la longueur de persistance du polymère, alors le régime de confinement est celui d'Odijk et le polymère forme des segments droits dans le nanopore ; dans l'autre cas, le régime de confinement est celui de de Gennes et le polymère forme des blobs. Dans notre étude, nous avons utilisé des nanopores d'un rayon compris entre 25 et 100 nm ; avec une longueur de persistance de 50 nm pour la molécule d'ADN, ces tailles de nanopores placent le confinement dans un régime intermédiaire entre celui d'Odijk et de de Gennes. Auger *et coll.*[299, 304] ont montré que le modèle de succion, qui considère un régime de de Gennes, est applicable même dans ce régime limite de confinement.

Pour étudier l'influence du rayon du nanopore sur le rendement du ratchet Y, nous avons réalisé des expériences de translocation à pression variable dans deux conditions distinctes : en absence de polycations (ratchet -) et en présence de polycations à ratio de charges $\rho_+/\rho_- = 0,5$ (ratchet +). Le polycation utilisé pour l'étude était du PEI et nous avons appliqué un protocole semblable à celui décrit dans la section 1.1.1.

Pour faire varier le rayon des nanopores, nous avons employé des membranes track-etched (Whatman Nucleopore) en polycarbonate de rayon variable : 25 nm, 40 nm, 50 nm et 100 nm. Toutes les membranes à part celles de 100 nm ont une épaisseur de 6 μm ; celles

de 100 nm ont une épaisseur de 10 μm . Cette différence peut se révéler être une source de bruit supplémentaire pour des comparaisons de résultats entre les membranes de 100 nm de rayon et les autres. N'ayant pas d'autres gammes d'épaisseur de membrane, nous n'avons pas pu quantifier cet effet en fonction de l'épaisseur de la membrane. Cependant, comme nous le verrons dans la suite, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les membranes de 100 nm de rayon et les autres, laissant supposer que la différence d'épaisseur ne joue qu'un rôle négligeable dans l'efficacité du ratchet de translocation. Pour aller plus loin dans cette analyse, nous proposons que l'effet de la longueur du nanopore (c'est-à-dire l'épaisseur de la membrane) ne joue pas de rôle durant l'étape d'entrée du polymère dans le nanopore, modélisée par le modèle de succion, dans le cadre du modèle que nous avons proposé dans la section 1.4.3. En revanche, cette longueur est susceptible de modifier la durée de la seconde étape de notre modèle cinétique, correspondant à la traversée du polymère confiné à travers le nanopore et son éjection du côté trans de la membrane. On peut aisément penser qu'une longueur de nanopore plus grande entraîne une durée plus longue de translocation, que le polymère soit entraîné par l'écoulement ou qu'il diffuse dans le pore.

Pour chaque condition, nous avons répété les expériences un minimum de 4 fois. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 1.14A.

Nous pouvons observer sur la figure 1.14A. que la fréquence de translocation évolue avec la pression hydrodynamique imposée selon le modèle de succion quel que soit le rayon des nanopores, ce qui rejoint les observations réalisées par Auger *et coll.*[299, 304]. Cette tendance est également observée pour les conditions avec PEI. A partir de ces mesures, nous pouvons en tirer une estimation de la pression critique P_c et la fréquence à la pression critique f_c pour chaque série de mesures à partir du modèle de succion. Les résultats de ces estimations sont résumés dans le tableau 1.5.

Rayon (nm)	ratchet -		ratchet +	
	P_c (mbar)	f_c (10^{-5} s^{-1})	P_c (mbar)	f_c (10^{-5} s^{-1})
25	$85,1 \pm 1,1$	$47,6 \pm 1,4$	$103,1 \pm 0,6$	$109,4 \pm 1,7$
40	$11,9 \pm 0,2$	$69,7 \pm 2,3$	$13,3 \pm 0,6$	$98,1 \pm 2,1$
50	$5,6 \pm 0,2$	$21,0 \pm 1,6$	$5,8 \pm 0,4$	$23,9 \pm 3,8$
100	$0,22 \pm 0,01$	$9,7 \pm 0,7$	$0,17 \pm 0,02$	$10,1 \pm 1,8$

TABLE 1.5

L'évolution de la pression critique avec le rayon des nanopores est conforme à la prédiction du modèle de succion dans le cadre d'un nanopore cylindrique, pour lequel la résistance hydraulique R_{hyd} évolue comme $R_{hyd} \propto \eta R^{-4} L$, avec η la viscosité du fluide, L la longueur du nanopore et R son rayon. On observe ainsi une loi d'échelle entre la pression critique et le rayon du nanopore avec un exposant -4 (Fig.1.15), ce qui rejoint à nouveau les observations de Auger *et coll.*[299, 304].

De même, la présence de PEI à la sortie des nanopores ne semble pas (ou peu) modifier la dépendance de la pression critique associée aux nanopores avec le rayon de ceux-ci, dans la gamme de ratio de charge testée, c'est-à-dire 0,5. On distingue juste une légère différence entre les pressions critiques avec et sans PEI pour les nanopores de 50 nm, déjà évoquée auparavant dans la section 1.1.2, qui ne se retrouve pas pour les nanopores de plus grande taille. Nous pouvons attribuer cette distinction à un simple effet de taille : une variation

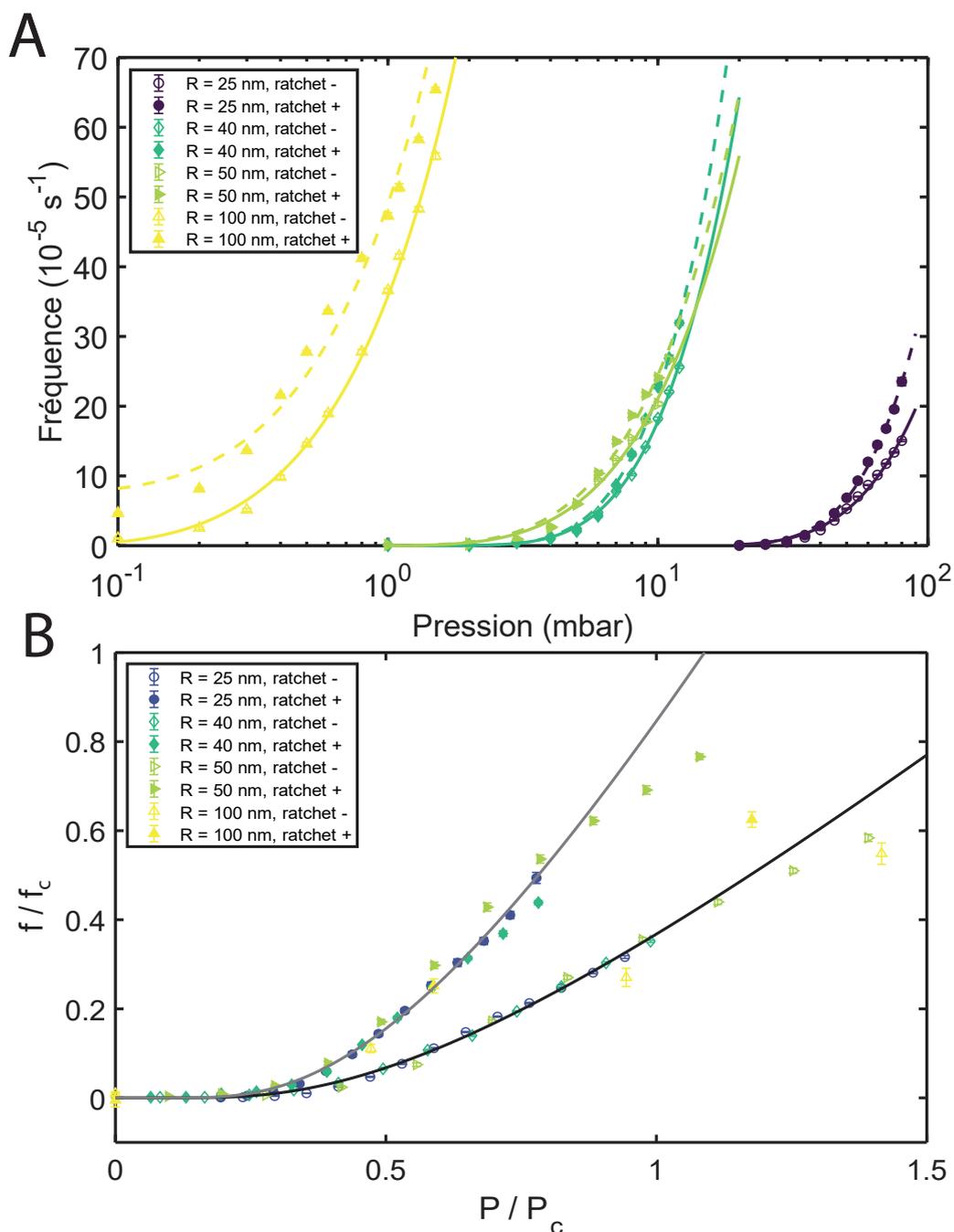


FIGURE 1.14 – A. Fréquence de translocation d'ADN λ en fonction de la pression appliquée à l'entrée des nanopores, pour différents rayons R de pores sans PEI (ratchet -) et avec PEI à un ratio de charges de 0,5 (ratchet +). Chaque série de courbes est ajustée par le modèle de suction (traits pleins : ratchet - ; pointillés : ratchet +). L'incertitude sur les données expérimentales est prise comme l'erreur standard (95%) et les expériences sont répétées un minimum de 4 fois. B. Même que A. avec les abscisses normalisées par la pression critique et les ordonnées normalisées par la fréquence à la pression critique ; ces paramètres ont été mesurés pour chaque série de données d'après un ajustement par le modèle de suction.

de quelques nanomètres sur une taille de 50 nm sera plus visible que la même variation sur 100 nm ou 200 nm :

$$\left(\frac{R_+}{R_-}\right)^{-4} = \left(\frac{R_- - \Delta R}{R_-}\right)^{-4} \simeq 1 + 4\frac{\Delta R}{R}, \quad (1.16)$$

avec R_- le rayon du nanopore sans agent de ratchet et ΔR l'épaisseur de la couche d'agents de ratchet adsorbés sur les parois du nanopore, réduisant son rayon effectif.

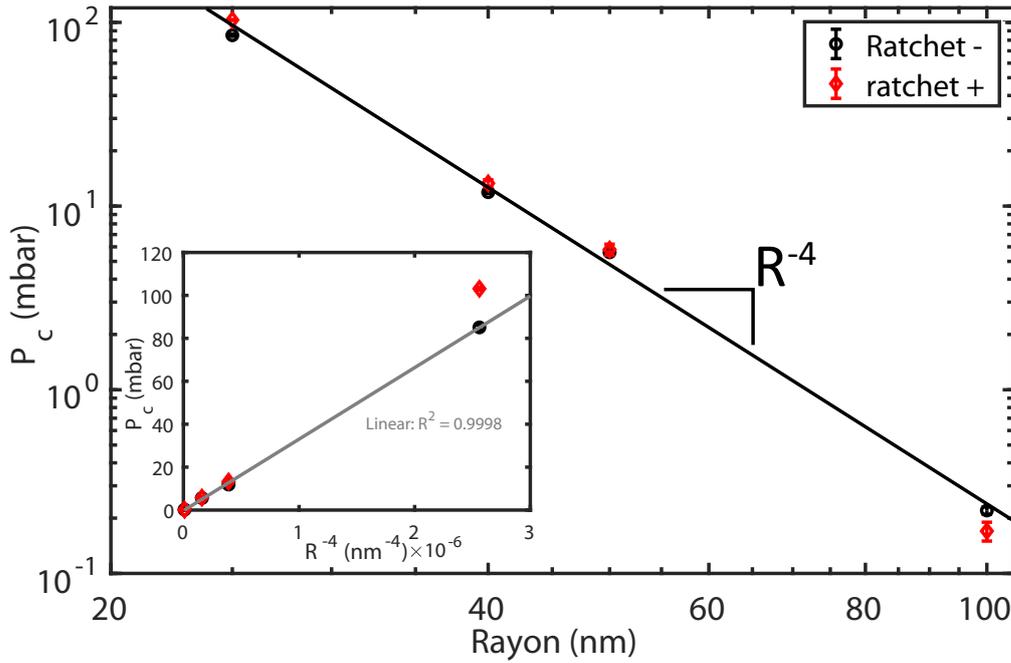


FIGURE 1.15 – Évolution de la pression critique P_c en fonction du rayon du nanopore en absence d'agents de ratchet (ratchet -) et en sa présence à un ratio de charge 0,5 (ratchet +). (insert) pression critique en fonction du rayon des nanopores à la puissance -4.

Nous avons représenté sur la figure 1.14B. les données de la figure 1.14A. avec les abscisses normalisées par la pression critique sans agents de ratchet associée à chaque série de mesures ; les ordonnées ont de même été normalisées par la fréquence à la pression critique sans agents de ratchet. Avec cette normalisation, les données s'alignent selon un modèle de succion dont le préfacteur évolue comme $1 + Y \times \rho_+/\rho_-$.

Nous pouvons très clairement observer que ces normalisations mettent en évidence une indépendance du rendement du ratchet Y avec le rayon des nanopores car tous les points s'organisent uniquement selon la présence ou non d'agents de ratchet. Plus précisément, les courbes sans agents de ratchet peuvent être ajustées avec un modèle de succion dont le préfacteur (ou fréquence à la pression critique) vaut 1 (avec les axes normalisés). Or, c'est précisément la valeur attendue dans le cadre de notre modèle cinétique en deux étapes pour la translocation, nous estimons ce paramètre comme $1 + Y \times \rho_+/\rho_-$; en absence d'agents de ratchet, nous avons $\rho_+/\rho_- = 0$, ce qui mène à un préfacteur égal à 1. En revanche, pour les courbes en présence d'agents de ratchet (ratchet +), le préfacteur obtenu par un ajustement des données par le modèle de succion donne une valeur de 2,3. Avec cette

valeur et connaissant le ratio de charges de 0,5, nous pouvons déduire un rendement de ratchet d'environ 2,6, ce qui est en très bon accord avec la valeur précédemment mesurée pour le rendement du ratchet avec PEI à pH 7,6 (Tab.1.3).

Pour des valeurs de pression proches de P_c ($P/P_c \simeq 1$), nous observons un écart des données au modèle de suction, marqué notamment pour les nanopores de 50 nm et 100 nm de rayon. Les données expérimentales se regroupent sous la courbe du modèle à ces pressions, ce qui signifie que la fréquence de translocation est moindre que celle attendue pour un entraînement des blobs suivant l'écoulement, soit $f \propto P$. Il est possible que cet écart observé soit le fruit d'un biais de la détection des événements de translocation (flashes) à haute pression, où le nombre d'événements devient conséquent et où le risque que plusieurs flashes se superposent et ne soient pas correctement détectés augmente, d'où la sous-estimation de la fréquence de translocation par rapport au modèle de suction.

Pour compléter l'étude de la dépendance entre le rendement de ratchet et le rayon des nanopores, nous avons procédé à des expériences de translocation de molécules d'ADN λ à pression fixe et concentration en polycation (PEI) variable, avec des nanopores de rayon 25 nm, 40 nm et 100 nm, selon le protocole décrit dans la section 1.2.3. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 1.16.

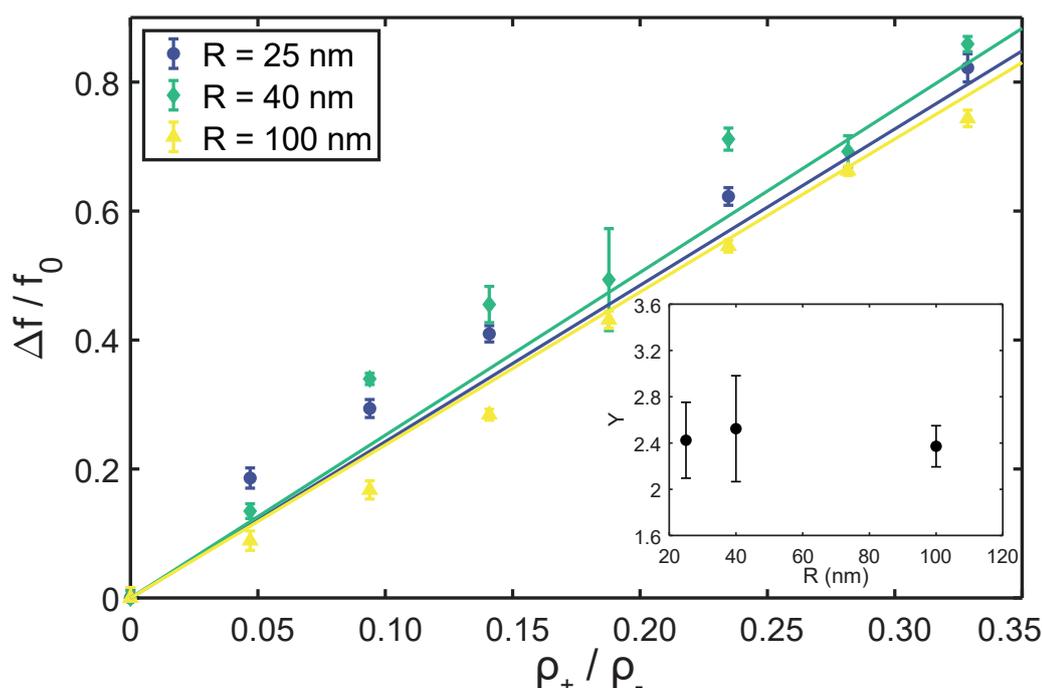


FIGURE 1.16 – Gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet en fonction du ratio de charges pour des nanopores de différents rayons. L'incertitude sur les données est prise comme l'erreur standard (95%). Pour chaque condition, l'expérience est répétée au minimum 4 fois. (insert) Rendement du ratchet Y en fonction du rayon du nanopore.

Nous observons sur la figure 1.16 que le gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet $\Delta f / f_0$ évolue de manière semblable indépendamment de la valeur du rayon des nanopores, au moins pour la gamme étudiée ici (25-100 nm). Les données expérimentales se superposent pour les trois courbes présentées dans le graphique, avec

une évolution linéaire du gain de fréquence par rapport au ratio de charges comme nous l'avons observé précédemment dans la section 1.2.4. La mesure de la pente de cette relation linéaire correspond au rendement du ratchet Y et vaut environ 2,4 pour les trois séries de mesures (rayon de 25/40/100 nm) (Fig.1.16-*insert*) ; les valeurs exactes sont résumées dans le tableau 1.6. À nouveau, cette valeur pour le rendement du ratchet est en accord quantitatif avec la mesure réalisée précédemment lors de l'expérience à pression variable et concentration en polycations fixe ainsi que les mesures réalisées dans la section 1.3.

Rayon (nm)	Y
25	$2,42 \pm 0.08$
40	2.52 ± 0.06
100	2.38 ± 0.03

TABLE 1.6 – Évolution du rendement de ratchet avec le rayon du nanopore. Les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife sur les données expérimentales de la figure 1.16 (95%).

Pour résumer, nous avons mis en évidence dans cette section l'indépendance du rendement du ratchet avec le rayon du nanopore. L'accélération de la translocation par le mécanisme de ratchet à la sortie des nanopores ne semble pas liée au rayon des nanopores dans le régime de confinement étudié ici.

1.6 Rendement de ratchet Y en fonction de la longueur de la molécule d'ADN

Le second paramètre géométrique que nous avons étudié est la longueur des molécules d'ADN en translocation. Dans le modèle du ratchet de translocation, le substrat en translocation est généralement considéré comme infiniment long, ce qui permet d'atteindre un régime stationnaire pour la vitesse de translocation. Dans ce cas idéal, la vitesse de translocation ne dépend pas de la longueur de substrat ayant déjà réalisé la translocation, se trouvant alors du côté trans de la membrane. Or, nous avons vu dans la section 3.3.3, dédiée au modèle de la propagation de tension, que la vitesse de la translocation, donc sa durée également, dépendent grandement de la longueur de la molécule d'ADN. Plus précisément, selon le régime de forçage, la durée de la translocation évolue avec le nombre de monomères à la puissance $1 + \nu$ à forçage supérieur à $k_B T / (N^\nu a)$ et 2ν pour un forçage inférieur à cette valeur (dans le modèle de Zimm, voir la section 3.3.3).

Le modèle de succion, décrivant la barrière d'énergie libre pour le confinement du polymère à l'entrée du nanopore en présence d'un forçage (voir section 3.3.4), ne montre pas de dépendance de la barrière d'énergie libre avec la longueur du polymère. Ceci peut se comprendre facilement avec le fait que la barrière d'énergie de confinement du polymère à l'entrée du nanopore est seulement définie par le coût entropique de confinement (soit le rayon du nanopore) et l'amplitude du forçage, qui fournit l'énergie nécessaire pour franchir la barrière d'énergie. Le reste du polymère à l'entrée du nanopore n'intervient pas sur cette barrière, donc sa longueur ne modifie pas la hauteur de la barrière d'énergie libre. Par conséquent, l'effet de la longueur du polymère sur la fréquence de translocation est attendu sur la fréquence à la pression critique f_c ; pour rappel, dans le modèle de succion présenté

dans l'étude de Auger *et coll.*[299], l'expression de la fréquence de translocation f évolue de la manière suivante :

$$f(P) = f_c \frac{P}{P_c} e^{-\frac{P_c}{P}}. \quad (1.17)$$

Pour mettre en lumière la dépendance du rendement du ratchet Y avec la longueur des molécules d'ADN N (en nombre de paires de bases), nous avons réalisé des expériences de translocation à pression fixe et concentrations en polycations variables. Le protocole de cette expérience est analogue à celui décrit dans la section 1.2.3. Le polycation utilisé pour ces expériences est le PEI (M. w. 60 000 g/mol, Acros Organics) à des ratios de charges compris entre 0 et 0,35. Les molécules d'ADN utilisées dans ces expériences sont les suivantes (Fig.1.17) :

- ADN λ (ThermoFisher ScientificTM) : ADN linéaire double brin (48 502 bp) issu du bactériophage lambda (infectieux pour la bactérie *Escherichia coli*, inoffensif pour l'humain). L'ADN λ dispose d'extrémités 5' simples brins complémentaires sur une longueur de 12 bp, ce qui lui permet une cyclisation spontanée.
- ADN λ /HindIII (New England Biolabs) : ADN λ digéré par l'enzyme de restriction HindIII en 8 fragments de tailles comprises entre 125 bp et 23 130 bp. La moyenne pondérée des fragments est de 14 300 bp ; c'est cette valeur que l'on considère dans cette étude lorsque l'ADN λ /HindIII est utilisé.
- ADN T4 GT7 (NIPPON GENE) : ADN linéaire double brin (166 kbp) issu du bactériophage T4 GT7. Il s'agit de l'ADN de plus haut poids moléculaire utilisé dans cette étude.
- ADN Φ X174 RF II (New England Biolabs) : ADN linéaire double brin (5 386 bp).
- ADN pNEB206A (New England Biolabs) : ADN linéaire double brin (2 706 bp).
- ADN pCLIP_f-H2B (New England Biolabs) : ADN circulaire double brin (6 249 bp).
- ADN pKLAC2 (New England Biolabs) : ADN circulaire double brin (9 107 bp).
- échelle d'ADN (New England Biolabs) : ADN linéaires double brins (100 bp jusqu'à 1 517 bp - moyenne à 710 bp).

Parmi ces molécules, nous trouvons des molécules d'ADN linéaires et circulaires (toutes sont double brins). Nous nous permettons de comparer ces molécules topologiquement différentes car le confinement que nous imposons (50 nm pour les rayons des pores) est très supérieur à l'épaisseur de la molécule d'ADN (2 nm pour une molécule d'ADN double brins). Alizadehheidari *et coll.*[374] ont montré que les molécules d'ADN double brins circulaires suivent les prédictions du modèle de blobs de de Gennes ainsi que celles du régime d'Odjik, selon l'amplitude du confinement. Par conséquent, nous pouvons nous attendre à un comportement similaire entre les molécules linéaires et circulaires par rapport au mécanisme de ratchet de translocation, d'où le choix d'employer les deux types de molécules pour notre étude. En revanche, il est nécessaire de considérer pour les molécules circulaires une longueur de contour correspondant à la moitié de leur périmètre, comme nous l'avons schématisé sur la figure 1.17, imposée par la fermeture topologique de la molécule. De plus, nous ferons l'hypothèse que les échantillons d'ADN circulaires ne contiennent pas (ou en proportions négligeables) de molécules surenroulées.

Avec cet ensemble de molécules, nous avons une gamme de longueur d'ADN allant de 710 bp jusqu'à 166 kbp. La borne inférieure est définie par une échelle d'ADN s'étalant

de 100 bp à 1517 bp, dont la moyenne pondérée est à 710 bp ; c'est cette dernière valeur que nous avons retenu pour cet échantillon d'ADN.

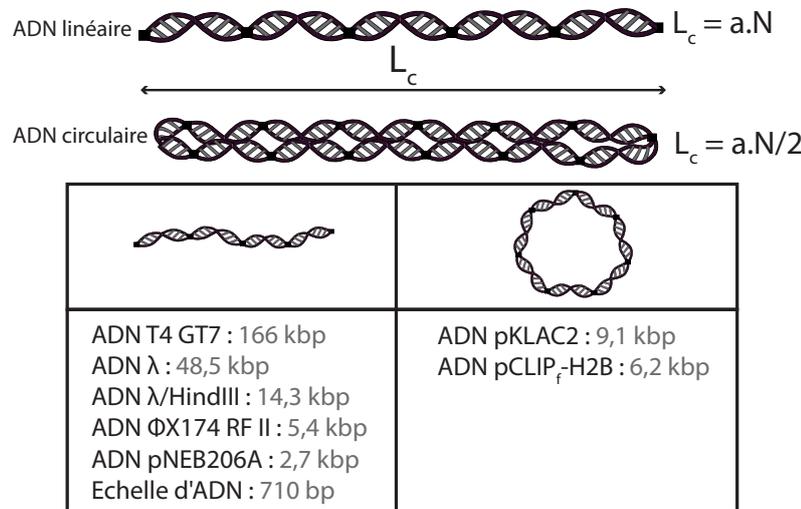


FIGURE 1.17 – Liste des molécules d'ADN utilisées dans nos expériences de translocations et tailles respectives (en nombre de paires de bases). Les molécules sont toutes double brins. La longueur de contour est ici illustrée pour les molécules d'ADN linéaires et circulaires.

Pour chaque échantillon d'ADN, nous réalisons l'expérience de translocation à pression fixe dont le protocole est détaillé dans la section 1.2.3. Le polycation utilisé est le PEI et les pores ont un rayon de 25 nm. Pour chacune de ces expériences, nous avons mesuré le gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet $\Delta f/f_0$ en fonction du ratio de charges. L'expérience a été réalisée au minimum 4 fois, puis nous avons mesuré le rendement du ratchet Y sur la moyenne de ces réalisations. Le résultat de ces mesures est présenté dans la figure 1.18A.

Nous pouvons observer sur la figure 1.18A que le gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet $\Delta f/f_0$ suit une relation linéaire avec le ratio de charge ρ_+/ρ_- pour tous les échantillons d'ADN. En revanche, le coefficient directeur de cette relation, à savoir le rendement du ratchet Y , est variable selon la longueur des molécules d'ADN ; les valeurs de Y selon la longueur de contour des échantillons d'ADN (exprimée en paires de bases) sont regroupées dans le tableau 1.7.

Il est important de noter ici que, contrairement à la constante de dissociation K_d et le rayon du nanopore, la longueur de contour de la molécule d'ADN joue un rôle important dans l'efficacité du ratchet de translocation et modifie sa valeur. Ainsi, il semblerait que l'efficacité du ratchet de translocation ne dépende pas de la géométrie du pore ou de l'agent de ratchet mais seulement du substrat en translocation.

L'évolution du rendement du ratchet Y en fonction de la longueur de contour des échantillons d'ADN est présentée dans la figure 1.19A. Sur cette figure, nous pouvons observer que le rendement de ratchet est très faible pour des molécules d'ADN de moins de 3 kbp. Il semblerait que la présence d'agents de ratchet à la sortie des nanopores ne déclenche pas de mécanisme de ratchet de translocation pour des molécules de taille inférieure à 3 kbp. Au contraire, au-delà de 3 kbp, le rendement du ratchet voit sa valeur

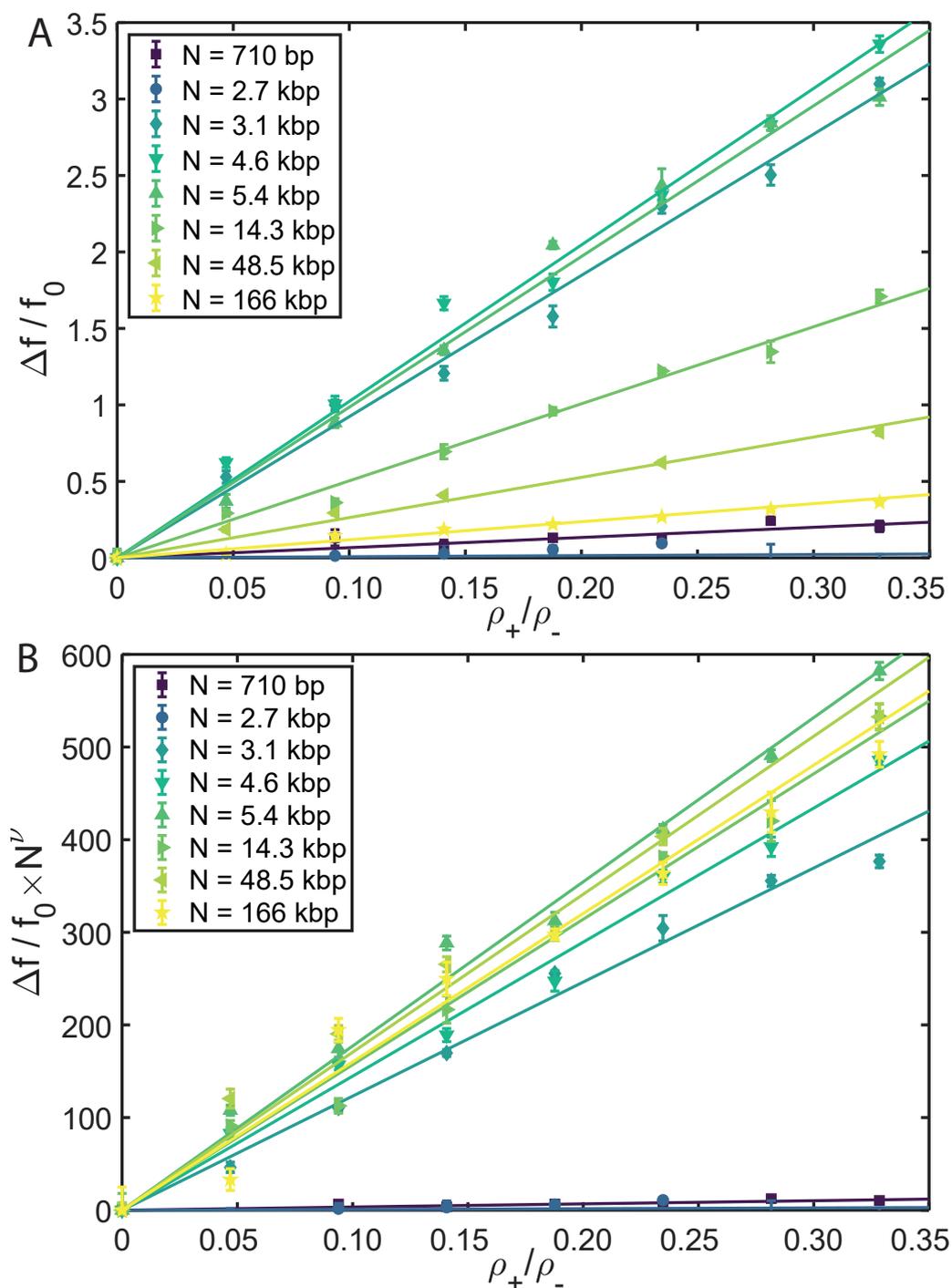


FIGURE 1.18 – A) Gain de fréquence de translocation par mécanisme de ratchet en fonction du ratio de charges pour des molécules d'ADN double brin de longueur de contour variable. L'incertitude sur les données est prise comme l'erreur standard (95%). Pour chaque condition, l'expérience est répétée au minimum 4 fois. B) Même figure que A mais avec les ordonnées normalisées par le nombre de bases de chaque molécule d'ADN à la puissance $-\nu$, avec $\nu = 0.6$.

L_c (kbp)	Y
0,710	$0,67 \pm 0,03$
2,7	$0,07 \pm 0,04$
3,1	$9,20 \pm 0,09$
4,6	$10,20 \pm 0,06$
5,4	$9,80 \pm 0,16$
14,3	$5,00 \pm 0,05$
48,5	$2,42 \pm 0,08$
166	$1,18 \pm 0,01$

TABLE 1.7 – Évolution du rendement de ratchet avec la longueur de contour des échantillons d'ADN. Les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife sur les données expérimentales de la figure 1.18 (95%).

bondir fortement pour atteindre un maximum entre 3 kbp et 5 kbp. Par exemple, pour une molécule d'ADN de 3 100 bp, le rendement du ratchet vaut $9,20 \pm 0,09$ alors que cette valeur tombe à $0,07 \pm 0,04$ pour des molécules d'ADN de 2 700 bp.

Au-delà de cette longueur critique de 3 000 bp, nous observons une loi de puissance entre le rendement du ratchet Y et la longueur des molécules d'ADN avec une puissance $-0,60 \pm 0,02$ (Fig.1.19A). Cette tendance est observée sur deux ordres de grandeurs et semble robuste. Nous avons repris les résultats de la figure 1.18A en normalisant les ordonnées par $N^{-0,6}$, avec N la longueur de contour des échantillons d'ADN. Le résultat de cette normalisation est présenté dans la figure 1.18B. Nous observons un regroupement des données expérimentales autour d'une courbe maîtresse pour les échantillons d'ADN de longueur supérieure à 3 kbp, venant confirmer les observations faites sur les mesures de rendement du ratchet. De la même manière, en normalisant le rendement de ratchet Y par $N^{-0,6}$ (Fig.1.19B), nous observons un plateau pour des longueurs de contour supérieures à 5 kbp, avec une transition située entre 3 kbp et 5 kbp.

1.6.1 Modèle phénoménologique du ratchet de translocation

Pour rendre compte de nos observations expérimentales concernant la loi d'échelle entre le rendement de ratchet Y et la longueur des molécules d'ADN, nous avons développé un modèle phénoménologique pour les deux régimes observés dans la figure 1.19 avec pour longueur critique 3 kbp.

Cas $N > 3$ kbp

Nous avons mis en évidence une loi d'échelle entre le rendement de ratchet Y et la longueur de la molécule d'ADN N pour une longueur critique $N^* = 3$ kbp, avec $Y \propto N^{-0,6}$. Cet exposant n'est pas sans rappeler la valeur de l'exposant de Flory pour un polymère en bon solvant, $\nu = 3/5$. A partir de ce constat, nous avons développé un modèle phénoménologique reliant le rendement de ratchet Y à la longueur N de la molécule d'ADN.

Nous reprenons ainsi l'expression du rendement de ratchet Y défini à partir de notre

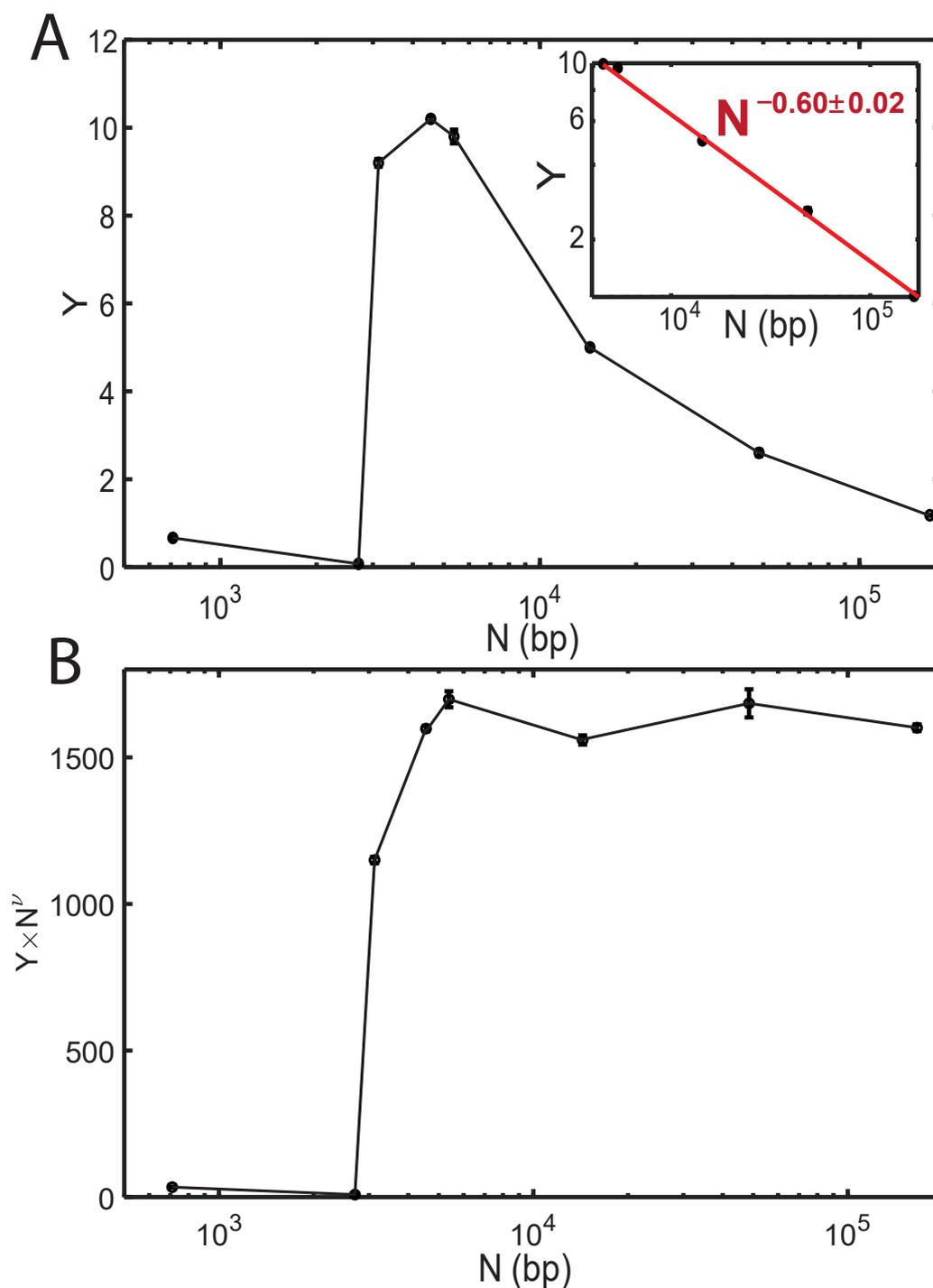


FIGURE 1.19 – Effet de la longueur de la molécule d'ADN sur le ratchet de translocation : A) Rendement du ratchet Y en fonction de la longueur de contour des molécules d'ADN. L'incertitude sur les données est prise comme l'erreur standard (95%). Pour chaque condition, l'expérience est répétée au minimum 4 fois. (insert) Détail de la courbe pour des molécules d'ADN d'une longueur de contour supérieure à 4 kbp. B) Idem, avec les rendements de ratchet normalisés par $N^{-\nu}$, où $\nu = 0,6$. Les lignes entre les points expérimentaux ont été ajoutées pour guider la lecture des graphes.

modèle cinétique (1.15) dans la section 1.4.3 :

$$Y = p_{rat}^*(k_{on}) \times \left(\frac{k_{rat}}{k_{\overline{rat}}} - 1 \right), \quad (1.18)$$

avec p_{rat}^* une fonction de k_{on} (le taux d'association entre l'agent de ratchet et la molécule d'ADN) donnant la probabilité de rencontre d'un agent de ratchet avec une portion d'ADN à la sortie du nanopore, qu'on prendra de ce fait de l'ordre de l'unité ; k_{rat} et $k_{\overline{rat}}$ sont respectivement les fréquences de translocation d'une molécule d'ADN à travers un nanopore en présence et en absence d'agents de ratchet à la sortie des nanopores, soit un mécanisme de ratchet de translocation ou non. Dans ce schéma, nous considérerons donc que le rendement de ratchet Y est de l'ordre du rapport entre k_{rat} et $k_{\overline{rat}}$:

$$Y \simeq \frac{k_{rat}}{k_{\overline{rat}}}. \quad (1.19)$$

Nous faisons ensuite les hypothèses suivantes concernant les mécanismes prédominants pour la translocation en présence et en absence de ratchet de translocation, qui constituent la base de notre modèle phénoménologique :

- En absence de ratchet de translocation, la translocation du polymère s'effectue par un mécanisme de diffusion à l'intérieur du nanopore. Dans ce schéma, la translocation est considérée comme terminée lorsque le centre de masse du polymère a traversé l'entièreté du nanopore, soit une longueur L (Fig.1.20A).
- En présence de ratchet de translocation, l'agent de ratchet exerce une tension dans la chaîne de monomères qui se transmet progressivement à chaque monomère jusqu'à l'entrée du nanopore. La translocation se trouve ainsi accélérée (Fig.1.20B).

Le temps typique de translocation en absence de ratchet se calcule aisément à partir du coefficient de diffusion D du polymère. Pour la diffusion du centre de masse du polymère, nous avons la relation suivante :

$$D \propto \frac{k_B T}{N \eta a}, \quad (1.20)$$

où η est la viscosité dynamique du milieu, N est le nombre de monomères et a leur longueur (nous considérerons des monomères de Kuhn, soit $a = 2L_p \simeq 100$ nm pour une molécule d'ADN dans les conditions de l'expérience).

Nous avons alors le temps de diffusion $\tau_{\overline{rat}}$ du centre de masse du polymère à travers le nanopore donné par la relation suivante (Fig.1.20A) :

$$\tau_{\overline{rat}} = \frac{L^2 N \eta a}{k_B T}. \quad (1.21)$$

En présence d'agents de ratchet à la sortie des nanopores, une tension est générée dans la chaîne de monomères lors de l'association des agents de ratchet à la molécule d'ADN à la sortie des nanopores. Dans ce schéma, nous pouvons reprendre le formalisme développé dans le modèle de propagation de tension (voir section 3.3.3) pour le transposer à la sortie de la molécule d'ADN du nanopore. En effet, avec ce formalisme, la translocation de la molécule est dominée par le temps de propagation de la tension jusqu'à l'extrémité de la chaîne de monomères à l'entrée du nanopore (Fig.1.20B). Ainsi, la durée de la

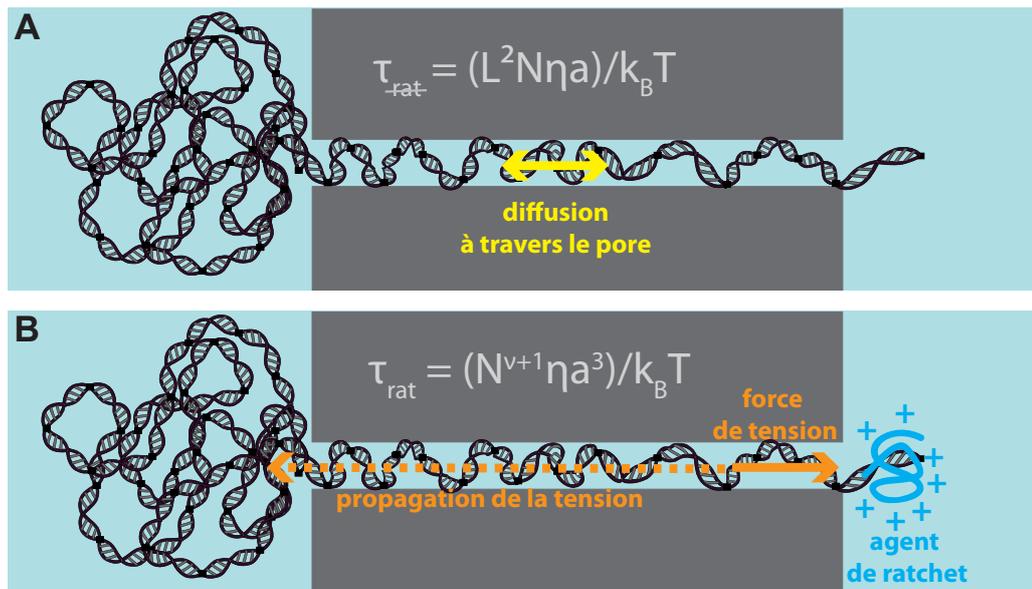


FIGURE 1.20 – Modèle phénoménologique du ratchet de translocation pour $N > 3$ kbp : A) En absence d'agent de ratchet à la sortie des nanopores, la translocation du polymère s'effectue selon un processus de diffusion à travers le pore. La translocation est considérée comme terminée lorsque le centre de masse du polymère a parcouru l'intégralité du nanopore. B) En présence d'agent de ratchet à la sortie des nanopores, l'association entre l'agent de ratchet et le polymère engendre une force de tension dans la chaîne de monomères qui se transmet progressivement jusqu'au début de la chaîne à l'entrée du nanopore. Selon la théorie de la propagation de tension, la durée de la translocation est dominée par le temps de propagation de la tension dans la chaîne.

translocation en présence d'un mécanisme de ratchet de translocation est donnée par la relation suivante issue du raisonnement développé dans la section 3.3.3 :

$$\tilde{\tau}_{rat} \sim \tilde{f}_0^{1/\nu-2} N^{1+\nu}, \quad (1.22)$$

où $\tilde{\tau}_{rat}$ correspond à la durée de translocation normalisée par le temps de relaxation caractéristique d'un monomère, soit $\eta a^3/(k_B T)$; \tilde{f}_0 correspond à la force générée par le ratchet de translocation et adimensionnée par $k_B T/a$. Dans le cadre du ratchet de translocation, nous prendrons cette force de l'ordre de l'unité.

Nous en déduisons alors la durée de translocation en présence d'un ratchet de translocation comme (Fig.1.20B) :

$$\tau_{rat} \simeq \frac{\eta a^3}{k_B T} N^{1+\nu}. \quad (1.23)$$

A partir des relations (1.19), (1.21) et (1.23), nous pouvons établir la relation suivante pour l'expression du rendement de ratchet Y :

$$Y = \frac{k_{rat}}{k_{rat}^-} = \frac{\tau_{rat}^-}{\tau_{rat}} = \left(\frac{L}{a}\right)^2 N^{-\nu}. \quad (1.24)$$

Nous retrouvons ainsi la loi d'échelle avec exposant $-\nu$ observée expérimentalement entre le rendement de ratchet Y et la longueur de contour de la molécule d'ADN N . Ce modèle fait également apparaître un préfacteur en $\left(\frac{L}{a}\right)^2$ qui n'est pas sans rappeler l'expression de l'efficacité du ratchet de translocation détaillée dans la section 1.3.2, où le rapport entre le temps de translocation sans ratchet et avec ratchet s'exprime comme le rapport L/δ , avec δ le pas du ratchet, à la différence près que nous obtenons une dépendance quadratique pour ce rapport.

Dans le cas de l'ADN λ , en prenant la taille d'un monomère comme celle du monomère de Kuhn (100 nm), nous avons $N \simeq 165$ monomères; la longueur des nanopores est égale à 6 μm pour des nanopores de 50 nm de diamètre. Avec ces valeurs numériques et d'après l'expression du rendement de ratchet Y développée dans notre modèle phénoménologique, nous obtenons une valeur numérique de 168 pour le rendement de ratchet Y , contre 2,4 pour nos mesures expérimentales. Avec la formule L/δ développée dans le modèle classique du ratchet de translocation, nous obtenons une valeur de 60 pour ce rendement de ratchet (en prenant le pas du ratchet comme égal à la taille d'un monomère). Dans les deux cas, la valeur numérique donnée par les modèles est plus grande que celle observée expérimentalement avec un facteur de 10-100. Cet écart observé pourrait provenir de facteurs numériques manquant ou d'une association imparfaite entre le substrat et les agents de ratchet (cas du ratchet imparfait, voir section 1.3.2). Nous verrons cependant dans la section suivante que la relation (1.24) conduit à une valeur numérique en très bon accord avec les résultats expérimentaux lorsqu'on remplace dans cette formule le rapport L/a par L/δ , dans le cadre du modèle développé dans la suite.

Au-delà de la discussion sur la loi d'échelle entre le rendement de ratchet Y et le rapport L/a , nous avons montré la dépendance non-linéaire de ce rendement avec la longueur de contour N de la molécule d'ADN évoluant selon un exposant -0,6. Cette dépendance n'est pas prédite par le modèle classique du ratchet de translocation et peut être attribuée à un effet spécifiquement lié à la nature de polymère du substrat. Cependant, nous avons vu dans le chapitre 2 que les polymères biologiques (protéines, ADN, ARN)

constituent l'essentiel des molécules utilisant des mécanismes de ratchet de translocation pour traverser des pores biologiques. Par conséquent, ce facteur $N^{-\nu}$ pourrait se révéler essentiel pour appréhender l'efficacité du transport par ratchet de translocation, qui serait sur-évaluée sans cette dépendance.

Cas $N < 3$ kbp

Nous avons observé sur la figure 1.19 l'existence d'une taille critique pour la longueur de contour de la molécule d'ADN d'environ 3 kbp, en-dessous de laquelle nous n'observons pas d'effet de ratchet, ce qui est représenté dans cette figure par un rendement de ratchet Y quasi-nul.

Cette valeur de 3000 bp n'est pas sans rappeler la longueur d'une boucle d'ADN pour laquelle l'énergie élastique E_{loop} vaut celle de l'énergie $k_B T$ du bain thermique[407] :

$$\frac{E_{loop}}{k_B T} = 2\pi^2 \times \frac{L_p}{l} \simeq \frac{3000}{N_{bp}}, \quad (1.25)$$

avec L_p la longueur de persistance de l'ADN, l la longueur de la boucle et N_{bp} le nombre de bases correspondant (en prenant 0,34 nm pour la taille d'une base).

Dans ce schéma, le mécanisme de ratchet de translocation ne serait effectif que si la portion d'ADN à la sortie des nanopores est capable de former spontanément une boucle. Nous pouvons alors envisager le mécanisme suivant pour déclencher l'effet de ratchet de translocation (Fig.1.21) :

- Lorsque la molécule d'ADN s'échappe du pore à sa sortie, il existe une probabilité qu'un agent de ratchet vienne s'associer à une portion de cette molécule d'ADN ; cette association ne déclenche pas l'effet de ratchet de translocation.
- Avec les fluctuations de conformations alimentées par le bain thermique, il existe une probabilité de croisement entre la molécule d'ADN et sa portion associée à l'agent de ratchet, ce qui conduit à la formation d'une boucle d'ADN stabilisée par l'agent de ratchet. Une fois formée, la boucle active l'effet de ratchet de translocation et les portions d'ADN extrudées du nanopore viennent se coller sur la boucle initiale, à la manière d'un "nano-enrouleur".

Ce modèle mécanique permettrait d'expliquer l'existence de la longueur critique pour la longueur de contour pour activer l'effet de ratchet de translocation. Il est important de noter que cette longueur critique n'est jusqu'ici jamais apparue dans un modèle de ratchet de translocation et semble propre à la nature polymère de la molécule d'ADN.

Nous pouvons détailler l'énergie libre d'une boucle d'ADN en ajoutant au terme enthalpique précédent un terme d'origine entropique correspondant au coût entropique de formation d'une boucle d'ADN. Ce terme s'exprime de la manière suivante [407] :

$$\Delta S_{loop} = k_B T \times \frac{3}{2} \ln(N_{bp}). \quad (1.26)$$

A partir des relations (1.25) et (1.26), nous pouvons établir l'expression de l'énergie libre de formation d'une boucle d'ADN d'une longueur de N_{bp} (en nombre de bases) :

$$\frac{\Delta F}{k_B T} = \frac{3000}{N_{bp}} + \frac{3}{2} \ln(N_{bp}). \quad (1.27)$$

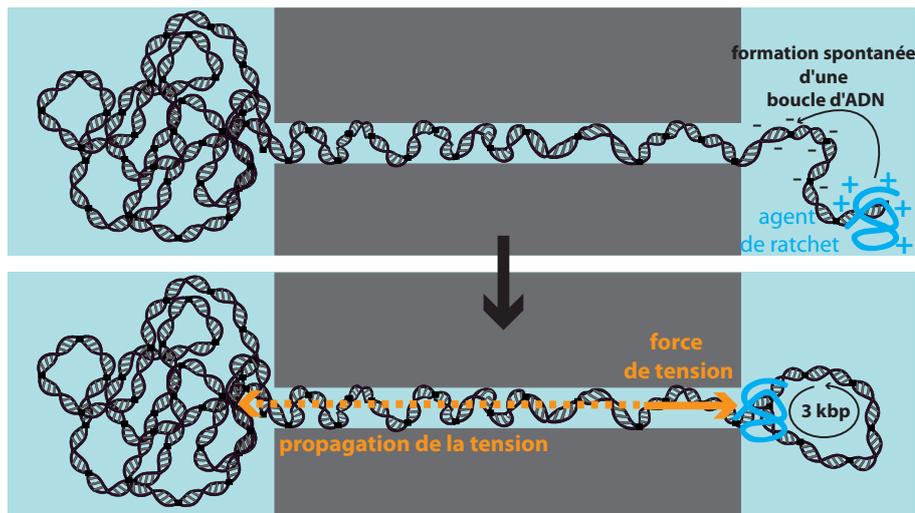


FIGURE 1.21 – Modèle du ratchet de translocation par formation d'une boucle d'ADN à la sortie des nanopores stabilisée par l'agent de ratchet.

La probabilité de formation d'une boucle d'ADN d'une longueur donnée s'obtient ensuite d'après le facteur de Boltzmann $\exp(-\Delta F_{loop}/k_B T)$. Son évolution est présentée dans la figure 1.22.

Le minimum de ce profil d'énergie libre se situe autour de 2000 bp (Fig.1.22), avec une forte augmentation de la probabilité de formation de boucle d'ADN à partir de 500 bp. En comparaison de nos mesures de rendement de ratchet en fonction de la longueur de contour des molécules d'ADN, le profil d'énergie libre détaillé ci-dessus induirait une augmentation du rendement de ratchet plus précoce, avec un effet observé dès 2000 bp, ce qui n'est pas le cas dans nos expériences (Fig.1.22). De plus, l'augmentation du rendement de ratchet expérimental est plus brutale que celle prédite par le profil d'énergie libre, avec une transition très nette autour de 3000 bp (Fig.1.19B). Nous attribuons ces différences à la nature hors-équilibre de notre système. En effet, l'expression précédente du profil d'énergie libre est valide à l'équilibre thermodynamique. Or, dans notre système expérimental, la molécule d'ADN est en pleine translocation ; par conséquent, ses conformations possibles ne suivent pas le profil d'énergie libre à l'équilibre. Nous pouvons dès lors nous attendre à une distribution de tailles de boucles moins lisse gouvernée sous contrôle cinétique. Dans ce schéma, il est probable qu'une boucle ne se forme spontanément que si sa contribution enthalpique est compensée par l'énergie du bain thermique, d'où la longueur de 3000 bp observée expérimentalement.

Dans le cadre de ce modèle, nous pouvons définir une taille effective du pas du ratchet de translocation comme la longueur de la boucle d'ADN : dès qu'une longueur équivalente d'ADN est extrudée du nanopore, celle-ci est "enroulée" autour de la boucle principale et ne peut alors plus rétro-diffuser à l'intérieur du nanopore, ce qui constitue un mécanisme de ratchet de translocation. Avec un seuil critique de 3000 bp, nous en déduisons un pas de ratchet effectif d'environ 1000 nm. A présent, si nous reprenons la formule (1.24) du rendement de ratchet établie dans la section 1.6.1, en remplaçant le rapport L/a par L/δ (avec δ le pas du ratchet au lieu de la longueur a d'un monomère de Kuhn), nous obtenons une valeur de 1,6 pour le rendement de ratchet Y , ce qui est en très bonne approximation

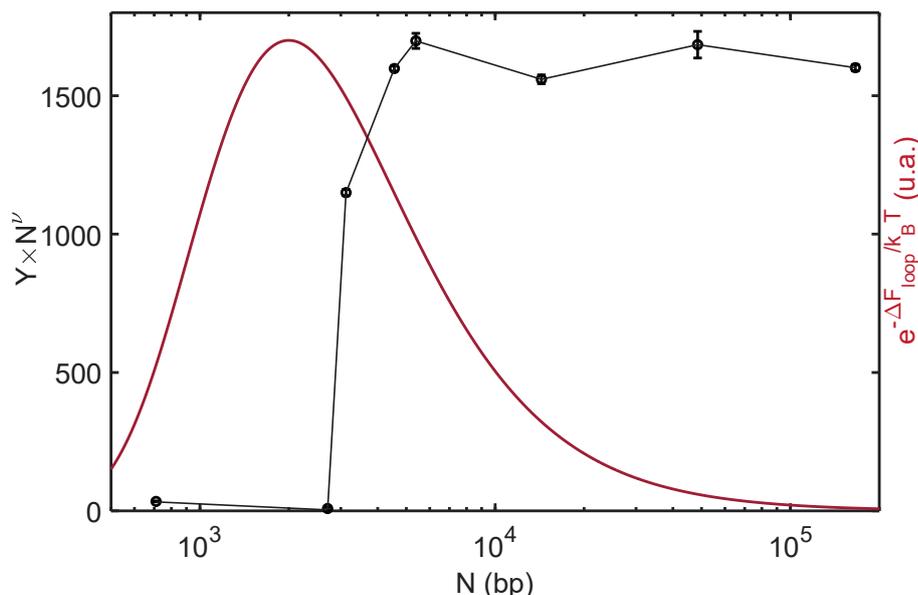


FIGURE 1.22 – Probabilité de formation d’une boucle d’ADN d’après le profil d’énergie libre décrit dans la relation (1.27) (en unité arbitraire). L’évolution expérimentale du rendement de ratchet (normalisé par $N^{-0,6}$) est présentée pour comparaison. Les lignes entre les points expérimentaux ont été ajoutées pour guider la lecture des graphes.

avec sa valeur expérimentale. Ainsi, l’hypothèse d’un effet de ratchet de translocation déclenché par la formation d’une boucle d’ADN semble une hypothèse raisonnable en regard des estimations numériques pour le seuil de 3000 bp observé ainsi que pour la valeur du rendement de ratchet Y.

Selon notre modèle, il semblerait que la formation de boucles d’ADN plus petites entraîne un seuil de déclenchement du ratchet de translocation plus petit ainsi qu’un rendement de ratchet plus grand (donné par le rapport L/δ). Dans la nature, il existe des protéines capables de générer des boucles d’ADN, comme la cohésine ou les ligases[408, 409]. Il est plausible que de telles moteurs moléculaires puissent intervenir lors de la translocation de biomolécules à travers des pores biologiques et participer à la réussite de ce processus par formation de boucles ou structures secondaires agissant comme agents de ratchet. En particulier, nous avons vu dans la section 2.2.1 qu’un grand nombre de translocons présentent des molécules de la famille Hsp70 à leur sortie chargées de capter les molécules en translocation. Ces molécules sont capables de modifier la conformation des protéines par activité ATPase. Nous pouvons alors envisager que la formation d’une structure secondaire rigide, comme une boucle, puisse induire un mécanisme de ratchet de translocation à la manière de celui observé dans nos expériences.

1.6.2 Observation des boucles d’ADN par pinces optiques

Pour observer l’effet de l’association d’un polycation sur la structure des molécules d’ADN, nous avons réalisé des expériences d’étirement de molécules d’ADN par pinces optiques en présence de polycations en solution. Ces expériences se sont déroulées sur deux journées en février 2020 au sein des locaux de la société Lumicks basée à Amsterdam. Nous

avons utilisé leur système commercial de pinces optiques C-Trap, qui combine des pinces optiques et un microscope confocal au sein d'un dispositif micro-fluidique intégré.

Système expérimental

A l'aide du système C-Trap, nous avons piégé une molécule d'ADN λ entre deux pièges optiques. L'ADN est biotinylé à ses deux extrémités, ce qui permet de le lier à des micro-billes de polystyrène couvertes de streptavidines ; les micro-billes sont piégées par les pinces optiques, ce qui permet de manipuler la molécule d'ADN (Fig.1.23). En modifiant l'écart entre les deux billes, nous pouvons étirer la molécule d'ADN et mesurer la force de tension associée, ce qui permet de sonder la conformation de la molécule d'ADN. Plus précisément, dans sa conformation B (conformation classique de l'ADN double brin, en forme de double hélice de 2 nm de diamètre avec 0,34 nm par bases), l'étirement de l'ADN à faible force (<65 pN) est bien décrit par le modèle Worm Like Chain (voir section 3.1.2). A partir de 65 pN, les liaisons entre bases complémentaires sont rompues, ce qui donne lieu à un plateau de force lorsque l'étirement s'accroît. Ainsi, en dessous de 65 pN, tout écart au modèle Worm Like Chain peut s'interpréter comme un indice de la présence d'une structure spécifique dans la molécule d'ADN.

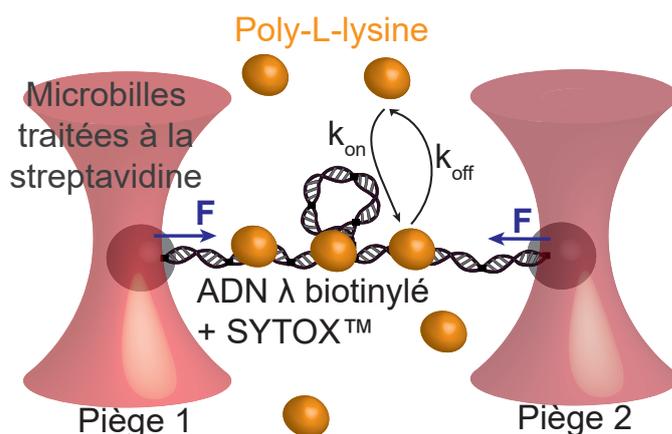


FIGURE 1.23 – Représentation schématique de l'expérience de pinces optiques : une molécule d'ADN λ marquée au Sytox et piégée entre deux pièges optiques est étirée en présence de molécules de poly-L-lysine en solution. La force de tension est mesurée au cours du temps ainsi qu'une acquisition d'images par microscopie confocale.

Nous avons ajouté en solution avec l'ADN piégé des molécules de poly-L-lysine (M. w. 150 000-300 000 g/mol) analogues à celles utilisées pour nos expériences de translocation (voir section 1.3), en excès (Fig.1.23). Nous avons laissé le système s'équilibrer pendant 5 minutes avant de débiter les expériences d'étirement de l'ADN. La molécule d'ADN a été préalablement marquée au Sytox Orange, ce qui permet sa visualisation par microscopie confocale durant l'expérience d'étirement. Avec ce dispositif, nous avons pu comparer la force de tension dans la molécule d'ADN à une longueur d'étirement donnée à sa fluorescence émise. La figure 1.24 présente le résultat de ces mesures.

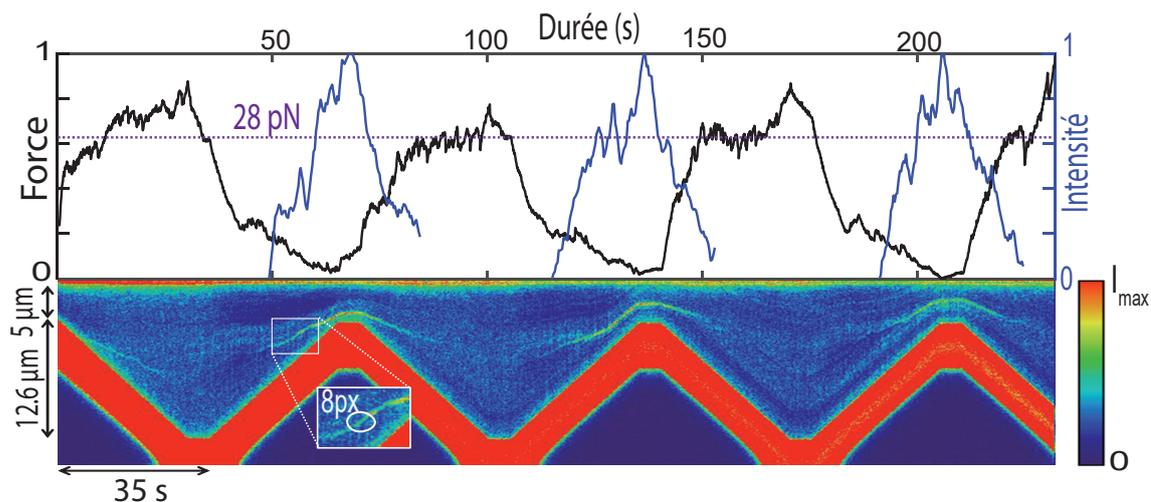


FIGURE 1.24 – Évolution temporelle de la force de tension (normalisée) le long de la molécule d'ADN λ et de l'intensité de fluorescence (normalisée) du point lumineux apparaissant durant la phase de relâchement de la tension ; le kymographe de l'expérience est présenté en comparaison. De la poly-L-lysine est présente en excès avec l'ADN.

Résultats

La figure 1.24 montre l'évolution temporelle de la force de tension mesurée dans la molécule d'ADN pour trois cycles successifs d'étirement-relaxation à vitesse constante. L'élongation minimale est de $5 \mu\text{m}$ contre $17,6 \mu\text{m}$ pour l'élongation maximale. Nous avons tracé en comparaison du profil temporel de force un kymographe de l'expérience. Ce kymographe est obtenu en moyennant spatialement l'intensité lumineuse de fluorescence le long d'une ligne tangente à la molécule d'ADN pour chaque image de la vidéo. Les zones rouges correspondent aux positions des billes.

Nous pouvons observer l'apparition d'un plateau de force lors de la phase d'étirement pour une valeur de 28 pN , marqué par une succession de dents de scie et reproductible d'un cycle d'étirement à l'autre. Ce plateau de force étant bien en-dessous de la valeur de 65 pN , pour laquelle les liaisons entre bases complémentaires sont rompues, les dents de scie de la courbe peuvent s'interpréter comme des ruptures locales de structures d'ADN, libérant ainsi des portions d'ADN venant accroître progressivement la longueur de contour de la molécule. Ce type de courbe n'a été observé qu'en présence de poly-L-lysine en solution (Fig.1.25), nous pouvons alors attribuer les plateaux de force à la présence du polycation.

Lors de la phase de relaxation, la force varie initialement selon le modèle Worm Like Chain avant de changer brutalement de pente pour une force de 10 pN , en-dessous de laquelle la courbe de force présente un profil décroissant en dents de scie. Ce profil est reproductible d'un cycle d'étirement-relaxation à l'autre. A nouveau, ce type de courbe n'a été observé qu'en présence de poly-L-lysine.

Le kymographe présenté dans la figure 1.24 fait apparaître un point lumineux dans la structure de l'ADN lors de la phase de relaxation, dont l'intensité lumineuse croît avec la relaxation puis décroît et finit par disparaître lors de la phase d'étirement. Nous avons mesuré l'évolution temporelle de l'intensité lumineuse de ce point lumineux dès que son

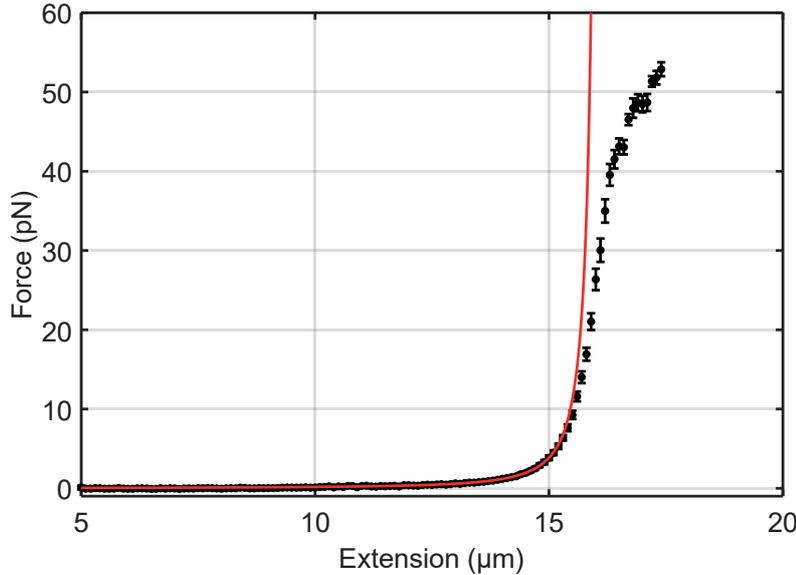


FIGURE 1.25 – Force de tension en fonction de l'extension entre les deux billes pour l'ADN λ en absence de PLL. Les données sont ajustées par le modèle Worm Like Chain avec les paramètres suivants : $L_c = (16, 2 \pm 0, 1) \mu\text{m}$ et $L_p = (49, 2 \pm 1, 7) \text{nm}$.

intensité dépassait le seuil de bruit de l'expérience (2σ au-dessous de la moyenne du bruit), prise comme le maximum sur un disque de 8 pixels de diamètre centré à la main autour du point lumineux. Le résultat de ces mesures est présenté en comparaison des mesures de force.

Lorsqu'on compare les évolutions temporelles de la force de tension et de l'intensité du point lumineux le long de l'ADN, il apparaît clairement que le point lumineux apparaît à partir de 10 pN lors de la phase de relaxation, c'est-à-dire avec l'apparition du profil en dents de scie attribué à la présence des polycations. L'intensité lumineuse du point augmente ensuite pour atteindre son maximum lorsque l'extension de la molécule d'ADN est la plus faible. L'intensité lumineuse décroît ensuite avec la phase d'étirement pour finalement disparaître lorsque la force de tension atteint son plateau à 28 pN. Ainsi, l'apparition et la disparition du point lumineux semblent parfaitement corrélées à l'apparition du profil en dents de scie lors de la relaxation et de l'étirement, que nous avons attribué à l'interaction entre l'ADN et la poly-L-lysine.

A partir de ces observations, nous en déduisons que la présence de la poly-L-lysine en solution avec l'ADN induit à faible force (inférieure à 10 pN) la formation de structures d'ADN compactes dont la présence est marquée par l'apparition d'un point lumineux dans nos expériences. La nature ponctuelle de ce point lumineux semble indiquer que ces structures sont toutes rassemblées à un même endroit le long de l'ADN. Le polycation servirait ainsi de centre de nucléation de ces structures compactes, à la manière d'un "nano-enrouleur". Lorsque la force de tension atteint 28 pN, ces structures sont rompues, ce qui donne lieu au profil en dents de scie observé, chaque dent correspondant à un événement de rupture d'une de ces structures. A l'inverse, les dents de scie observées lors de la phase de relaxation correspondent à des événements de nucléation de ces structures.

Une étude de van den Broek *et coll.*[410] avait déjà décrit l'apparition d'un point lu-

mineux similaire sur une expérience analogue à la notre avec de la spermine à la place de la poly-L-lysine. En revanche, la force critique de condensation était plus basse que celle mesurée dans notre étude, autour de 3-4 pN, ce qui peut s'expliquer par la différence de nature des polycations utilisés entre nos deux études : la spermine est une polyamine dotée de 4 charges positives à pH physiologique[411], tandis que la poly-L-lysine est un polymère formé de monomères de lysine. Il est alors concevable que la différence considérable de charges positives entre les deux molécules puisse expliquer la force de condensation plus grande pour la poly-L-lysine que pour la spermine. A partir d'un modèle simple de formation de boucles d'ADN stabilisées par la spermine, les auteurs retrouvent des valeurs de force de condensation comparables à celle mesurée expérimentalement.

La valeur de 28 pN nous semble particulièrement éloquente : en effet, nous pouvons en déduire une énergie pour rompre les structures d'ADN formées en multipliant cette force par une longueur. Nous avons choisi de prendre 2 nm pour cette longueur, qui correspond au diamètre d'une molécule d'ADN double brin ; il nous semble plausible que la longueur sur laquelle travaille la force de tension pour rompre une structure d'ADN soit de l'ordre du diamètre de la molécule (il suffit pour cela d'imaginer ces structures comme des boucles d'ADN, formées par le croisement de la molécule avec elle-même). Avec cette valeur pour la longueur et la force de 28 pN, nous obtenons un travail de 56 pN.nm, ce qui équivaut à $13,6 k_B T$. Cette valeur est en très bonne adéquation avec la valeur d'énergie d'association entre une molécule d'ADN et une de poly-L-Lysine, évaluée précédemment par MST dans la section 1.4.1 par la relation $\Delta G/k_B T = -\ln(K_d/C_0)$ ($C_0 = 1,0$ M). Ainsi, l'hypothèse de formation de structures compactes d'ADN stabilisées par association avec la poly-L-lysine est appuyée par la valeur de la force au plateau d'étirement, que nous pouvons comparer avec succès à la force de rupture d'une liaison ADN-PLL.

Pour résumer, les observations réalisées conjointement par pinces optiques et microscopie confocale sur l'association entre l'ADN λ et la poly-L-lysine supportent l'hypothèse de formation de boucles d'ADN stabilisées par les polycations développée dans le modèle de la section 1.6.1.

Résumé des observations sur le ratchet de translocation par polycations

Grâce à notre dispositif expérimental, nous avons apporté la preuve de principe du fonctionnement du mécanisme du ratchet de translocation, jusqu'ici uniquement observé dans les systèmes biologiques.

Nous avons quantifié l'augmentation de la fréquence de translocation de molécules d'ADN en fonction de la concentration en polycations à la sortie des nanopores, ce qui nous a permis d'introduire la notion de rendement de ratchet Y. La caractérisation de cette grandeur en fonction des paramètres géométriques (rayon du pore, longueur de la molécule d'ADN) et cinétiques (K_d et concentration en agents de ratchet) du ratchet de translocation nous ont permis de mettre en lumière la nature hors équilibre de ce mécanisme, notamment à travers l'indépendance du rendement de ratchet Y avec la constante de dissociation K_d entre l'ADN et le polycation.

L'évolution de Y avec la longueur de la molécule d'ADN, avec l'observation d'une taille critique autour de 3 kbp pour déclencher l'effet ratchet, nous a conduit à développer un modèle mécanique pour le ratchet de translocation, où l'effet de ratchet est déclenché

lorsque le polymère forme spontanément une boucle à la sortie des nanopores. L'existence physique d'une telle structure a été confirmée à partir de nos observations de pinces optiques combinées à de la microscopie confocale. En particulier, nous avons mesuré une force critique de 28 pN entraînant la rupture des boucles d'ADN, en accord quantitatif avec l'énergie d'association de $14 k_B T$ entre l'ADN et le polycation mesurée précédemment par MST.

Nous avons également observé une loi d'échelle d'exposant -0,6 entre le rendement de ratchet Y et la longueur de la molécule d'ADN, ce qui a conduit au développement d'un modèle phénoménologique basé sur la théorie de propagation de tension.

1.7 Ratchet de translocation par effet mauvais solvant

Nous avons mis en évidence dans les sections précédentes qu'un mécanisme de ratchet de translocation pour le transport transmembranaire de molécules d'ADN est réalisable à l'aide d'agents de ratchet situés à la sortie des nanopores. En se liant à la molécule d'ADN en translocation, les polycations utilisés comme agents de ratchet empêchent la rétro-diffusion du polymère dans le nanopore, ce qui promeut la translocation dans le sens direct à la manière d'un ratchet de translocation.

Conceptuellement, c'est la brisure de symétrie de la conformation de la molécule d'ADN de part et d'autre du nanopore qui induit la directionnalité du transport. En effet, les polycations viennent créer des liaisons intra-moléculaires au sein de la chaîne d'acides nucléiques de la molécule d'ADN en raison de leur multivalence. Le gain enthalpique lors de la création de ces liaisons, que nous avons estimé être de l'ordre de $14 k_B T$, compense le coût entropique induit par la réduction des degrés de liberté du polymère venant des liaisons intra-moléculaires. L'interaction entre les polycations et la molécule d'ADN se traduit par une compaction de la molécule d'ADN à la sortie des nanopores. La structure rigide ainsi formée empêche la rétro-diffusion de la molécule d'ADN à travers le pore.

Dans ce schéma, nous avons provoqué la formation d'un complexe compact d'ADN en introduisant dans la chambre inférieure des polycations. Cependant, il est également possible de provoquer l'effondrement d'une molécule d'ADN sur elle-même en la plaçant dans un mauvais solvant. Il s'agit alors d'une transition coil-globule, que nous avons détaillée dans la section 3.1.3. L'idée que nous avons alors eue a été de réaliser un mécanisme de ratchet de translocation en absence d'agents de ratchet mais avec une différence de qualité de solvant entre l'entrée et la sortie des nanopores : un bon solvant côté cis et un mauvais côté trans. Notre idée est de provoquer l'effondrement de la molécule d'ADN à la sortie des nanopores et d'employer le globule ainsi formé en tant qu'agent de ratchet.

1.7.1 Ratchet par mauvais solvant : un problème débattu

Cette idée a déjà été proposée par le passé mais aucune études expérimentales n'a jusque là été menée. La première mention du ratchet de translocation "par mauvais solvant" remonte à l'étude de Gu et Wang[412] où les auteurs procèdent à une étude analytique de la translocation d'un polymère en présence d'une différence de qualité de solvant entre

l'entrée et la sortie du nanopore. En détaillant l'expression du profil d'énergie libre dans une démarche proche de celle de Muthukumar (voir section 3.3.2), avec notamment une énergie d'interaction entre les monomères et le solvant prise comme proportionnelle au nombre de monomères en contact avec celui-ci (soit N pour un coil et $N^{2/3}$ pour un globule), les auteurs montrent que la translocation est favorisée vers le côté du mauvais solvant. Cependant, cette étude considère une évolution quasi-statique pour la translocation, ce qui n'est pas vérifié dans les expériences de translocation de polymères. Une étude de Wei *et coll.*[413] a montré par simulation via une approche de Langevin que la translocation d'un polymère entre deux qualités de solvant différents est transporté de manière préférentielle vers le mauvais solvant, confirmant les prédictions de Gu et Wang. Cependant, les auteurs ont modélisé l'effet du solvant en modifiant le potentiel entre monomères. Or, un changement de nature de solvant modifie le potentiel d'interaction entre un particule de solvant et un monomère mais pas celui entre deux monomères. Il s'agit de la principale critique faite à l'encontre de cette étude par une autre étude similaire, celle de Kapahnke *et coll.*[414]. Dans cette étude, les auteurs s'appuient sur une modélisation de DPD (dissipative particle dynamics) pour prendre en compte la modification de potentiel d'interaction entre un monomère et une molécule du solvant lorsque la nature du solvant est modifiée. Les auteurs montrent que la translocation est favorisée vers le côté du bon solvant car il minimise l'énergie d'interaction entre le polymère et le solvant. En modifiant au contraire le potentiel d'interaction entre monomères, les auteurs montrent qu'il est possible de biaiser la translocation vers le côté du mauvais solvant, ce qui apparaît comme un artefact de la méthode.

La possibilité d'un mécanisme de ratchet par effet de mauvais solvant se présente donc comme un problème encore aujourd'hui débattu, où les résultats diffèrent selon le type de modélisation employée. Une étude expérimentale semble donc de rigueur pour apporter des éléments nouveaux dans ce problème.

1.7.2 Dispositif expérimental

Ce système expérimental est réalisable expérimentalement grâce au forçage hydrodynamique que nous employons. En effet, il est nécessaire d'induire un écoulement pour prévenir la diffusion du mauvais solvant vers le bon solvant côté cis, ce qui annulerait le mécanisme de ratchet attendu. A nouveau, nous constatons qu'un forçage électrostatique comme utilisé dans la majorité des études expérimentales de translocation d'ADN ne pourrait pas convenir pour réaliser ce mécanisme de ratchet par mauvais solvant car il ne pourrait pas contenir le mauvais solvant du côté trans de la membrane.

Pour notre dispositif expérimental, nous avons repris le système employé pour étudier la translocation des molécules d'ADN à pression fixe en présence ou non d'agents de ratchet, à la différence près que nous n'avons pas ici employé d'agents de ratchet mais nous l'avons remplacé par un solvant côté cis composé d'un mélange d'un bon et d'un mauvais solvant pour les molécules d'ADN, à des fractions volumiques variables. En considérant le gain de fréquence de translocation en fonction de la fraction volumique en mauvais solvant, nous souhaitons mesurer le rendement du ratchet induit par le mauvais solvant.

1.7.3 Effet de ratchet de translocation par 2-propanol

Nous avons choisi d'employer le 2-propanol comme mauvais solvant. Cette espèce est couramment employée pour faire précipiter des molécules d'ADN et procéder à leur extraction sans dégradation des acides nucléiques, ce qui en fait un candidat idéal pour notre expérience[415]. De plus, la transition coil-globule de la molécule d'ADN induite par une fraction volumique croissante de 2-propanol a été décrite précisément dans la littérature : nous pouvons citer les études de Ueda et Yoshikawa[416] ou Ma *et coll.*[417] sur lesquelles nous reviendrons plus en détail après.

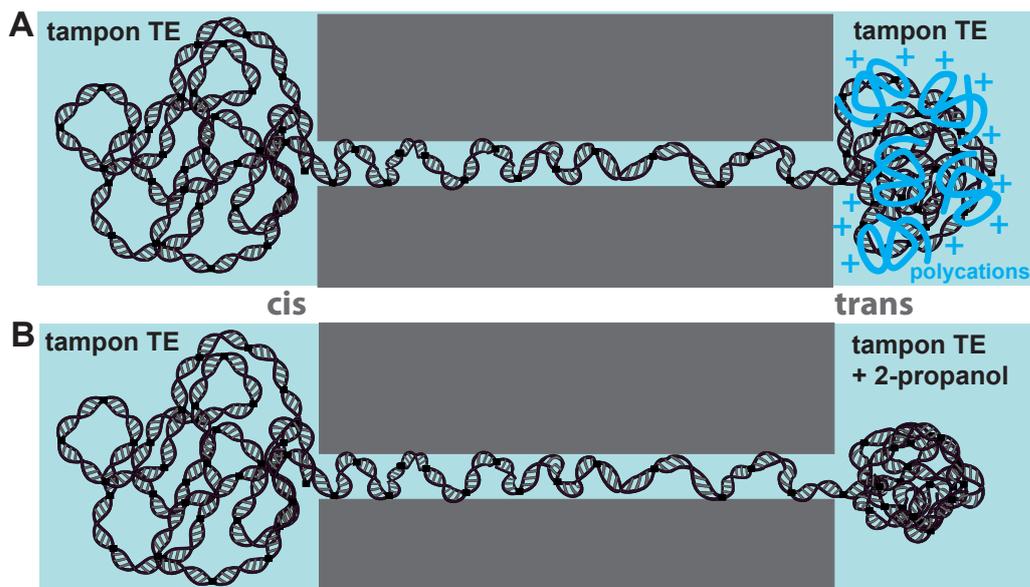


FIGURE 1.26 – Mécanisme de ratchet de translocation : A) par agents de ratchet (polycations); B) par différence de qualité de solvant, avec un effondrement de la molécule d'ADN du côté trans de la membrane par effet de mauvais solvant.

Nous avons utilisé des molécules d'ADN λ pour la translocation en solution dans un tampon TE (bon solvant). Les nanopores employés ici étaient des nanopores de 50 nm de diamètre. Nous avons mis en place le protocole suivant pour réaliser cette expérience :

- Injecter 100 μL d'une solution d'ADN λ à une concentration de 4,9 nM (en équivalent phosphates) dans un mélange Tris-KCl (10 mM) et EDTA (1 mM) à pH 7,6. L'ADN λ a été préalablement marqué au YOYO-1 (3,0 nM).
- Injecter 500 μL de solution Tris-KCl (10 mM) et EDTA (1 mM) dans la chambre inférieure, puis déposer la chambre supérieure sur la chambre inférieure afin d'assurer le mouillage des nanopores.
- Appliquer une pression "médiane" avec le contrôleur de pression (de l'ordre de la moitié de la pression critique; avec des nanopores de 50 nm de diamètre, nous appliquons en général une pression de 50 mbar).
- Faire la mise au point de l'objectif sur la surface métallique de la membrane à l'aide de la lampe de fluorescence; une fois cette étape réalisée, passer au laser 473 nm (Fig.1.27).

- Réaliser quelques acquisitions de vidéos (au moins 4 de 250 frames à 33 fps) (Fig.1.27).
- Couper le laser 473 nm, défocaliser l'objectif pour l'éloigner de la lamelle de verre. Ne pas couper la pression. Sortir la chambre supérieure de son support sur la chambre inférieure tout en la maintenant à sa verticale.
- Sécher la chambre inférieure à l'aide d'un papier absorbant propre, puis injecter 500 μL d'un mélange de tampon TE et de 2-propanol préalablement préparé avant l'expérience, à une fraction volumique en 2-propanol donnée (généralement des multiples de 0,1) (Fig.1.27).
- Repositionner la chambre supérieure sur son support dans la chambre inférieure. Patienter au moins 30 s avant de réaliser des acquisitions pour laisser au système le temps de se relaxer.
- Répéter le processus d'acquisition pour chaque fraction volumique de 2-propanol désirée.

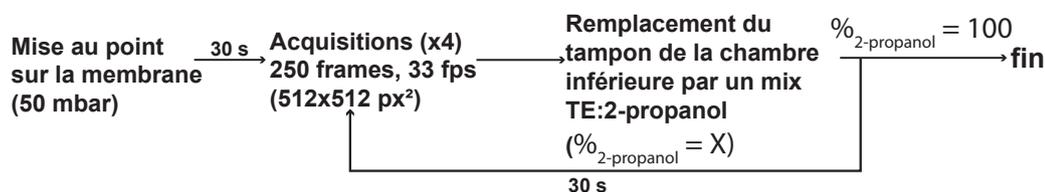


FIGURE 1.27 – Protocole de l'expérience de translocation avec mauvais solvant du côté trans de la membrane.

Pour chaque fraction volumique de mauvais solvant donnée, nous avons mesuré la fréquence de translocation. Comme pour les expériences avec les polycations, nous avons défini un gain de fréquence de translocation analogue tel que $\Delta f/f_0 = (f - f_0)/f_0$, avec f la fréquence de translocation à une fraction volumique de mauvais solvant donnée et f_0 la fréquence de translocation en absence de mauvais solvant côté trans de la membrane. Le résultat de ces mesures est présenté dans la figure 1.28.

Nous pouvons observer sur la figure 1.28 que le gain de fréquence de translocation est positif lorsque nous ajoutons un mauvais solvant en mélange à la sortie des nanopores, ce qui signifie que la présence d'un mauvais solvant côté trans de la membrane accélère la translocation des molécules d'ADN, conformément aux attentes pour un mécanisme de ratchet de translocation.

En revanche, l'évolution du gain de fréquence de translocation n'est pas linéaire comme c'est le cas pour les expériences de translocation en présence de polycations à la sortie des nanopores. Nous observons ici une courbe de forme sigmoïde, avec une forte croissance du gain de fréquence de translocation qui débute pour des fractions volumiques en 2-propanol entre 10% et 20% pour atteindre ensuite un plateau à une valeur proche de 1,7 à des fractions volumiques de l'ordre de 50%-60%. Ce plateau se poursuit jusqu'à 90%, avec une légère baisse constatée entre 70% et 90%, suivie d'une forte baisse pour une fraction volumique de 100% (c'est-à-dire un solvant ne contenant exclusivement que du 2-propanol), où le gain de fréquence reste positif mais à une valeur plus faible de l'ordre de l'unité.

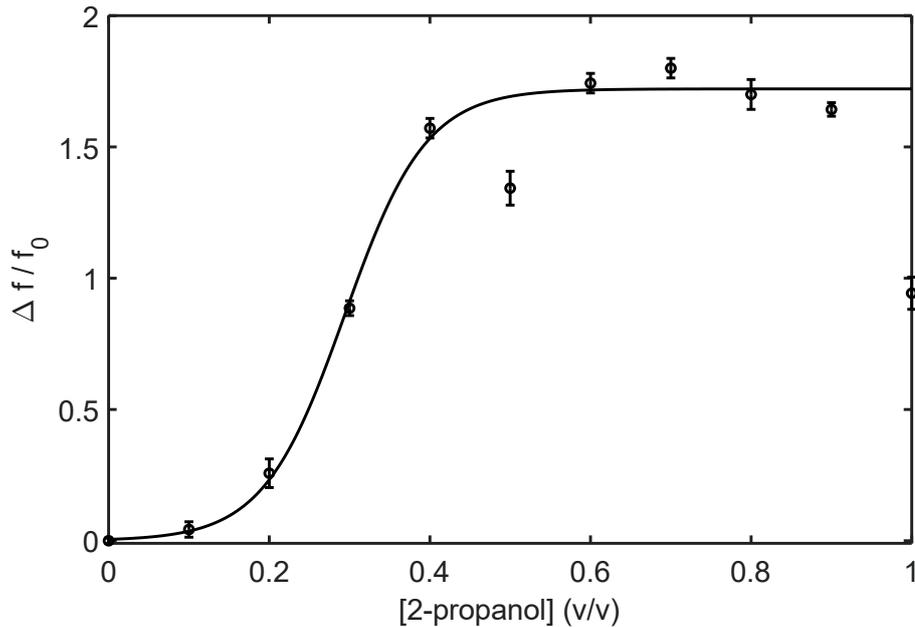


FIGURE 1.28 – Gain de fréquence de translocation en fonction de la fraction volumique de 2-propanol contenue dans le solvant. L'incertitude sur les données est prise comme l'erreur standard (95%). Pour chaque condition, l'expérience est répétée 4 fois. L'ajustement en trait plein correspond au modèle (1.29).

La forte décroissance du gain de fréquence à une fraction volumique de 100% de 2-propanol est assez énigmatique. Il est possible que la modification de la composition chimique du solvant de la chambre inférieure modifie de manière conséquente la qualité des observations, avec en particulier un changement d'indice optique entre le tampon TE, majoritairement composé d'eau à un indice optique de 1,33 et le 2-propanol à 1,37. L'objectif que nous utilisons est un objectif à eau, il est alors possible qu'une fraction volumique de 2-propanol perturbe les acquisitions, conduisant à une détection des flashes lumineux (soit les événements de translocation) plus difficile. Cependant, ce changement d'indice optique reste assez faible et il est assez peu probable que cet élément seul suffise à expliquer la forte décroissance observée pour une forte fraction volumique de 2-propanol.

Pour expliquer la forme sigmoïde de la courbe obtenue, nous proposons un modèle simple où les molécules d'ADN se répartissent en deux catégories : celles dont la portion côté trans de la membrane est sous une forme coil et celles où cette portion est sous forme globulaire. Lorsque la portion d'ADN côté trans est sous forme globulaire, alors un mécanisme de ratchet de translocation se met en place et accélère le transport de la molécule d'ADN à travers le pore ; autrement, le transport se fait à la vitesse normale en absence de ratchet. Ce modèle est analogue à celui que nous avons développé pour la translocation en présence de polycations dans la section 1.4.3. En revanche, nous considérerons que la répartition des molécules d'ADN sous forme coil et globule suit la répartition à l'équilibre thermodynamique, en faisant l'hypothèse que l'effondrement du polymère est un processus rapide par rapport à la durée de la translocation. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une transition coil-globule est une transition de phase du premier ordre, c'est-à-dire une transition discrète entre deux états (coil et globule). Dans ce schéma, il existe

une fraction volumique critique x^* de 2-propanol marquant la transition entre ces deux états. Cette fraction volumique correspond à la fraction volumique en mauvais solvant pour laquelle l'énergie d'interaction entre un monomère et le solvant en contact équivaut à l'énergie d'interaction entre monomères.

Dans le cadre de ce modèle, nous pouvons exprimer la proportion de molécules d'ADN sous forme globulaire P_{glob} par rapport à celles sous forme coil en reprenant la formule utilisée par Schweizerhof *et coll.*[418, 419] dans leur étude de la transition coil-globule de polymères de PNIPAm par changement de température, en adaptant l'expression à notre système :

$$P_{glob} \simeq \frac{1}{1 + \exp\left[\frac{-\Delta F^*(x-x^*)}{k_B T}\right]}, \quad (1.28)$$

où ΔF^* correspond à l'énergie libre de transition entre les formes coil et globule de la molécule d'ADN, x est la fraction volumique en 2-propanol et x^* la fraction volumique critique à la transition coil-globule.

Lorsque la molécule d'ADN est sous forme de globule, l'effet de ratchet de translocation est activé et la translocation est accélérée selon un rendement de ratchet Y (par extension avec la définition du rendement de ratchet défini dans la section 1.2.2). Nous noterons toutefois que le rendement de ratchet Y dans le cadre de l'effet "mauvais solvant" n'est pas défini comme le coefficient de proportionnalité entre la gain de ratchet $\Delta f/f_0$ comme précédemment mais comme la valeur de ce gain lorsque toutes les molécules sont sous forme de globules (soit une valeur constante). Avec cette définition, nous pouvons alors établir l'expression du gain de ratchet $\Delta f/f_0$ pour l'effet "mauvais solvant" de la manière suivante :

$$\frac{\Delta f}{f_0} = Y \times P_{glob} = \frac{Y}{1 + \exp\left[\frac{-\Delta F^*(x-x^*)}{k_B T}\right]}. \quad (1.29)$$

Nous avons ajusté avec succès les données expérimentales présentées dans la figure 1.28 selon le modèle (1.29), ce qui valide l'approche adoptée pour appréhender l'évolution expérimentale du gain de ratchet $\Delta f/f_0$. De cet ajustement, nous avons tiré des estimations pour les paramètres du modèle, à savoir la variation d'énergie libre ΔF^* pour la transition coil-globule de l'ADN λ en présence de 2-propanol, la fraction volumique critique x^* en 2-propanol de cette transition et la valeur du rendement de ratchet Y . Nous avons ainsi obtenu les valeurs suivantes (les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife (95%) :

- $\Delta F^* = (20,0 \pm 1,2) k_B T$ (95%) ;
- $x^* = 0,29 \pm 0,01$ (95%) ;
- $Y = 1,70 \pm 0,03$ (95%).

La valeur de la fraction volumique critique se compare avec succès aux mesures de l'étude de Ueda et Yoshikawa[416], réalisées sur des molécules d'ADN T4 marquées au YOYO-1, où les auteurs ont observé par microscopie de fluorescence la transition coil-globule de l'ADN induite par l'ajout de 2-propanol en solution avec l'ADN ; en particulier, les auteurs ont mesuré une transition coil-globule discrète pour une valeur de fraction volumique critique autour de 30%, ce qui est en très bon accord avec notre mesure. Une autre étude de Ma *et coll.*[417] montre une transition plus lisse du rayon de giration de la molécule d'ADN λ à partir d'une fraction volumique en 2-propanol de 30%. Cette

transition peut s'interpréter comme une valeur moyenne des molécules à la fois sous forme coil et sous forme globule, la mesure étant une valeur moyenne sur tout l'échantillon.

L'estimation de la variation d'énergie libre pour la transition coil-globule de l'ADN est comparable à la variation d'enthalpie libre par association de l'ADN avec des polycations d'une valeur de $14 k_B T$ (voir section 1.4.1). Les polycations ayant pour effet de compacter la molécule d'ADN, l'énergie apportée par la liaison avec le polycation doit compenser le coût entropique de compaction, d'où la valeur de $20 k_B T$ également mesurée pour le ratchet avec effet mauvais solvant.

Enfin, la valeur du rendement de ratchet Y est comparable avec celle mesurée pour l'ADN λ en présence d'agents de ratchet à la sortie des nanopores. La valeur de gain de ratchet $\Delta f/f_0$ présente ici un plateau à 1,7 que nous avons défini comme rendement de ratchet Y . Dans le cas du ratchet de translocation induit par des agents de ratchet cationiques, le gain de ratchet $\Delta f/f_0$ est linéaire avec le ratio de charges ρ_+/ρ_- , avec le rendement de ratchet Y défini comme le coefficient directeur de cette relation. La plus haute valeur de ratio de charges que nous avons mesurée était de 0,6 ; avec un rendement de ratchet Y de 2,4, nous obtenons ainsi un gain de ratchet $\Delta f/f_0$ de 1,4, ce qui est en accord quantitatif avec la mesure de gain de ratchet pour le mécanisme induit par effet mauvais solvant. Les valeurs comparables d'efficacité de ratchet pour des mécanismes différents (agents de ratchet cationiques d'un côté, effet mauvais solvant de l'autre) laissent entrevoir une généralité de l'efficacité du ratchet de translocation. De la même manière que le mécanisme de ratchet ne semble pas dépendant de la spécificité de l'agent de ratchet, comme nous l'avons montré dans la section 1.3, le ratchet de translocation n'est pas même dépendant de la nature du processus compactant la molécule à la sortie des nanopores, ce qui soutient l'idée d'un mécanisme général de sélection des fluctuations thermiques pour induire un mouvement directif.

1.7.4 Effet de ratchet de translocation par PEG

Pour aller plus loin dans notre étude sur l'effet de ratchet par mauvais solvant et confirmer les observations faites avec le 2-propanol, nous avons réalisé les mêmes expériences mais en remplaçant cette fois-ci le 2-propanol par une solution contenant du PEG. En effet, le PEG (polyéthylène glycol) est connu pour induire une condensation de l'ADN au-delà d'une concentration critique C^* [420]. Cette condensation est provoquée par l'augmentation de la pression osmotique liée à l'introduction du PEG en solution ; lorsque le travail de cette pression osmotique exercée sur la molécule d'ADN (sous forme coil) est supérieure à la barrière d'énergie libre pour induire la transition coil-globule, l'ADN se compacte pour adopter une conformation globulaire.

Le protocole employé pour réaliser cette expérience est semblable à celui décrit pour les expériences avec le 2-propanol, en remplaçant le 2-propanol par une solution de PEG-100k ($M.w. = 100\,000$ g/mol) à des concentrations variables entre 0 et 1,6 mM (en concentration de monomères). Pour comparer nos résultats à ceux obtenus pour le 2-propanol et au modèle (1.29), nous avons converti ces concentrations en fraction volumique (à savoir le volume occupé par les molécules de PEG en solution par rapport au volume de la solution). Pour cela, nous avons pris comme référence des monomères de taille 0,35 nm [421] et un modèle de polymère en bon solvant avec volume exclu ; pour le PEG-100k, nous obtenons ainsi un rayon par molécule de 36 nm, soit un volume de $20 \times 10^4 \mu m^3$.

Pour chaque valeur de fraction volumique en PEG-100k, nous avons mesuré la fréquence de translocation de molécules d'ADN λ marquées au YOYO-1. L'expérience a été répétée 4 fois puis nous avons moyenné les fréquences de translocation par valeur de fraction volumique en PEG-100k. La figure 1.29 présente le gain en fréquence de ratchet $\Delta f/f_0$ en fonction de la fraction volumique en PEG-100k.

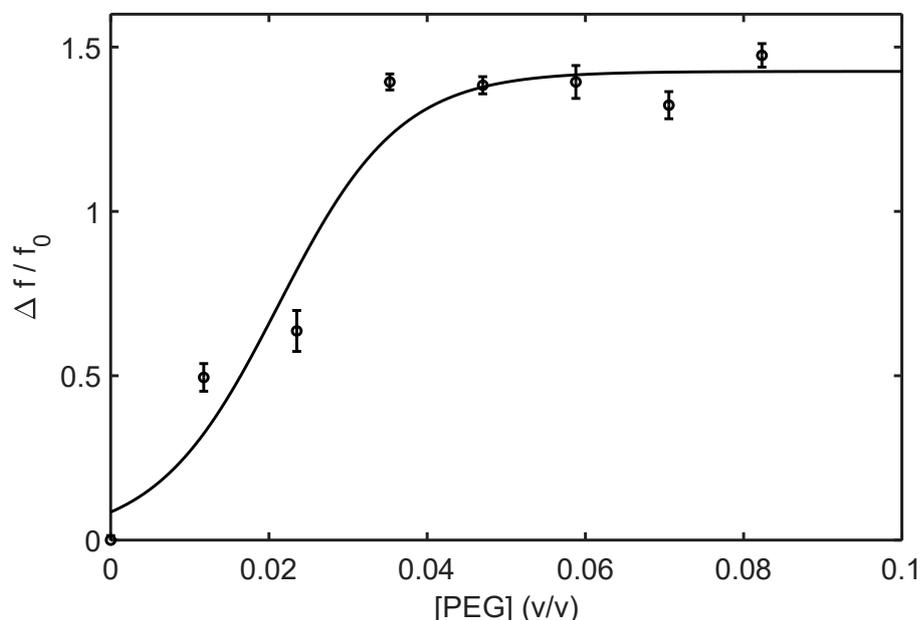


FIGURE 1.29 – Gain de fréquence de translocation en fonction de la fraction volumique de PEG-100k contenue dans le solvant. L'incertitude sur les données est prise comme l'erreur standard (95%). Pour chaque condition, l'expérience est répétée 4 fois. L'ajustement en trait plein correspond au modèle (1.29).

Nous pouvons observer sur la figure 1.29 que le gain de ratchet suit une évolution similaire à celle obtenue pour les expériences en présence de 2-propanol, à savoir une sigmoïde se terminant par un plateau à une valeur de 1,4. Ce gain de ratchet positif signifie que la translocation des molécules d'ADN λ à travers les nanopores est accélérée en présence de PEG-100k à la sortie des nanopores. Au regard de nos observations précédentes, nous pouvons affirmer que le PEG-100k induit un mécanisme de ratchet de translocation de la même manière que les polycations ou le 2-propanol. Nous pouvons classer le PEG-100k comme un ratchet de type "mauvais solvant", car il induit la compaction de la molécule d'ADN sans se lier à la molécule. Cette observation vient confirmer la possibilité de réaliser un ratchet de translocation par un effet mauvais solvant, ce qui vient étendre la vision canonique du ratchet de translocation comme nécessitant un agent de ratchet pour fonctionner. Nous avons montré que la compaction de la molécule d'ADN est au coeur du mécanisme de ratchet de translocation et son efficacité semble indépendante du processus à l'origine de cette compaction.

De manière quantitative, nous avons ajusté les données expérimentales de la figure 1.29 par le modèle (1.29); le résultat de cet ajustement est présenté dans la figure 1.29. Nous avons ainsi mesuré les paramètres du modèle pour le cas du PEG-100k :

$$- \Delta F^* = (122 \pm 9) k_B T \text{ (95\%);}$$

- $x^* = 0,021 \pm 0,001$ (95%);
- $Y = 1,43 \pm 0,01$ (95%).

La valeur du rendement de ratchet Y mesurée pour le PEG-100k est comparable à celle mesurée pour le 2-propanol. Une fois encore, la généralité du ratchet de translocation transparait à travers la valeur de rendement de ratchet invariable d'un système à l'autre.

Concernant la valeur de la fraction volumique critique, celle-ci est inférieure à celle obtenue pour le 2-propanol : 0,02 contre 0,29, soit près de 10 fois moins. Cet écart observé entre les deux systèmes est susceptible de provenir d'une mauvaise estimation du volume occupé par les molécules de PEG en solution via la formule pour les polymères en bon solvant avec volume exclu, conduisant alors à une imprécision sur la fraction volumique. De plus, notre calcul fait l'hypothèse d'une distribution monodisperse de l'échantillon de PEG-100k. Or, avec le haut degré de polymérisation de la molécule, la dispersion en tailles des molécules de l'échantillon n'est pas négligeable, ce qui peut là-aussi induire une imprécision sur l'estimation de la fraction volumique.

La mesure de ΔF^* pour le PEG-100k nous indique une valeur de $122 k_B T$, ce qui semble être une valeur excessive. Nous attribuons cette valeur à une mauvaise définition de la transition coil-globule sur la figure 1.29. Comme nous pouvons le voir sur cette figure, la transition est moins bien définie que celle pour le 2-propanol, ce qui peut conduire à une mauvaise estimation du paramètre d'énergie libre rendant compte de la largeur de cette transition.

1.7.5 En résumé

Nous avons vu dans la section précédente qu'un mécanisme de ratchet de translocation est réalisable sans agent de ratchet à partir d'une différence de qualité de solvant entre l'entrée et la sortie des nanopores. En particulier, la présence d'un mauvais solvant à la sortie des nanopores peut provoquer une transition d'une forme coil vers une forme globulaire pour la molécule d'ADN, ce qui génère un mécanisme de ratchet de translocation, le globule empêchant grâce à sa nature compacte la rétro-diffusion du polymère dans le nanopore. Nous avons vu que l'efficacité du ratchet de translocation n'est pas dépendant du type de ratchet employé (par agent de ratchet ou par mauvais solvant), ce qui souligne la généralité du mécanisme. Ces observations constituent les premières observations expérimentales d'un phénomène jusqu'ici uniquement débattu sur des bases théoriques et de modélisations.

Translocation d'ADN simple brin

Nous avons vu dans le chapitre 2 qu'un grand nombre de molécules traversant les translocons biologiques sont initialement couvertes de molécules chaperonnes Hsp, ces dernières permettant de protéger la molécule transportée face à des modifications physiques ou chimiques anormales, comme des variations brutales de température ou de pH. Ces chaperonnes permettent également à la molécule d'intérêt d'adopter sa conformation physiologique en favorisant son repliement. Pour assurer le transport de ces molécules, les translocons fonctionnant sur le principe du ratchet de translocation doivent dénaturer temporairement les protéines pour leur permettre de traverser le pore, ce qui peut potentiellement modifier l'efficacité du mécanisme de ratchet de translocation.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'influence sur l'efficacité du ratchet de translocation de la présence de structures secondaires dans le substrat en translocation. Nous avons utilisé pour cela des molécules d'ADN présentant des structures secondaires (Fig.2.1). Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de structures secondaires sur la translocation de molécule d'ADN en absence d'agents de ratchet, ce qui nous a servi de point de comparaison pour voir, dans un second temps, l'effet de ratchet induit par la présence d'agents de ratchet à la sortie des nanopores sur le transport de ces molécules.



FIGURE 2.1 – Conformation de plus basse énergie de l'ADN viral simple brin Φ X174 obtenue grâce à l'algorithme du serveur mfold[422, 423].

L'étude présentée dans ce chapitre a été réalisée en collaboration avec Léa Chazot-

Franguiadakis et Thomas Auger. Les résultats obtenus ont donné lieu à une publication (actuellement soumise au journal PRL).

2.1 Protocole expérimental

2.1.1 ADN avec structures secondaires utilisés dans nos expériences

Dans notre étude, nous avons utilisé deux types de molécules d'ADN possédant des structures secondaires : des molécules d'ADN simple brin et des molécules d'ADN double brin préalablement dénaturées par chauffage.

Les molécules d'ADN simple brin présentent spontanément des structures secondaires en raison de leur topologie. Les bases d'ADN simple brin s'associent entre elles par liaisons intramoléculaires, ce qui conduit à des structures rigides appelées structures secondaires.

Nous comptons dans notre études les ADN simple brin suivants :

- ADN M13mp18 (New England Biolabs) : ADN circulaire simple brin de 7249 nt d'origine virale.
- ADN Φ X174 (New England Biolabs) : ADN circulaire simple brin de 5386 nt d'origine virale.

Nous avons également utilisé des molécules d'ADN λ préalablement dénaturées par chauffage à 80°C pendant 10 minutes, suivies d'une trempe thermique de 5 minutes sur bain de glace (5°C). Avec ce protocole, la molécule d'ADN λ double brin est dénaturée en deux brins complémentaires, puis la trempe thermique induit la formation de liaisons intramoléculaires au sein de ces brins complémentaires, générant ainsi des structures secondaires analogues à celles des ADNs simple brin. Les molécules d'ADN λ "chauffées" sont ensuite immédiatement utilisées pour les expériences de translocation pour éviter la ré-hybridation des brins complémentaires.

2.1.2 Préparation des molécules d'ADN

Des expériences préliminaires de translocation de molécules d'ADN simple brin (ADN Φ X, 5386 nt) à travers des nanopores de 50 nm de diamètre ont montré une faible reproductibilité des résultats, attribuée à une grande variabilité des structures secondaires formées par les molécules. En effet, la formation de structures secondaires dans l'ADN simple brin suit le profil d'énergie libre en adoptant les conformations des minimums locaux jusqu'à atteindre le minimum global du profil d'énergie libre. La molécule d'ADN Φ X174 étant longue et complexe, il existe un grand nombre de minimums locaux dans lesquels la molécule peut rester piégée. Ainsi, la variabilité des structures secondaires rencontrées dans un échantillon d'ADN simple brin tend à augmenter au cours du temps. Pour limiter cet effet, il est possible de chauffer l'échantillon au-delà de la température de dénaturation de la molécule d'ADN, ce qui permet de rompre les liaisons intramoléculaires. Ce chauffage est ensuite suivi d'une phase de trempe thermique, ayant pour but de figer les molécules dans une conformation donnée. L'ensemble des molécules d'ADN simple brin ayant été précédemment dénaturées, les conformations adoptées lors de la

trempe sont plus homogènes qu'à l'état initial avant le processus de dénaturation, ce qui améliore la reproductibilité des résultats.

Nous avons donc suivi le protocole suivant pour homogénéiser les échantillons d'ADN et les préparer pour les expériences de translocation (Fig.2.2) :

- Faire chauffer à 80°C pendant 10 minutes la solution d'ADN simple brin (M13mp18 ou Φ X174 dans nos expériences) en solution à 725 nM (en équivalent de bases) dans 1 mL de solution tampon TE (Tris-KCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6 à 25°C).
- Dès les 10 minutes de chauffage terminés, plongez immédiatement la solution d'ADN dans un bain de glace (5°C) pendant 5 minutes pour effectuer la trempe thermique de la solution.
- Une fois la trempe thermique terminée, ajouter du YOYO-1 en solution avec l'ADN pour une concentration finale en YOYO-1 de 300 nM. Laisser reposer la solution à température ambiante pendant 10 minutes avant de commencer les expériences de translocation.

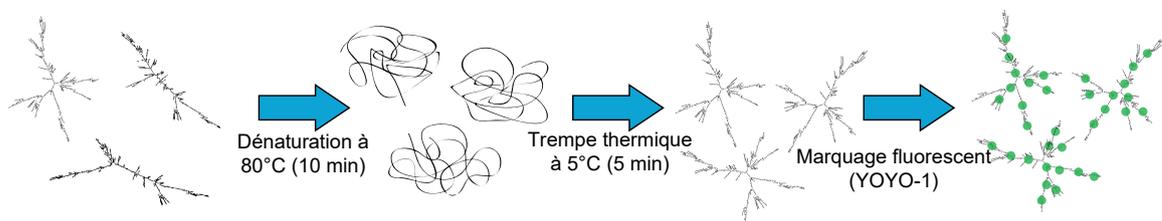


FIGURE 2.2 – Protocole de préparation des molécules d'ADN simple brin pour les expériences de translocation : les molécules sont d'abord chauffées pendant 10 minutes à 80°C pour les dénaturer puis elles subissent une trempe thermique à 5°C pendant 5 minutes, ce qui fige les structures secondaires formées et permet une homogénéisation des conformations des molécules d'ADN au sein de l'échantillon. Pour finir, les molécules sont marquées au YOYO-1.

2.1.3 Déroulement de l'expérience

Après avoir préparé l'échantillon d'ADN simple brin, nous procédons de manière analogue au protocole développé dans la section 1.1.1 pour la translocation de molécules d'ADN λ . Nous rappelons ci-dessous le protocole de l'expérience :

- Injecter 100 μ L de la solution d'ADN simple brin (préalablement préparée selon le protocole décrit précédemment) diluée à 1/100 dans une solution tampon TE, soit une concentration de travail d'environ 7 nM (en équivalent de bases) dans un bouchon contenant une membrane nanoporeuse.
- Injecter 500 μ L de la solution tampon TE dans la chambre inférieure, puis déposer le bouchon rempli de solution d'ADN dans la chambre inférieure afin d'assurer le mouillage de la membrane nanoporeuse.
- Appliquer une pression correspondant à la borne supérieure des pressions utilisées lors de l'expérience (150 mbar dans nos expériences), ce qui induit la translocation des molécules d'ADN à travers les nanopores.

- Faire la mise au point de l'objectif sur la membrane nanoporeuse à l'aide de la lampe de fluorescence. Lorsque la mise au point est faite, éteindre la lampe de fluorescence et allumer le laser 473 nm.
- Débuter les acquisitions vidéo ; généralement, nous procédons à 4 acquisitions successives de 250 frames à 33 fps.
- Une fois les acquisitions à une pression donnée terminées, baisser la pression de 10 mbar, puis attendre au minimum 30 secondes avant de réaliser une nouvelle acquisition, pour laisser le système s'équilibrer.

2.2 Translocation d'ADN simple brin avec structures secondaires

Nous avons observé la translocation de molécules d'ADN simple brin présentant des structures secondaires. Nous avons utilisé l'ADN M13mp18 et les nanopores de 50 nm de diamètre pour ces mesures et nous avons suivi le protocole décrit dans la section précédente. La fréquence de translocation a été mesurée en fonction de la pression hydrodynamique imposée pour des pressions allant de 20 mbar à 150 mbar. Ces expériences ont été reproduites un minimum de 36 fois et nous avons moyenné les résultats obtenus pour chaque valeur de pression. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 2.3.

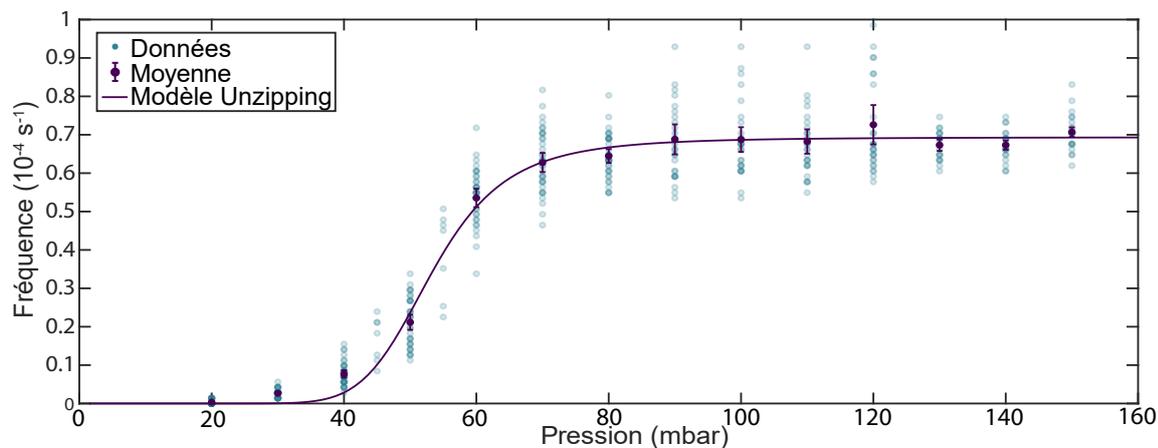


FIGURE 2.3 – Expérience de translocation de molécules d'ADN simple brin à pression variable : fréquence de translocation des molécules d'ADN simple brin M13mp18 en fonction de la pression hydrodynamique imposée à travers des nanopores de 50 nm de diamètre. Les données expérimentales sont représentées par les points de couleur cyan et la moyenne de ces points pour chaque valeur de pression est représentée par les points violets (les barres d'erreur sont prises comme l'incertitude standard à 95%). La courbe moyenne est ensuite ajustée par le modèle d'unzipping développé dans la section 2.4.1

Nous pouvons observer sur la figure 2.3 que la fréquence de translocation pour les molécules d'ADN avec structures secondaires présente un seuil de pression critique en dessous de laquelle nous n'observons pas d'événements de translocation. Visuellement, ce seuil se situe entre 20 mbar et 40 mbar. Ce profil n'est pas sans rappeler celui du modèle

de succion, vérifié expérimentalement pour des molécules d'ADN λ (double brin, sans structures secondaires).

Cependant, la forme de la courbe s'éloigne du modèle de succion pour des pressions supérieures à 60 mbar, pour lesquelles la fréquence de translocation sature et présente un plateau d'une valeur de $0,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Ce plateau se poursuit jusqu'à la valeur de pression maximale appliquée durant nos expériences (150 mbar).

Ces mesures semblent donc indiquer que la translocation des molécules d'ADN présentant des structures secondaires s'effectue avec une barrière d'énergie d'entrée dans le nanopore donnée par le modèle de succion, soit une barrière d'énergie résultante de la compétition entre le coût entropique de confinement du polymère à l'intérieur du nanopore et du travail fourni au polymère par l'écoulement et permettant de déformer la pelote de polymère. En revanche, au-delà d'une certaine pression (ici de l'ordre de 60 mbar), l'étape limitante de la translocation n'est plus l'étape de confinement du polymère dans le nanopore mais une étape ne dépendant pas de la pression. A partir de ces observations, nous pouvons conclure que la présence d'une saturation de la fréquence de translocation pour des pressions fortes semble propre aux translocations d'ADN présentant des structures secondaires.

Pour confirmer cette observation, nous avons réalisé les mêmes mesures avec d'autres types d'ADN présentant des structures secondaires, à savoir l'ADN ΦX174 , qui est un ADN simple brin et l'ADN λ préalablement dénaturé (voir section 2.1.1). Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 2.4.

Pour chaque type d'ADN, nous avons ajusté le début de la courbe à basse pression avant la saturation par le modèle de succion pour en tirer des estimations de la pression critique P_c et de la fréquence à la pression critique f_c ; ces paramètres nous ont ensuite permis de normaliser les axes des abscisses et des ordonnées. Pour la comparaison, nous avons également tracé la courbe de fréquence de translocation pour l'ADN λ non-dénaturé.

Nous pouvons observer une saturation de la fréquence de translocation pour tous les types d'ADN présentant des structures secondaires (M13mp18, ΦX174 et ADN λ dénaturé), saturation qui n'apparaît pas pour l'ADN λ non-dénaturé. Cette saturation apparaît pour tous les ADNs avec structures secondaires pour des pressions de l'ordre de $0,6P_c$ et la fréquence de saturation, même si elle semble moins marquée pour les ADNs ΦX et λ dénaturé que pour M13mp18, est de l'ordre de $0,1f_c$.

A partir de ces observations, nous pouvons confirmer l'observation faite précédemment sur l'ADN M13mp18 : la présence de structures secondaires dans la molécule d'ADN semble induire à forte pression (pour $P \simeq P_c$) une saturation de la fréquence de translocation dont la valeur ne semble pas ou peu spécifique du type d'ADN. La présence d'un plateau indique que l'étape limitante à l'origine de cette saturation de la fréquence de translocation n'est pas dépendante de la pression exercée.

Une hypothèse possible pour expliquer l'origine de cette saturation pourrait consister en un blocage de l'accès à l'entrée du nanopore par les structures secondaires de l'ADN. En effet, ces structures rigides pourraient limiter la déformation du polymère à l'entrée du nanopore, ne lui permettant ainsi pas de s'engouffrer à l'intérieur et de poursuivre sa translocation. La translocation ne serait alors possible qu'après l'ouverture spontanée des structures secondaires par fluctuation, d'où l'indépendance de la fréquence de saturation avec la pression imposée. Ainsi, à faible pression, l'ouverture spontanée des structures secondaires surviendrait plus vite que les déformations de la pelote à l'entrée du nano-

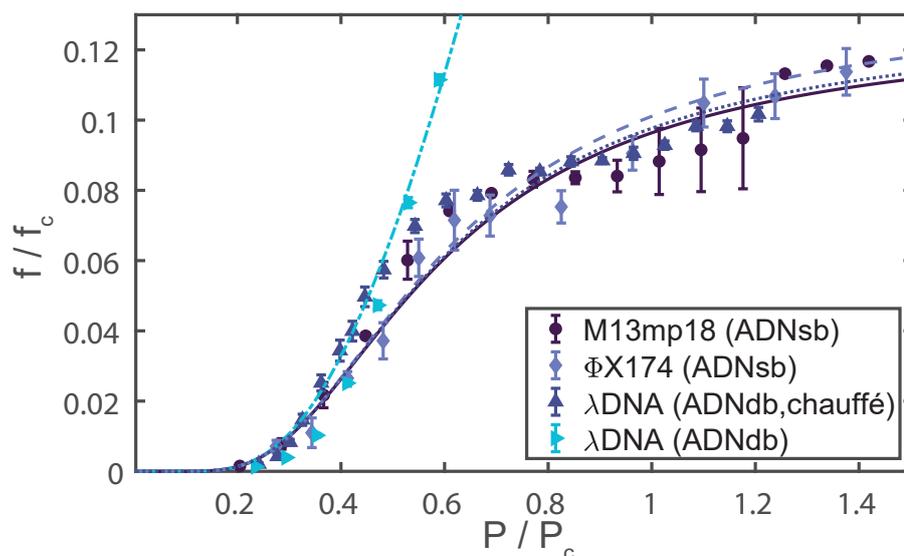


FIGURE 2.4 – Expérience de translocation de molécules d'ADN avec structures secondaires : fréquence de translocation de diverses molécules d'ADN simple brin (sb) ou double brin (db) en fonction de la pression hydrodynamique imposée à travers des nanopores de 50 nm de diamètre. Les abscisses et ordonnées sont respectivement normalisées par la pression critique P_c et la fréquence à la pression critique f_c pour chaque série de courbes. Les courbes sont obtenues en moyennant par valeur de pression des échantillons d'au moins 36 points expérimentaux et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à 95%. Les molécules d'ADN simple brin possèdent des structures secondaires, de même pour les molécules d'ADN double brin ayant subi une dénaturation par chauffage. Les données sont ajustées par le modèle d'unzipping développé dans la section 2.4.1.

pore lui permettant de pénétrer dedans, ce qui mènerait à une dynamique donnée par le modèle de succion. Cependant, à plus forte pression, l'ouverture de ces structures secondaires deviendrait l'étape limitante et la fréquence de translocation serait dominée par la fréquence d'ouverture spontanée des structures secondaires.

Dans ce schéma, nous devrions observer une disparition du plateau de saturation pour des nanopores de diamètre plus grand : si le nanopore est plus grand que la taille des structures secondaires, alors celles-ci ne devraient plus gêner la translocation et nous devrions observer une dynamique gouvernée par le modèle de succion.

Une estimation de la taille de ces structures secondaires peut s'effectuer d'après la conformation de l'ADN Φ X174 présentée dans la figure 2.1. Nous pouvons estimer qu'une structure secondaire, visible sur la figure sous la forme d'une "épine", s'étend en moyenne sur une longueur d'au moins 100 bases, soit près de 30 nm. Ces structures étant de part et d'autre de l'axe principal de la molécule, nous pouvons estimer qu'un diamètre de nanopore de plus de 60 nm devrait permettre aux ADNs avec structures secondaires de passer sans nécessité d'ouverture spontanée des structures secondaires.

Pour vérifier cette prédiction, nous avons réalisé des expériences de translocation de molécules d'ADN M13mp18 et Φ X174 à travers des pores de 80 nm de diamètre selon le même protocole qu'auparavant. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 2.5.

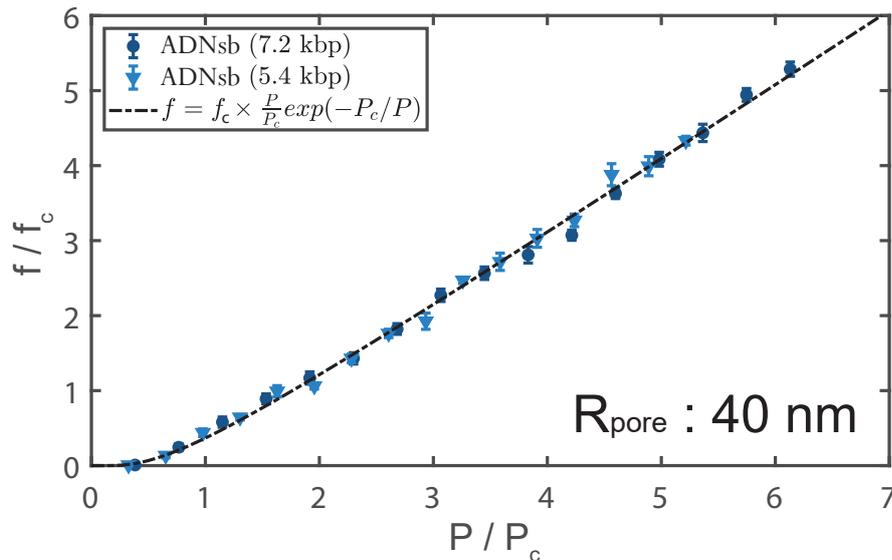


FIGURE 2.5 – Expérience de translocation de molécules d'ADN avec structures secondaires : fréquence de translocation de diverses molécules d'ADN simple brin en fonction de la pression hydrodynamique imposée à travers des nanopores de 80 nm de diamètre. Les abscisses et ordonnées sont respectivement normalisées par la pression critique P_c et la fréquence à la pression critique f_c pour chaque série de courbes. Les courbes sont obtenues en moyennant par valeur de pression des échantillons d'au moins 36 points expérimentaux et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à 95%. Les données sont ajustées par le modèle de succion.

Nous pouvons observer une absence claire de saturation pour des translocations d'ADN

M13mp18 et Φ X174 dans des nanopores de 80 nm de diamètre, conformément aux prédictions issues de notre raisonnement précédent. Les données expérimentales sont parfaitement ajustées par le modèle de succion et nous n'observons aucune saturation même pour des pressions supérieures à $5P_c$.

Les observations précédentes sont donc en adéquation avec les prédictions de notre modèle expliquant la saturation de la fréquence de translocation par le blocage induit par les structures secondaires à l'entrée des nanopores. Nous allons voir dans la section suivante que la suppression des structures secondaires par hybridation des ADN simple brin avec des bases libres en solution, formant ainsi un hétéroduplex double brin, provoque la disparition progressive du plateau de saturation.

2.3 Translocation d'ADN simple brin en présence de dNTP

Pour tester l'hypothèse de saturation de la fréquence de translocation par les structures secondaires de l'ADN, nous avons ajouté dans les solutions d'ADN des nucléotides libres (dNTP), capables de se lier aux bases simple brin de l'ADN, empêchant ainsi la formation de liaisons intramoléculaires et donc de structures secondaires. L'ajout progressif de dNTP en solution avec les ADN permet de rompre localement les appariements de bases intramoléculaires. Lorsque les dNTP sont en excès par rapport aux bases d'ADN, alors l'échantillon est essentiellement composé d'hétéroduplex ADN-dNTP sous une forme double brin ne présentant pas de structures secondaires. L'ajout de dNTP en concentration croissante devrait donc estomper le plateau de saturation exhibé par la fréquence de translocation jusqu'à totalement disparaître en excès de dNTP.

Pour réaliser les expériences de translocation d'ADN simple brin en présence de dNTP, les solutions d'ADN sont préparées selon le protocole décrit dans la section 2.1.2. Les dNTP sont ajoutés en solution avec l'ADN simple brin après la trempe thermique de celui-ci et avant le marquage fluorescent au YOYO-1. Les dNTP sont injectés à la concentration voulue puis la solution est laissée au repos à 5°C pendant un minimum d'une heure pour que l'association entre les dNTP et les bases d'ADN ait le temps de s'équilibrer. Les concentrations en dNTP seront données en fraction de dNTP par rapport aux bases d'ADN disponibles, notée θ , telle que $\theta = [dNTP] / [ssDNA]$, où la concentration en ADN est donnée en équivalent de bases. Avec cette définition, une valeur de 1 pour θ signifie qu'il y a en solution autant de dNTP que de bases d'ADN simple brin.

Nous avons donc mené des expériences de translocation avec des molécules d'ADN M13mp18 en présence de concentrations variables en dNTP, allant de 0 à 3 en fraction par rapport aux bases d'ADN. Pour chaque série de mesures, nous avons répété les expériences un minimum de 36 fois. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 2.6.

Nous pouvons observer sur la figure 2.6 que le plateau de saturation disparaît progressivement avec l'ajout de dNTP en concentrations croissantes, pour totalement disparaître pour des fractions en dNTP de l'ordre de 2-3. Ainsi, plus les structures secondaires sont remplacées par des hybrides dNTP-ADN, plus la courbe de fréquence de translocation se rapproche de celle prédite par le modèle de succion, conformément à nos prédictions précédentes.

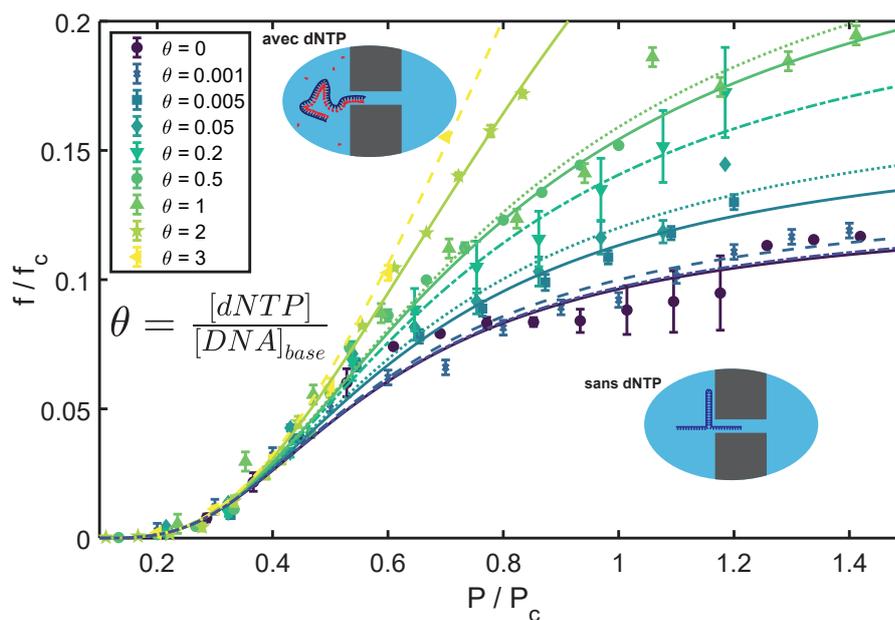


FIGURE 2.6 – Expérience de translocation de molécules d'ADN avec structures secondaires en présence de dNTP : fréquence de translocation de molécules d'ADN simple brin M13mp18 en fonction de la pression hydrodynamique imposée à travers des nanopores de 50 nm de diamètre en présence de concentrations variables en dNTP. Les abscisses et ordonnées sont respectivement normalisées par la pression critique P_c et la fréquence à la pression critique f_c pour chaque série de courbes. Les courbes sont obtenues en moyennant par valeur de pression des échantillons d'au moins 36 points expérimentaux et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à 95%. Les données sont ajustées par le modèle d'unzipping développé dans la section 2.4.1.

A partir de ces observations et celles réalisées sur les expériences de translocation d'ADN avec structures secondaires dans des nanopores de 80 nm de diamètre, nous pouvons conclure que la saturation de la fréquence de translocation à forte pression est bien due à la présence des structures secondaires, qui bloquent l'entrée du polymère à l'intérieur des nanopores.

Pour modéliser ce comportement, nous avons développé un modèle basé sur celui du modèle de succion, en prenant en compte une étape supplémentaire correspondant à l'ouverture spontanée des structures secondaires par fluctuations thermiques. Nous appellerons par la suite ce modèle sous le nom de modèle d'unzipping.

2.4 Modèle d'unzipping

2.4.1 Développements théoriques du modèle d'unzipping

Dans le modèle d'unzipping, l'accès de la molécule d'ADN dans les nanopores est uniquement permis si les structures secondaires de celle-ci sont ouvertes. L'ouverture des structures secondaires est un processus spontané sous l'effet de fluctuations thermiques que nous pouvons concevoir comme le franchissement d'une barrière d'énergie libre dans la théorie cinétique de Kramers. Nous supposons que la hauteur de cette barrière d'énergie est indépendante de la pression hydrodynamique appliquée, conformément à nos observations expérimentales. Dans ce schéma, la fréquence caractéristique d'ouverture des structures secondaires est une constante notée k_{off} .

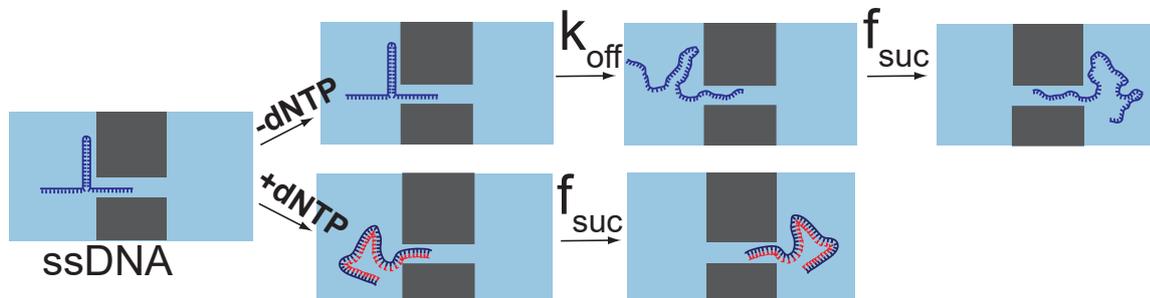


FIGURE 2.7 – Modèle d'unzipping pour la translocation de molécules d'ADN avec structures secondaires : en absence de dNTP (-dNTP), la réussite de la translocation est conditionnée par l'ouverture spontanée des structures secondaires avec une fréquence caractéristique k_{off} , puis la molécule traverse le nanopore en suivant le modèle de succion. En présence de dNTP (+dNTP), les structures secondaires sont déjà rompues à l'arrivée de la molécule d'ADN à l'entrée du nanopore, donc la translocation suit le modèle de succion exactement.

Lorsque la molécule d'ADN présente une structure secondaire, sa translocation à travers les nanopores s'effectue avec un temps additionnel par rapport au modèle de succion, dont la valeur moyenne est k_{off}^{-1} . Une fois ses structures secondaires ouvertes par un processus spontané, la molécule peut pénétrer à l'intérieur du nanopore selon le modèle de succion avec une fréquence caractéristique f_{suc} (Fig.2.7).

Lorsque le milieu contient des nucléotides libres en solution, il existe une probabilité que ces nucléotides soient liés aux ADN simple brins, entraînant ainsi la disparition des structures secondaires. Par conséquent, ces hétéroduplex ne sont pas bloqués à l'entrée des nanopores et les traversent alors selon le modèle de succion (Fig.2.7). La probabilité P_{duplex} qu'un nucléotide libre soit lié à une base d'ADN simple brin (et par extension la probabilité qu'une structure secondaire soit détruite par la liaison avec des dNTPs) s'exprime, dans le cadre de la théorie des isothermes d'adsorption de Langmuir, selon la concentration en dNTP et la constante de dissociation entre un nucléotide libre et une base d'ADN simple brin K_d de la manière suivante :

$$P_{duplex} = \frac{\theta}{\theta + K_d}, \quad (2.1)$$

où θ représente la fraction de dNTP par rapport aux bases de l'ADN simple brin et K_d est exprimé en unité de θ , qu'on peut aisément convertir en concentration molaire connaissant la concentration en ADN simple brin (en équivalent de bases).

De manière analogue, la probabilité P_{ss} de trouver une structure secondaire dans la structure d'une molécule d'ADN même en présence de dNTP est donnée par la probabilité complémentaire à P_{duplex} , soit :

$$P_{ss} = \frac{K_d}{\theta + K_d}. \quad (2.2)$$

Ainsi, dans le modèle d'unzipping, la durée totale τ de translocation d'une molécule d'ADN présentant des structures secondaires, en présence de nucléotides libres en solution à une fraction θ , est donnée par la relation suivante :

$$\tau = k_{off}^{-1} \times P_{ss} + f_{suc}^{-1}. \quad (2.3)$$

La fréquence de translocation f s'exprime comme l'inverse de la durée caractéristique de la translocation, soit :

$$f(P, \theta) = \tau^{-1}(P, \theta) = \frac{f_c \frac{P}{P_c}}{\frac{f_c}{k_{off}} \times \frac{K_d}{K_d + \theta} + \exp\left(\frac{P_c}{P}\right)}. \quad (2.4)$$

Pour des raisons de commodité, nous définissons un paramètre β appelé paramètre de structure secondaire et définit de la manière suivante :

$$\beta(\theta) = \frac{f_c}{k_{off}} \times \frac{K_d}{K_d + \theta}. \quad (2.5)$$

D'après l'expression de la fréquence de translocation (2.4), lorsque $P \ll P_c$, nous retrouvons l'expression canonique du modèle de succion : $f = f_c(P/P_c)\exp(-P_c/P)$. Dans ce régime, l'ouverture des structures secondaires de l'ADN est un processus négligeable par rapport au temps caractéristique du confinement du polymère à l'intérieur du nanopore.

Au contraire, lorsque $P \gg P_c$, nous avons $f \propto f_c/(P_{ss} + P_c/P)$. Si $P_{ss} \ll P_c/P$, c'est-à-dire dans le cas où la présence de structures secondaires est peu probable, nous retrouvons l'expression du modèle de succion à forte pression, à savoir $f \propto f_c \times P/P_c$. Dans ce régime, la translocation est dominée par l'advection du polymère par l'écoulement. Dans le cas contraire, soit $P_{ss} \gg P_c/P$, la présence de structures secondaires est fort probable,

donc la fréquence de translocation présente un plateau de saturation à la valeur $f_c P_{ss}^{-1}$. La translocation est alors dominée par l'ouverture spontanée des structures secondaires par fluctuations thermiques.

Nous verrons dans la section 2.4.4 une généralisation du modèle d'unzipping prenant en compte un équilibre en solution entre les formes ouvertes et fermées des structures secondaires.

2.4.2 Validation expérimentale du modèle d'unzipping

Nous avons mis notre modèle d'unzipping à l'épreuve des données expérimentales. Le résultat des ajustements des courbes expérimentales par notre modèle est visible sur les figures précédentes en trait plein. Nous pouvons constater un très bon ajustement des données expérimentales par le modèle d'unzipping, ce qui vient valider l'approche cinétique pour modéliser la translocation des molécules d'ADN présentant des structures secondaires.

De manière analogue et pour une meilleure lisibilité, nous avons repris les données de la figure 2.3 que nous avons tracées de manière à faire apparaître une courbe maîtresse rendant compte du modèle d'unzipping. Le résultat de cette représentation est montré dans la figure 2.8. Plus les points expérimentaux sont proches de la droite tracée en pointillés, plus la qualité du modèle d'unzipping pour les représenter est grande.

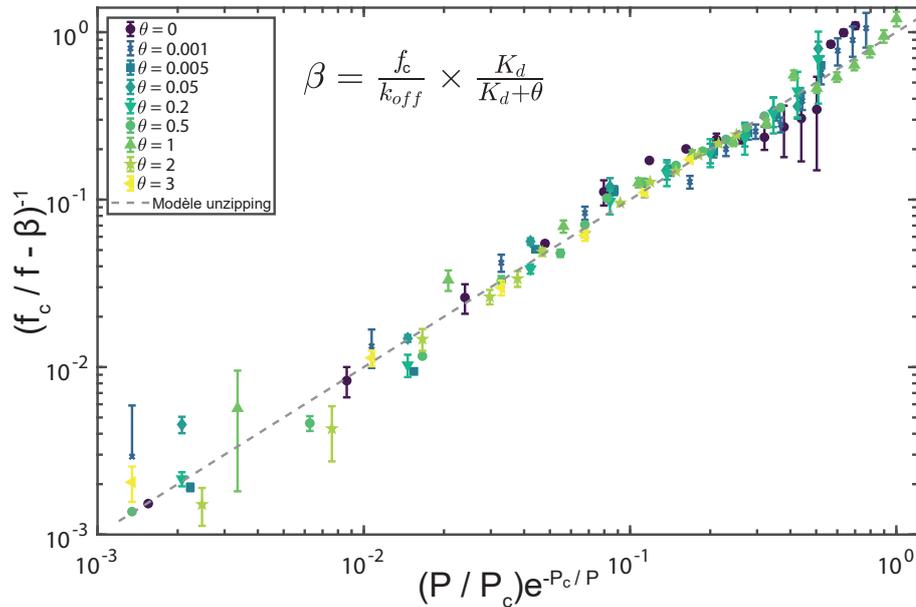


FIGURE 2.8 – Courbe maîtresse du modèle d'unzipping pour la translocation de molécules d'ADN avec structures secondaires. Les données expérimentales sont issues de la figure 2.6.

Nous pouvons observer un grand accord entre les données expérimentales et le modèle d'unzipping pour l'ensemble des conditions testées. Nous constatons un faible écart des données au modèle à basse et haute pression. Ces écarts peuvent s'interpréter comme des limitations techniques liées à notre méthode de mesure : à basse pression, nous ne

comptons qu'un faible nombre d'événements; si la durée de la mesure est inférieure au temps caractéristique entre l'apparition de deux événements de translocation successifs, la statistique des mesures est erronée et elle sous-estime la fréquence de translocation réelle. Au contraire, à haute pression, le nombre d'événements de translocation est très grand et la distinction sur une image entre deux événements proches (soit deux flashes lumineux confondus) est difficile, ce qui peut mener à des erreurs de détection.

2.4.3 Mesures de K_d et k_{off}

Pour chacun de ces ajustements, nous avons mesuré le paramètre β , qui rend compte du poids de la structure secondaire dans le processus de translocation. Nous avons résumé dans le tableau 2.1 les valeurs numériques de ces mesures et nous avons tracé dans la figure 2.9 l'évolution du paramètre β par rapport à la fraction en dNTP θ pour les trois types d'ADNs présentant des structures secondaires utilisés dans notre étude (pour les ADNs $\Phi X174$ et λ dénaturé, seuls les points sans dNTP sont représentés ($\theta = 0$)).

θ	β (95%)
0	$7,7 \pm 0,6$
0,001	$7,3 \pm 0,4$
0,005	$6,1 \pm 0,4$
0,05	$5,6 \pm 0,6$
0,2	$4,4 \pm 0,3$
0,5	$3,8 \pm 0,2$
1	$3,6 \pm 0,2$
2	$1,7 \pm 0,1$
3	$0,6 \pm 0,4$

TABLE 2.1 – Paramètre d'ajustement β du modèle d'unzipping des données expérimentales de la figure 2.6. Les incertitudes sont obtenues par une méthode du jackknife sur les données expérimentales (95%).

Nous pouvons observer sur la figure 2.9 que les valeurs prises par le paramètre β suivent en très bonne approximation l'évolution prédite par le modèle d'unzipping, soit une décroissance hyperbolique avec la fraction en dNTP. A partir de ces mesures, nous avons pu en déduire une estimation numérique de la constante de dissociation K_d entre un nucléotide libre en solution et une base simple brin d'ADN ainsi que la fréquence caractéristique d'ouverture spontanée des structures secondaires k_{off} . Ainsi, nous avons mesuré $K_d = (264 \pm 38) \text{ nM}$ (95%), $k_{off, M13mp18} = (13 \pm 1) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (95%), $k_{off, \Phi X174} = (4,4 \pm 0,3) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (95%) et $k_{off, \lambda DNA} = (13 \pm 1) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (95%).

La valeur numérique de la constante de dissociation K_d mesurée à partir de l'ajustement présenté dans la figure 2.9 est comparable en ordre de grandeur à celle mesurée par Dahl *et coll.*[424], $K_d \simeq 1,4 \mu\text{M}$, sur un complexe phi29 DNAP-DNA en présence de dGTP en solution, ou encore celle de Picard-Jean *et coll.*[425], $K_d \simeq 7 - 16 \mu\text{M}$, sur un système d'ADN viral et de dNTPs en solution (la variabilité de la valeur de K_d provient du type de nucléotides). Les écarts observés entre ces différentes mesures s'interprètent comme des spécificités liées aux conditions de la solution tampon utilisée, en particulier la force ionique, comme cela a été montré par Picard-Jean *et coll.*[425]

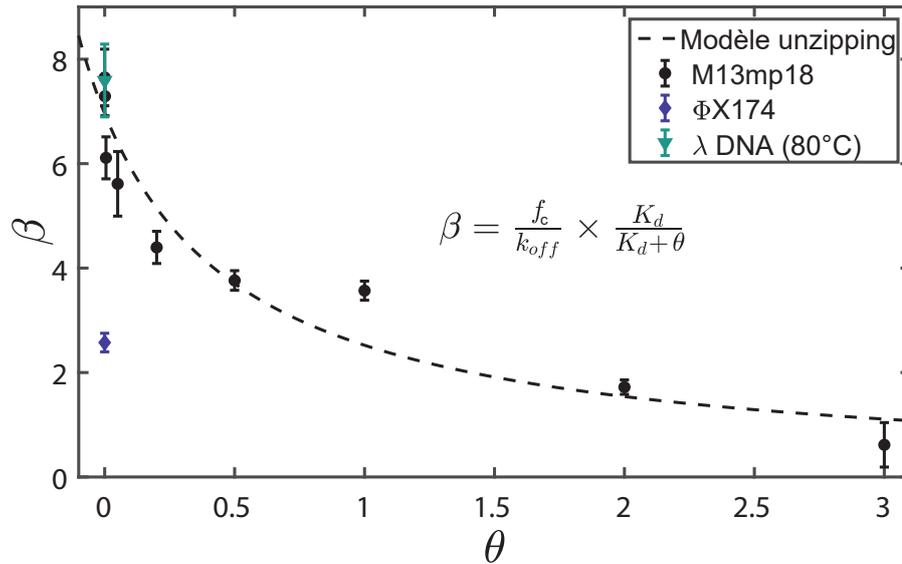


FIGURE 2.9 – Paramètre β du modèle d'unzipping en fonction de la fraction de dNTP θ pour différentes molécules d'ADN disposant de structures secondaires. Les données expérimentales pour l'ADN M13mp18 sont ajustées par l'expression de β en fonction de θ du modèle d'unzipping. Les valeurs de β pour l'ADN M13mp18 sont résumées dans le tableau 2.1.

Concernant nos mesures de k_{off} , celles-ci sont en bon accord avec celles mesurées par Bercy *et coll.*[426], $k_{off} \simeq (3,8 - 30,0) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ obtenues à partir de pinces optiques sur des structures secondaires d'ADN (hairpins) parfaitement définies (la variabilité vient une fois encore de la spécificité de la séquence ADN). Une autre étude de Liphardt *et coll.*[427] vient confirmer cette valeur avec $k_{off} = 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ sur des mesures de pinces optiques avec des hairpins d'ARN P5ab.

2.4.4 Généralisation du modèle d'unzipping

Dans cette section, nous allons voir une généralisation du modèle d'unzipping développé dans la section 2.4.1 aux cas où la molécule d'ADN simple brin est en équilibre entre ses formes avec structures secondaires ouvertes ou fermées, avec les taux de transition de l'une vers l'autre k_{on} et k_{off} . Dans ce schéma, même en absence de nucléotides libres en solution, il est possible qu'une molécule d'ADN arrive à l'entrée du nanopore avec ses structures secondaires déjà ouvertes, ce qui lui permet de pénétrer dans le nanopore immédiatement. Ainsi, les structures secondaires peuvent être supprimées en solution par l'action des dNTP ou par fluctuations thermiques. On notera la constante de dissociation des nucléotides libres avec les bases d'ADN simple brin $K_d = k_{-1}/k_1$, avec respectivement k_{-1} et k_1 les taux de dissociation et taux d'association liés à cet équilibre. Nous pouvons alors illustrer le modèle d'unzipping général selon le schéma cinétique de la figure 2.10.

Nous ferons l'hypothèse d'un équilibre rapide entre les formes ouvertes et fermées des structures secondaires par rapport à la durée de la translocation de la molécule à travers les nanopores ; même hypothèse pour l'équilibre d'association entre les dNTP et les bases de l'ADN simple brin.

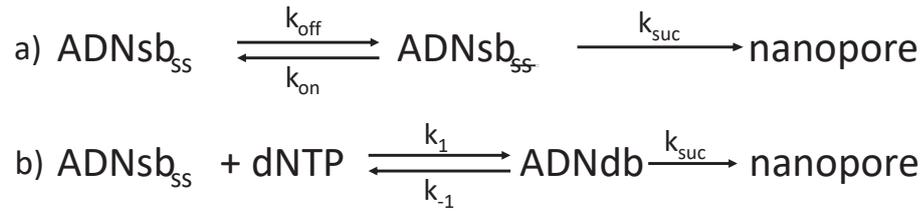


FIGURE 2.10 – Modèle d'unzipping général : a) en absence de dNTP en solution, la molécule d'ADN simple brin (ADNsb) est en équilibre entre ses formes avec structures secondaires ouvertes ou fermées, selon les taux de transition k_{on} et k_{off} . Une fois les structures secondaires ouvertes, l'ADN simple brin pénètre dans le nanopore et réalise sa translocation avec une fréquence k_{suc} décrite par le modèle de succion. b) avec des dNTP en solution, les structures secondaires sont éliminées par association entre les dNTP et les bases de l'ADN simple brin, avec une constante de dissociation de l'équilibre $K_d = k_{-1}/k_1$.

A partir de ce schéma cinétique et selon les hypothèses décrites précédemment, nous pouvons en tirer une expression pour la fréquence de translocation globale d'une molécule d'ADN simple brin à travers des nanopores :

$$f(P, \theta) = k_{suc}(P) \times \frac{k_{suc}(P) + k_{on} + k_{off} \times \frac{k_{-1} + k_{suc}(P)}{k_1 \theta}}{k_{suc}(P) + k_{on} + (k_{off} + k_{on} + k_{suc}(P)) \times \frac{k_{-1} + k_{suc}(P)}{k_1 \theta}}, \quad (2.6)$$

où P est la pression imposée et θ la fraction en dNTP.

En l'absence de dNTP en solution ($\theta = 0$), nous retrouvons l'expression typique du modèle d'unzipping :

$$f/f_c = \frac{\frac{P}{P_c}}{\frac{f_c}{k_{off}} \times \frac{P}{P_c} + \frac{k_{on} + k_{off}}{k_{off}} \times \exp\left(\frac{P_c}{P}\right)}, \quad (2.7)$$

avec un préfacteur $(k_{on} + k_{off})/k_{off}$ au dénominateur ajouté par le modèle d'unzipping général.

Dans le cas inverse, avec des dNTP en excès par rapport au bases d'ADN simple brin ($\theta \gg 1$), nous retrouvons l'expression classique du modèle de succion, toutes les bases d'ADN simple brin étant liées à des nucléotides libres, ce qui forme une structure double brin.

A l'aide de l'outil *Curve fitting* de la Toolbox MATLAB, nous avons ajusté les données expérimentales présentées dans la figure 2.6 selon le modèle d'unzipping général. Nous avons obtenu les valeurs suivantes pour les paramètres du modèle : $k_{off} = 1,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{on} = 6,0 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ et $K_d = k_{-1}/k_1 \simeq 320 \text{ nM}$. Nous attribuons la très faible valeur de k_{on} à des limitations numériques de l'outil *Curve fitting*, ce qui laisse supposer que cette valeur devrait être prise comme nulle d'après l'ajustement.

D'après les valeurs des paramètres mesurés, l'équilibre entre les formes ouvertes et fermées des structures secondaires n'est pas vérifié expérimentalement, la translocation se passe comme s'il n'y avait pas de refermeture des structures secondaires une fois celles-ci ouvertes par fluctuations thermiques, ce qui revient à un contrôle cinétique de la translocation et non pas un contrôle thermodynamique. Ainsi, d'après ces observations, nous

pouvons conclure que le modèle d'unzipping "simple" est suffisant pour décrire la dynamique de translocation des ADN avec structures secondaires à travers des nanopores.

2.4.5 Conclusion

A partir de nos observations expérimentales, nous avons mis en évidence l'existence d'un plateau de saturation de la fréquence de translocation pour les molécules d'ADN disposant de structures secondaires. Ce plateau apparaît à haute pression ($P > P_c$) et ne semble pas dépendant de la séquence ADN. Nous avons vu que cette saturation disparaît lorsqu'on augmente le diamètre des nanopores, ce qui laisse supposer un blocage stérique de la molécule d'ADN à l'entrée du nanopore. Nous avons ensuite montré que la disparition des structures secondaires par hybridation des bases d'ADN simple brin avec des nucléotides libres en solution provoque la disparition du plateau de saturation et une évolution prédite par le modèle de succion. Grâce à un modèle cinétique basé sur le modèle de succion, en ajoutant une étape d'ouverture spontanée des structures secondaires, nous avons ajusté avec succès les données expérimentales, ce qui nous a permis de mesurer la constante de dissociation entre les bases de l'ADN simple brin et les nucléotides libres en solution ainsi que la fréquence d'ouverture spontanée des structures secondaires. Ces valeurs se comparent quantitativement avec celles obtenues dans des études précédentes sur des systèmes analogues.

Pour aller plus loin, à travers notre méthode, nous avons réussi à mesurer des paramètres thermodynamiques et cinétiques que sont les constantes de dissociation K_d et les taux de dissociation k_{off} pour un système aussi complexe qu'un hétéroduplex ADN-dNTP. Ces mesures sont habituellement réalisées à l'aide de techniques telles que l'ITC ou la MST pour K_d et la SPR ou BLI pour k_{off} . Ces dernières sont des techniques complexes qui nécessitent une grande expertise et peuvent se révéler compliquées à réaliser pour des macromolécules (pour plus de détails, voir la section 2.3). Au contraire, notre méthode basée sur la translocation à travers les nanopores est facile à mettre en place et ne nécessite pas de grande préparation pour l'échantillon à part le marquage fluorescent. Notre technique dispose des avantages liés à la microscopie ZMW pour nanopores, soit une grande parallélisation des translocations, ce qui permet une analyse statistique fiable même pour des systèmes disposant d'un faible taux de dissociation. Enfin, l'extraction de la valeur de k_{off} est simple car il s'agit de la valeur de la fréquence de translocation au plateau de saturation. A partir de ce constat, nous pouvons envisager des applications pratiques de cette technique pour des mesures de dissociation de complexes protéiques sans limitations pour la borne supérieure de la masse moléculaire ; il suffit pour cela d'adapter le diamètre du nanopore pour ne laisser passer la molécule que sous sa forme dissociée.

2.5 ADN simple brin et ratchet de translocation

Après avoir étudié la translocation d'ADN simple brin et mis en évidence l'importance des structures secondaires dans la dynamique de translocation, nous allons terminer ce chapitre par une étude portant sur la réalisation d'un ratchet de translocation avec des ADN simple brin. Nous reprendrons la méthodologie développée dans la section 1.1.1 pour la translocation d'ADN λ à pression variable en présence de PEI à la sortie des nanopores à une concentration fixe. Nous verrons que la présence de PEI à la sortie des

nanopores accélère le transport des molécules d'ADN simple brin de la même manière que les molécules double brin, preuve que le ratchet de translocation est également effectif pour les ADNs simple brin.

2.5.1 Protocole

Pour la préparation des molécules d'ADN λ dénaturé, nous avons repris le protocole décrit dans la section 2.1.2, comprenant une première étape de chauffage à 80°C pendant 10 minutes pour dénaturer l'ADN λ double brin, suivies de 5 minutes sur bain de glace (5°C) pour figer les brins d'ADN par liaisons intramoléculaires et ainsi générer des molécules d'ADN simple brin avec structures secondaires. L'ADN est ensuite marqué au YOYO-1 et laissé à reposer 10 minutes à température ambiante.

L'expérience de translocation s'effectue immédiatement après les dix minutes de repos suivant le marquage de l'ADN au YOYO-1. Nous avons suivi le protocole décrit dans la section 1.1.1 pour réaliser les expériences de translocation à pression variable et concentration en PEI constante.

2.5.2 Ratchet de translocation et structures secondaires

Nous avons mesuré la fréquence de translocation des molécules d'ADN λ dénaturées à travers des nanopores de 50 nm sous trois conditions différentes : absence de PEI, PEI à ratio de charges 0.05 et 0.5 (nous rappelons que le ratio de charge correspond au rapport des concentrations en groupes amines des polycations par rapport aux groupes sulfates de la chaîne carbonée de l'ADN). Pour chaque condition, nous avons fait varier la pression imposée entre 30 mbar et 145 mbar ; les expériences ont été répétées un minimum de 16 fois et les données ont été moyennées par valeur de pression. Le résultat de ces mesures est présenté dans la figure 2.11A.

Nous pouvons observer sur la figure 2.11A que la fréquence de translocation suit le modèle de succion à basse pression quelque soit la concentration en PEI à la sortie des nanopores. La pression critique est sensiblement la même pour les trois conditions, conformément aux observations faites dans la section 1.1.2, avec une valeur de 137 mbar, ce qui est un peu plus élevé que la valeur 85 mbar mesurée pour l'ADN λ non-dénaturé (voir Tab.1.1). Nous attribuons cette légère différence à la présence des structures secondaires dans la conformation de l'ADN λ dénaturé, qui tendent à rigidifier le polymère. Auger *et coll.*[304] ont montré que la longueur de persistance d'un polymère modifie la pression critique en ajoutant un facteur $\ln(\lambda/R)$, où $\lambda = (L_p D^2)^{1/3}$ avec R le rayon du pore et D son diamètre et L_p la longueur de persistance du polymère. A partir des valeurs numériques de pression critique et les dimensions du pore, en supposant une longueur de persistance de 50 nm pour la molécule d'ADN λ double brin, nous pouvons estimer d'après la formule précédente la longueur de persistance de l'ADN λ dénaturé à environ 178 nm, ce qui correspond à une augmentation d'un facteur supérieur à 3 de la rigidité de la molécule. Cette valeur semble relativement élevée, en sachant que la longueur de persistance d'une molécule d'ADN simple brin est de 2 nm[428]. Même si la formation de structures de type hairpin tend à rigidifier la molécule, une valeur 3 fois plus élevée de longueur de persistance par rapport à la valeur de l'ADN double brin semble surestimée. Nous pensons que la présence de petites structures secondaires d'une taille inférieure ou

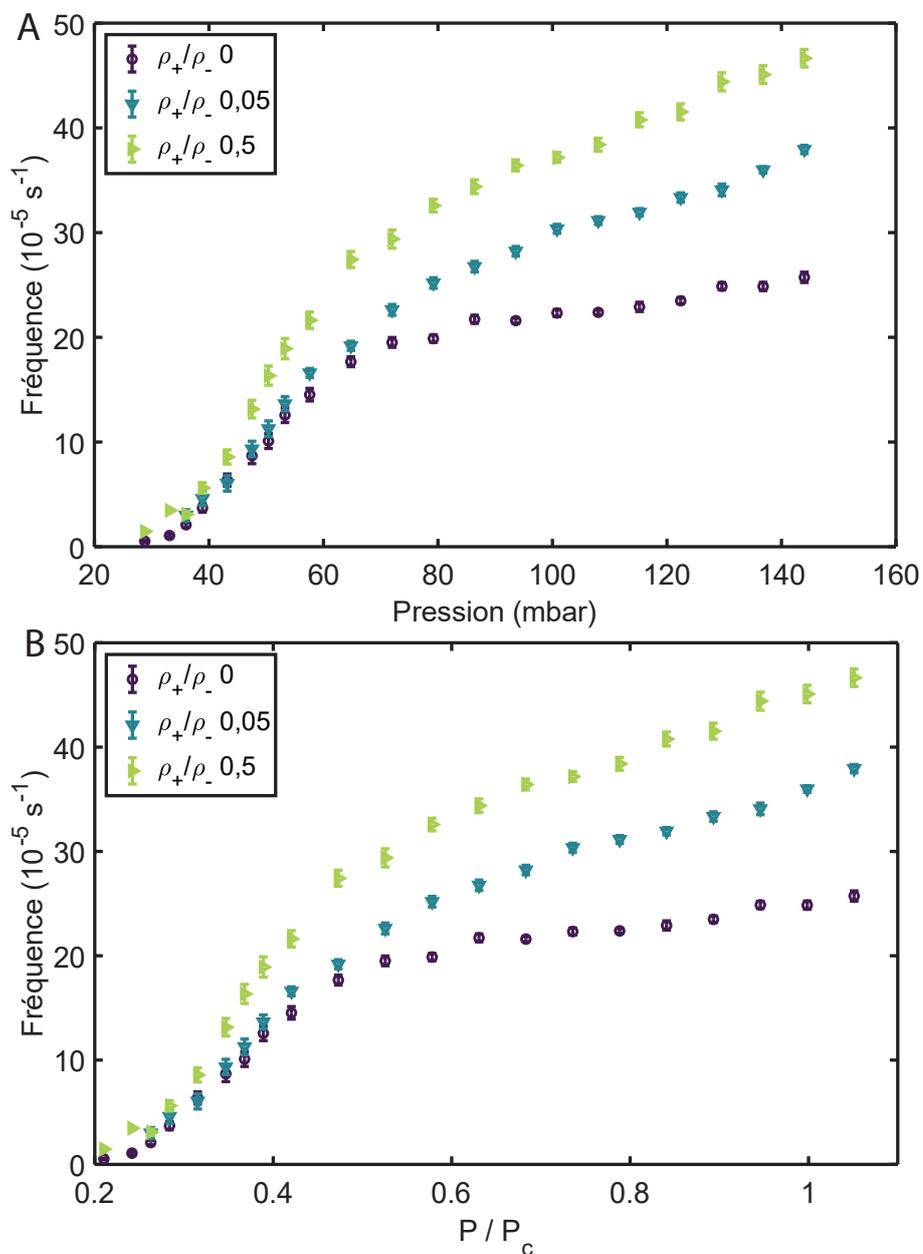


FIGURE 2.11 – Expériences de translocation d'ADN λ dénaturé dans des nanopores de 50 nm de diamètre. A) Fréquence de translocation en fonction de la pression hydrodynamique imposée pour différentes concentrations en PEI à la sortie des nanopores. B) Idem avec l'axe des abscisses normalisé par la pression critique. Les expériences sont répétées un minimum de 16 fois et les données présentées ici correspondent à une moyenne par valeur de pression de ces données. L'incertitude associée est prise comme l'incertitude standard (95%).

égale au diamètre du pore peut perturber la pénétration du polymère à l'intérieur du nanopore, ce qui augmente le coût de confinement et donc la barrière d'énergie libre.

La pression critique étant la même pour toutes les conditions, nous pouvons normaliser l'axe des pressions par la pression critique pour faciliter les comparaisons entre les courbes. Le résultat de cette représentation est visible sur la figure 2.11B.

Comme pour les expériences de translocation en absence de PEI, nous observons l'apparition d'un plateau de saturation de la fréquence de translocation pour des valeurs de pression supérieures à $0,5P_c$. Nous observons cependant une pente plus prononcée pour les conditions avec PEI à la sortie, en comparaison à la condition sans PEI où la fréquence de translocation est relativement constante à forte pression. De plus, la hauteur de ce plateau de saturation augmente avec la concentration en PEI, avec une augmentation de près du double entre les conditions sans PEI et celle à un ratio de charges de 0,5. Ainsi, il semblerait que la présence de PEI à la sortie des nanopores accélère la translocation des ADN λ dénaturés, comme c'est le cas pour l'ADN λ non-dénaturé. Avec le recul acquis sur notre étude du ratchet de translocation avec des molécules d'ADN double brin, nous pouvons conclure que le ratchet de translocation est également fonctionnel pour les ADN présentant des structures secondaires. Là encore, nous observons une augmentation linéaire de l'efficacité du ratchet de translocation avec la concentration en polycations à la sortie des nanopores, comme en témoignent les données de la figure 2.12, pour lesquelles la fréquence de translocation a été normalisée par la fréquence expérimentale à $P = P_c$. Avec cette normalisation, les courbes se superposent, ce qui signifie une homothétie de la fréquence de translocation par ajout de PEI à la sortie des nanopores, comme cela a déjà été montré pour l'ADN λ dans la section 1.2.1.

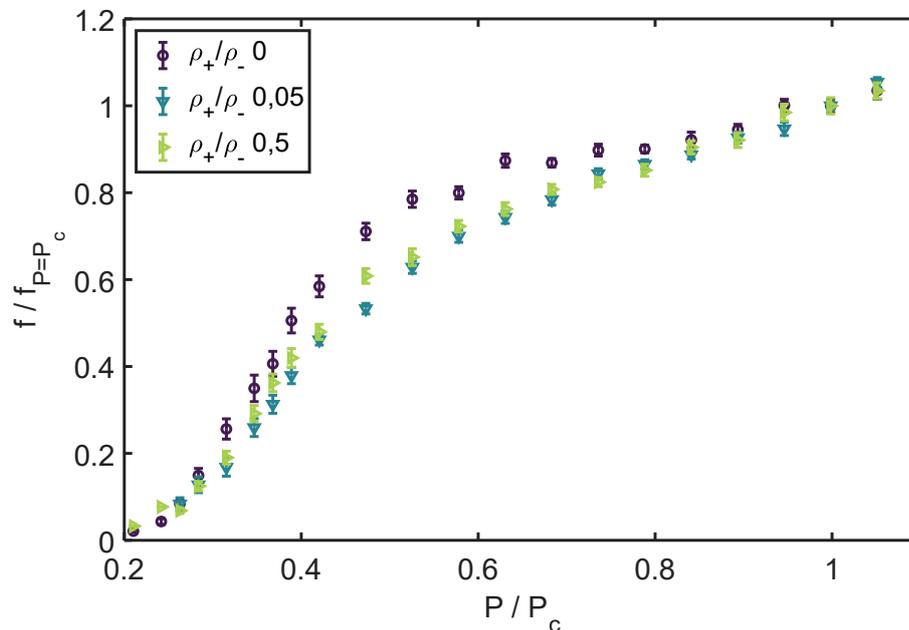


FIGURE 2.12 – Fréquence de translocation normalisée par la fréquence expérimentale à $P = P_c$ en fonction de la pression imposée. Les données sont issues de la figure 2.11.

Pour estimer le gain de fréquence $\Delta f / f_0$, il suffit de faire le quotient entre les courbes à une concentration en PEI donnée par celle sans PEI puis de retrancher 1. Avec cette

méthode, à partir des données présentées dans la figure 2.12, nous mesurons pour l'ADN λ dénaturé avec comme agent de ratchet le PEI des gains de fréquence par ratchet de translocation de $0,26 \pm 0,07$ (95%) et $0,75 \pm 0,19$ (95%) respectivement pour des ratios de charges ρ_+/ρ_- de 0,05 et 0,5, ce qui est en très bon accord avec les mesures réalisées pour l'ADN λ non-dénaturé avec le PEI présentées dans la figure 1.8.

Revenons sur la pente non-nulle du plateau présente pour les conditions avec PEI. Nous avons vu dans la section précédente que la présence de structures secondaires dans la molécule d'ADN induit une saturation de la fréquence de translocation, que nous avons interprétée comme un blocage du polymère à l'entrée du nanopore en raison de ses structures secondaires l'empêchant de pénétrer dans le pore. L'ouverture des structures secondaires étant un processus spontané, l'augmentation de la pression imposée n'accélère pas l'ouverture de ces structures, d'où la saturation observée. Or, pour les conditions avec PEI, nous observons une augmentation linéaire de la fréquence de translocation au niveau du plateau, ce qui semble indiquer que la présence du ratchet de translocation à la sortie des nanopores facilite l'ouverture des structures secondaires. La courbe se rapproche alors de celle prédite par le modèle de succion à forte pression, soit une évolution linéaire. Une hypothèse possible pour expliquer ce comportement serait la longueur de contour de la molécule d'ADN λ (16 μm) par rapport à la longueur des nanopores (6 μm) : le ratchet de translocation à la sortie des nanopores exerce une force sur le polymère en translocation qui est transmise à l'entrée du nanopore au niveau des structures secondaires bloquées (car fermées). Dans ce schéma, le ratchet de translocation facilite l'ouverture des structures secondaires comme c'est le cas pour les ratchets biologiques tels que Sec61, qui facilite la dénaturation des protéines en translocation chaperonnées par les molécules Hsp.

Une autre explication possible pour la pente non-nulle du plateau de saturation pourrait être que l'échantillon d'ADN λ , même chauffé selon le protocole décrit 2.5.1 pour le dénaturer, contiendrait encore une partie de molécule sous forme double brin. La translocation de ces molécules double brin s'effectue selon le modèle de succion, c'est-à-dire linéairement avec la pression pour des pressions de l'ordre de la pression critique. Ainsi, la fréquence de translocation, qui est une mesure moyenne pour un échantillon d'ADN donné, correspondrait à la moyenne de la fréquence de translocation des molécules dénaturées (qui sature à forte pression) et des molécules non-dénaturées (linéaire à forte pression), d'où la pente non-nulle pour le plateau de saturation.

2.5.3 Effet de l'héparine sur le ratchet de translocation avec ADN λ dénaturé

De la même manière que celle utilisée pour mettre en évidence le mécanisme de ratchet de translocation pour l'ADN λ , nous avons ajouté en solution avec les molécules de PEI de l'héparine en excès pour jouer le rôle de compétiteur de l'ADN pour l'association avec le PEI (voir section 1.1.3).

Nous avons donc employé le protocole décrit dans la partie précédente pour réaliser les expériences de translocation avec des molécules d'ADN λ dénaturées et nous avons ajouté en solution à la sortie des nanopores de l'héparine en excès avec le PEI (concentration en héparine 10 fois plus concentrée que celle du PEI, en équivalent de groupements amines). Nous avons mesuré la fréquence de translocation en fonction de la pression imposée avec et sans PEI à la sortie des nanopores et avec et sans héparine. L'expérience a été répétée

un minimum de 8 fois et nous avons moyenné les données par valeur de pression. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure 2.13.

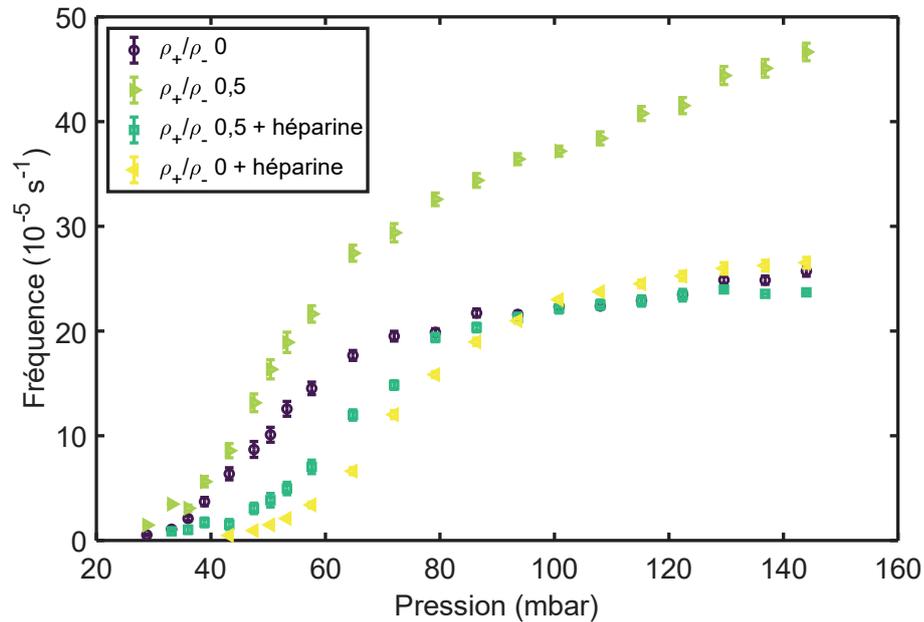


FIGURE 2.13 – Effet de l’héparine sur le ratchet de translocation pour la molécule d’ADN λ dénaturée dans des nanopores de 50 nm de diamètre : fréquence de translocation en fonction de la pression imposée pour avec ou sans PEI à la sortie des nanopores et avec ou sans héparine (en concentration 10 fois plus grande que celle du PEI). Les expériences sont répétées un minimum de 8 fois et les données présentées ici correspondent à une moyenne par valeur de pression de ces données. L’incertitude associée est prise comme l’incertitude standard (95%).

Nous observons sur la figure 2.13 que la présence d’héparine à la sortie des nanopores annule le gain de fréquence lié à la présence du ratchet de translocation à la sortie des nanopores. En effet, le plateau de saturation caractéristique des ADNs avec structures secondaires en présence de PEI et d’héparine se confond avec celui de la courbe sans PEI ni héparine. Une fois encore, la mise en évidence de l’effet de ratchet de translocation est montré par l’effet de l’héparine, comme nous l’avions montré dans la section 1.1.3 pour l’ADN λ non-dénaturé.

En revanche, nous constatons une nette élévation de la pression critique par ajout d’héparine en excès à la sortie des nanopores : par un ajustement des données par le modèle de succion sur le début de la courbe à basse pression, nous mesurons une pression critique de 155 mbar en présence de PEI et d’héparine à la sortie des nanopores, contre 137 mbar avec PEI mais sans héparine. Pour sonder cet effet, nous avons réalisé des expériences de translocation d’ADN λ dénaturé en présence d’héparine à la sortie des nanopores mais cette fois-ci sans PEI. L’expérience a été répétée 8 fois et les résultats sont présentés dans la figure 2.13 (courbe en jaune signalée " $\rho_+/\rho_- = 0 + \text{héparine}$ ").

En présence d’héparine à la sortie des nanopores et sans PEI, nous observons un plateau de saturation de la fréquence de translocation à haute pression confondu avec celui des courbes sans PEI ni héparine et celle avec PEI et héparine, ce qui appuie les obser-

vations précédentes sur l'effet de ratchet de translocation induit par le PEI. Concernant la pression critique, l'élévation observée précédemment est confirmée par cette nouvelle expérience et même accentuée, avec une pression critique mesurée à 259 mbar. Il semblerait donc que la présence d'héparine à la sortie des nanopores soit bien responsable de l'augmentation de la pression critique.

Pour expliquer cette élévation de pression critique, nous proposons l'idée que la présence en excès d'héparine à la sortie des nanopores puisse induire un potentiel électrostatique globalement négatif à la sortie des nanopores, venant perturber la translocation des molécules d'ADN à travers le nanopore. Ainsi, la molécule d'ADN doit remonter un gradient de potentiel électrostatique, ce qui vient augmenter la barrière d'énergie libre de confinement du polymère à l'intérieur du nanopore. Il s'agit ici d'un modèle simple où nous négligeons l'effet des contre-ions sur le potentiel électrostatique. Un modèle plus élaboré de diffusio-osmose serait de prendre en compte les sels en solution et de résoudre l'équation de Poisson-Boltzmann pour en tirer une valeur du potentiel électrostatique le long du nanopore. Dans cette approche, il serait nécessaire de prendre en compte le forçage hydrodynamique venant perturber la répartition des ions à la sortie du nanopore. Notre démarche est ici d'estimer grossièrement si un potentiel électrostatique induit par la présence d'héparine en excès entre les extrémités du nanopore est susceptible de modifier la pression critique, d'où le modèle simple que nous développons.

Dans ce schéma, nous pouvons réécrire l'expression du flux critique J_{c*} en présence d'héparine à la sortie des nanopores en introduisant un coût $\Delta\mu$ de potentiel électrostatique supplémentaire :

$$J_{c*} = \frac{k_B T + \Delta\mu}{\eta} = J_c + \frac{\Delta\mu}{\eta} \rightarrow \frac{J_{c*}}{J_c} = 1 + \frac{\Delta\mu}{k_B T}. \quad (2.8)$$

Expérimentalement, nous avons $J_{c*}/J_c = P_{c*}/P_c \simeq 2$, ce qui conduit à $\Delta\mu \simeq k_B T$. En reprenant la relation de Nernst (1.1), nous pouvons en déduire que cette énergie correspond à une différence de potentiel d'environ 25 mV entre la sortie du nanopore et son entrée. En considérant la densité de charge d'une pelote d'ADN à l'entrée du nanopore, que nous avons estimé à 2 fois la concentration en polycation à la sortie du nanopore ($\rho_+/\rho_- = 0,5$) et en sachant que l'héparine est elle-même dix fois plus concentrée que le PEI, nous avons un rapport de concentrations (en charges) entre l'héparine et l'ADN d'un facteur 5, ce qui conduit à une différence de potentiel d'environ 40 mV entre la sortie et l'entrée du nanopore, d'après l'équation de Nernst. Cette estimation est en très bon accord avec l'élévation de pression critique observée expérimentalement, ce qui semble justifier l'hypothèse de coût énergétique supplémentaire lié au potentiel électrostatique négatif induit par l'excès d'héparine à la sortie des nanopores.

2.5.4 Translocation d'ADN Φ X et M13mp18 en présence de PEI

Pour confirmer les observations faites sur l'ADN λ dénaturé en présence de PEI, nous avons réalisé des expériences similaires avec les molécules d'ADN Φ X (5386 nt) et M13mp18 (7249 nt) ; ces deux molécules d'ADN sont des ADNs simple brin mais l'ADN Φ X est linéaire tandis que l'ADN M13mp18 est circulaire, ce qui donne une longueur de contour de 5386 nt pour le premier contre 3625 nt pour le second.

Les expériences présentées dans cette section ont été réalisées par Tristan Jocteur que j'ai encadré lors de son stage de L3.

Pour ces expériences, nous avons préalablement chauffé les échantillons d'ADN selon le protocole décrit dans la section 2.5.1. Pour chaque échantillon d'ADN, nous avons mesuré la fréquence de translocation à travers des nanopores de 50 nm de diamètre pour des pressions allant de 50 mbar à 300 mbar, avec ou sans PEI à la sortie des nanopores (dans le cas avec PEI, la concentration est telle que le ratio de charges ρ_+/ρ_- vaut 0,5). Chaque expérience est répétée un minimum de 4 fois, puis la fréquence de translocation est moyennée par valeur de pression. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 2.14.

Nous observons sur la figure 2.14A que la présence de PEI à la sortie des nanopores accélère le transport de l'ADN ΦX à travers les nanopores, avec en particulier un plateau de saturation présentant une augmentation de près de 20% de sa valeur en absence de PEI. En revanche, l'observation de la figure 2.14B nous montre une absence d'effet du PEI sur la fréquence de translocation pour l'ADN M13mp18. Pour cet ADN, les courbes avec et sans PEI à la sortie des nanopores se confondent.

Les observations faites dans la section 1.6.1 sur l'existence d'une longueur de contour critique pour déclencher l'effet de ratchet de translocation peuvent nous aider à comprendre les résultats des ADNs ΦX et M13mp18 avec le PEI. En effet, nous avons écrit au début de cette section que l'ADN ΦX dispose d'une longueur de contour de 5386 nt, contre 3625 nt pour l'ADN M13mp18. Pour réussir leur translocation, les structures secondaires les plus grandes de ces molécules doivent s'ouvrir pour permettre la passage de la molécule dans le nanopore. Il reste cependant les structures secondaires les plus petites dans la structures du polymère, ce qui contribue à réduire la longueur de contour effective de la molécule. Il est de ce fait concevable que la longueur de contour de la molécule d'ADN ΦX soit supérieure à 3 kbp à la sortie du nanopore pour permettre le déclenchement du mécanisme de ratchet de translocation comme nous l'avons décrit dans la section 1.6.1. En revanche, la longueur de contour effective de la molécule d'ADN M13mp18 est certainement inférieure à cette taille critique, ce qui ne permet pas de déclencher le mécanisme de ratchet de translocation et l'accélération du transport de la molécule à travers le nanopore.

A travers cette expérience, nous avons pu confirmer l'observation de la longueur de contour critique pour le mécanisme de ratchet de translocation sur un système expérimental différent (ADNs simple à la place d'ADNs double brins). Cette observation contribue à la généralité déjà décrite auparavant dans cette étude pour le ratchet de translocation.

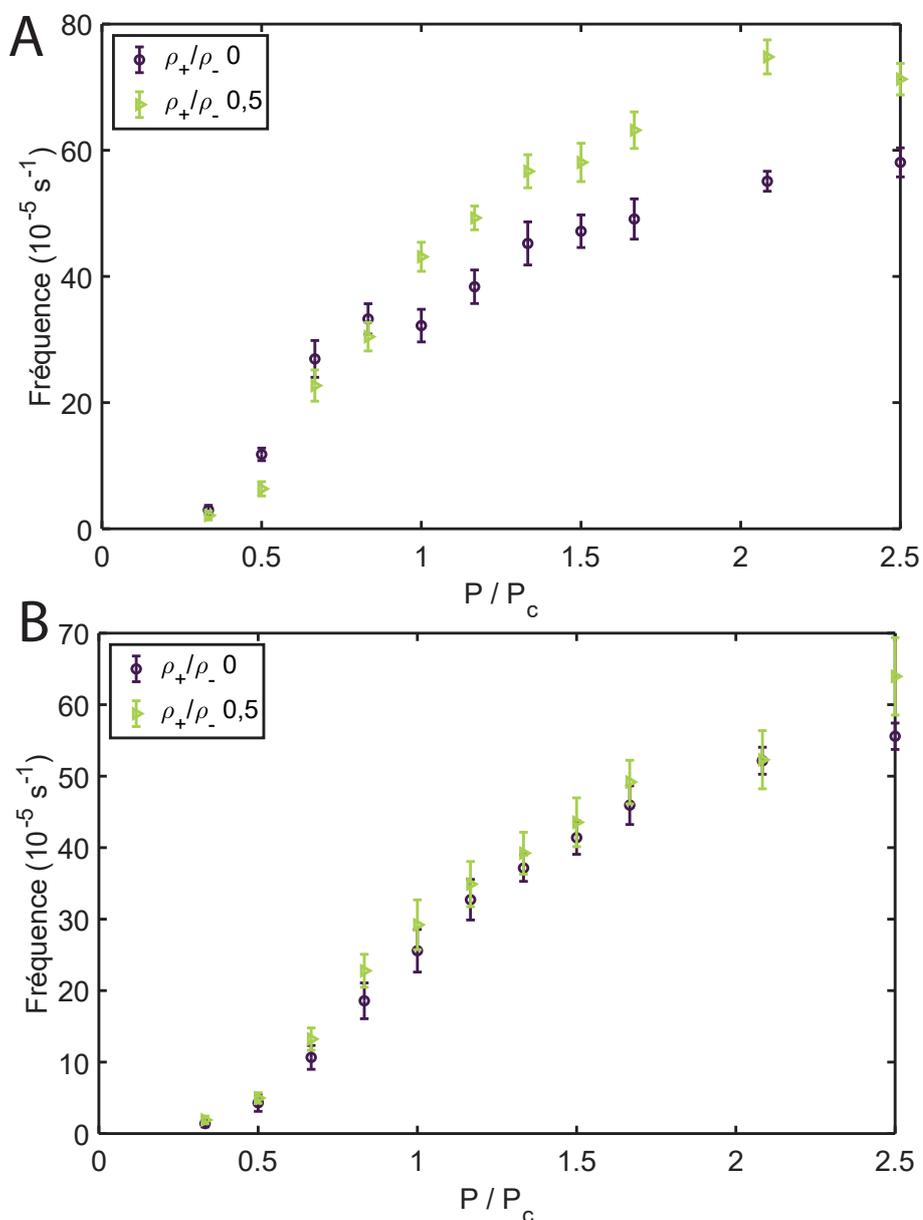


FIGURE 2.14 – Effet de ratchet pour les molécules d'ADN simple brin ΦX et M13mp18 : A) Fréquence de translocation de molécules d'ADN ΦX en fonction de la pression imposée avec et sans PEI à la sortie des nanopores. B) Idem mais pour l'ADN M13mp18. Les expériences sont répétées un minimum de 8 fois et les données présentées ici correspondent à une moyenne par valeur de pression de ces données. L'incertitude associée est prise comme l'incertitude standard (95%).

Projet Annexe : Switchable Nanopores by Cononsolvency Effect

Durant mon projet de thèse, j'ai eu la chance de travailler sur un projet annexe en collaboration avec le groupe de Jens-Uwe Sommer (Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden) portant sur l'observation d'un effet co-nonsolvant dans des nanopores greffés de polymères PNiPAAm. L'effet de co-nonsolvant consiste, pour un polymère, à une sensibilité accrue à un mélange de solvants, pouvant mener deux bons solvants à former un mauvais solvant lorsqu'ils sont en mélange. C'est le cas notamment pour le PNiPAAm en solution dans un mélange eau-éthanol.

Nous nous sommes servis de cet effet pour créer des nanopores disposant d'un rayon effectif variable selon la composition du solvant. Pour cela, nous avons greffé des polymères PNiPAAm dans des nanopores, puis nous avons étudié la translocation de molécules d'ADN λ marquées en fluorescence à travers ces nanopores greffés. La mesure de la pression critique nous a permis de remonter au rayon effectif du pore, soit la hauteur de la brosse de polymères greffés. En modifiant la composition du solvant, nous avons observé l'effet de co-nonsolvant sur la pression critique et ainsi mis en évidence la possibilité de créer des nanopores de tailles modulables à partir de cet effet.

J'ai contribué à cette étude en réalisant avec Huaisong Yong les expériences de microscopie Zero-Mode Waveguide. Les résultats que nous avons obtenus ont mené à une publication en avril 2021 dans le journal *Macromolecules*. Ce qui suit correspond à cette publication.

Regulating the translocation of DNA through poly(N-isopropylacrylamide) decorated switchable nanopores by cononsolvency effect

Huaisong Yong^{1,2,*}, Bastien Molcrette³, Marcel Sperling⁴, Fabien Montel^{3,*}, and Jens-Uwe Sommer^{1,5,*}

¹Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Dresden, Germany

²Technische Universität Dresden, Faculty of Chemistry and Food Chemistry, Dresden, Germany

³Université de Lyon, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard, CNRS, Laboratoire de Physique, F-69342, Lyon, France

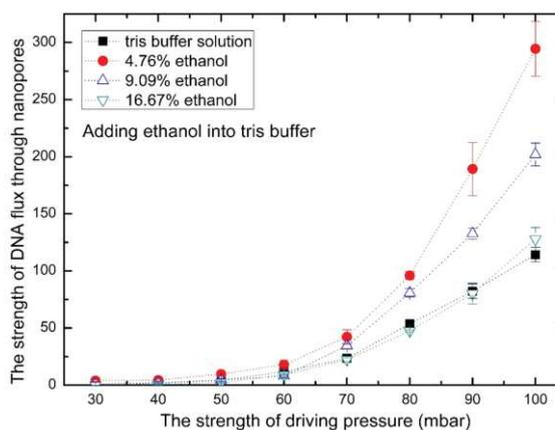
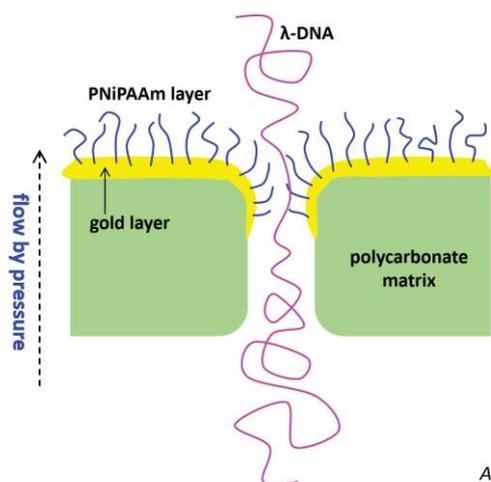
⁴Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung, Potsdam-Golm, Germany

⁵Technische Universität Dresden, Institute for Theoretical Physics, Dresden, Germany

*Correspondence: yong@ipfdd.de (H.Y.); fabien.montel@ens-lyon.fr (F.M.); sommer@ipfdd.de (J.-U.S.)

Abstract

Stimuli response of polymer-decorated nanopores/nanochannels is a fascinating topic both in polymer science and modern nanotechnology; however, it is still challenging for standard analytical methods to characterize these switchable nanopores/nanochannels. In this study, based on the physics of polymer translocation we developed an analytic method and thus for the first time were able to quantitatively measure the effective thickness of the polymer layer around the rim of nanopores. As an application example of this method, we studied the translocation dynamics of fluorescence DNA through poly(N-isopropylacrylamide) decorated switchable nanopores in aqueous environments. By adding small amounts of ethanol to the aqueous buffer solution a switch-like response of the DNA-translocation can be observed. It is also observed that a pronounced switching effect can be only realized in a window of moderate grafting densities of poly(N-isopropylacrylamide) layer. These are attributed to the cononsolvency effect which causes a collapse of the polymer layer and thus a transition between "closed" and "open" states of the nanopores. Our study clearly transpired that cononsolvency effect of polymers can be used as a novel trigger to change the size of nanopores, in analogy to the opening and closure of the gates of cell-membrane channels. We envisage that our study will spawn further developments for the design of switchable nanogates and nanopores.



A transition between "closed" and "open" states of the switchable nanopores is realized by the cononsolvency effect of grafted PNiPAAm.

1. Introduction

Switch-like response in soft matter can be achieved by volume changes of immobilized polymers such as gels and polymer brushes in solution, triggered by pH, thermal and photo responses [1]. However, harnessing of these effects in applications generally requires a large change of the environmental parameters such as temperature and pH. Particularly when considering applications in biomaterials this is inconvenient, since in living environments temperature and pH usually has to be controlled in a narrow range. On the other hand, it is known that volume phase transitions take place when biopolymers such as RNA are mixed with multicomponent solutes/solvents including non-specifically RNA-binding proteins [2, 3]. Another example is a reentrant condensation of proteins in aqueous solutions observed by addition of multivalent salts [4]. A phenomenon similar to reentrant condensation of proteins is cononsolvency first observed in synthetic polymers [5]. Here, a mixture of two good solvents causes the collapse or demixing of polymers such as poly(N-isopropylacrylamide) (PNiPAAm) in a certain range of compositions of these two solvents. It is worth noting that this transition is of first order even for immobilized macromolecules [6], thus a small concentration change of the cosolvent is sufficient to trigger the collapse. Previous studies [7] confirmed that the thickness of a PNiPAAm brush on a flat surface exhibits a switch-like response when a very small amount of alcohol (usually termed as cosolvent) is added into the aqueous solutions of polymer brushes. Thus, cononsolvency of polymer brushes appears as a promising candidate to mimic the opening and closing of cell-membrane channels, but so far this is merely supported by coarse-grained computer simulations [8-10] and not yet reported in any experimental investigation [11-14].

Meanwhile, we have to realize that it is impossible to do a rational experimental investigation on the cononsolvency response of polymer-decorated switchable nanopores, unless suitable characterizing methods are available. However, it is still challenging for standard analytical methods to characterize stimuli-responsive behaviors of polymer layers in

various confined environments such as nanopores. To our best knowledge, only few studies [15-17] reported that the atomic force microscopy can be used to qualitatively detect the hydrodynamic thickness of a polymer layer around the hollow structures. Lack of analytic methods to quantify the thickness of a polymer layer around the rim of nanopores, actually impedes further developments for the rational design of switchable nano-gates and nanopores.

Hence it is an important aim of this work to develop a method to quantitatively determine the thickness of polymer layer around the rim of nanopores. In this study we achieved this task on the basis of the physics of polymer translocation. As an application example of this method, we studied the translocation dynamics of fluorescence DNA through PNiPAAm decorated switchable nanopores in aqueous environments. We demonstrated that switchable nanopores can be prepared by harnessing the cononsolvency transition in grafted polymers. The widening of the PNiPAAm decorated nano-channels occurs in a narrow window of about 5% volume fraction of ethanol in aqueous buffer solution. Experimental results quantitatively showed that PNiPAAm layers around the rim of nanopores show solvent-composition responsive behaviors in the range of metabolic pH values and room temperatures. In the following, the methodology used in this study will be firstly described in **Section 2**, then experimental results will be discussed in **Section 3** and finally concluding remarks will be made in **Section 4**.

2. Experiments and Methods

2.1. DNA translocation experiments

In our experiments, track-etched polycarbonate membranes (Whatman, with nominal pore diameters equal to 50nm and thicknesses equal to 6 μ m) were used in DNA translocation experiments. First the membranes are one-side sputtered with a thin layer of gold (EVA 300 Alliance Concept evaporator, thickness 50 nm, speed of deposit 0.2 nm), then the gold layer is grafted with a PNiPAAm layer by grafting-to method. In this study, the different samples are named as “higher-graft-15K” and “lower-graft-15K” to discriminate the higher and lower grafting densities of polymer layers with a molecular weight of $M_n = 1.5 \times 10^4$ g/mol, and dispersity $M_w/M_n = 1.18$. We named “higher-graft-30K” and “lower-graft-30K” to discriminate the higher and lower grafting densities of polymer layers with a molecular weight of $M_n = 3.0 \times 10^4$ g/mol, and dispersity $M_w/M_n = 1.25$. For the details of preparing polymer layers, see **section S1.1 of Supporting Materials**.

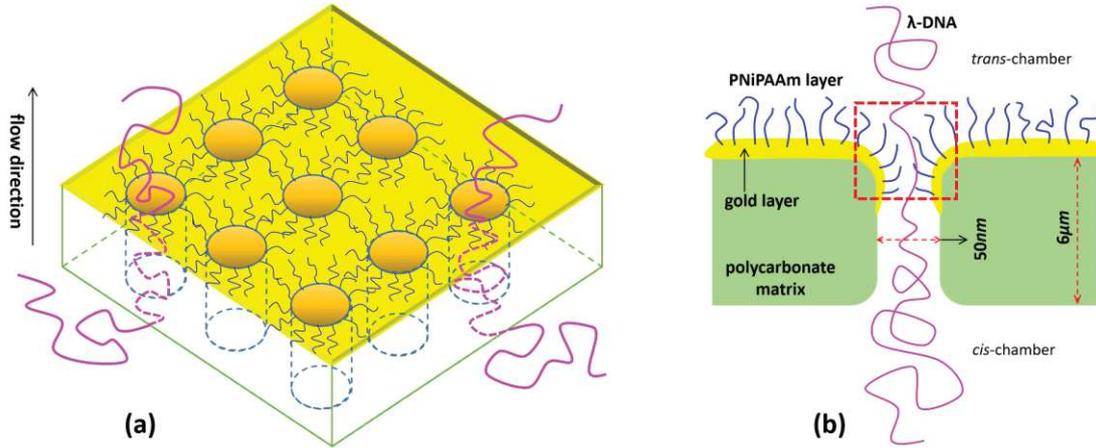


Figure 1. A sketch of fluorescence λ -DNAs translocating through PNiPAAm-grafted nanopores: (a) Three-dimensional view of nanopore structures, and (b) side view of a single nanopore. In this study, based on the DNA-translocation efficiency we developed an analytic method to quantitatively measure the effective thickness of a polymer layer around the rim of nanopores, i.e., the polymer layer in the box region depicted in the right figure.

As for DNA translocation experiments, a dilute solution of λ -DNA (0.1 pM, 48 kbp) in tris buffer solution (tris 10 mM, EDTA 1 mM and KCl 10 mM, pH \approx 7.6) fluorescently labeled with YoYo-1 (Life Tech) filled in the *cis*-chamber where the pressure was applied, for the experimental details please refer to our previous publications such as **ref.[18]**. A few hundred DNA translocation events were observed simultaneously with a time resolution of about 10ms by fluorescence microscopy, which was sufficient to resolve each translocation event. A cartoon depiction of λ -DNAs translocating through PNiPAAm-grafted nanopores, is shown in **Figure 1**.

In our cononsolvency experiments, ethanol is merely added to the buffer solution in the *trans*-chamber, see **Figure 1b**. Taking into account that DNAs are driven from the *cis*-chamber to the *trans*-chamber, the composition of the tris buffer (without ethanol) in the *cis*-chamber is unlikely affected by the composition change of solvent in the *trans*-chamber. Thus, it is unlikely that the DNA translocation is directly affected by the addition of ethanol in the *trans*-chamber. It is worth pointing out that the volume size of the *trans*-chamber is significantly larger than that of the *cis*-chamber; thus, in our study, the solvent-composition change in the *trans*-chamber due to the liquid driven from the *cis*-chamber can be neglected.

2.2. Characterizing the effective thickness of a grafted polymer layer around the rim of nanopores

In this study, to quantitatively estimate the thickness of the polymer layer around the rim of nanopores, we used the celebrated suction model for the translocation of polymer in dilute solutions introduced by P.-G. de Gennes [19, 20]. Our method is on the basis of the DNA-translocation efficiency which in turn relies on the proven fact that in the strong confinement

regime, the critical force to guide flexible linear polymer chains through nanopores is independent of the chain length [21]. We analyzed the variation of the DNA translocation frequency per pore (f_{DNA}) with the gradient of pressure (P) where the pressure on the side of membrane without coating a gold layer is higher, see **Figure 1b**. In the framework of the suction model [18, 22], the translocation frequency is expressed as

$$f_{DNA} = k_1 \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right), \quad (1)$$

by assuming that DNA translocation is described as the travel of a flexible polymer through a free-energy landscape with a barrier of height ΔF and assuming the translocation process follows a Boltzmann statistic. We note that the persistence length of DNA is about 50 nm which is also the nanopore size in this study, thus a flexible-polymer-chain assumption for DNA in this study is reasonable [23].

In **Eq.(1)**, k_B is the Boltzmann constant and T is the thermodynamical temperature. k_1 (s^{-1}) is the rate of incidence on the barrier. By Kramers' theory [24, 25] for Brownian motion in a field of force, when k_1 is dominated by the presence of the barrier ΔF , $k_1 \propto J/J_c$ holds with J the solvent flux ($m^3 s^{-1}$) and J_c the solvent-flux threshold. In the suction model, the energy barrier is $\Delta F = k_B T (J/J_c)$ and the translocation frequency f_{DNA} finally reads

$$f_{DNA} = k_2 \left(\frac{P}{P_c}\right) \exp\left(-\frac{P_c}{P}\right), \quad (2a)$$

with k_2 a proportionality factor (s^{-1}), P the gradient of pressure applied by the equipment where the pressure on the side of membrane without coating a gold layer is higher, the critical pressure $P_c = R_h J_c$. R_h is the hydrodynamical resistance of the pore equals to $8\eta L/\pi R_{eff}^4$ with L the length of a pore ($L = 6\mu m$ in this study), R_{eff} is the effective radius of pores, and η is the solvent viscosity in the *cis*-chamber, see **Figure 1b**. In this study, η is the solvent viscosity of the tris buffer (without ethanol).

Taking into account of that the pore size is significantly larger than the cross-sectional size of DNA backbone and the Reynolds number is at the order of about 10^{-4} , the Poiseuille's law and Darcy's law are still valid for the flow in this study [18, 26]. Keeping in mind that the

solvent-flux threshold (J_c) of polymer translocation has been proven by both theories [19, 20] and experiments [21] at the order of

$$J_c = \text{const} \times \frac{k_B T}{\eta}, \quad (3a)$$

then we can use this relation to estimate the thickness of a polymer layer around the rim of nanopores. Technically speaking, it is unnecessary to know the numerical prefactor on the right-hand side of **Eq.(3a)** in experiments; the effective (hydrodynamic) radius of the polymer-decorated pore, R_{eff} can be calculated in a way of avoiding the numerical prefactor as below,

$$R_{eff} = R_0 \left(\frac{P_{c,0}}{P_{c,eff}} \times \frac{T_{eff}}{T_0} \right)^{\frac{1}{4}}, \quad (4a)$$

where $P_{c,0}$ and $P_{c,eff}$ are critical pressures of the blank membrane and when the same membrane is grafted with a polymer layer, respectively; T_0 and T_{eff} are temperatures where experiments are conducted for the blank membrane and when the same membrane is grafted with a polymer layer, respectively. In our cononsolvency experiments, the temperature is fixed at 298K; thus, $T_{eff} = T_0$ holds in our experiments. R_0 is the radius of nanopores without grafted polymers, usually it is insensitive to normal temperature change, in this study $R_0 = 25.0 \pm 1.0$ nm is the corresponding measured value using scanning electron microscopy.

Taking into account the fact that the polymer layer grafted around the rim of nanopores, the relation of $R_{eff} \leq R_0$ always holds. Then, the effective thickness of the polymer layer around the rim of nanopores can be obtained as

$$H = R_0 - R_{eff}, \quad (5)$$

i.e., the effective thickness of the polymer layer in the box region depicted in **Figure 1b**. It is remarkable that **Eq.(4a)** is a fourth-order power law, this implies that the change of critical pressure is sensitive to the change of pore size and thus the effective thickness of the polymer layer around the rim of nanopores can be estimated in a relatively high accuracy. It is noted that we measure H under flow conditions which leads to that the estimated thickness (H) may not coincide with the thickness of equilibrium polymer layers.

The frequency f_{DNA} is calculated as

$$f_{DNA} = \frac{N_{DNA}}{\rho_{pore} A t}. \quad (6)$$

The DNA-translocation efficiency, i.e., the number of DNA translocation events (N_{DNA}) through a fixed area ($A = 135\mu m \times 135\mu m$) of membranes and in a fixed period of time ($t = 30$ s) is counted both by a combination of visual inspection by human eyes and using an in-house script coded in Python. Examples to determine the number of DNA translocation events are shown in **Figure S1** of **Supporting Materials** and **Video Supporting Materials**. For the details how to count the number of DNA translocation events and process these data, see **sections S1.2** and **S1.3** of **Supporting Materials**.

The pore density in **Eq.(6)** is with a value of $\rho_{pore} = 6 \times 10^8$ pores/cm² in this study. The average number of pores in the fixed area is about 1.1×10^5 , thus the observed number fluctuation of DNA translocation events in this study actually can be neglected. As shown in **Eq.(6)**, the number of translocation events (N_{DNA}) observed in this study only differs from the translocation frequency (f_{DNA}) by a constant multiplicatory factor. In the following we use N_{DNA} instead of f_{DNA} in discussion by convenience, since we are only interested in the relative variation of the frequency with respect to the buffer conditions. Thus, in this study the critical pressure (P_c) is obtained by fitting the nonlinear equation

$$N_{DNA} = k_3 \left(\frac{P}{P_c} \right) \exp\left(-\frac{P_c}{P}\right), \quad (7)$$

where k_3 is a constant for a given system. The detail of using **Eq.(7)** to process experimental data in this study is shown in **section S1.4** of **Supporting Materials**.

We note that the driving force for DNA translocation through nanopores/nanochannels can be an electric field [27, 28] which is widely used in translocation experiments and still lack of quantitative methods to characterize, our experimental method can be extended and formulated to this case. Following a derivation in analogy to the case of pressure driving as shown above, for the case of electric field as the driving force, the translocation frequency f_{DNA} reads as [29],

$$f_{DNA} = k_4 \left(\frac{E}{E_c} \right) \exp\left(-\frac{E_c}{E}\right), \quad (2b)$$

with k_4 a proportionality factor (s^{-1}), E the strength of the electric field applied to drive DNA translocation and E_c the electric-field threshold. In experiments, the voltage strength $V = EL$ is usually used instead of the electric-field strength (E) with L the length of a pore (such as $L = 6\mu m$ in this study). The applicability of **Eq.(2b)** can be verified by experimental data reported by **refs.[29-31]**.

For the case of electric field as the driving force, the electric-field threshold (E_c) to overcome the entropy barrier of polymer translocation is bias equivalent to the critical flux in the suction model and is scaled at the order of

$$E_c = const \times \frac{k_B T}{qR^3}, \quad (3b)$$

with R the pore radius [29]. Taking into account of that for controlled experiments the surface charge density (q) of polymer “blobs” in the nanopore usually is a constant and insensitive to normal temperature change; the effective (hydrodynamic) radius of the polymer-decorated pore, R_{eff} can be calculated in a similar way like **Eq.(4a)**,

$$R_{eff} = R_0 \left(\frac{E_{c,0}}{E_{c,eff}} \times \frac{T_{eff}}{T_0} \right)^{\frac{1}{3}}, \quad (4b)$$

where $E_{c,0}$ and $E_{c,eff}$ are electric-field thresholds of the blank membrane and when the same membrane is grafted with a polymer layer, respectively. Note that the exponent difference between **Eq.(4a)** and **Eq.(4b)**, it implies that a pressure-controlling experiment is preferable; because comparing with the change of electric-field threshold, the change of critical pressure is much sensitive to the change of pore size. Nevertheless, one advantage of translocation experiments by electric-field driving is that the translocation frequency f_{DNA} can be easily and accurately obtained via the analysis of electric-current signals with respect to time trace.

It is particularly worthy of mentioning that our experimental methods are valid for the pressure and electric injections of polymers with a radius of gyration larger than the pore diameter and in the dilute regime. We also note that in the translocation experiments, other polymers can be also used such as proteins [32, 33] and synthetic polymers [34, 35], in principle our experimental methods can be extended without difficulty to these cases; however, this topic is beyond the scope of this study.

3. Results and Discussion

3.1. Results of DNA flux through (PNiPAAm-decorated) nanopores

Our experimental results of the number of DNA translocation events through nanopores in a tris-buffer solution as a function of pressure are displayed in **Figure 2**. We compare the results for blank membranes (with gold layer) and for different grafting densities of PNiPAAm. For different grafting densities the translocation efficiency, i.e., the number of translocation events at a given pressure, is reduced dramatically as compared to the bare or blank membrane. At higher pressure the higher grafting density leads to a higher reduction of the translocation efficiency in accordance with the fact that higher grafting densities lead to thicker polymer layers. With the help of a scaling analysis, we can show that the polymer layers displayed in **Figure 2a** are in a brush state, while the polymer layers displayed in **Figure 2b** are below the brush state; for the details see **sections S1.1 and S1.5 of Supporting Materials**.

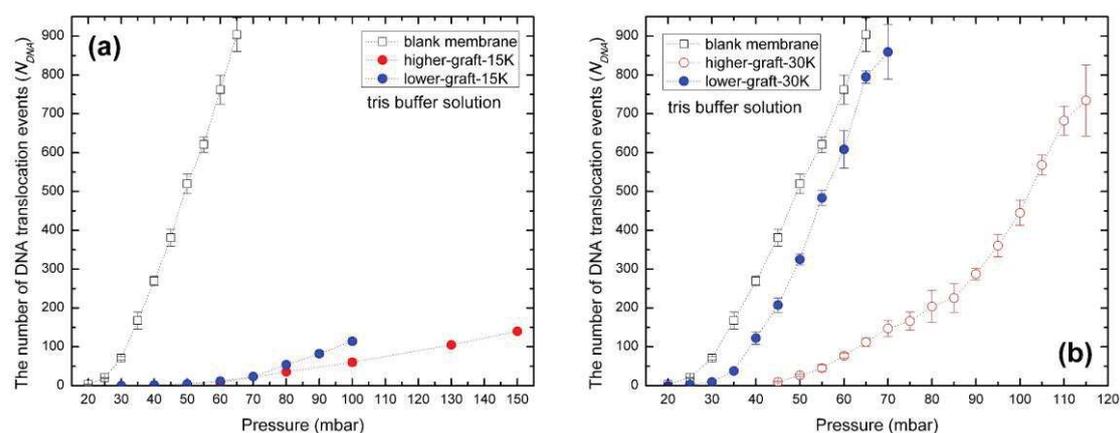


Figure 2. Number of DNA translocation events with respect to pressure. **(a)** Grafting-density effect of different PNiPAAm layers with a shorter polymer chain in tris buffer, the molecular weight of PNiPAAm layers is $M_n = 1.5 \times 10^4$ g/mol, and dispersity is $M_w/M_n = 1.18$. **(b)** Grafting-density effect of different PNiPAAm layers with a longer polymer chain in tris buffer, the molecular weight of PNiPAAm layers is $M_n = 3.0 \times 10^4$ g/mol, and dispersity is $M_w/M_n = 1.25$. pH value of the buffer is about 7.6 and measurement temperature is at 25 °C. The dotted lines in the figures are guides to eyes.

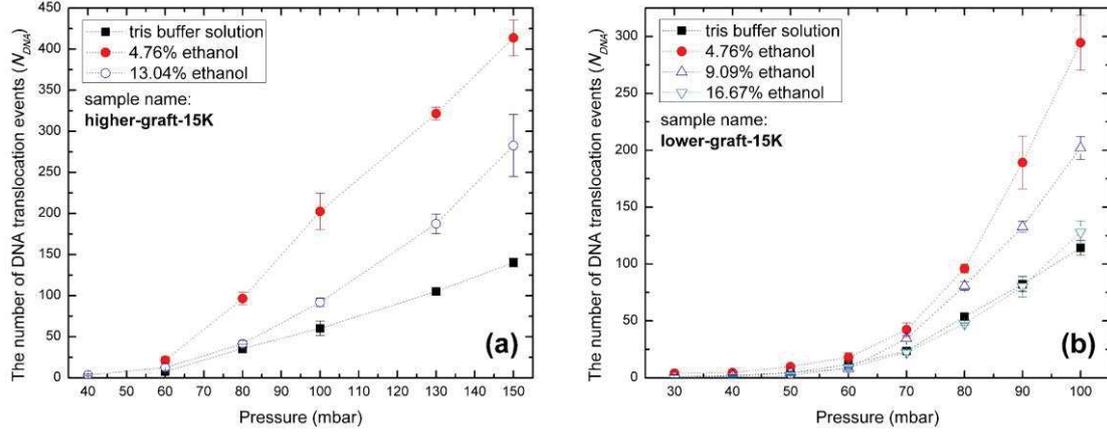


Figure 3. Number of DNA translocation events with respect to pressure. Solvent-composition response of different PNiPAAm layers: (a) for a membrane of a higher grafting density, and (b) for a membrane of a lower grafting density. The molecular weight of PNiPAAm layers is $M_n = 1.5 \times 10^4$ g/mol, and dispersity is $M_w/M_n = 1.18$. pH value of the buffer is about 7.6 and measurement temperature is at 25 °C. The dotted lines in the figures are guides to eyes.

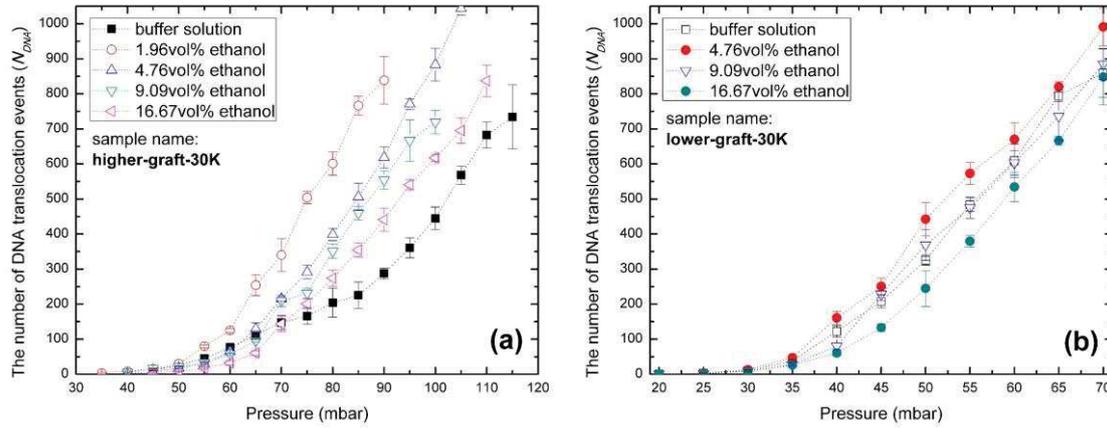


Figure 4. Number of DNA translocation events with respect to pressure. Solvent-composition response of different PNiPAAm layers: (a) for a membrane of a higher grafting density, and (b) for a membrane of a lower grafting density. The molecular weight of PNiPAAm layers is $M_n = 3.0 \times 10^4$ g/mol, and dispersity is $M_w/M_n = 1.25$. pH value of the buffer is about 7.6 and measurement temperature is at 25 °C. The dotted lines in the figures are guides to eyes.

As shown in **Figures 3** and **Figures 4**, for each membrane with a PNiPAAm layer, the number of DNA translocation events first increases with an increase of ethanol concentration. With further increasing ethanol concentration, the number of DNA translocation events decreases again. This implies the size of the nanopores firstly increases under the stimuli of increasing ethanol concentration, later the nanopore size reduces by further increasing ethanol concentration. This indicates that grafted PNiPAAm shows re-entrant signature of

cononsolvency transition in the ethanol/tris-buffer mixtures, as observed for flat brushes [7]. This observation is clearly supported by a study of the normalized number of DNA translocation events which is plotted with respect to the change of ethanol concentration under different driving pressures, see **Figure 5** and **Figure S5 (Supporting Materials)**. Solvent-composition responsive behaviors shown in **Figures 3-5** and **Figure S5** indicate that the cononsolvency effect of grafted PNiPAAm can be used to control the size of nanopores.

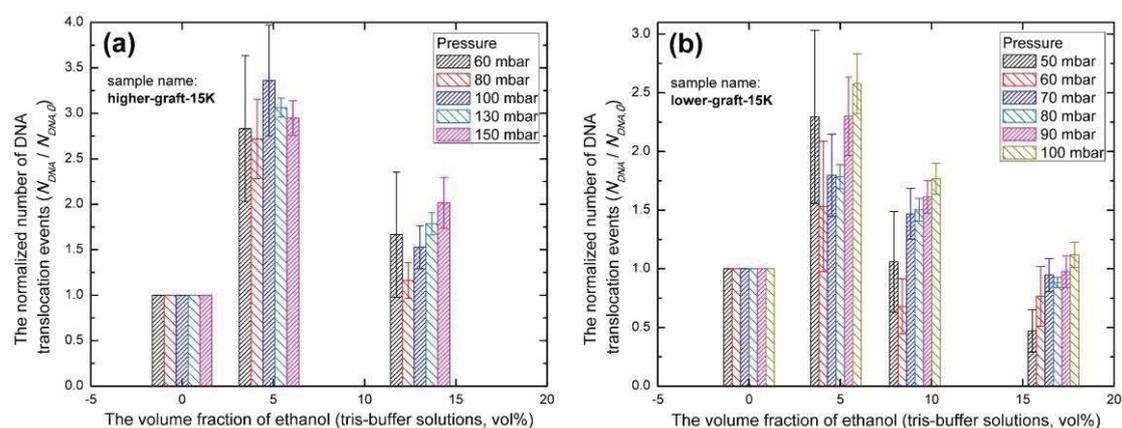


Figure 5. The normalized number of translocation events is plotted with respect to ethanol concentration change under different driving pressure. (a) For a higher grafting density of PNiPAAm-grafted nanopores, data are the same as in Figure 3a. (b) For a lower grafting density of PNiPAAm-grafted nanopores, data are the same as in Figure 3b. Note that $N_{DNA,0}$ is the observed number of DNA translocation events in tris buffer solutions (no addition of ethanol). From the left-hand to the right-hand sides of the figure, column bars arrange the pressure in increasing order.

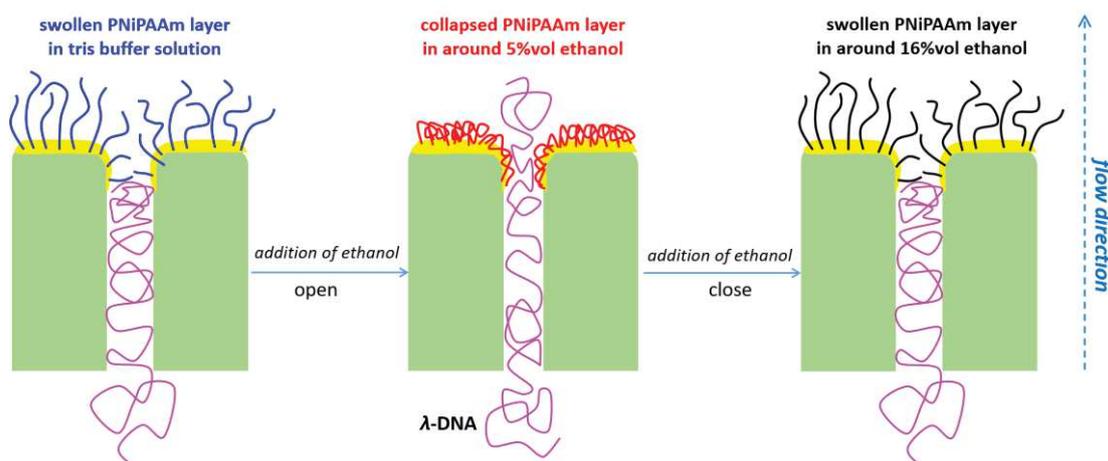


Figure 6. For a polymer layer with a moderate-grafting density, when the applied flow pressure is low and in a certain range, the DNA translocation through PNiPAAm-decorated nanopores can be regulated by the addition of ethanol to tris buffer solutions. This phenomenon is attributed to the cononsolvency effect which causes a collapse of the polymer layer and thus a transition between "closed" and "open" states of the nanopores.

In **Figure 3b** and **Figure 4a**, it is noted that for polymer layers with moderate-grafting densities, when the applied flow pressure is low and in a certain range, DNA can translocate through PNiPAAm-decorated nanopores at very low concentrations of ethanol (4.76%vol and 1.96%vol, respectively) but not at much higher concentrations of ethanol and in tris buffer. This phenomenon is unavoidably attributed to the cononsolvency effect which causes a collapse of the polymer layer and thus a transition between "closed" and "open" states of the nanopores. Under the condition of flow pressure, a depiction of DNA translocation and ethanol-concentration induced phase transition of a PNiPAAm layer around the rim of nanopores, is shown in **Figure 6**.

In **Figure 7**, we display the results for both grafting densities at the opening of PNiPAAm-grafted nanopores at 4.76%vol of ethanol. Comparing results for both grafting densities in tris buffer (**Figure 2**) and 4.76%vol of ethanol (**Figure 7**), we observe a consistent increase of DNA translocation efficiency with decreasing grafting density of the polymer layer. We made control experiments verifying that ethanol has no swelling effect on the matrix material (polycarbonate) used to manufacture nanopores in this study. Therefore, the origin of the non-monotonous opening/closing behavior of the nanochannel can be merely the solvent response of the grafted PNiPAAm. These results are in agreement with our previous studies of flat brushes, where a non-monotonous change of the brush height is with a minimum at low alcohol concentrations [7].

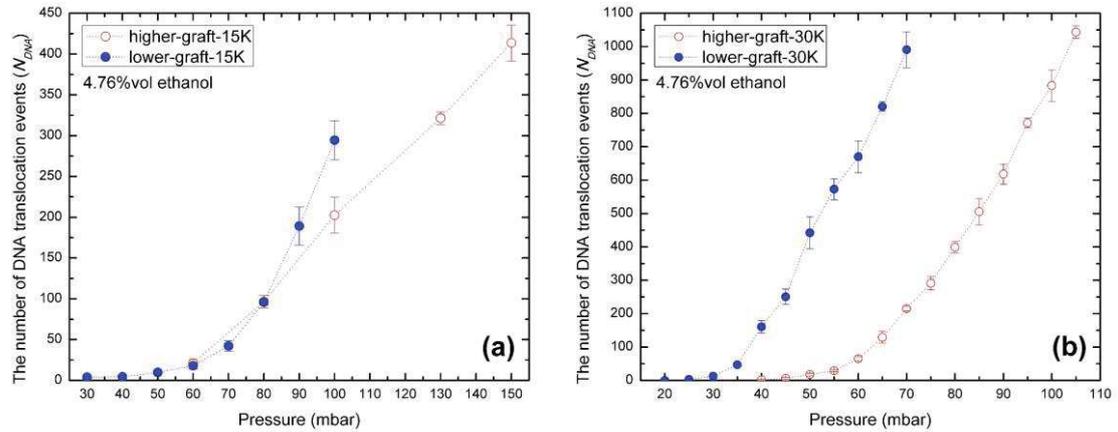


Figure 7. Number of DNA translocation events with respect to pressure. Grafting-density effect of different PNiPAAm layers in 4.76%vol ethanol-tris buffer mixtures when DNAs translocate through nanopores. (a)

Membranes with the molecular weight of PNiPAAm layers $M_n = 1.5 \times 10^4$ g/mol, and dispersity is $M_w/M_n = 1.18$.

(b) Membranes with the molecular weight of PNiPAAm layers $M_n = 3.0 \times 10^4$ g/mol, and dispersity is $M_w/M_n =$

1.25. pH value of the buffer is about 7.6 and measurement temperature is at 25 °C. The dotted lines in the figures are guides to eyes.

3.2. A comparative study between nanopore brushes and flat brushes

Although our experimental results of DNA flux through nanopores are in agreement with our present understanding of the cononsolvency effect in grafted polymer layers for flat surfaces, the above discussions are still qualitative so far. To get some quantitative insights, we used the experimental results in **Figures 2-4** to calculate the reference values for the absolute height of PNiPAAm layers around the rim of nanopores using **Eq.(4a)**, **Eq.(5)** and **Eq.(7)**, the results are displayed in **Table 1**. It should be noted that the small uncertainty estimated for the thickness of polymer layers, is not accidental; it is a consequence of the fact that the conformation fluctuation of the polymer layers is compressed by flow fields where the free chain ends are prone to be compressed from the outer edge of the polymer layers into a region deeper inside the polymer layers [36]. By virtue of this fact and a scaling analysis, the relative grafting densities and morphologies of polymer layers in this study were determined, see **Table 1**; for the details see **section S1.5 of Supporting Materials**.

Table 1. The reference values for the swollen thickness of PNiPAAm layers around the rims of nanopores in mixtures of tris buffer added with various concentrations of ethanol. The layer thickness is calculated based on the data of DNA translocation events reported in **Figures 2-4**. These data are calculated by the analytic method developed in this study, for details see **section 2.2**.

sample name	grafting density (chains/nm ²)	Tris buffer (nm)	1.96%vol (nm)	4.76%vol (nm)	9.09%vol (nm)	13.04%vol (nm)	16.67%vol (nm)	morphologies
higher-graft-15K	~ 0.30	10.0 ± 1.0	/	8.5 ± 0.1	/	9.0 ± 0.5	/	brush
lower-graft-15K	~ 0.15	7.0 ± 0.1	/	3.8 ± 0.1	6.3 ± 0.1	/	7.5 ± 0.5	brush
higher-graft-30K	~ 0.05	5.3 ± 0.1	3.5 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	/	4.5 ± 0.1	mushroom/bush*
lower-graft-30K	<< 0.05	1.6 ± 0.1	/	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	/	2.1 ± 0.1	mushroom

*It is hard to determine the exact morphology for this sample merely based on a scaling analysis.

In **Figure 8**, we also display the normalized swollen thickness of polymer layers which are grafted around the rim of nanopores. It is observed that in **Figure 8a** an increase of grafting density of nanopore brushes, weakens the collapse transition of brush layer in ethanol/tris buffer mixtures, this follows the analytic prediction of a mean-field model for cononsolvency transition by our previous studies [6, 37]. As well as shown in **Figure 4b** and **Figure 8b**, a PNiPAAm polymer layer with very low grafting density below the brush state still displays reentrant behavior; however, corresponding phase-transition behaviors are not pronounced. It becomes clear that a pronounced switching effect can only be realized in a window of moderate grafting densities.

In **Figure 8b**, we observed that a decrease of grafting density weakens the collapse regarding the normalized swollen polymer thickness, this is quite different from brush behaviors as shown in **Figure 8a**. These observations are manifestations that phase behaviors of grafted polymers at a collapsed state (poor-solvent state) can be quite different from free

polymers in solutions. Merely with a decrease of the grafting density of a PNiPAAm layer, at a poor-solvent state the swollen polymer chains can show various morphologies [38-41] such as collapsed brush, coexistence of two phases, octopus-shape micelle and collapsed globule. In **Figure 8**, it is interesting to observe in our current experimental data that the grafting density has only a very small effect on the solvent-composition location of the maximum collapsed state, whether or not the polymer layer is located in the brush regime. These above-mentioned phase behaviors of PNiPAAm layers grafted around the rim of nanopores, are also observed in our study of grafted PNiPAAm polymers on flat surface both in ethanol/water mixtures [7] and in ethanol/tris buffer mixtures, see **Figure S6** and **Figure S7** (**Supporting Materials**).

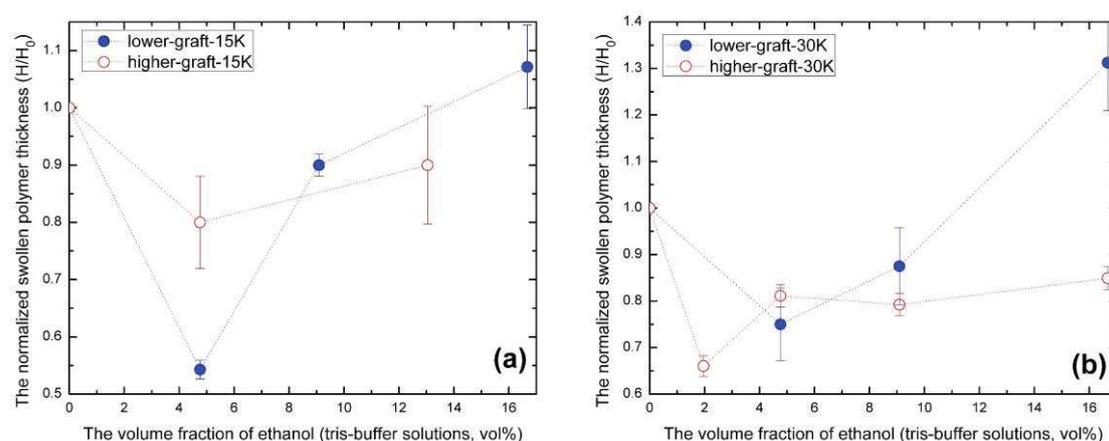


Figure 8. Ethanol-concentration response of grafted PNiPAAm polymers around the rim of nanopores, the relative polymer thickness is calculated by the analytic method as described in **section 2.2**. (a) Membranes with the molecular weight of PNiPAAm layers $M_n = 1.5 \times 10^4$ g/mol, and dispersity $M_w/M_n = 1.18$. (b) Membranes with the molecular weight of PNiPAAm layers $M_n = 3.0 \times 10^4$ g/mol, and dispersity $M_w/M_n = 1.25$. pH value of the buffer is about 7.6 and measurement temperature is at 25 °C. The dotted lines in the figures are guides to eyes.

Figure 9 shows measurements of in-situ Vis-spectroscopic ellipsometry for equilibrium swollen thickness of two PNiPAAm brushes with different grafting densities on flat surface which are immersed in tris-buffer/ethanol mixtures, for more results also see **Figures S7-S9** (**Supporting Materials**). The methods of preparing these flat brushes and conducting ellipsometry experiments were reported in our previous studies [42]. The ellipsometry study clearly indicates that PNiPAAm brushes undergo a collapse with respect to an increase of ethanol concentration; as well as at higher concentration of ethanol, the PNiPAAm brushes begin to show re-entrant behavior. It also indicates that a slight increase of grafting density of PNiPAAm flat brushes, slightly weakens the collapse transition of flat brushes in ethanol/tris buffer mixtures. In addition, it is of interest to see that in the re-entrant transition for the

relative brush thickness (**Figure 8a** and **Figure 9b**), nanopore brushes and flat brushes show similar re-entrant behaviors regarding the change of grafting density. These ellipsometry observations qualitatively cross-verified our DNA translocation experiments.

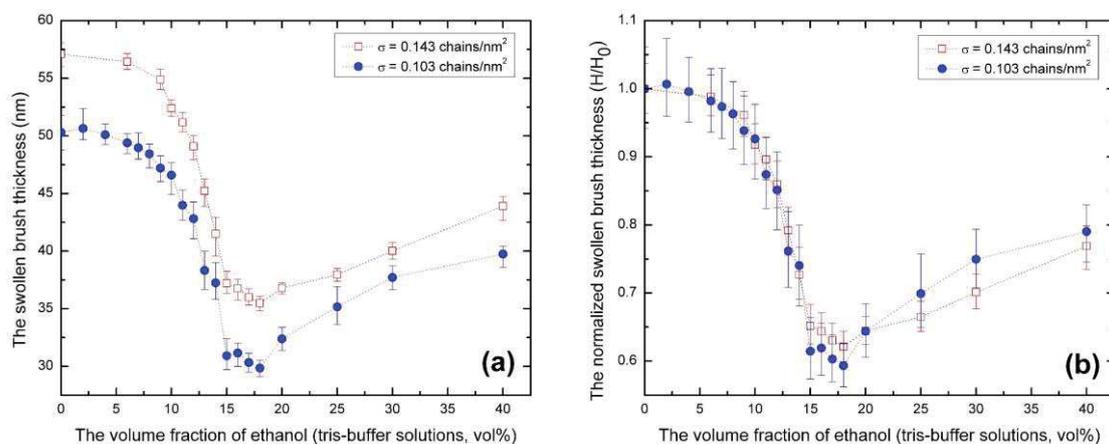


Figure 9. A study of in-situ Vis-spectroscopic ellipsometry for equilibrium swollen brush thickness on grafting-density effect in the cononsolvency transition of grafted PNiPAAm brushes in ethanol/tris buffer mixtures on the flat surface, at the temperature of 25°C, the pH value of the buffer is 7.45: (a) absolute swollen brush thickness; (b) normalized swollen brush thickness. Experiments were conducted with the molecular weight of $M_n = 6.1 \times 10^4$ g/mol, $M_w/M_n = 1.40$ for all polymer brushes. The dotted lines in the figures are guides to eyes.

From the comparison of **Figure 8** and **Figure 9**, it should however be noted that the phase-transition window detected by translocation experiments through nanopores under non-equilibrium conditions differs from the window detected by ellipsometry experiments at equilibrium states. The reason for this discrepancy may be attributed to the fact that the brush is subjected to flow fields, osmotic pressure induced by the translocating DNA and hydrostatic pressure effects. From the theoretical description of the cononsolvency transition in brushes and in solutions [6, 43], it is known that densification of the polymer due to external forces shifts the cononsolvency transition to smaller cosolvent concentrations. It is worthy of addressing that from the comparison of **Figure 8a** and **Figure 9b**, it can be seen that despite of the shift in the transition window, the reduction of relative height in the flat brush corresponds the change of the radius of the polymer-grafted nanopore when the grafting density is at the same level, see data of blue circles in **Figure 8a** and data in **Figure 9b**, this can be analytically predicted by our previous theoretical studies for brush layers [6, 37]; readers who are interested in theoretical details, please refer to our previous publications [6, 37].

4. Conclusions

In summary, one contribution of our study is that we demonstrated that small amounts of ethanol admixed to an aqueous solution can trigger the translocation of DNA through

polymer-decorated nanopores. We can identify the cononsolvency effect as being responsible for this observation which causes an abrupt collapse of the brush by increasing the alcohol content of the aqueous solution followed by a reswelling at higher alcohol concentration. Regardless of the grafting density of a grafted PNiPAAm polymer layer around the rim of nanopores, in the alcohol-tris buffer mixtures, the polymer layer displays solvent-composition responsive behaviors in the range of metabolic pH values and room temperatures. Our study also shows that a pronounced switching effect can be only realized in a window of moderate grafting densities of PNiPAAm layers. Although in this study PNiPAAm was chosen as a model synthetic polymer, due to the universality of the cononsolvency effect in competitive solvents the conclusions made for PNiPAAm can be extended to other synthetic polymers as well as to biopolymers [4, 44]. As a proof of concept of using synthetic polymers to mimic biological functions of cell-membrane channels [8, 45], our study clearly transpired that cononsolvency effect of polymers can be used as a novel trigger [46] to change the size of nanopores in analogy to the opening and closure of the gates of cell-membrane channels.

Another contribution of our study is that using the suction model for the pressure-driving translocation of the DNA chains and on the basis of the DNA-translocation efficiency, for the first time we were able to quantitatively measure effective hydrodynamic thickness of a polymer layer which is grafted around the rim of nanopores. We envisage that our study will spawn further developments for the design of switchable nano-gates and nanopores which are also based on other stimuli-responsive effects such as thermal and pH responses.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Materials

The details of methods used in this study: (1) the method of preparing PNiPAAm-grafted gold membranes; (2) the method of identification and counting of DNA translocation events and the Python source code to realize this method, the method of processing data, information of how to deal with Video Supporting Materials; (3) how to estimate grafting density. And (i) additional results of DNA translocation experiments for nanopores grafted by longer PNiPAAm chain (with molecular weight of $M_n = 3.0 \times 10^4$ g/mol, and dispersity $M_w/M_n = 1.25$); (ii) additional results of switch effect of PNiPAAm polymer layers on flat surface both in the ethanol/water mixture and in the ethanol/tris-buffer mixtures. (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*yong@ipfdd.de (H.Y.)

*fabien.montel@ens-lyon.fr (F.M.)

*sommer@ipfdd.de (J.-U.S.)

Author Contributions

Huaisong Yong prepared the manuscript draft. Huaisong Yong and Bastien Molcrette conducted the experiments. Marcel Sperling and Huaisong Yong developed the source code to analyze data of DNA translocation experiments. Fabien Montel and Jens-Uwe Sommer directed this work. The manuscript was written through contributions of all authors.

Notes

The authors declare no conflict of finance interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungs Gemeinschaft (DFG) under Grant No. SO 277/17. The authors thank Holger Merlitz and Jingguo Li for critical reading the manuscript. The authors also thank Andreas Fery for valuable discussions.

References and Notes

- [1] P. Theato, B.S. Sumerlin, R.K. O'Reilly, T.H. Epps, III, Stimuli responsive materials, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 7055-7056.
- [2] S. Saha, C.A. Weber, M. Nusch, O. Adame-Arana, C. Hoege, M.Y. Hein, E. Osborne-Nishimura, J. Mahamid, M. Jahnel, L. Jawerth, A. Pozniakovski, C.R. Eckmann, F. Julicher, A.A. Hyman, Polar Positioning of Phase-Separated Liquid Compartments in Cells Regulated by an mRNA Competition Mechanism, *Cell*, 166 (2016) 1572-1584 e1516.
- [3] J. Berry, C.P. Brangwynne, M. Haataja, Physical principles of intracellular organization via active and passive phase transitions, *Reports on Progress in Physics*, 81 (2018) 046601.
- [4] O. Matsarskaia, F. Roosen-Runge, F. Schreiber, Multivalent ions and biomolecules: Attempting a comprehensive perspective, *Chemphyschem*, 21 (2020) 1742-1767.
- [5] H.G. Schild, M. Muthukumar, D.A. Tirrell, Cononsolvency in mixed aqueous solutions of poly (N-isopropylacrylamide), *Macromolecules*, 24 (1991) 948-952.
- [6] J.-U. Sommer, Adsorption-Attraction Model for Co-Nonsolvency in Polymer Brushes, *Macromolecules*, 50 (2017) 2219-2228.
- [7] H. Yong, E. Bittrich, P. Uhlmann, A. Fery, J.-U. Sommer, Co-Nonsolvency Transition of Poly(N-isopropylacrylamide) Brushes in a Series of Binary Mixtures, *Macromolecules*, 52 (2019) 6285-6293.
- [8] R.D. Coalson, A.E. Nasrabad, D. Jasnow, A. Zilman, A Polymer-Brush-Based Nanovalve Controlled by Nanoparticle Additives: Design Principles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 119 (2015) 11858-11866.
- [9] A.E. Nasrabad, D. Jasnow, A. Zilman, R.D. Coalson, Precise control of polymer coated nanopores by nanoparticle additives: Insights from computational modeling, *The Journal of Chemical Physics*, 145 (2016) 064901.
- [10] C.-W. Li, H. Merlitz, C.-X. Wu, J.-U. Sommer, Nanopores as Switchable Gates for

- Nanoparticles: A Molecular Dynamics Study, *Macromolecules*, 51 (2018) 6238-6247.
- [11] G. Perez-Mitta, M.E. Toimil-Molares, C. Trautmann, W.A. Marmisol, O. Azzaroni, Molecular Design of Solid-State Nanopores: Fundamental Concepts and Applications, *Advanced Materials*, 31 (2019) e1901483.
- [12] R. Brilmayer, C. Forster, L. Zhao, A. Andrieu-Brunsen, Recent trends in nanopore polymer functionalization, *Current Opinion in Biotechnology*, 63 (2020) 200-209.
- [13] T. Ma, J.M. Janot, S. Balme, Track-Etched Nanopore/Membrane: From Fundamental to Applications, *Small Methods*, 4 (2020) 2000366.
- [14] Y.A. Perez Sirkin, M. Tagliazucchi, I. Szleifer, Transport in nanopores and nanochannels: some fundamental challenges and nature-inspired solutions, *Materials Today Advances*, 5 (2020) 100047.
- [15] G.W. de Groot, M.G. Santonicola, K. Sugihara, T. Zambelli, E. Reimhult, J. Voros, G.J. Vancso, Switching transport through nanopores with pH-responsive polymer brushes for controlled ion permeability, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5 (2013) 1400-1407.
- [16] G. Emilsson, Y. Sakiyama, B. Malekian, K. Xiong, Z. Adali-Kaya, R.Y.H. Lim, A.B. Dahlin, Gating Protein Transport in Solid State Nanopores by Single Molecule Recognition, *ACS Central Science*, 4 (2018) 1007-1014.
- [17] G. Emilsson, K. Xiong, Y. Sakiyama, B. Malekian, V. Ahlberg Gagner, R.L. Schoch, R.Y.H. Lim, A.B. Dahlin, Polymer brushes in solid-state nanopores form an impenetrable entropic barrier for proteins, *Nanoscale*, 10 (2018) 4663-4669.
- [18] T. Auger, J. Mathe, V. Viasnoff, G. Charron, J.M. Di Meglio, L. Auvray, F. Montel, Zero-mode waveguide detection of flow-driven DNA translocation through nanopores, *Physical Review Letters*, 113 (2014) 028302.
- [19] F. Brochard, P.G. de Gennes, Dynamics of confined polymer chains, *The Journal of Chemical Physics*, 67 (1977) 52-56.
- [20] P.-G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, 1979.
- [21] T. Zheng, M. Zhu, J. Yang, J. He, M. Waqas, L. Li, Revisiting the Flow-Driven Translocation of Flexible Linear Chains through Cylindrical Nanopores: Is the Critical Flow Rate Really Independent of the Chain Length?, *Macromolecules*, 51 (2018) 9333-9343.
- [22] P. Rowghanian, A.Y. Grosberg, Electrophoretic capture of a DNA chain into a nanopore, *Physical Review E*, 87 (2013) 042722.
- [23] A.Y. Grosberg, A.R. Khokhlov, *Statistical Physics of Macromolecules*, American Institute of Physics, New York, USA, 1994.
- [24] P. Hänggi, P. Talkner, M. Borkovec, Reaction-rate theory: fifty years after Kramers, *Reviews of Modern Physics*, 62 (1990) 251-341.
- [25] H.A. Kramers, Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions, *Physica*, 7 (1940) 284-304.

- [26] P. Huber, Soft matter in hard confinement: phase transition thermodynamics, structure, texture, diffusion and flow in nanoporous media, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27 (2015) 103102.
- [27] B. Shen, P. Piskunen, S. Nummelin, Q. Liu, M.A. Kostianen, V. Linko, Advanced DNA Nanopore Technologies, *ACS Applied Bio Materials*, 3 (2020) 5606-5619.
- [28] G. Bucci, A.J. Spakowitz, Systematic Approach toward Accurate and Efficient DNA Sequencing via Nanoconfinement, *ACS Macro Letters*, 9 (2020) 1184-1191.
- [29] T. Auger, E. Bourhis, J. Donnez, A. Durnez, J.M. Di Meglio, L. Auvray, F. Montel, J. Yates, J. Gierak, Zero-mode waveguide detection of DNA translocation through FIB-organised arrays of engineered nanopores, *Microelectronic Engineering*, 187-188 (2018) 90-94.
- [30] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A.Y. Grosberg, A. Meller, Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient, *Nature Nanotechnology*, 5 (2010) 160-165.
- [31] N.A. Bell, M. Muthukumar, U.F. Keyser, Translocation frequency of double-stranded DNA through a solid-state nanopore, *Physical Review E*, 93 (2016) 022401.
- [32] Z.L. Hu, M.Z. Huo, Y.L. Ying, Y.T. Long, Biological Nanopore Approach for Single-Molecule Protein Sequencing, *Angewandte Chemie International Edition*, DOI 10.1002/anie.202013462(2020).
- [33] A. Asandei, G. Di Muccio, I. Schiopu, L. Mereuta, I.S. Dragomir, M. Chinappi, T. Luchian, Nanopore-Based Protein Sequencing Using Biopores: Current Achievements and Open Challenges, *Small Methods*, 4 (2020) 1900595.
- [34] Q. Chen, J. Liu, A.E.P. Schibel, H.S. White, C. Wu, Translocation Dynamics of Poly(styrenesulfonic acid) through an α -Hemolysin Protein Nanopore, *Macromolecules*, 43 (2010) 10594-10599.
- [35] A.G. Oukhaled, A.L. Biance, J. Pelta, L. Auvray, L. Bacri, Transport of long neutral polymers in the semidilute regime through a protein nanopore, *Physical Review Letters*, 108 (2012) 088104.
- [36] K. Binder, T. Kreer, A. Milchev, Polymer brushes under flow and in other out-of-equilibrium conditions, *Soft Matter*, 7 (2011) 7159.
- [37] H. Yong, H. Merlitz, A. Fery, J.-U. Sommer, Polymer Brushes and Gels in Competing Solvents: The Role of Different Interactions and Quantitative Predictions for Poly(N-isopropylacrylamide) in Alcohol–Water Mixtures, *Macromolecules*, 53 (2020) 2323-2335.
- [38] K. Gao, L.T. Kearney, J.A. Howarter, Planar Phase Separation of Weak Polyelectrolyte Brushes in Poor Solvent, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 55 (2017) 370-377.
- [39] G. Park, Y. Jung, Many-chain effects on the co-nonsolvency of polymer brushes in a good solvent mixture, *Soft Matter*, 15 (2019) 7968-7980.
- [40] C. Jentzsch, J.U. Sommer, Polymer brushes in explicit poor solvents studied using a new

- variant of the bond fluctuation model, *The Journal of Chemical Physics*, 141 (2014) 104908.
- [41] B.C. Choi, S. Choi, D.E. Leckband, Poly(N-isopropyl acrylamide) brush topography: dependence on grafting conditions and temperature, *Langmuir*, 29 (2013) 5841-5850.
- [42] H. Yong, S. Rauch, K.J. Eichhorn, P. Uhlmann, A. Fery, J.U. Sommer, Cononsolvency Transition of Polymer Brushes: A Combined Experimental and Theoretical Study, *Materials (Basel)*, 11 (2018).
- [43] J.-U. Sommer, Gluonic and Regulatory Solvents: A Paradigm for Tunable Phase Segregation in Polymers, *Macromolecules*, 51 (2018) 3066-3074.
- [44] C.E. Mills, E. Ding, B.D. Olsen, Cononsolvency of Elastin-like Polypeptides in Water/Alcohol Solutions, *Biomacromolecules*, 20 (2019) 2167-2173.
- [45] R.J. Gilbert, M. Dalla Serra, C.J. Froelich, M.I. Wallace, G. Anderluh, Membrane pore formation at protein-lipid interfaces, *Trends in Biochemical Sciences*, 39 (2014) 510-516.
- [46] W.H. Binder, Polymer-induced transient pores in lipid membranes, *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (2008) 3092-3095.

Bibliographie

- [1] Ron Milo & Ron PHILIPS. “How much energy is released in ATP hydrolysis?” en. In : (). Library Catalog : book.bionumbers.org.
- [2] M. MUTHUKUMAR. *Polymer Translocation*. English. 1st edition. Boca Raton : CRC Press, mai 2011. ISBN : 978-1-4200-7516-8.
- [3] B. M. DENKER et al. “Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules”. eng. In : *J Biol Chem* 263.30 (oct. 1988), p. 15634–15642. ISSN : 0021-9258.
- [4] Janette B. MYERS et al. “Structure of native lens connexin-46/50 intercellular channels by CryoEM”. In : *Nature* 564.7736 (déc. 2018), p. 372–377. ISSN : 0028-0836.
- [5] Werner R. LOEWENSTEIN. “Permeability of Membrane Junctions*”. en. In : *Annals of the New York Academy of Sciences* 137.2 (1966). __eprint : <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1749-6632.1966.tb50175.x>, p. 441–472. ISSN : 1749-6632.
- [6] Bertil HILLE. *Ionic channels of excitable membranes*. English. OCLC : 681129062. Sunderland, Mass. : Sinauer Associates, 1992.
- [7] Hans MOLDENHAUER et al. “Effective pore size and radius of capture for K⁺ ions in K-channels”. en. In : *Scientific Reports* 6.1 (fév. 2016). Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 1–5. ISSN : 2045-2322.
- [8] Lina ABDUL KADIR, Michael STACEY et Richard BARRETT-JOLLEY. “Emerging Roles of the Membrane Potential : Action Beyond the Action Potential”. In : *Front Physiol* 9 (nov. 2018). ISSN : 1664-042X.
- [9] L. SONG et al. “Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore”. eng. In : *Science* 274.5294 (déc. 1996), p. 1859–1866. ISSN : 0036-8075.
- [10] T CHAKRABORTY et al. “Aerolysin of *Aeromonas sobria* : evidence for formation of ion-permeable channels and comparison with alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*.” In : *Infect Immun* 58.7 (juil. 1990), p. 2127–2132. ISSN : 0019-9567.
- [11] David KOZONO et al. “Aquaporin water channels : atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine”. In : *J Clin Invest* 109.11 (juin 2002), p. 1395–1399. ISSN : 0021-9738.
- [12] Pierre DELANAYE et al. “Normal reference values for glomerular filtration rate : what do we really know?” In : *Nephrology Dialysis Transplantation* 27.7 (juil. 2012), p. 2664–2672. ISSN : 0931-0509.
- [13] *Wikipedia - Aquaporine*. en.
- [14] Gerald LITWACK. “Chapter 12 - Hormonal Regulation of Epithelial Sodium Channel (ENaC) and Other Nonneuronal Epithelial Ion Channels”. en. In : *Hormonal Signaling in Biology and Medicine*. Sous la dir. de Gerald LITWACK. Academic Press, jan. 2020, p. 283–309. ISBN : 978-0-12-813814-4.
- [15] Rebecca E. DAY et al. “Human aquaporins : Regulators of transcellular water flow”. en. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Aquaporins 1840.5 (mai 2014), p. 1492–1506. ISSN : 0304-4165.
- [16] Peter AGRE. “The Aquaporin Water Channels”. In : *Proc Am Thorac Soc* 3.1 (mar. 2006), p. 5–13. ISSN : 1546-3222.
- [17] J. S. D’ARRIGO. “Screening of membrane surface charges by divalent cations : an atomic representation”. eng. In : *Am J Physiol* 235.3 (sept. 1978), p. C109–117. ISSN : 0002-9513.
- [18] Emmanuel JASPARD. *Porines et aquaporines - <http://biochimie.j.univ-angers.fr> - Droits réservés.*
- [19] Simon GRAVELLE et al. “Optimizing water permeability through the hourglass shape of aquaporins”. en. In : *PNAS* 110.41 (oct. 2013). Publisher : National Academy of Sciences Section : Physical Sciences, p. 16367–16372. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [20] Bert L. de GROOT et Helmut GRUBMÜLLER. “Water Permeation Across Biological Membranes : Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF”. en. In : *Science* 294.5550 (déc. 2001). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report, p. 2353–2357. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.

- [21] Binghua WU et al. “Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel”. In : *The EMBO Journal* 28.15 (août 2009). Publisher : John Wiley & Sons, Ltd, p. 2188–2194. ISSN : 0261-4189.
- [22] Hanning CHEN, Yujie WU et Gregory A. VOTH. “Origins of Proton Transport Behavior from Selectivity Domain Mutations of the Aquaporin-1 Channel”. In : *Biophys J* 90.10 (mai 2006), p. L73–L75. ISSN : 0006-3495.
- [23] Romina OLIVA et al. “Electrostatics of aquaporin and aquaglyceroporin channels correlates with their transport selectivity”. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.9 (mar. 2010), p. 4135–4140. ISSN : 0027-8424.
- [24] Wolfgang BUSCH et Milton H. SAIER. “The transporter classification (TC) system, 2002”. eng. In : *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37.5 (2002), p. 287–337. ISSN : 1040-9238.
- [25] Harvey LODISH et al. “Transport across Cell Membranes”. en. In : *Molecular Cell Biology. 4th edition* (2000). Publisher : W. H. Freeman.
- [26] Emmanuel JASPARD. *Transport actif - <http://biochimej.univ-angers.fr> - Droits réservés.*
- [27] Shinichiro SHOJI, Sarah E. WALKER et Kurt FREDRICK. “Ribosomal Translocation : One Step Closer to the Molecular Mechanism”. In : *ACS Chem Biol* 4.2 (fév. 2009), p. 93–107. ISSN : 1554-8929.
- [28] “Classification and nomenclature of enzymes”. In : *Enzyme Nomenclature*. San Diego : Academic Press, 1992, p. 5–22. ISBN : 978-0-12-227164-9.
- [29] Michael V. CLAUSEN, Florian HILBERS et Hanne POULSEN. “The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease”. English. In : *Front. Physiol.* 8 (2017). Publisher : Frontiers. ISSN : 1664-042X.
- [30] Yasaman PIRAHANCHI, Rishita JESSU et Narothama R. AEDDULA. “Physiology, Sodium Potassium Pump”. eng. In : *StatPearls*. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2021.
- [31] Joanne S. ING WALL et James A. BALSCHI. “Energetics of the Na⁺ Pump in the Heart”. en. In : *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 17.s1 (2006). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1540-8167.2006.00397.x>, S127–S133. ISSN : 1540-8167.
- [32] Søren Brandt POULSEN, Robert A. FENTON et Timo RIEG. “Sodium-glucose cotransport”. In : *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24.5 (sept. 2015), p. 463–469. ISSN : 1062-4821.
- [33] Mariana RUIZ VILLARREAL. *sodium-potassium pump*. fr. Page Version ID : 161079282. Juil. 2019.
- [34] E. TURK, M. G. MARTÍN et E. M. WRIGHT. “Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1”. eng. In : *J Biol Chem* 269.21 (mai 1994), p. 15204–15209. ISSN : 0021-9258.
- [35] E. M. WRIGHT. “Renal Na(+)-glucose cotransporters”. eng. In : *Am J Physiol Renal Physiol* 280.1 (jan. 2001), F10–18. ISSN : 1931-857X.
- [36] *Le transport actif (leçon)*. fr. Library Catalog : fr.khanacademy.org.
- [37] George A. ORDWAY et Daniel J. GARRY. “Myoglobin : an essential hemoprotein in striated muscle”. In : *Journal of Experimental Biology* 207.20 (sept. 2004), p. 3441–3446. ISSN : 0022-0949.
- [38] G. I. MAKHATADZE et P. L. PRIVALOV. “Energetics of protein structure”. eng. In : *Adv Protein Chem* 47 (1995), p. 307–425. ISSN : 0065-3233.
- [39] Gennady P. MANCHENKO. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. eng. Boca Raton, Fla. : CRC Press, 1994. ISBN : 978-0-8493-8935-1.
- [40] Marian SMOLUCHOWSKI. “Experimentell nachweisbare, der üblichen Thermodynamik widersprechende Molekularphänomene”. deu. In : *Pisma Mariana Smoluchowskiego* 2.1 (1927), p. 226–251.
- [41] Congrès international de PHYSIQUE et Société française de PHYSIQUE. *Rapports présentés au Congrès international de physique réuni à Paris en 1900 sous les auspices de la Société française de physique*. français. Sous la dir. de Lucien POINCARÉ et Charles-Édouard GUILLAUME. Paris, France : Gauthier-Villars, 1900.
- [42] Richard P. FEYNMAN, Robert B. LEIGHTON et Matthew SANDS. *The Feynman Lectures on Physics, Vol. I : The New Millennium Edition : Mainly Mechanics, Radiation, and Heat*. Anglais. New York : Basic Books, oct. 2011. ISBN : 978-0-465-02493-3.
- [43] DMGUALTIERI. *English : Diagram of a Brownian ratchet, also known as a Feynman-Smoluchowski ratchet*. Oct. 2018.
- [44] J.M.R. PARRONDO et B.J. de CISNEROS. “Energetics of Brownian motors : a review”. en. In : *Appl Phys A* 75.2 (août 2002), p. 179–191. ISSN : 1432-0630.
- [45] Eva ZIMMERMANN et Udo SEIFERT. “Efficiencies of a molecular motor : a generic hybrid model applied to the F1-ATPase”. en. In : *New J. Phys.* 14.10 (oct. 2012). Publisher : IOP Publishing, p. 103023. ISSN : 1367-2630.
- [46] Chun-Biu LI et Shoichi TOYABE. “Efficiencies of molecular motors : a comprehensible overview”. In : *Biophys Rev* 12.2 (mar. 2020), p. 419–423. ISSN : 1867-2450.
- [47] Juan M. R. PARRONDO et Pep ESPAÑOL. “Criticism of Feynman’s analysis of the ratchet as an engine”. In : *American Journal of Physics* 64.9 (sept. 1996). Publisher : American Association of Physics Teachers, p. 1125–1130. ISSN : 0002-9505.
- [48] Marcelo O. MAGNASCO. “Forced thermal ratchets”. In : *Phys. Rev. Lett.* 71.10 (sept. 1993). Publisher : American Physical Society, p. 1477–1481.

- [49] D. ABBOTT et G. P. HARMER. "Parrondo's paradox". In : *Statistical Science* 14.2 (mai 1999). Publisher : Institute of Mathematical Statistics, p. 206–213. ISSN : 0883-4237, 2168-8745.
- [50] Derek ABBOTT, Bruce R. DAVIS et Juan M. R. PARRONDO. "The problem of detailed balance for the Feynman-Smoluchowski Engine (FSE) and the Multiple Pawl Paradox". In : *AIP Conference Proceedings* 511.1 (mar. 2000). Publisher : American Institute of Physics, p. 213–218. ISSN : 0094-243X.
- [51] A AJDARI et J PROST. "Drift induced by a spatially periodic potential of low symmetry-pulsed dielectrophoresis". In : *Comptes rendus de l'academie des sciences serie II* 315.13 (1992), p. 1635–1639.
- [52] Frank JÜLICHER, Armand AJDARI et Jacques PROST. "Modeling molecular motors". In : *Rev. Mod. Phys.* 69.4 (oct. 1997). Publisher : American Physical Society, p. 1269–1282.
- [53] R. Dean ASTUMIAN et Imre DERÉNYI. "A Chemically Reversible Brownian Motor : Application to Kinesin and Ncd". en. In : *Biophysical Journal* 77.2 (août 1999), p. 993–1002. ISSN : 0006-3495.
- [54] Rachid AIT-HADDOU et Walter HERZOG. "Brownian ratchet models of molecular motors". eng. In : *Cell Biochem Biophys* 38.2 (2003), p. 191–214. ISSN : 1085-9195.
- [55] Vincent A. A. JANSEN et Jin YOSHIMURA. "Populations can persist in an environment consisting of sink habitats only". In : *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.7 (mar. 1998), p. 3696–3698. ISSN : 0027-8424.
- [56] Michael J. STUTZER. *The Paradox of Diversification*. en. SSRN Scholarly Paper ID 1567126. Rochester, NY : Social Science Research Network, juin 2009.
- [57] Gregory P. HARMER et Derek ABBOTT. "A review of parrondo's paradox". In : *Fluct. Noise Lett.* 02.02 (juin 2002). Publisher : World Scientific Publishing Co., R71–R107. ISSN : 0219-4775.
- [58] Joel Weijia LAI et Kang Hao CHEONG. "Parrondo's paradox from classical to quantum : A review". en. In : *Nonlinear Dyn* 100.1 (mar. 2020), p. 849–861. ISSN : 1573-269X.
- [59] S M SIMON, C S PESKIN et G F OSTER. "What drives the translocation of proteins?" In : *Proc Natl Acad Sci U S A* 89.9 (mai 1992), p. 3770–3774. ISSN : 0027-8424.
- [60] C S PESKIN, G M ODELL et G F OSTER. "Cellular motions and thermal fluctuations : the Brownian ratchet." In : *Biophys J* 65.1 (juil. 1993), p. 316–324. ISSN : 0006-3495.
- [61] C M FELDHERR, E KALLENBACH et N SCHULTZ. "Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes." In : *Journal of Cell Biology* 99.6 (déc. 1984), p. 2216–2222. ISSN : 0021-9525.
- [62] Newmeyer DD, Finlay DR et Forbes DJ. "In vitro transport of a fluorescent nuclear protein and exclusion of non-nuclear proteins." English. In : *J Cell Biol* 103.6 Pt 1 (déc. 1986), p. 2091–2102. ISSN : 0021-9525, 1540-8140.
- [63] L W JIANG et M SCHINDLER. "Chemical factors that influence nucleocytoplasmic transport : a fluorescence photobleaching study." In : *Journal of Cell Biology* 102.3 (mar. 1986), p. 853–858. ISSN : 0021-9525.
- [64] S. M. SIMON et G. BLOBEL. "A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum". eng. In : *Cell* 65.3 (mai 1991), p. 371–380. ISSN : 0092-8674.
- [65] Pierre-Gilles GENNES. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Anglais. Ithaca, N.Y : Cornell University Press, nov. 1979. ISBN : 978-0-8014-1203-5.
- [66] M. E. YOUNG, P. A. CARROAD et R. L. BELL. "Estimation of diffusion coefficients of proteins". en. In : *Biotechnology and Bioengineering* 22.5 (1980). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.260220504>, p. 947–955. ISSN : 1097-0290.
- [67] P. KRAPIVSKY et K. MALLICK. "Fluctuations in polymer translocation". In : (2010).
- [68] Kay STUBENRAUCH et al. "Characterization of murine anti-human Fab antibodies for use in an immunoassay for generic quantification of human Fab fragments in non-human serum samples including cynomolgus monkey samples". eng. In : *J Pharm Biomed Anal* 72 (jan. 2013), p. 208–215. ISSN : 1873-264X.
- [69] J. P. LANDRY et al. "Measuring Affinity Constants of 1,450 Monoclonal Antibodies to Peptide Targets with a Microarray-based Label-Free Assay Platform". In : *J Immunol Methods* 417 (fév. 2015), p. 86–96. ISSN : 0022-1759.
- [70] Ashutosh CHILKOTI et Patrick S. STAYTON. "Molecular Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics". In : *J. Am. Chem. Soc.* 117.43 (nov. 1995). Publisher : American Chemical Society, p. 10622–10628. ISSN : 0002-7863.
- [71] A. V. SLITA et al. "DNA-polycation complexes : effect of polycation structure on physico-chemical and biological properties". eng. In : *J Biotechnol* 127.4 (jan. 2007), p. 679–693. ISSN : 0168-1656.
- [72] Sirirat CHOOSAKOONKRIANG et al. "Biophysical characterization of PEI/DNA complexes". eng. In : *J Pharm Sci* 92.8 (août 2003), p. 1710–1722. ISSN : 0022-3549.
- [73] Christopher M. WARD et al. "Modification of pLL/DNA complexes with a multivalent hydrophilic polymer permits folate-mediated targeting in vitro and prolonged plasma circulation in vivo". eng. In : *J Gene Med* 4.5 (oct. 2002), p. 536–547. ISSN : 1099-498X.
- [74] Matthias MANN et Ole N. JENSEN. "Proteomic analysis of post-translational modifications". en. In : *Nature Biotechnology* 21.3 (mar. 2003). Number : 3 Publisher : Nature Publishing Group, p. 255–261. ISSN : 1546-1696.

- [75] Sana QAUSAIN et al. “Chapter 3 - Phosphorylation and Acetylation of Proteins as Posttranslational Modification : Implications in Human Health and Associated Diseases”. en. In : *Protein Modificomics*. Sous la dir. de Tanveer Ali DAR et Laishram Rajendrakumar SINGH. Academic Press, jan. 2019, p. 69–86. ISBN : 978-0-12-811913-6.
- [76] Lars ELLGAARD et al. “Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER”. eng. In : *Traffic* 17.6 (juin 2016), p. 615–638. ISSN : 1600-0854.
- [77] Katja KAPP et al. *Post-Targeting Functions of Signal Peptides*. en. Publication Title : Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience, 2013.
- [78] David J.F. DU PLESSIS, Nico NOUWEN et Arnold J.M. DRIESSEN. “The Sec translocase”. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808.3 (2011). Including the Special Section : Protein translocation across or insertion into membranes, p. 851–865. ISSN : 0005-2736.
- [79] William WICKNER et Randy SCHEKMAN. “Protein Translocation Across Biological Membranes”. en. In : *Science* 310.5753 (déc. 2005). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Special Reviews, p. 1452–1456. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [80] Andrew R. OSBORNE, Tom A. RAPOPORT et Bert van den BERG. “PROTEIN TRANSLOCATION BY THE SEC61/SECY CHANNEL”. In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21.1 (2005). PMID : 16212506, p. 529–550. eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133214>.
- [81] Tom A. RAPOPORT. “Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes”. en. In : *Nature* 450.7170 (nov. 2007). Number : 7170 Publisher : Nature Publishing Group, p. 663–669. ISSN : 1476-4687.
- [82] Max GEMMER et Friedrich FÖRSTER. “A clearer picture of the ER translocon complex”. In : *Journal of Cell Science* 133.3 (2020). ISSN : 0021-9533. eprint : <https://jcs.biologists.org/content/133/3/jcs231340.full.pdf>.
- [83] A. A. KOSSIAKOFF. “Protein dynamics investigated by neutron diffraction”. eng. In : *Methods Enzymol* 131 (1986), p. 433–447. ISSN : 0076-6879.
- [84] Katherine HENZLER-WILDMAN et Dorothee KERN. “Dynamic personalities of proteins”. en. In : *Nature* 450.7172 (déc. 2007). Number : 7172 Publisher : Nature Publishing Group, p. 964–972. ISSN : 1476-4687.
- [85] Lee MAKOWSKI et al. “Molecular Crowding Inhibits Intramolecular Breathing Motions in Proteins”. In : *J Mol Biol* 375.2 (jan. 2008), p. 529–546. ISSN : 0022-2836.
- [86] Walter NEUPERT et Michael BRUNNER. “The protein import motor of mitochondria”. eng. In : *Nat Rev Mol Cell Biol* 3.8 (août 2002), p. 555–565. ISSN : 1471-0072.
- [87] Nils WIEDEMANN et Nikolaus PFANNER. “Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly”. In : *Annual Review of Biochemistry* 86.1 (2017). _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352>, p. 685–714.
- [88] Sylvie CALLEGARI, Luis Daniel CRUZ-ZARAGOZA et Peter REHLING. “From TOM to the TIM23 complex – handing over of a precursor”. en. In : *Biological Chemistry* 401.6-7 (mai 2020). Publisher : De Gruyter Section : Biological Chemistry, p. 709–721. ISSN : 1437-4315.
- [89] Lynn G. L. RICHARDSON, Rajneesh SINGHAL et Danny J. SCHNELL. “The integration of chloroplast protein targeting with plant developmental and stress responses”. eng. In : *BMC Biol* 15.1 (déc. 2017), p. 118. ISSN : 1741-7007.
- [90] Masato NAKAI. “New Perspectives on Chloroplast Protein Import”. In : *Plant and Cell Physiology* 59.6 (juin 2018), p. 1111–1119. ISSN : 0032-0781.
- [91] Simon M. THOMSON, Pablo PULIDO et R. Paul JARVIS. “Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system”. In : *Biochemical Society Transactions* 48.1 (jan. 2020), p. 71–82. ISSN : 0300-5127.
- [92] J. P. VOGEL, L. M. MISRA et M. D. ROSE. “Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast”. eng. In : *J Cell Biol* 110.6 (juin 1990), p. 1885–1895. ISSN : 0021-9525.
- [93] Bernd BUKAU et Arthur L HORWICH. “The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines”. In : *Cell* 92.3 (1998), p. 351–366. ISSN : 0092-8674.
- [94] Matthias P. MAYER et Lila M. GIERASCH. “Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones”. In : *Journal of Biological Chemistry* 294.6 (2019), p. 2085–2097. ISSN : 0021-9258.
- [95] H. C. SCHNEIDER et al. “Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import”. eng. In : *Nature* 371.6500 (oct. 1994), p. 768–774. ISSN : 0028-0836.
- [96] David WHITLEY, Steven P. GOLDBERG et William D. JORDAN. “Heat shock proteins : A review of the molecular chaperones”. In : *Journal of Vascular Surgery* 29.4 (1999), p. 748–751. ISSN : 0741-5214.
- [97] Rina ROSENZWEIG et al. “The Hsp70 chaperone network”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20.11 (nov. 2019). Number : 11 Publisher : Nature Publishing Group, p. 665–680. ISSN : 1471-0080.
- [98] Anush BAKUNTS et al. “Ratiometric sensing of BiP-client versus BiP levels by the unfolded protein response determines its signaling amplitude”. In : *eLife* 6 (déc. 2017). Sous la dir. de Davis NG. Publisher : eLife Sciences Publications, Ltd, e27518. ISSN : 2050-084X.
- [99] P. N. DATSKEVICH et al. “Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases”. eng. In : *Biochemistry (Moscow)* 77.13 (déc. 2012), p. 1500–1514. ISSN : 1608-3040.

- [100] Carles VILARIÑO-GÜELL et al. “DNAJC13 mutations in Parkinson disease”. In : *Human Molecular Genetics* 23.7 (nov. 2013), p. 1794–1801. ISSN : 0964-6906.
- [101] Wolfram LIEBERMEISTER et al. “Visual account of protein investment in cellular functions”. en. In : *PNAS* 111.23 (juin 2014). ISBN : 9781314810110 Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 8488–8493. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [102] M. P. MAYER et B. BUKAU. “Hsp70 chaperones : Cellular functions and molecular mechanism”. In : *Cell Mol Life Sci* 62.6 (mar. 2005), p. 670–684. ISSN : 1420-682X.
- [103] Adrien NICOLAÏ et al. “Human Inducible Hsp70 : Structures, Dynamics, and Interdomain Communication from All-Atom Molecular Dynamics Simulations”. In : *Journal of Chemical Theory and Computation* 6 (mai 2010).
- [104] L. SHI, M. KATAOKA et A. L. FINK. “Conformational characterization of DnaK and its complexes by small-angle X-ray scattering”. eng. In : *Biochemistry* 35.10 (mar. 1996), p. 3297–3308. ISSN : 0006-2960.
- [105] Scott J. HUGHES et al. “Probing the ATP Site of GRP78 with Nucleotide Triphosphate Analogs”. en. In : *PLOS ONE* 11.5 (mai 2016). Publisher : Public Library of Science, e0154862. ISSN : 1932-6203.
- [106] Nathalie CASANOVA-MORALES et al. “Mechanical properties of BiP protein determined by nano-rheology”. In : *Protein Sci* 27.8 (août 2018), p. 1418–1426. ISSN : 0961-8368.
- [107] Moritz MARCINOWSKI et al. “Conformational selection in substrate recognition by Hsp70 chaperones”. eng. In : *J Mol Biol* 425.3 (fév. 2013), p. 466–474. ISSN : 1089-8638.
- [108] P. KASPER, P. CHRISTEN et H. GEHRING. “Empirical calculation of the relative free energies of peptide binding to the molecular chaperone DnaK”. eng. In : *Proteins* 40.2 (août 2000), p. 185–192. ISSN : 0887-3585.
- [109] Roman KITYK et al. “Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones”. en. In : *Nature Communications* 6.1 (sept. 2015). Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 1–11. ISSN : 2041-1723.
- [110] R. RUSSELL et al. “DnaJ dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK : insight into targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates”. eng. In : *Biochemistry* 38.13 (mar. 1999), p. 4165–4176. ISSN : 0006-2960.
- [111] Dianne S. SCHWARZ et Michael D. BLOWER. “The endoplasmic reticulum : structure, function and response to cellular signaling”. In : *Cell Mol Life Sci* 73 (2016), p. 79–94. ISSN : 1420-682X.
- [112] B. D. HAMMAN et al. “The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane”. eng. In : *Cell* 89.4 (mai 1997), p. 535–544. ISSN : 0092-8674.
- [113] Xudong WU, Cerrone CABANOS et Tom A. RAPOPORT. “Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane”. en. In : *Nature* 566.7742 (fév. 2019). Number : 7742 Publisher : Nature Publishing Group, p. 136–139. ISSN : 1476-4687.
- [114] Roland BECKMANN et al. “Alignment of Conduits for the Nascent Polypeptide Chain in the Ribosome-Sec61 Complex”. In : *Science* 278.5346 (1997), p. 2123–2126. ISSN : 0036-8075. eprint : <https://science.sciencemag.org/content/278/5346/2123.full.pdf>.
- [115] K. HATSUZAWA, M. TAGAYA et S. MIZUSHIMA. “The hydrophobic region of signal peptides is a determinant for SRP recognition and protein translocation across the ER membrane”. eng. In : *J Biochem* 121.2 (fév. 1997), p. 270–277. ISSN : 0021-924X.
- [116] Iwona BUSKIEWICZ et al. “Domain rearrangement of SRP protein Ffh upon binding 4.5S RNA and the SRP receptor FtsY”. eng. In : *RNA* 11.6 (juin 2005), p. 947–957. ISSN : 1355-8382.
- [117] Jin-Der WEN et al. “Following translation by single ribosomes one codon at a time”. In : *Nature* 452.7187 (avr. 2008), p. 598–603. ISSN : 0028-0836.
- [118] Deepak Kumar SINHA, U. S. BHALLA et G. V. SHIVASHANKAR. “Kinetic measurement of ribosome motor stalling force”. In : *Appl. Phys. Lett.* 85.20 (nov. 2004). Publisher : American Institute of Physics, p. 4789–4791. ISSN : 0003-6951.
- [119] Ashok GARAI et al. “Stochastic kinetics of ribosomes : Single motor properties and collective behavior”. In : *Phys. Rev. E* 80.1 (juil. 2009). Publisher : American Physical Society, p. 011908.
- [120] Clarence LING et Dmitri N. ERMOLENKO. “Structural insights into ribosome translocation”. In : *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7.5 (2016), p. 620–636. ISSN : 1757-7004.
- [121] Kevin S. WILSON et Harry F. NOLLER. “Mapping the Position of Translational Elongation Factor EF-G in the Ribosome by Directed Hydroxyl Radical Probing”. English. In : *Cell* 92.1 (jan. 1998). Publisher : Elsevier, p. 131–139. ISSN : 0092-8674, 1097-4172.
- [122] S. SCHILLING-BARTETZKO, A. BARTETZKO et K. H. NIERHAUS. “Kinetic and thermodynamic parameters for tRNA binding to the ribosome and for the translocation reaction”. eng. In : *J Biol Chem* 267.7 (mar. 1992), p. 4703–4712. ISSN : 0021-9258.
- [123] R. J. DESHAIES et al. “Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex”. eng. In : *Nature* 349.6312 (fév. 1991), p. 806–808. ISSN : 0028-0836.
- [124] Steffen PANZNER et al. “Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p”. In : *Cell* 81.4 (1995), p. 561–570. ISSN : 0092-8674.

- [125] Timothy C. ELSTON. “The Brownian Ratchet and Power Stroke Models for Posttranslational Protein Translocation into the Endoplasmic Reticulum”. en. In : *Biophysical Journal* 82.3 (mar. 2002), p. 1239–1253. ISSN : 0006-3495.
- [126] Kent E. S. MATLACK et al. “BiP Acts as a Molecular Ratchet during Posttranslational Transport of Prepro- α Factor across the ER Membrane”. English. In : *Cell* 97.5 (mai 1999). Publisher : Elsevier, p. 553–564. ISSN : 0092-8674, 1097-4172.
- [127] M. G. WATERS, E. A. EVANS et G. BLOBEL. “Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence.” English. In : *Journal of Biological Chemistry* 263.13 (mai 1988). Publisher : Elsevier, p. 6209–6214. ISSN : 0021-9258, 1083-351X.
- [128] Harvey LODISH et al. “Hierarchical Structure of Proteins”. en. In : *Molecular Cell Biology. 4th edition* (2000). Publisher : W. H. Freeman.
- [129] B. D. EDITORS. *tRNA*. en-US. Library Catalog : biologydictionary.net. Nov. 2016.
- [130] E MEYHÖFER et J HOWARD. “The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load.” In : *Proc Natl Acad Sci U S A* 92.2 (jan. 1995), p. 574–578. ISSN : 0027-8424.
- [131] Ron Milo & Ron PHILIPS. » *What is the entropy cost when two molecules form a complex?* en. Library Catalog : book.bionumbers.org.
- [132] Ron Milo & Ron PHILIPS. » *How fast do molecular motors move on cytoskeletal filaments?* en. Library Catalog : book.bionumbers.org.
- [133] W. LIEBERMEISTER, T. A. RAPOPORT et R. HEINRICH. “Ratcheting in post-translational protein translocation : a mathematical model”. eng. In : *J Mol Biol* 305.3 (jan. 2001), p. 643–656. ISSN : 0022-2836.
- [134] Jodi NUNNARI et Anu SUOMALAINEN. “Mitochondria : In Sickness and in Health”. In : *Cell* 148.6 (mar. 2012), p. 1145–1159. ISSN : 0092-8674.
- [135] Jonathan R. FRIEDMAN et Jodi NUNNARI. “Mitochondrial form and function”. In : *Nature* 505.7483 (jan. 2014), p. 335–343. ISSN : 0028-0836.
- [136] Donald D. NEWMAYER et Shelagh FERGUSON-MILLER. “Mitochondria : Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death”. English. In : *Cell* 112.4 (fév. 2003). Publisher : Elsevier, p. 481–490. ISSN : 0092-8674, 1097-4172.
- [137] Heidi M. MCBRIDE, Margaret NEUSPIEL et Sylwia WASIAK. “Mitochondria : More Than Just a Powerhouse”. In : *Current Biology* 16.14 (2006), R551–R560. ISSN : 0960-9822.
- [138] Florian J. BOCK et Stephen W. G. TAIT. “Mitochondria as multifaceted regulators of cell death”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21.2 (fév. 2020). Number : 2 Publisher : Nature Publishing Group, p. 85–100. ISSN : 1471-0080.
- [139] Gráinne S. GORMAN et al. “Mitochondrial diseases”. en. In : *Nature Reviews Disease Primers* 2.1 (oct. 2016). Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 1–22. ISSN : 2056-676X.
- [140] Joyeeta RAHMAN et Shamima RAHMAN. “Mitochondrial medicine in the omics era”. eng. In : *Lancet* 391.10139 (juin 2018), p. 2560–2574. ISSN : 1474-547X.
- [141] Lyndsey CRAVEN et al. “Recent Advances in Mitochondrial Disease”. In : *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 18.1 (2017). PMID : 28415858, p. 257–275. eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035426>.
- [142] Michael W. GRAY. “Mitochondrial Evolution”. In : *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.9 (sept. 2012). ISSN : 1943-0264.
- [143] Andrew J. ROGER, Sergio A. MUÑOZ-GÓMEZ et Ryoma KAMIKAWA. “The Origin and Diversification of Mitochondria”. In : *Current Biology* 27.21 (2017), R1177–R1192. ISSN : 0960-9822.
- [144] Otto G. BERG et C. G. KURLAND. “Why Mitochondrial Genes are Most Often Found in Nuclei”. In : *Molecular Biology and Evolution* 17.6 (juin 2000), p. 951–961. ISSN : 0737-4038.
- [145] S. A. PASCHEN et W. NEUPERT. “Protein import into mitochondria”. eng. In : *IUBMB Life* 52.3-5 (nov. 2001), p. 101–112. ISSN : 1521-6543.
- [146] C. M. KOEHLER et al. “Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space”. eng. In : *Science* 279.5349 (jan. 1998), p. 369–373. ISSN : 0036-8075.
- [147] Agnieszka CHACINSKA et al. “Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins”. eng. In : *EMBO J* 23.19 (oct. 2004), p. 3735–3746. ISSN : 0261-4189.
- [148] F.-Nora VÖGTLE et al. “Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability”. English. In : *Cell* 139.2 (oct. 2009). Publisher : Elsevier, p. 428–439. ISSN : 0092-8674, 1097-4172.
- [149] D ROISE et al. “A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers.” In : *EMBO J* 5.6 (juin 1986), p. 1327–1334. ISSN : 0261-4189.
- [150] K. P. KÜNKELE et al. “The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria”. eng. In : *Cell* 93.6 (juin 1998), p. 1009–1019. ISSN : 0092-8674.

- [151] Concepción MURO et al. “Comparison of the TIM and TOM Channel Activities of the Mitochondrial Protein Import Complexes”. en. In : *Biophysical Journal* 84.5 (mai 2003), p. 2981–2989. ISSN : 0006-3495.
- [152] David G. NICHOLLS et al. “Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity : mortality and millivolts”. English. In : *Trends in Neurosciences* 23.4 (avr. 2000). Publisher : Elsevier, p. 166–174. ISSN : 0166-2236, 1878-108X.
- [153] P. R. DORES-SILVA et al. “Structural and stability studies of the human mtHsp70-escort protein 1 : An essential mortalin co-chaperone”. en. In : *International Journal of Biological Macromolecules* 56 (mai 2013), p. 140–148. ISSN : 0141-8130.
- [154] Benjamin S GLICK. “Can Hsp70 proteins act as force-generating motors?” en. In : *Cell* 80.1 (jan. 1995), p. 11–14. ISSN : 0092-8674.
- [155] James A. SPUDICH. “How molecular motors work”. en. In : *Nature* 372.6506 (déc. 1994). Number : 6506 Publisher : Nature Publishing Group, p. 515–518. ISSN : 1476-4687.
- [156] Paolo De Los RIOS et al. “Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling”. en. In : *PNAS* 103.16 (avr. 2006). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 6166–6171. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [157] Guillaume STIRNEMANN et al. “Elasticity, structure, and relaxation of extended proteins under force”. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* 110.10 (mar. 2013), p. 3847–3852. ISSN : 0027-8424.
- [158] Paul JARVIS et Enrique LÓPEZ-JUEZ. “Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14.12 (déc. 2013). Number : 12 Publisher : Nature Publishing Group, p. 787–802. ISSN : 1471-0080.
- [159] Chitose KAMI et al. “Light-regulated plant growth and development”. eng. In : *Curr Top Dev Biol* 91 (2010), p. 29–66. ISSN : 1557-8933.
- [160] Jeremy N. TIMMIS et al. “Endosymbiotic gene transfer : organelle genomes forge eukaryotic chromosomes”. en. In : *Nature Reviews Genetics* 5.2 (fév. 2004). Number : 2 Publisher : Nature Publishing Group, p. 123–135. ISSN : 1471-0064.
- [161] Geoffrey I. MCFADDEN. “Origin and Evolution of Plastids and Photosynthesis in Eukaryotes”. en. In : *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.4 (jan. 2014). Company : Cold Spring Harbor Laboratory Press Distributor : Cold Spring Harbor Laboratory Press Institution : Cold Spring Harbor Laboratory Press Label : Cold Spring Harbor Laboratory Press Publisher : Cold Spring Harbor Lab, a016105. ISSN : , 1943-0264.
- [162] H. L. RACE, R. G. HERRMANN et W. MARTIN. “Why have organelles retained genomes?” eng. In : *Trends Genet* 15.9 (sept. 1999), p. 364–370. ISSN : 0168-9525.
- [163] Ursula FLORES-PÉREZ et Paul JARVIS. “Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import”. en. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Protein Import and Quality Control in Mitochondria and Plastids 1833.2 (fév. 2013), p. 332–340. ISSN : 0167-4889.
- [164] Yamuna D. PAULA, Lynn G. L. RICHARDSON et Danny J. SCHNELL. “New Insights into the Mechanism of Chloroplast Protein Import and Its Integration with Protein Quality Control, Organelle Biogenesis and Development”. en. In : *Journal of Molecular Biology*. Elucidation of Protein Translocation Pathways (Part I) 427.5 (mar. 2015), p. 1038–1060. ISSN : 0022-2836.
- [165] Iniyan GANESAN et al. “Evaluating the Functional Pore Size of Chloroplast TOC and TIC Protein Translocons : Import of Folded Proteins”. en. In : *The Plant Cell* 30.9 (sept. 2018). Publisher : American Society of Plant Biologists Section : Research Article, p. 2161–2173. ISSN : 1040-4651, 1532-298X.
- [166] Patrick K. O’NEIL et al. “The POTRA domains of Toc75 exhibit chaperone-like function to facilitate import into chloroplasts”. en. In : *PNAS* 114.24 (juin 2017). Publisher : National Academy of Sciences Section : PNAS Plus, E4868–E4876. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [167] Stephanie GLASER et al. “Tic22 Is an Essential Chaperone Required for Protein Import into the Apicoplast*,” en. In : *Journal of Biological Chemistry* 287.47 (nov. 2012), p. 39505–39512. ISSN : 0021-9258.
- [168] Yih-Lin CHEN et al. “TIC236 links the outer and inner membrane translocons of the chloroplast”. en. In : *Nature* 564.7734 (déc. 2018). Number : 7734 Publisher : Nature Publishing Group, p. 125–129. ISSN : 1476-4687.
- [169] Raphael TRÖSCH et Paul JARVIS. “The Stromal Processing Peptidase of Chloroplasts is Essential in Arabidopsis, with Knockout Mutations Causing Embryo Arrest after the 16-Cell Stage”. In : *PLOS ONE* 6.8 (août 2011), p. 1–9.
- [170] Shingo KIKUCHI et al. “Uncovering the Protein Translocon at the Chloroplast Inner Envelope Membrane”. en. In : *Science* 339.6119 (fév. 2013). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report, p. 571–574. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [171] Shingo KIKUCHI et al. “A Ycf2-FtsHi Heteromeric AAA-ATPase Complex Is Required for Chloroplast Protein Import”. In : *The Plant Cell* 30.11 (nov. 2018), p. 2677–2703. ISSN : 1040-4651.
- [172] Inês CHEN, Peter J. CHRISTIE et David DUBNAU. “The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria”. In : *Science* 310.5753 (déc. 2005), p. 1456–1460. ISSN : 0036-8075.
- [173] Shannon M. SOUCY, Jinling HUANG et Johann Peter GOGARTEN. “Horizontal gene transfer : building the web of life”. en. In : *Nature Reviews Genetics* 16.8 (août 2015). Number : 8 Publisher : Nature Publishing Group, p. 472–482. ISSN : 1471-0064.

- [174] Melissa EMAMALIPOUR et al. "Horizontal Gene Transfer : From Evolutionary Flexibility to Disease Progression". English. In : *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020). Publisher : Frontiers. ISSN : 2296-634X.
- [175] Kevin J. FORSBERG et al. "The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens". In : *Science* 337.6098 (août 2012), p. 1107–1111. ISSN : 0036-8075.
- [176] Christian J. H. von WINTERSDORFF et al. "Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer". In : *Frontiers in Microbiology* 7 (2016), p. 173. ISSN : 1664-302X.
- [177] Randall K. HOLMES et Michael G. JOBLING. "Genetics". eng. In : *Medical Microbiology*. Sous la dir. de Samuel BARON. 4th. Galveston (TX) : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN : 978-0-9631172-1-2.
- [178] Elena CABEZÓN et al. "Towards an integrated model of bacterial conjugation". In : *FEMS Microbiology Reviews* 39.1 (jan. 2015), p. 81–95. ISSN : 0168-6445.
- [179] N. FIRTH, K. IPPEH-IHLER et R. A. SKURRAY. "Gene Transfer : Conjugation Structure and Function of the F Factor and Mechanism of Conjugation". In : 1999.
- [180] Margaret CLARKE et al. "F-pili dynamics by live-cell imaging". en. In : *PNAS* 105.46 (nov. 2008). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 17978–17981. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [181] Tiago R.D. COSTA et al. "Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex". In : *Cell* 166.6 (sept. 2016), 1436–1444.e10. ISSN : 0092-8674.
- [182] Joyce J. W. WONG, Jun LU et J. N. Mark GLOVER. "Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids - a structural biology perspective". eng. In : *Mol Microbiol* 85.4 (août 2012), p. 602–617. ISSN : 1365-2958.
- [183] Anthony JF GRIFFITHS et al. "Transduction". en. In : *An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition* (2000). Publisher : W. H. Freeman.
- [184] Calum JOHNSTON et al. "Bacterial transformation : distribution, shared mechanisms and divergent control". en. In : *Nature Reviews Microbiology* 12.3 (mar. 2014). Number : 3 Publisher : Nature Publishing Group, p. 181–196. ISSN : 1740-1534.
- [185] Dongchang SUN. "Pull in and Push Out : Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria". eng. In : *Front Microbiol* 9 (2018), p. 2154. ISSN : 1664-302X.
- [186] David DUBNAU et Melanie BLOKESCH. "Mechanisms of DNA Uptake by Naturally Competent Bacteria". eng. In : *Annu Rev Genet* 53 (déc. 2019), p. 217–237. ISSN : 1545-2948.
- [187] Manuela K. HOSPENTHAL, Tiago R. D. COSTA et Gabriel WAKSMAN. "A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria". en. In : *Nature Reviews Microbiology* 15.6 (juin 2017). Number : 6 Publisher : Nature Publishing Group, p. 365–379. ISSN : 1740-1534.
- [188] Lisa CRAIG, Katrina T. FOREST et Berenike MAIER. "Type IV pili : dynamics, biophysics and functional consequences". en. In : *Nature Reviews Microbiology* 17.7 (juil. 2019). Number : 7 Publisher : Nature Publishing Group, p. 429–440. ISSN : 1740-1534.
- [189] Jeffrey M. SKERKER et Howard C. BERG. "Direct observation of extension and retraction of type IV pili". en. In : *PNAS* 98.12 (juin 2001). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 6901–6904. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [190] Berenike MAIER et al. "Single pilus motor forces exceed 100 pN". en. In : *PNAS* 99.25 (déc. 2002). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 16012–16017. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [191] Christof HEPP et Berenike MAIER. "Kinetics of DNA uptake during transformation provide evidence for a translocation ratchet mechanism". eng. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* 113.44 (nov. 2016), p. 12467–12472. ISSN : 1091-6490.
- [192] H NIWA et al. "Crystal structure of competence protein ComEA-related protein from *Thermus thermophilus* HB8". en. In : *Nat Struct Mol Biol* 10.12 (juil. 2011), p. 980–980. ISSN : 1545-9993, 1545-9985.
- [193] A J DOHERTY, L C SERPELL et C P PONTING. "The helix-hairpin-helix DNA-binding motif : a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA." In : *Nucleic Acids Res* 24.13 (juil. 1996), p. 2488–2497. ISSN : 0305-1048.
- [194] Patrick SEITZ et al. "ComEA Is Essential for the Transfer of External DNA into the Periplasm in Naturally Transformable *Vibrio cholerae* Cells". en. In : *PLOS Genetics* 10.1 (jan. 2014). Publisher : Public Library of Science, e1004066. ISSN : 1553-7404.
- [195] David C. I. HUNG et al. "Characterization of DNA Binding Sites of the ComE Response Regulator from *Streptococcus mutans*". In : *J Bacteriol* 193.14 (juil. 2011), p. 3642–3652. ISSN : 0021-9193.
- [196] David G. THANASSI et al. "Protein secretion in the absence of ATP : the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review)". eng. In : *Mol Membr Biol* 22.1-2 (avr. 2005), p. 63–72. ISSN : 0968-7688.
- [197] Kerstin STINGL et al. "Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*". en. In : *PNAS* 107.3 (jan. 2010). ISBN : 9780909955106 Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 1184–1189. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [198] Heike GANGEL et al. "Concerted Spatio-Temporal Dynamics of Imported DNA and ComE DNA Uptake Protein during Gonococcal Transformation". en. In : *PLOS Pathogens* 10.4 (avr. 2014). Publisher : Public Library of Science, e1004043. ISSN : 1553-7374.

- [199] Finn Erik AAS, Cecilia LØVOLD et Michael KOOMEY. “An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae* : mechanism of action and links to Type IV pilus expression”. eng. In : *Mol Microbiol* 46.5 (déc. 2002), p. 1441–1450. ISSN : 0950-382X.
- [200] I. CHEN et E. C. GOTSCHLICH. “ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity”. eng. In : *J Bacteriol* 183.10 (mai 2001), p. 3160–3168. ISSN : 0021-9193.
- [201] Caterina STRAMBIO-DE-CASTILLIA, Mario NIEPEL et Michael P. ROUT. “The nuclear pore complex : bridging nuclear transport and gene regulation”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11.7 (juil. 2010). Number : 7 Publisher : Nature Publishing Group, p. 490–501. ISSN : 1471-0080.
- [202] Martin BECK et Ed HURT. “The nuclear pore complex : understanding its function through structural insight”. en. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18.2 (fév. 2017). Number : 2 Publisher : Nature Publishing Group, p. 73–89. ISSN : 1471-0080.
- [203] GG MAUL et L DEAVEN. “Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing DNA content”. In : *J Cell Biol* 73.3 (juin 1977), p. 748–760. ISSN : 0021-9525.
- [204] Katharina RIBBECK et Dirk GÖRLICH. “Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes”. In : *EMBO J* 20.6 (mar. 2001), p. 1320–1330. ISSN : 0261-4189.
- [205] Martin BECK et al. “Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography”. eng. In : *Science* 306.5700 (nov. 2004), p. 1387–1390. ISSN : 1095-9203.
- [206] Daniel H. LIN et al. “Architecture of the symmetric core of the nuclear pore”. en. In : *Science* 352.6283 (avr. 2016). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Research Article. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [207] Shaobao LIU et al. “Electrostatic switching of nuclear basket conformations provides a potential mechanism for nuclear mechanotransduction”. en. In : *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 133 (déc. 2019), p. 103705. ISSN : 0022-5096.
- [208] Daniel P. DENNING et al. “Disorder in the nuclear pore complex : The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded”. en. In : *PNAS* 100.5 (mar. 2003). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 2450–2455. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [209] Roderick Y. H. LIM et al. “Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport”. en. In : *PNAS* 103.25 (juin 2006). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 9512–9517. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [210] *Infographic : The Nuclear Pore Complex*. en. Library Catalog : www.the-scientist.com.
- [211] Brittany J. LEE et al. “Rules for Nuclear Localization Sequence Recognition by Karyopherin β 2”. In : *Cell* 126.3 (août 2006), p. 543–558. ISSN : 0092-8674.
- [212] Lucy F. PEMBERTON et Bryce M. PASCHAL. “Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export”. en. In : *Traffic* 6.3 (2005). __eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1600-0854.2005.00270.x>, p. 187–198. ISSN : 1600-0854.
- [213] Susan R. WENTE et Michael P. ROUT. “The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport”. In : *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.10 (oct. 2010). ISSN : 1943-0264.
- [214] Johannes L. BOS, Holger REHMANN et Alfred WITTINGHOFER. “GEFs and GAPs : Critical Elements in the Control of Small G Proteins”. English. In : *Cell* 129.5 (juin 2007). Publisher : Elsevier, p. 865–877. ISSN : 0092-8674, 1097-4172.
- [215] Marion WEBERRUSS et Wolfram ANTONIN. “Perforating the nuclear boundary – how nuclear pore complexes assemble”. en. In : *J Cell Sci* 129.24 (déc. 2016). Publisher : The Company of Biologists Ltd Section : Commentary, p. 4439–4447. ISSN : 0021-9533, 1477-9137.
- [216] Jiong MA et al. “Self-regulated viscous channel in the nuclear pore complex”. en. In : *PNAS* 109.19 (mai 2012). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 7326–7331. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [217] Dagmar MOHR et al. “Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes”. In : *The EMBO Journal* 28.17 (sept. 2009). Publisher : John Wiley & Sons, Ltd, p. 2541–2553. ISSN : 0261-4189.
- [218] Bertil DANEHOLT. “Assembly and transport of a premessenger RNP particle”. en. In : *PNAS* 98.13 (juin 2001). Publisher : National Academy of Sciences Section : Colloquium Paper, p. 7012–7017. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [219] H. MEHLIN, B. DANEHOLT et U. SKOGLUND. “Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography”. eng. In : *Cell* 69.4 (mai 1992), p. 605–613. ISSN : 0092-8674.
- [220] Ali GHAVAMI, Erik van der GIESSEN et Patrick R. ONCK. “Energetics of Transport through the Nuclear Pore Complex”. en. In : *PLOS ONE* 11.2 (fév. 2016). Publisher : Public Library of Science, e0148876. ISSN : 1932-6203.
- [221] Michael P. ROUT et al. “Virtual gating and nuclear transport : the hole picture”. en. In : *Trends in Cell Biology* 13.12 (déc. 2003), p. 622–628. ISSN : 0962-8924.
- [222] Steffen FREY et Dirk GÖRLICH. “A Saturated FG-Repeat Hydrogel Can Reproduce the Permeability Properties of Nuclear Pore Complexes”. en. In : *Cell* 130.3 (août 2007), p. 512–523. ISSN : 0092-8674.

- [223] Reiner PETERS. “Translocation Through the Nuclear Pore Complex : Selectivity and Speed by Reduction-of-Dimensionality”. en. In : *Traffic* 6.5 (2005). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1600-0854.2005.00287.x>, p. 421–427. ISSN : 1600-0854.
- [224] Larisa E. KAPINOS et al. “Karyopherin-Centric Control of Nuclear Pores Based on Molecular Occupancy and Kinetic Analysis of Multivalent Binding with FG Nucleoporins”. In : *Biophys J* 106.8 (avr. 2014), p. 1751–1762. ISSN : 0006-3495.
- [225] Roderick Y. H. LIM et al. “Nanomechanical Basis of Selective Gating by the Nuclear Pore Complex”. en. In : *Science* 318.5850 (oct. 2007). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report, p. 640–643. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [226] Justin YAMADA et al. “A Bimodal Distribution of Two Distinct Categories of Intrinsically Disordered Structures with Separate Functions in FG Nucleoporins”. In : *Mol Cell Proteomics* 9.10 (oct. 2010), p. 2205–2224. ISSN : 1535-9476.
- [227] Michael G. OPFERMAN et al. “Morphological control of grafted polymer films via attraction to small nanoparticle inclusions”. In : *Phys. Rev. E* 86.3 (sept. 2012). Publisher : American Physical Society, p. 031806.
- [228] Murray STEWART. “Ratcheting mRNA out of the nucleus”. eng. In : *Mol Cell* 25.3 (fév. 2007), p. 327–330. ISSN : 1097-2765.
- [229] Murray STEWART. “Polyadenylation and nuclear export of mRNAs”. In : *J Biol Chem* 294.9 (mar. 2019), p. 2977–2987. ISSN : 0021-9258.
- [230] Stephanie HEINRICH et al. “Temporal and spatial regulation of mRNA export : Single particle RNA-imaging provides new tools and insights”. eng. In : *Bioessays* 39.2 (fév. 2017). ISSN : 1521-1878.
- [231] Shintaro AIBARA et al. “Domain organization within the nuclear export factor Mex67 :Mtr2 generates an extended mRNA binding surface”. In : *Nucleic Acids Research* 43.3 (fév. 2015), p. 1927–1936. ISSN : 0305-1048.
- [232] Marius B. FAZA et al. “Role of Mex67-Mtr2 in the Nuclear Export of 40S Pre-Ribosomes”. en. In : *PLOS Genetics* 8.8 (août 2012). Publisher : Public Library of Science, e1002915. ISSN : 1553-7404.
- [233] Carlo BAEJEN et al. “Transcriptome Maps of mRNA Biogenesis Factors Define Pre-mRNA Recognition”. en. In : *Molecular Cell* 55.5 (sept. 2014), p. 745–757. ISSN : 1097-2765.
- [234] Alex Charles TUCK et David TOLLERVEY. “A Transcriptome-wide Atlas of RNP Composition Reveals Diverse Classes of mRNAs and lncRNAs”. en. In : *Cell* 154.5 (août 2013), p. 996–1009. ISSN : 0092-8674.
- [235] C. SCHMITT et al. “Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p”. eng. In : *EMBO J* 18.15 (août 1999), p. 4332–4347. ISSN : 0261-4189.
- [236] Christine S. WEIRICH et al. “The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore”. eng. In : *Mol Cell* 16.5 (déc. 2004), p. 749–760. ISSN : 1097-2765.
- [237] Rebecca L. ADAMS et Susan R. WENTE. “Dbp5 associates with RNA-bound Mex67 and Nab2 and its localization at the nuclear pore complex is sufficient for mRNP export and cell viability”. en. In : *PLOS Genetics* 16.10 (oct. 2020). Publisher : Public Library of Science, e1009033. ISSN : 1553-7404.
- [238] Joshua S. MINCER et Sanford M. SIMON. “Simulations of nuclear pore transport yield mechanistic insights and quantitative predictions”. en. In : *PNAS* 108.31 (août 2011). Publisher : National Academy of Sciences Section : PNAS Plus, E351–E358. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [239] Claire E. ATKINSON et al. “Conserved Spatial Organization of FG Domains in the Nuclear Pore Complex”. In : *Biophys J* 104.1 (jan. 2013), p. 37–50. ISSN : 0006-3495.
- [240] Francesco CARDARELLI, Luca LANZANO et Enrico GRATTON. “Capturing directed molecular motion in the nuclear pore complex of live cells”. en. In : *PNAS* 109.25 (juin 2012). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 9863–9868. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [241] Marie CHUPEAU et al. “Optimizing Brownian escape rates by potential shaping”. en. In : *PNAS* 117.3 (jan. 2020). ISBN : 9781910677117 Publisher : National Academy of Sciences Section : Physical Sciences, p. 1383–1388. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [242] Ching-Hao WANG, Pankaj MEHTA et Michael ELBAUM. “Thermodynamic Paradigm for Solution Demixing Inspired by Nuclear Transport in Living Cells”. In : *Phys. Rev. Lett.* 118.15 (avr. 2017). Publisher : American Physical Society, p. 158101.
- [243] Alessio FRAGASSO et al. “A designer FG-Nup that reconstitutes the selective transport barrier of the nuclear pore complex”. en. In : *Nature Communications* 12.1 (mar. 2021). Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 1–15. ISSN : 2041-1723.
- [244] Paul J. FLORY. *Principles of Polymer Chemistry*. en. Google-Books-ID : CQ0EbEkT5R0C. Cornell University Press, 1953. ISBN : 978-0-8014-0134-3.
- [245] Jacques des CLOIZEAUX, Gerard JANNINK et G. JANNINK. *Polymers in Solution : Their Modelling and Structure*. English. Trad. par J. des CLOIZEAUX. 1st edition. Oxford : Clarendon Press, fév. 1991. ISBN : 978-0-19-852036-8.
- [246] M. DOI et S. F. EDWARDS. *The Theory of Polymer Dynamics*. Anglais. Oxford : Oxford University Press, nov. 1986. ISBN : 978-0-19-851976-8.

- [247] Alexei R. KHOKHLOV, Alexander Yu GROSBERG et Vijay S. PANDE. *Statistical Physics of Macromolecules*. en. Polymers and Complex Materials. AIP-Press, 1994. ISBN : 978-1-56396-071-0.
- [248] Kerry S. BLOOM. “Beyond the code : the mechanical properties of DNA as they relate to mitosis”. In : *Chromosoma* 117.2 (avr. 2008), p. 103–110. ISSN : 0009-5915.
- [249] S. B. SMITH, L. FINZI et C. BUSTAMANTE. “Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads”. en. In : *Science* 258.5085 (nov. 1992). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Reports, p. 1122–1126. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [250] C. BUSTAMANTE et al. “Entropic elasticity of lambda-phage DNA”. en. In : *Science* 265.5178 (sept. 1994). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Technical Comments, p. 1599–1600. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [251] Hans KUHN, Horst-Dieter FÖRSTERLING et David H. WALDECK. *Principles of Physical Chemistry*. English. 2nd edition. Hoboken, NJ : Wiley-Interscience, mar. 2009. ISBN : 978-0-470-08964-4.
- [252] P. J. HAGERMAN. “Flexibility of DNA”. eng. In : *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 17 (1988), p. 265–286. ISSN : 0883-9182.
- [253] Toshio YANAGIDA et al. “Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin”. en. In : *Nature* 307.5946 (jan. 1984). Number : 5946 Publisher : Nature Publishing Group, p. 58–60. ISSN : 1476-4687.
- [254] B. MICKEY et J. HOWARD. “Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents”. eng. In : *J Cell Biol* 130.4 (août 1995), p. 909–917. ISSN : 0021-9525.
- [255] M. RIEF et al. “Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM”. eng. In : *Science* 276.5315 (mai 1997), p. 1109–1112. ISSN : 0036-8075.
- [256] N. MÜCKE et al. “Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy”. eng. In : *J Mol Biol* 335.5 (jan. 2004), p. 1241–1250. ISSN : 0022-2836.
- [257] Seungho CHOE et Sean X. SUN. “The elasticity of alpha-helices”. eng. In : *J Chem Phys* 122.24 (juin 2005), p. 244912. ISSN : 0021-9606.
- [258] B. DERJAGUIN et L. LANDAU. “Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes”. en. In : *Progress in Surface Science* 43.1 (mai 1993), p. 30–59. ISSN : 0079-6816.
- [259] E. J. W. VERWEY. “Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.” In : *J. Phys. Chem.* 51.3 (mar. 1947). Publisher : American Chemical Society, p. 631–636. ISSN : 0092-7023.
- [260] Jacob N. ISRAELACHVILI. *Intermolecular and Surface Forces*. en. Google-Books-ID : MVbWBhbrugIC. Academic Press, mai 2015. ISBN : 978-0-08-092363-5.
- [261] Michael RUBINSTEIN et Ralph H. COLBY. *Polymer Physics*. Anglais. Oxford ; New York : OUP Oxford, juin 2003. ISBN : 978-0-19-852059-7.
- [262] P. G. DE GENNES. “Collapse of a polymer chain in poor solvents”. en. In : *J. Physique Lett.* 36.3 (mar. 1975). Publisher : Société Française de Physique, p. 55–57. ISSN : 0302-072X.
- [263] S. M. BHATTACHARJEE, A. GIACOMETTI et A. MARITAN. “Flory theory for polymers.” In : *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* (2013).
- [264] Izumi NISHIO et al. “First observation of the coil-globule transition in a single polymer chain”. en. In : *Nature* 281.5728 (sept. 1979). Number : 5728 Publisher : Nature Publishing Group, p. 208–209. ISSN : 1476-4687.
- [265] Jing Cun FAN et al. “Molecular mechanism of viscoelastic polymer enhanced oil recovery in nanopores”. In : *R Soc Open Sci* 5.6 (juin 2018). ISSN : 2054-5703.
- [266] F. BROCHARD-WYART et E. RAPHAEL. “Scaling theory of molten polymers in small pores”. In : *Macromolecules* 23.8 (avr. 1990). Publisher : American Chemical Society, p. 2276–2280. ISSN : 0024-9297.
- [267] Yanwei WANG, Douglas R. TREE et Kevin D. DORFMAN. “Simulation of DNA Extension in Nanochannels”. In : *Macromolecules* 44.16 (août 2011). Publisher : American Chemical Society, p. 6594–6604. ISSN : 0024-9297.
- [268] Liang DAI et Patrick S. DOYLE. “Comparisons of a Polymer in Confinement versus Applied Force”. In : *Macromolecules* 46.15 (août 2013). Publisher : American Chemical Society, p. 6336–6344. ISSN : 0024-9297.
- [269] M. DAUD et P.-G. DE GENNES. “Statistics of macromolecular solutions trapped in small pores”. In : *Journal de Physique* 38.1 (1977), p. 85–93.
- [270] Liang DAI, Johan van der MAAREL et Patrick S. DOYLE. “Extended de Gennes Regime of DNA Confined in a Nanochannel”. In : *Macromolecules* 47.7 (avr. 2014). Publisher : American Chemical Society, p. 2445–2450. ISSN : 0024-9297.
- [271] Jonas O. TEGENFELDT et al. “The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels”. en. In : *PNAS* 101.30 (juil. 2004). ISBN : 9780403849109 Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 10979–10983. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [272] Walter REISNER et al. “Statics and Dynamics of Single DNA Molecules Confined in Nanochannels”. In : *Phys. Rev. Lett.* 94.19 (mai 2005). Publisher : American Physical Society, p. 196101.

- [273] Damini GUPTA et al. “Experimental evidence of weak excluded volume effects for nanochannel confined DNA”. In : *ACS Macro Lett* 4.7 (juil. 2015), p. 759–763. ISSN : 2161-1653.
- [274] Fredrik WESTERLUND et al. “Fluorescence Microscopy of Nanochannel-Confined DNA”. eng. In : *Methods Mol Biol* 1665 (2018), p. 173–198. ISSN : 1940-6029.
- [275] Thomas AUGER. “Translocation de biopolymères à travers des pores naturels ou artificiels”. These de doctorat. Sorbonne Paris Cité, oct. 2016.
- [276] H. A. KRAMERS. “Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions”. en. In : *Physica* 7.4 (avr. 1940), p. 284–304. ISSN : 0031-8914.
- [277] Jeffrey CHUANG, Yacov KANTOR et Mehran KARDAR. “Anomalous dynamics of translocation”. eng. In : *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 65.1 Pt 1 (jan. 2002), p. 011802. ISSN : 1539-3755.
- [278] Yacov KANTOR et Mehran KARDAR. “Anomalous dynamics of forced translocation”. In : *Phys. Rev. E* 69.2 (fév. 2004). Publisher : American Physical Society, p. 021806.
- [279] F. BROCHARD-WYART. “Polymer Chains Under Strong Flows : Stems and Flowers”. In : *EPL (Europhysics Letters)* 30.7 (1995). Publisher : IOP, p. 387–392. ISSN : 0295-5075.
- [280] F. BROCHARD-WYART. “Deformations of One Tethered Chain in Strong Flows”. en. In : *EPL* 23.2 (juil. 1993). Publisher : IOP Publishing, p. 105–111. ISSN : 0295-5075.
- [281] M. MUTHUKUMAR. “Polymer translocation through a hole”. In : *J. Chem. Phys.* 111.22 (nov. 1999). Publisher : American Institute of Physics, p. 10371–10374. ISSN : 0021-9606.
- [282] W. SUNG et P. J. PARK. “Polymer Translocation through a Pore in a Membrane”. In : *Phys. Rev. Lett.* 77.4 (juil. 1996). Publisher : American Physical Society, p. 783–786.
- [283] Takahiro SAKAUE. “Nonequilibrium dynamics of polymer translocation and straightening”. eng. In : *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 76.2 Pt 1 (août 2007), p. 021803. ISSN : 1539-3755.
- [284] Takahiro SAKAUE. “Sucking genes into pores : insight into driven translocation”. eng. In : *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 81.4 Pt 1 (avr. 2010), p. 041808. ISSN : 1550-2376.
- [285] T. SAITO et T. SAKAUE. “Dynamical diagram and scaling in polymer driven translocation”. en. In : *Eur. Phys. J. E* 34.12 (déc. 2011), p. 135. ISSN : 1292-895X.
- [286] Takahiro SAKAUE. “Dynamics of Polymer Translocation : A Short Review with an Introduction of Weakly-Driven Regime”. In : *Polymers (Basel)* 8.12 (déc. 2016). ISSN : 2073-4360.
- [287] Payam ROWGHANIAN et Alexander Y. GROSBURG. “Force-Driven Polymer Translocation through a Nanopore : An Old Problem Revisited”. In : *J. Phys. Chem. B* 115.48 (déc. 2011). Publisher : American Chemical Society, p. 14127–14135. ISSN : 1520-6106.
- [288] John J. KASIANOWICZ et al. “Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel”. en. In : *PNAS* 93.24 (nov. 1996). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 13770–13773. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [289] A. MELLER, L. NIVON et D. BRANTON. “Voltage-driven DNA translocations through a nanopore”. eng. In : *Phys Rev Lett* 86.15 (avr. 2001), p. 3435–3438. ISSN : 0031-9007.
- [290] Amit MELLER et Daniel BRANTON. “Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore”. eng. In : *Electrophoresis* 23.16 (août 2002), p. 2583–2591. ISSN : 0173-0835.
- [291] Ranulu Samantha S. de ZOYSA et al. “Translocation of single stranded DNA through the α -hemolysin protein nanopore in acidic solutions”. In : *Electrophoresis* 32.21 (nov. 2011), p. 3034–3041. ISSN : 0173-0835.
- [292] Arnold J. STORM et al. “Fast DNA Translocation through a Solid-State Nanopore”. In : *Nano Lett.* 5.7 (juil. 2005). Publisher : American Chemical Society, p. 1193–1197. ISSN : 1530-6984.
- [293] Spencer CARSON et al. “Smooth DNA transport through a narrowed pore geometry”. eng. In : *Biophys J* 107.10 (nov. 2014), p. 2381–2393. ISSN : 1542-0086.
- [294] V. V. LEHTOLA, R. P. LINNA et K. KASKI. “Dynamics of forced biopolymer translocation”. en. In : *EPL* 85.5 (mar. 2009). Publisher : IOP Publishing, p. 58006. ISSN : 0295-5075.
- [295] Mark AKESON et al. “Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments Within Single RNA Molecules”. en. In : *Biophysical Journal* 77.6 (déc. 1999), p. 3227–3233. ISSN : 0006-3495.
- [296] Meni WANUNU. “Nanopores : A journey towards DNA sequencing”. eng. In : *Phys Life Rev* 9.2 (juin 2012), p. 125–158. ISSN : 1873-1457.
- [297] Fabien MONTEL. “Séquençage de l’ADN par nanopores - Résultats et perspectives”. fr. In : *Med Sci (Paris)* 34.2 (fév. 2018). Number : 2 Publisher : EDP Sciences, p. 161–165. ISSN : 0767-0974, 1958-5381.
- [298] Nobuaki KONO et Kazuharu ARAKAWA. “Nanopore sequencing : Review of potential applications in functional genomics”. eng. In : *Dev Growth Differ* 61.5 (juin 2019), p. 316–326. ISSN : 1440-169X.
- [299] Thomas AUGER et al. “Zero-Mode Waveguide Detection of Flow-Driven DNA Translocation through Nanopores”. In : *Phys. Rev. Lett.* 113.2 (juil. 2014). Publisher : American Physical Society, p. 028302.

- [300] C. GAY et al. "Injection Threshold for a Statistically Branched Polymer inside a Nanopore". In : *Macromolecules* 29.26 (jan. 1996). Publisher : American Chemical Society, p. 8379–8382. ISSN : 0024-9297.
- [301] Pierre-Gilles de GENNES. "Flexible Polymers in Nanopores". en. In : *Polymers in Confined Environments*. Sous la dir. de S. GRANICK et al. Advances in Polymer Science. Berlin, Heidelberg : Springer, 1999, p. 91–105. ISBN : 978-3-540-69711-4.
- [302] T. SAKAUE et al. "Flow injection of branched polymers inside nanopores". en. In : *Europhys. Lett.* 72.1 (oct. 2005). Number : 1 Publisher : EDP Sciences, p. 83–88. ISSN : 0295-5075, 1286-4854.
- [303] Lucie BÉGUIN et al. "Suction of hydrosoluble polymers into nanopores". en. In : *Soft Matter* 7.1 (déc. 2010). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 96–103. ISSN : 1744-6848.
- [304] Thomas AUGER et al. "Uncooked spaghetti in a colander : Injection of semiflexible polymers in a nanopore". en. In : *Eur. Phys. J. E* 41.5 (mai 2018), p. 63. ISSN : 1292-895X.
- [305] G. GUILLOT, L. LEGER et F. RONDELEZ. "Diffusion of large flexible polymer chains through model porous membranes". In : *Macromolecules* 18.12 (déc. 1985). Publisher : American Chemical Society, p. 2531–2537. ISSN : 0024-9297.
- [306] T. D. LONG et J. L. ANDERSON. "Flow-dependent rejection of polystyrene from microporous membranes". en. In : *Journal of Polymer Science : Polymer Physics Edition* 22.7 (1984). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pol.1984.1261-1281>. ISSN : 1542-9385.
- [307] Fan JIN et Chi WU. "Observation of the first-order transition in ultrafiltration of flexible linear polymer chains". eng. In : *Phys Rev Lett* 96.23 (juin 2006), p. 237801. ISSN : 0031-9007.
- [308] Eric SAHIN et Christopher J. ROBERTS. "Size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering for elucidating protein aggregation mechanisms". eng. In : *Methods Mol Biol* 899 (2012), p. 403–423. ISSN : 1940-6029.
- [309] Shuji ADACHI et al. "A method for estimating the rejection coefficient–molecular weight relationship of ultrafiltration membrane for a chain polymer by using gel permeation chromatography". en. In : *Biotechnology and Bioengineering* 28.12 (1986). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.260281208>, p. 1809–1813. ISSN : 1097-0290.
- [310] S. DAUDI et F. BROCHARD. "Flows of Flexible Polymer Solutions in Pores". In : *Macromolecules* 11.4 (juil. 1978). Publisher : American Chemical Society, p. 751–758. ISSN : 0024-9297.
- [311] Tao ZHENG et al. "Revisiting the Flow-Driven Translocation of Flexible Linear Chains through Cylindrical Nanopores : Is the Critical Flow Rate Really Independent of the Chain Length?" In : *Macromolecules* 51.22 (nov. 2018). Publisher : American Chemical Society, p. 9333–9343. ISSN : 0024-9297.
- [312] V. V. LEHTOLA, R. P. LINNA et K. KASKI. "Critical evaluation of the computational methods used in the forced polymer translocation". In : *Phys. Rev. E* 78.6 (déc. 2008). Publisher : American Physical Society, p. 061803.
- [313] Roya ZANDI et al. "What drives the translocation of stiff chains?" en. In : *PNAS* 100.15 (juil. 2003). Publisher : National Academy of Sciences Section : Physical Sciences, p. 8649–8653. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [314] P. M. SUHONEN et R. P. LINNA. "Chaperone-assisted translocation of flexible polymers in three dimensions". In : *Phys. Rev. E* 93.1 (jan. 2016). Publisher : American Physical Society, p. 012406.
- [315] Wancheng YU et Kaifu LUO. "Chaperone-Assisted Translocation of a Polymer through a Nanopore". In : *J. Am. Chem. Soc.* 133.34 (août 2011). Publisher : American Chemical Society, p. 13565–13570. ISSN : 0002-7863.
- [316] M. J. LEVENE et al. "Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations". In : *Science* 299.5607 (2003), p. 682–686. ISSN : 0036-8075. eprint : <https://science.sciencemag.org/content/299/5607/682.full.pdf>.
- [317] Deep PUNJ et al. "Plasmonic antennas and zero-mode waveguides to enhance single molecule fluorescence detection and fluorescence correlation spectroscopy toward physiological concentrations". en. In : *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 6.3 (2014). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/wnan.1261>, p. 268–282. ISSN : 1939-0041.
- [318] Paul ZHU et Harold G. CRAIGHEAD. "Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis". In : *Annual Review of Biophysics* 41.1 (2012). _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102338>, p. 269–293.
- [319] Jose M. MORAN-MIRABAL et Harold G. CRAIGHEAD. "Zero-mode waveguides : Sub-wavelength nanostructures for single molecule studies at high concentrations". en. In : *Methods*. Single molecule detection and therapeutic technologies 46.1 (sept. 2008), p. 11–17. ISSN : 1046-2023.
- [320] John David JACKSON. *Classical Electrodynamics, third edition*. Anglais. 3rd Edition. New York : John Wiley & Sons, Inc., jan. 1998. ISBN : 978-0-471-30932-1.
- [321] K. T. SAMIEE et al. " λ -Repressor Oligomerization Kinetics at High Concentrations Using Fluorescence Correlation Spectroscopy in Zero-Mode Waveguides". In : *Biophys J* 88.3 (mar. 2005), p. 2145–2153. ISSN : 0006-3495.
- [322] Samuel T HESS et Watt W WEBB. "Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy." In : *Biophys J* 83.4 (oct. 2002), p. 2300–2317. ISSN : 0006-3495.
- [323] Chris XU et Watt W. WEBB. "Multiphoton Excitation of Molecular Fluorophores and Nonlinear Laser Microscopy". en. In : *Topics in Fluorescence Spectroscopy : Volume 5 : Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence*. Sous la dir. de Joseph R. LAKOWICZ. Topics in Fluorescence Spectroscopy. Boston, MA : Springer US, 2002, p. 471–540. ISBN : 978-0-306-47070-7.

- [324] Mikhail BAIBAKOV et al. “Zero-mode waveguides can be made better : fluorescence enhancement with rectangular aluminum nanoapertures from the visible to the deep ultraviolet”. en. In : *Nanoscale Adv.* 2.9 (sept. 2020). Publisher : RSC, p. 4153–4160. ISSN : 2516-0230.
- [325] Stefan Alexander MAIER. *Plasmonics : Fundamentals And Applications*. Anglais. New York, NY : Springer-Verlag New York Inc., mai 2007. ISBN : 978-0-387-33150-8.
- [326] Charles KITTEL. *Introduction to Solid State Physics*. Anglais. 8th Edition. Hoboken, NJ : John Wiley & Sons, nov. 2004. ISBN : 978-0-471-41526-8.
- [327] Paolo BIAGIONI, Jer-Shing HUANG et Bert HECHT. “Nanoantennas for visible and infrared radiation”. eng. In : *Rep Prog Phys* 75.2 (fév. 2012), p. 024402. ISSN : 1361-6633.
- [328] Hervé RIGNEAULT et al. “Enhancement of Single-Molecule Fluorescence Detection in Subwavelength Apertures”. In : *Phys. Rev. Lett.* 95.11 (sept. 2005). Publisher : American Physical Society, p. 117401.
- [329] Heykel AOUANI et al. “Bright unidirectional fluorescence emission of molecules in a nanoaperture with plasmonic corrugations”. eng. In : *Nano Lett* 11.2 (fév. 2011), p. 637–644. ISSN : 1530-6992.
- [330] Heykel AOUANI et al. “Crucial Role of the Adhesion Layer on the Plasmonic Fluorescence Enhancement”. In : *ACS Nano* 3.7 (juil. 2009). Publisher : American Chemical Society, p. 2043–2048. ISSN : 1936-0851.
- [331] Deep PUNJ et al. “A plasmonic ‘antenna-in-box’ platform for enhanced single-molecule analysis at micromolar concentrations”. en. In : *Nature Nanotechnology* 8.7 (juil. 2013). Number : 7 Publisher : Nature Publishing Group, p. 512–516. ISSN : 1748-3395.
- [332] Mikhail BAIBAKOV et al. “Extending Single-Molecule Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Range beyond 10 Nanometers in Zero-Mode Waveguides”. In : *ACS Nano* 13.7 (juil. 2019). Publisher : American Chemical Society, p. 8469–8480. ISSN : 1936-0851.
- [333] Aleksandr BARULIN et al. “Deep Ultraviolet Plasmonic Enhancement of Single Protein Autofluorescence in Zero-Mode Waveguides”. In : *Nano Lett.* 19.10 (oct. 2019). Publisher : American Chemical Society, p. 7434–7442. ISSN : 1530-6984.
- [334] Davy GÉRARD et al. “Nanoaperture-enhanced fluorescence : Towards higher detection rates with plasmonic metals”. In : *Phys. Rev. B* 77.4 (jan. 2008). Publisher : American Physical Society, p. 045413.
- [335] Nils KLUGHAMMER et Cees DEKKER. “Palladium zero-mode waveguides for optical single-molecule detection with nanopores”. eng. In : *Nanotechnology* 32.18 (avr. 2021), 18LT01. ISSN : 1361-6528.
- [336] Vincenzo AMENDOLA et al. “Surface plasmon resonance in gold nanoparticles : a review”. en. In : *J. Phys. : Condens. Matter* 29.20 (avr. 2017). Publisher : IOP Publishing, p. 203002. ISSN : 0953-8984.
- [337] Xiaohua HUANG et Mostafa A. EL-SAYED. “Gold nanoparticles : Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy”. en. In : *Journal of Advanced Research* 1.1 (jan. 2010), p. 13–28. ISSN : 2090-1232.
- [338] Davy GÉRARD et Stephen K. GRAY. “Aluminium plasmonics”. en. In : *J. Phys. D : Appl. Phys.* 48.18 (déc. 2014). Publisher : IOP Publishing, p. 184001. ISSN : 0022-3727.
- [339] Juan de TORRES et al. “FRET enhancement in aluminum zero-mode waveguides”. eng. In : *Chemphyschem* 16.4 (mar. 2015), p. 782–788. ISSN : 1439-7641.
- [340] W. Elliott MARTIN et al. “A Comparison of Single-Molecule Emission in Aluminum and Gold Zero-Mode Waveguides”. eng. In : *J Phys Chem A* 120.34 (sept. 2016), p. 6719–6727. ISSN : 1520-5215.
- [341] Dale LEWIS et al. “Multilevel autoregulation of λ repressor protein CI by DNA looping in vitro”. en. In : *PNAS* 108.36 (sept. 2011). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 14807–14812. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [342] Tomoya SAMESHIMA et al. “Single-molecule Study on the Decay Process of the Football-shaped GroEL-GroES Complex Using Zero-mode Waveguides”. In : *J Biol Chem* 285.30 (juil. 2010), p. 23159–23164. ISSN : 0021-9258.
- [343] Jill ZEILSTRA-RYALLS, Olivier FAYET et Costa GEORGOPOULOS. “THE UNIVERSALLY CONSERVED GroE (Hsp60) CHAPERONINS”. In : *Annu. Rev. Microbiol.* 45.1 (oct. 1991). Publisher : Annual Reviews, p. 301–325. ISSN : 0066-4227.
- [344] Joshua B. EDEL et al. “High Spatial Resolution Observation of Single-Molecule Dynamics in Living Cell Membranes”. English. In : *Biophysical Journal* 88.6 (juin 2005). Publisher : Elsevier, p. L43–L45. ISSN : 0006-3495.
- [345] Sotaro UEMURA et al. “Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution”. eng. In : *Nature* 464.7291 (avr. 2010), p. 1012–1017. ISSN : 1476-4687.
- [346] Igor D. VILFAN et al. “Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription”. eng. In : *J Nanobiotechnology* 11 (avr. 2013), p. 8. ISSN : 1477-3155.
- [347] John EID et al. “Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules”. en. In : *Science* 323.5910 (jan. 2009). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Report, p. 133–138. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [348] Ben McNALLY et al. “Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays”. In : *Nano Lett* 10.6 (juin 2010), p. 2237–2244. ISSN : 1530-6984.

- [349] *SMRT Sequencing - PacBio - Highly Accurate Long-read Sequencing*. en-US. Library Catalog : www.pacb.com.
- [350] Joseph LARKIN et al. "Length-Independent DNA Packing into Nanopore Zero-Mode Waveguides for Low-Input DNA Sequencing". In : *Nat Nanotechnol* 12.12 (déc. 2017), p. 1169–1175. ISSN : 1748-3387.
- [351] Joseph LARKIN et al. "Reversible Positioning of Single Molecules inside Zero-Mode Waveguides". In : *Nano Lett.* 14.10 (oct. 2014). Publisher : American Chemical Society, p. 6023–6029. ISSN : 1530-6984.
- [352] Vivek JADHAV et al. "Porous Zero-Mode Waveguides for Picogram-Level DNA Capture". In : *Nano Lett.* 19.2 (fév. 2019). Publisher : American Chemical Society, p. 921–929. ISSN : 1530-6984.
- [353] Huaisong YONG et al. "Regulating the Translocation of DNA through Poly(N -isopropylacrylamide)-Decorated Switchable Nanopores by Cononsolvency Effect". In : *Macromolecules* 54 (mai 2021), p. 4432–4442.
- [354] P. Yu APEL et al. "Diode-like single-ion track membrane prepared by electro-stopping". en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms* 184.3 (nov. 2001), p. 337–346. ISSN : 0168-583X.
- [355] T. W. CORNELIUS et al. "Investigation of nanopore evolution in ion track-etched polycarbonate membranes". en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms* 265.2 (déc. 2007), p. 553–557. ISSN : 0168-583X.
- [356] Z. SIWY et al. "Electro-responsive asymmetric nanopores in polyimide with stable ion-current signal". en. In : *Appl Phys A* 76.5 (mar. 2003), p. 781–785. ISSN : 1432-0630.
- [357] Haad BESSBOUSSE et al. "Functionalized nanoporous track-etched β -PVDF membrane electrodes for lead(II) determination by square wave anodic stripping voltammetry". en. In : *Anal. Methods* 3.6 (juin 2011). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 1351–1359. ISSN : 1759-9679.
- [358] L. I KRAVETS, S. N DMITRIEV et P. Yu APEL. "The properties and porous structure of polypropylene track membranes". en. In : *Radiation Measurements*. Nuclear Tracks in Solids 25.1 (jan. 1995), p. 729–732. ISSN : 1350-4487.
- [359] Peter SIGMUND. *Stopping of Heavy Ions : A Theoretical Approach*. en. Springer Tracts in Modern Physics. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2004. ISBN : 978-3-540-22273-6.
- [360] Youmei SUN et al. "Swift heavy ion induced amorphisation and chemical modification in polycarbonate". en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*. Fifth International Symposium on Swift Heavy Ions in Matter 209 (août 2003), p. 188–193. ISSN : 0168-583X.
- [361] F DEHAYE et al. "Chemical modifications induced in bisphenol A polycarbonate by swift heavy ions". en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*. Fifth International Symposium on Swift Heavy Ions in Matter 209 (août 2003), p. 103–112. ISSN : 0168-583X.
- [362] C. TRAUTMANN, S. BOUFFARD et R. SPOHR. "Etching threshold for ion tracks in polyimide". en. In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*. Radiation Effects in Insulators 116.1 (août 1996), p. 429–433. ISSN : 0168-583X.
- [363] Yuqi ZHANG et al. "Fabrication of Nanochannels". en. In : *Materials* 8.9 (sept. 2015). Number : 9 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 6277–6308.
- [364] Artem KOZLOVSKIY et al. "PET Ion-Track Membranes : Formation Features and Basic Applications". en. In : *Nanocomposites, Nanostructures, and Their Applications*. Sous la dir. d'Olena FESENKO et Leonid YATSENKO. Springer Proceedings in Physics. Cham : Springer International Publishing, 2019, p. 461–479. ISBN : 978-3-030-17759-1.
- [365] Z. ZHANG, L. WEN et L. JIANG. "Bioinspired smart asymmetric nanochannel membranes." In : *Chemical Society reviews* (2018).
- [366] Birgitta SCHIEDT. "Characterization and application of ion track-etched nanopores". Thèse de doct. Uperto-Carola University of Heidelberg, Germany, mai 2007.
- [367] Yingjie LIU et al. "Microfabricated Polycarbonate CE Devices for DNA Analysis". In : *Anal. Chem.* 73.17 (sept. 2001). Publisher : American Chemical Society, p. 4196–4201. ISSN : 0003-2700.
- [368] Claire GAILLARD et Francois STRAUSS. "Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments". en. In : *Technical Tips Online* T01392 (1998), p. 1.
- [369] Xiaoli LIU et al. "Poly(vinylpyrrolidone-b-styrene) block copolymers tethered surfaces for protein adsorption and cell adhesion regulation". en. In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 79.2 (sept. 2010), p. 452–459. ISSN : 0927-7765.
- [370] John PIERACCI, James V CRIVELLO et Georges BELFORT. "Photochemical modification of 10kDa polyethersulfone ultrafiltration membranes for reduction of biofouling". en. In : *Journal of Membrane Science* 156.2 (avr. 1999), p. 223–240. ISSN : 0376-7388.
- [371] Paul CERIA. "Schéma simplifié d'un évaporateur". In : *Site personnel* ().
- [372] Elizabeth A. STRYCHALSKI et al. "Quantitative Measurements of the Size Scaling of Linear and Circular DNA in Nanofluidic Slitlike Confinement". In : *Macromolecules* 45.3 (fév. 2012). Publisher : American Chemical Society, p. 1602–1611. ISSN : 0024-9297.

- [373] Cristian MICHELETTI et Enzo ORLANDINI. “Numerical Study of Linear and Circular Model DNA Chains Confined in a Slit : Metric and Topological Properties”. In : *Macromolecules* 45.4 (fév. 2012). Publisher : American Chemical Society, p. 2113–2121. ISSN : 0024-9297.
- [374] Mohammadreza ALIZADEHHEIDARI et al. “Nan confined Circular and Linear DNA : Equilibrium Conformations and Unfolding Kinetics”. In : *Macromolecules* 48.3 (fév. 2015). Publisher : American Chemical Society, p. 871–878. ISSN : 0024-9297.
- [375] G GOMORI. *Preparation of Buffers for use in Enzyme Studies* *. en. Pages : 370-377 Publication Title : CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. CRC Press, avr. 2018. ISBN : 978-1-351-07242-7.
- [376] J. Roger HART. “Ethylenediaminetetraacetic Acid and Related Chelating Agents”. en. In : *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*. ISSN : 1435-6007 _eprint : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/14356007.a10_095. American Cancer Society, 2000. ISBN : 978-3-527-30673-2.
- [377] Hays S. RYE et al. “Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes : properties and applications”. In : *Nucleic Acids Research* 20.11 (juin 1992), p. 2803–2812. ISSN : 0305-1048.
- [378] Thomas L. NETZEL et al. “Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA : Photophysical Properties of Monomeric and Bichromophoric DNA Stains”. In : *J. Phys. Chem.* 99.51 (déc. 1995). Publisher : American Chemical Society, p. 17936–17947. ISSN : 0022-3654.
- [379] Alexandre FÜRSTENBERG et al. “Ultrafast excited-state dynamics of DNA fluorescent intercalators : new insight into the fluorescence enhancement mechanism”. eng. In : *J Am Chem Soc* 128.23 (juin 2006), p. 7661–7669. ISSN : 0002-7863.
- [380] Marcel REUTER et David T. F. DRYDEN. “The kinetics of YOYO-1 intercalation into single molecules of double-stranded DNA”. eng. In : *Biochem Biophys Res Commun* 403.2 (déc. 2010), p. 225–229. ISSN : 1090-2104.
- [381] Katrin GÜNTHER, Michael MERTIG et Ralf SEIDEL. “Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA”. In : *Nucleic Acids Res* 38.19 (oct. 2010), p. 6526–6532. ISSN : 0305-1048.
- [382] Binu KUNDUKAD, Jie YAN et Patrick S. DOYLE. “Effect of YOYO-1 on the mechanical properties of DNA”. en. In : *Soft Matter* 10.48 (nov. 2014), p. 9721–9728. ISSN : 1744-6848.
- [383] Stefan DUHR et Dieter BRAUN. “Thermophoretic depletion follows Boltzmann distribution”. eng. In : *Phys Rev Lett* 96.16 (avr. 2006), p. 168301. ISSN : 0031-9007.
- [384] Stefan DUHR et Dieter BRAUN. “Why molecules move along a temperature gradient”. en. In : *PNAS* 103.52 (déc. 2006). ISBN : 9780603873102 Publisher : National Academy of Sciences Section : Physical Sciences, p. 19678–19682. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [385] Philipp REINECK, Christoph J. WIENKEN et Dieter BRAUN. “Thermophoresis of single stranded DNA”. en. In : *ELECTROPHORESIS* 31.2 (2010). _eprint : <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/elps.200900505>, p. 279–286. ISSN : 1522-2683.
- [386] Yusuke T. MAEDA, Tsvi TLUSTY et Albert LIBCHABER. “Effects of long DNA folding and small RNA stem-loop in thermophoresis”. en. In : *PNAS* 109.44 (oct. 2012). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 17972–17977. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [387] Maren REICHL et al. “Understanding the similarity in thermophoresis between single- and double-stranded DNA or RNA”. In : *Phys. Rev. E* 91.6 (juin 2015). Publisher : American Physical Society, p. 062709.
- [388] *Harvard Medical School - Center for Macromolar Interactions*. en. Library Catalog : cmi.hms.harvard.edu.
- [389] *Exploring Optimal Interaction Techniques | SPR vs ITC vs MST vs BLI* |. en. Library Catalog : nicoyalife.com.
- [390] Kimberly A. CURTIS et al. “Unusual Salt and pH Induced Changes in Polyethylenimine Solutions”. In : *PLOS ONE* 11.9 (sept. 2016), p. 1–20.
- [391] M. H. QUENOUILLE. “Problems in Plane Sampling”. In : *The Annals of Mathematical Statistics* 20.3 (sept. 1949). Publisher : Institute of Mathematical Statistics, p. 355–375. ISSN : 0003-4851, 2168-8990.
- [392] Rupert G. MILLER. “The Jackknife—A Review”. In : *Biometrika* 61.1 (1974). Publisher : [Oxford University Press, Biometrika Trust], p. 1–15. ISSN : 0006-3444.
- [393] Sergio CARACCILO, Bortolo Matteo MOGNETTI et Andrea PELISSETTO. “Virial coefficients and osmotic pressure in polymer solutions in good-solvent conditions”. en. In : *The Journal of Chemical Physics* 125.9 (sept. 2006). Publisher : American Institute of PhysicsAIP, p. 094903. ISSN : 0021-9606.
- [394] Caleb E. GALLOPS et al. “Effect of the Protonation Level and Ionic Strength on the Structure of Linear Polyethylenimine”. In : *ACS Omega* 4.4 (avr. 2019). Publisher : American Chemical Society, p. 7255–7264. ISSN : 2470-1343.
- [395] Hunghao CHU et al. “A [polycation :heparin] complex releases growth factors with enhanced bioactivity”. eng. In : *J Control Release* 150.2 (mar. 2011), p. 157–163. ISSN : 1873-4995.
- [396] Noah Ray JOHNSON, Trisha AMBE et Yadong WANG. “Lysine-based polycation :heparin coacervate for controlled protein delivery”. en. In : *Acta Biomaterialia* 10.1 (jan. 2014), p. 40–46. ISSN : 1742-7061.
- [397] Hong DENG et al. “Structural basis of polyamine–DNA recognition : spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy”. In : *Nucleic Acids Res* 28.17 (sept. 2000), p. 3379–3385. ISSN : 0305-1048.

- [398] Amin Ahmed OUAMEUR et Heidar-Ali TAJMIR-RIAAHI. “Structural Analysis of DNA Interactions with Biogenic Polyamines and Cobalt(III)hexamine Studied by Fourier Transform Infrared and Capillary Electrophoresis *”. English. In : *Journal of Biological Chemistry* 279.40 (oct. 2004). Publisher : Elsevier, p. 42041–42054. ISSN : 0021-9258, 1083-351X.
- [399] Giuseppe IACOMINO, Gianluca PICARIELLO et Luciano D’AGOSTINO. “DNA and nuclear aggregates of polyamines”. en. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823.10 (oct. 2012), p. 1745–1755. ISSN : 0167-4889.
- [400] M. X. TANG et F. C. SZOKA. “The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes”. eng. In : *Gene Ther* 4.8 (août 1997), p. 823–832. ISSN : 0969-7128.
- [401] Roger M. PALLARES et al. “Fluorescence sensing of protein–DNA interactions using conjugated polymers and graphene oxide”. en. In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 271 (oct. 2018), p. 97–103. ISSN : 0925-4005.
- [402] Ming XIAO et Pui-Yan KWOK. “DNA Analysis by Fluorescence Quenching Detection”. In : *Genome Res* 13.5 (mai 2003), p. 932–939. ISSN : 1088-9051.
- [403] Siddhartha ROY. “Fluorescence Quenching Methods to Study Protein–Nucleic Acid Interactions”. en. In : *Methods in Enzymology*. T. 379. Energetics of Biological Macromolecules, Part D. Academic Press, jan. 2004, p. 175–187.
- [404] Fatemeh NOURI et al. “Preparation, characterization, and transfection efficiency of low molecular weight polyethylenimine-based nanoparticles for delivery of the plasmid encoding CD200 gene”. In : *International Journal of Nanomedicine* Volume 12 (août 2017), p. 5557–5569.
- [405] Graeme A. KING et al. “Revealing the competition between peeled ssDNA, melting bubbles, and S-DNA during DNA overstretching using fluorescence microscopy”. en. In : *PNAS* 110.10 (mar. 2013). Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 3859–3864. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [406] Joost van MAMEREN et al. “Unraveling the structure of DNA during overstretching by using multicolor, single-molecule fluorescence imaging”. en. In : *PNAS* 106.43 (oct. 2009). ISBN : 9780904322101 Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences, p. 18231–18236. ISSN : 0027-8424, 1091-6490.
- [407] Rob PHILLIPS et al. *Physical Biology of the Cell*. Anglais. \$ {number}nd édition. London : New York, NY : Garland Science, nov. 2012. ISBN : 978-0-8153-4450-6.
- [408] Iain F. DAVIDSON et al. “DNA loop extrusion by human cohesin”. en. In : *Science* 366.6471 (déc. 2019). Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Research Article, p. 1338–1345. ISSN : 0036-8075, 1095-9203.
- [409] L M WESTERN et S J ROSE. “A novel DNA joining activity catalyzed by T4 DNA ligase.” In : *Nucleic Acids Res* 19.4 (fév. 1991), p. 809–813. ISSN : 0305-1048.
- [410] Bram van den BROEK et al. “Visualizing the Formation and Collapse of DNA Toroids”. In : *Biophys J* 98.9 (mai 2010), p. 1902–1910. ISSN : 0006-3495.
- [411] Gail S. PRINS et Mark LINDGREN. “Chapter 18 - Accessory Sex Glands in the Male”. en. In : *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. Sous la dir. de Tony M. PLANT et Anthony J. ZELEZNIK. San Diego : Academic Press, jan. 2015, p. 773–804. ISBN : 978-0-12-397175-3.
- [412] GU FANG et WANG Hai-Jun AND. “Translocation of Single Polymer Chain from Nanopore on a Membrane : Solvent Effect”. In : *Chinese Physics Letters* 22.10, 2549-2552 (2005), p. 2549–2552.
- [413] Dongshan WEI et al. “Unforced translocation of a polymer chain through a nanopore : The solvent effect”. In : *The Journal of Chemical Physics* 126.20 (2007), p. 204901. eprint : <https://doi.org/10.1063/1.2735627>.
- [414] Felix KAPAHNKE et al. “Polymer translocation through a nanopore : The effect of solvent conditions”. In : *The Journal of Chemical Physics* 132.16 (2010), p. 164904. eprint : <https://doi.org/10.1063/1.3400650>.
- [415] Michael R. GREEN et Joseph SAMBROOK. “Precipitation of DNA with Isopropanol”. eng. In : *Cold Spring Harb Protoc* 2017.8 (août 2017), p. prot093385. ISSN : 1559-6095.
- [416] null UEDA et null YOSHIKAWA. “Phase Transition and Phase Segregation in a Single Double-Stranded DNA Molecule”. eng. In : *Phys Rev Lett* 77.10 (sept. 1996), p. 2133–2136. ISSN : 1079-7114.
- [417] Yue MA et al. “Marked Difference in the Conformational Transition of DNA Caused by Propanol Isomer”. In : *Polymers (Basel)* 12.7 (juil. 2020). ISSN : 2073-4360.
- [418] Sjören SCHWEIZERHOF et al. “Thermodynamic Parameters of Temperature-Induced Phase Transition for Brushes onto Nanoparticles : Hydrophilic versus Hydrophobic End-Groups Functionalization”. In : *Macromolecular Rapid Communications* 38.19 (2017). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/marc.201700362>, p. 1700362. ISSN : 1521-3927.
- [419] Sjören SCHWEIZERHOF et al. “Temperature-Induced Phase Transition Characterization of Responsive Polymer Brushes Grafted onto Nanoparticles”. In : *Macromolecular Chemistry and Physics* 218.6 (2017). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/macp.201600495>, p. 1600495. ISSN : 1521-3935.
- [420] K R PAITHANKAR et K S PRASAD. “Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol.” In : *Nucleic Acids Res* 19.6 (mar. 1991), p. 1346. ISSN : 0305-1048.
- [421] Jung Soo SUK et al. “PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery”. In : *Adv Drug Deliv Rev* 99.Pt A (avr. 2016), p. 28–51. ISSN : 0169-409X.

BIBLIOGRAPHIE

- [422] M. ZUKER, D. H. MATHEWS et D. H. TURNER. “Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction : A Practical Guide”. en. In : *RNA Biochemistry and Biotechnology*. Sous la dir. de Jan BARCISZEWSKI et Brian F. C. CLARK. NATO Science Series. Dordrecht : Springer Netherlands, 1999, p. 11–43. ISBN : 978-94-011-4485-8.
- [423] Michael ZUKER. “Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction”. In : *Nucleic Acids Research* 31.13 (juil. 2003), p. 3406–3415. ISSN : 0305-1048. eprint : <https://academic.oup.com/nar/article-pdf/31/13/3406/9487491/gkg595.pdf>.
- [424] Joseph M. DAHL et al. “Direct Observation of Translocation in Individual DNA Polymerase Complexes”. In : *J Biol Chem* 287.16 (avr. 2012), p. 13407–13421. ISSN : 0021-9258.
- [425] Frédéric PICARD-JEAN, Isabelle BOUGIE et Martin BISAILLON. “Characterization of the DNA- and dNTP-binding activities of the human cytomegalovirus DNA polymerase catalytic subunit UL54”. In : *Biochem J* 407.Pt 3 (nov. 2007), p. 331–341. ISSN : 0264-6021.
- [426] Mathilde BERCY et Ulrich BOCKELMANN. “Hairpins under tension : RNA versus DNA”. eng. In : *Nucleic Acids Res* 43.20 (nov. 2015), p. 9928–9936. ISSN : 1362-4962.
- [427] J. LIPHARDT et al. “Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force”. eng. In : *Science* 292.5517 (avr. 2001), p. 733–737. ISSN : 0036-8075.
- [428] Qingjia CHI, Guixue WANG et Jiahuan JIANG. “The persistence length and length per base of single-stranded DNA obtained from fluorescence correlation spectroscopy measurements using mean field theory”. en. In : *Physica A : Statistical Mechanics and its Applications* 392.5 (mar. 2013), p. 1072–1079. ISSN : 0378-4371.

Abstract :

Some natural systems known as Brownian ratchets use thermal fluctuations to extract mechanical power. In these systems, diffusion is biased in order to achieve unidirectional biological processes. Good examples are the molecular motors as kinesins or myosins that walk on the cytoskeleton and use ATP to bias their movement. Another case is the transport of mRNA between the nucleus and the cytoplasm through Nuclear Pore Complexes (NPC). The NPC is a large molecular complex which selects molecules that enter or exit the nucleus. It has been shown to be highly selective and directional. To study the directional transport of biomolecules through the NPC, a simplified mimetic device based on nanoporous membranes was designed. Our approach used near-field microscopy technique, Zero Mode Waveguide for Nanopores. With this method single DNA molecules translocation through nanopores was observed in real time. Ratchet agents which are polycations that bind strongly to the DNA and cannot diffuse through the pore were added on the exit side of the membrane. We quantified the effect of the ratchet agent on the translocation frequency of DNA molecules and established the proof of principle of the translocation ratchet. From these measurements, we defined a ratchet efficiency that we characterized according to its geometrical and kinetics parameters and compared with coarse grained modeling. We observed a critical length of 3 kbp for the DNA molecule to trigger the ratchet effect, that we explained according to a DNA loop formation model.

Résumé :

Il existe dans la nature des systèmes connus sous le nom de ratchets browniens qui utilisent les fluctuations thermiques pour extraire un travail mécanique. Dans ces systèmes, la diffusion est biaisée de manière à rendre possible des processus biologiques unidirectionnels. Les moteurs moléculaires en sont de bons exemples, comme la kinésine et la myosine qui se déplacent sur le cytosquelette et utilisent l'ATP pour biaiser leurs mouvements. Un autre cas est le transport d'ARNm entre le noyau et le cytoplasme à travers le pore nucléaire (NPC). Le pore nucléaire est un complexe moléculaire massif sélectionnant les molécules qui peuvent entrer ou sortir à travers le noyau. Le pore nucléaire a été prouvé comme très sélectif et directionnel. Pour étudier la directionnalité du transport de biomolécules à travers le pore nucléaire, nous avons développé un système simplifié mimétique basé sur les membranes nanoporeuses. Notre approche s'est basée sur une technique de microscopie de champ proche, le Zero-Mode Waveguide pour nanopores. Avec cette méthode, nous avons observé la translocation en temps réel de molécules d'ADN uniques à travers des nanopores. Des agents de ratchet, constitués de polycations se liant fortement à l'ADN et ne pouvant pas diffuser à travers le pore, ont été ajoutés à la sortie des nanopores. Nous avons quantifié l'effet de ces agents de ratchet sur la fréquence de translocation des molécules d'ADN et mis en évidence le fonctionnement expérimental du mécanisme de ratchet de translocation. A partir de ces mesures, nous avons défini une efficacité de ratchet que nous avons caractérisée par rapport à ses paramètres géométriques et cinétiques puis nous l'avons comparée à des modèles phénoménologiques. Nous avons notamment observé l'existence d'une longueur critique de 3 kbp pour la taille de la molécule d'ADN pour activer l'effet de ratchet, ce que nous avons expliqué à partir d'un modèle de formation de boucles d'ADN.