



Transport d'ions et d'objets dans des nanopores

Christophe Tasserit

► To cite this version:

Christophe Tasserit. Transport d'ions et d'objets dans des nanopores. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Ecole Polytechnique X, 2011. Français. NNT : . pastel-00589602

HAL Id: pastel-00589602

<https://pastel.hal.science/pastel-00589602>

Submitted on 20 May 2011

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

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

Thèse présentée pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE
Spécialité : physique

par

Christophe TASSERIT

Transport d'ions et d'objets dans des nanopores

soutenue le 15 mars 2011 devant le jury composé de :

Jean-Éric WEGROWE	LSI, Palaiseau	Président du jury
Emmanuel BALANZAT	CIMAP, Caen	Rapporteur
Philippe DÉJARDIN	IEM, Montpellier	Rapporteur
Gilbert ZALCZER	SPEC, Saclay	
Marie-Claude CLOCHARD	LSI, Palaiseau	Co-directrice de thèse
Didier LAIREZ	LLB, Saclay	Directeur de thèse

Remerciements

Parce que ma thèse restera un très agréable souvenir, je tiens à remercier tous ceux qui ont participé aux bons moments que j'ai passés.

Je remercie Didier Lairez, qui a été un très bon directeur de thèse. Ses grandes qualités scientifiques m'ont beaucoup encouragé à progresser. J'ai pu profiter de son sens pratique d'expérimentateur et de ses explications de physique « avec les mains ». Au quotidien, son franc-parler m'a révélé une personnalité beaucoup plus attentionnée que je ne l'avais cru initialement, et d'une honnêteté totale. J'admire également son extrême disponibilité, puisque j'ai toujours pu entrer librement dans son bureau pour des conseils ou des services immédiats.

Je remercie Marie-Claude Clochard pour sa touche féminine au sein de l'équipe de mes encadrants. Sa gentillesse remarquable était très agréable tout au long de mes années de doctorat. J'ai beaucoup apprécié sa vision artistique de la science : elle aime faire de belles choses.

Je remercie Gilbert Zalczer, mon troisième encadrant, qui m'a accueilli dans son bureau pendant toute ma première année. J'ai apprécié son calme, sa patience, sa grande culture scientifique, ses raisonnements instructifs, et son sens aigu du bricolage.

Je remercie Emmanuel Balanzat, pour son accueil chaleureux à Caen et sa disponibilité pour toutes les séances d'irradiations au GANIL.

Je remercie Emmanuel Balanzat et Philippe Déjardin d'avoir accepté de relire mon manuscrit avec attention.

Je remercie Jean-Éric Wegrowe d'avoir orchestré les réflexions de mon jury de soutenance.

Je remercie Martine Soyer, Philippe Mangin et Christiane Alba-Simionesco, directeurs du LSI et du LLB, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie Fabrice Baronnet et toute l'équipe de l'école doctorale, pour leur cordialité, leur écoute permanente et les formations très intéressantes qu'ils proposent.

Je remercie tous mes collègues de m'avoir couvert de cadeaux lors de ma soutenance, mais aussi surtout pour toutes les discussions échangées aux pauses café et dans les couloirs. Je penserai bien à eux quand je serai dans l'avion, quelques minutes avant le grand saut dans le vide !

Je remercie :

- Giulia Fadda d'être elle aussi une fan des nanopores, même s'ils ne sont pas artificiels. Grâce à elle, les paillasses sont propres et bien rangées désormais. Je remercie Giulia pour sa bonne humeur en toute circonstance.
- Lay-Theng Lee pour son calme et sa tasse de thé « Mad Cow ». Ses conseils m'ont été précieux lors de la préparation de mon voyage en Asie.
- Jean-Marc Zanotti pour son humour et son tact.
- Stéphane Longeville pour l'animation des débats des pauses café.
- José Teixeira d'être une encyclopédie vivante.
- Jacques Jestin pour son flegme et son humour de pince-sans-rire.
- Géraldine Carrot pour son infatigable passion pour la course.
- Sophie Combet pour son aide précieuse sur la luciférase et le laboratoire de biologie en général.
- Annie Brûlet pour sa franchise et son humour.
- Natalie Malikova pour son dynamisme.
- François Müller pour sa grande gentillesse, et l'originalité de sa voiture.
- François Boué pour son goût du voyage.
- Marie-Claire Bellissent-Funel pour son intérêt pour mes travaux.
- Alain Lapp pour sa cordialité.
- Laurence Noirez pour sa curiosité sur les liquides ioniques.
- Burkhard Annighöfer pour sa disponibilité, ses petites blagues et son accueil.
- Benoît Homatter pour son extrême gentillesse.
- Jean-Pierre Ambroise pour avoir dessiné et construit des prototypes très perfectionnés pour mes expériences.
- Mohamed Daoud pour son aide sur mes projets à la fin de ma thèse.

Je rends hommage à Xavier Agostini qui m'a donné de nombreux conseils pratiques et qui a réalisé des prototypes pour moi, ainsi qu'à Gabriel Gibrat qui a lui aussi travaillé sur les nanopores, sa soutenance de thèse a été la première à laquelle j'ai assisté.

Je remercie également Christine Houy, Chantal Marais et Aurore Verdier pour leur zèle et leur rapidité.

Je remercie tous mes collègues de m'avoir offert un lance-missiles USB, ainsi que tous ceux qui ont accepté (ou pas) de servir de cible pour m'aider à me changer les idées après la soutenance.

Je remercie François Gal, avec qui j'ai partagé mon bureau du Laboratoire Léon Brillouin pendant deux ans, et qui a dû supporter mon humour pendant tout ce temps. J'ai beaucoup apprécié son léger accent ensoleillé, ses talents de géographie et de moto, son endurance face à l'adversité, son goût pour la bonne chair et pour les canards. Je le remercie d'avoir regardé le film « La revanche du Cobra », ainsi je ne suis pas le seul à avoir vu ce chef-d'œuvre du cinéma.

Je remercie Anne-Sophie Robbes et sa chère Titine pour tous les trajets LLB-Paris, tout en écoutant de la musique de qualité. Très soucieuse de l'ambiance chaleureuse entre thésards du troisième étage du LLB, elle a soutenu toutes les initiatives du petit groupe, en contribuant fortement à y instaurer des relations amicales.

Je remercie Debsindhu Bhowmik pour ces capacités à faire le clown et divertir tout le monde, mais aussi pour les discussions très profondes que j'ai aimé partager avec lui. Je lui souhaite de réaliser ses rêves dans le futur, et je le félicite de son apprentissage rapide de la langue française.

Je remercie Chloé Chevigny pour sa vision originale du monde et ses talents pour cuisiner des desserts succulents et innovants. J'ai beaucoup apprécié sa blague du gars qui saute d'un immeuble avec des courants ascendants...

Je remercie Nicolas Jouault pour son humour et sa disponibilité. Ses qualités de cadreur très stable m'ont permis de tourner le plan du siècle ! J'espère qu'il ne blessera pas au cours de ses nombreux entraînements de musculation. J'ai apprécié également son goût pour les films de qualité, que seulement lui et moi avions vu auparavant : « Starship troopers » 1, 2, et 3, « Fortress », « Total Recall », etc.

Je remercie Céline Labouesse pour sa spontanéité et son enthousiasme de tous les jours, malgré les expériences de luciférase qui ne marchaient pas toujours. Grâce à elle, j'ai eu de nombreuses données utiles pour ma thèse. Je lui souhaite plein de réussite pour sa thèse en Suisse !

Je remercie Alexandros Koutsoumbas à qui je dois un grand savoir-faire : c'est lui le grand expert du perçage des nanopores de Kapton ! Il m'a accompagné sur de nombreuses expériences, et m'a surpris par son savoir théorique et pratique de la physique. J'ai de plus beaucoup apprécié son humour et son calme. Je lui souhaite une carrière de chercheur riche en découvertes, et j'ajoute : Ζητω η Ελλάδα !

Je remercie Émilie Fortas d'apprécier autant mes blagues, auxquelles parfois elle était la seule à sourire. J'ai été ravi de la voir resurgir un beau jour au LLB pour un deuxième stage. Je lui descerne le prix de la personne la

plus rapide du texto que je connaisse.

Je remercie Fabrice Cousin pour son accueil tous les matins, et pour son dévouement à la fonction de maître du café de l'étage. Fabrice restera pour moi une référence en culture musicale des dernières décennies.

Je remercie Caroline Crauste pour sa prévenance envers tous les membres de la fine équipe des non-permanents du troisième étage du LLB. Grande amatrice de chocolat, elle a su entretenir la tradition du chocolat au goûter.

Je remercie Adrien Bouty d'être le M. Michelin de l'étage. J'espère qu'il parviendra un jour à toucher sa cible au lancer de marron.

Je remercie Claire Martret pour son visage souriant et toutes les conversations agréables sur le chemin du bus. Je lui souhaite de belles colonies et beaucoup de courage pour la suite de ses études.

Je remercie Bastien Cayrol d'avoir tenu le labo de biologie pendant de nombreux mois. Je garderai en souvenir le jour où il avait dû marcher dans les couloirs en caleçon, après avoir renversé des produits dangereux sur son pantalon.

Je remercie Anne-Laure Ventureira (hé hé!) pour son dynamisme sans pareil! Je la félicite pour la rédaction si rapide de sa thèse, j'entendais les touches de son clavier se succéder à un rythme effréné. Longue vie aux peaux de tomate et aux Argentins!

Je remercie Adrien Lebreton pour sa participation aux cafés du matin. Grâce à lui, je sais que les clous jouent au tennis pour obtenir la coupe Davis.

Je remercie Aurélie Castanar pour sa grande gentillesse et les belles cartes de vœux qu'elle avait réalisées avec Claire. J'ai beaucoup apprécié la douceur avec laquelle elle parle toujours.

Je remercie Zineb Guennouni de s'être lancée dans une thèse au LLB, ce qui m'a permis de la voir plus que pendant son stage. J'ai apprécié sa sincérité et son goût pour les chaussures confortables.

Je remercie Cynthia pour sa participation très active à ma soutenance et pour les très beaux emballages de cadeaux de thèse.

Je remercie Clémence Le Cœur qui m'a aidé à trouver un logement au début de ma thèse et qui m'a accueilli au CEA. Je la remercie pour tout le temps passé ensemble ces dernières années, en France et aussi en Suède avant nos thèses. Je lui souhaite de réussir un jour à garder un téléphone intact pendant plus d'un mois...

Je remercie Julie Bourgeois de s'être souvent exilée du premier étage du LLB pour nous rejoindre aux débuts de journée.

Je remercie Isaura d'avoir pris soin des thésards et des locaux pendant de nombreuses années. Je lui souhaite une heureuse retraite et de profiter de ses petits enfants.

Je remercie Cédric Slostowski pour sa bonne humeur.

Je remercie Judith Bourguille d'avoir fait ses expériences de nanopores parallèlement aux miennes.

Je remercie Guillaume Couture d'avoir une culture geek bien meilleure que la mienne.

Je remercie Elsa, ancienne stagiaire de Marie-Hélène Mathon, pour les discussions entre voisins du treizième arrondissement.

Je remercie Vincent Glénisson pour l'énergie qu'il arrive à transmettre à tout le monde.

Je remercie Isabelle Colinet pour ses cours de français à Sindhu, ses goûts musicaux originaux (DM !) et ses gâteaux au chocolat décorés aux Smarties. J'ai apprécié les nombreuses rigolades partagées.

Je remercie Camila Rezende d'avoir baptisé les plantes de la pause café « la djeun-gueule ».

Je remercie Prélixia pour sa simplicité et sa joie de vivre.

Je remercie Karine Lagrené pour son attention pour tout le groupe de thésards qu'elle a laissé derrière elle.

Je remercie Perrine Vallat d'être une experte en karaté.

Je remercie Lucie Reversat d'avoir égayé de nombreux repas à la cantine, et d'avoir fait le déplacement pour ma soutenance.

Je remercie Olivia Cuscito d'avoir ouvert mon domaine d'étude avec ses travaux de thèse.

Je remercie Carole Cerclier d'avoir été un membre parallèle du groupe des thésards et d'être venue à la soirée chants scouts.

Je remercie Marie-Bel Le Corre de m'avoir aidé avec les démarches du service médical même lorsque je m'y prenais au dernier moment, et de m'avoir toujours bien accueilli là-bas.

Je remercie mes parents d'avoir préparé et organisé un merveilleux pot pour tous dans une ambiance festive.

Je remercie mes amis d'être venus nombreux à ma soutenance et de m'avoir donné une multitude d'encouragements dans les jours qui l'ont précédée, mais aussi tout au long de mon doctorat.

Sommaire

Introduction	1
1 Historique et état de l'art	3
1.1 Historique de la détection de molécule unique	4
1.2 Le nanopore naturel α -hémolysine	11
1.3 Les nanopores sur support silicium	21
1.4 Les nanopores à trace attaquée	31
2 Préparation et caractérisation	39
2.1 Méthode de l'attaque de traces	40
2.2 Caractérisation de la géométrie	57
2.3 Caractérisation de la paroi du pore	68
3 Transport des ions	83
3.1 Rectification	84
3.2 Effets de confinement	92
3.3 Bruit de conduction électrique	99
4 Translocation et transport d'objets	115
4.1 Translocation de la luciférase	116
4.2 Tentatives de transport	126
Conclusion générale	133
Bibliographie	135
Index	149
Table des figures et des tableaux	151
Table des sigles et abbréviations	159

Introduction

Il est aujourd'hui bien connu que les propriétés des matériaux peuvent être très différentes entre l'échelle macroscopique et nanométrique. Ceci s'explique notamment par l'augmentation du rapport entre surface et volume, qui rend les propriétés surfaciques dominantes. De plus, au fur et à mesure que l'échelle d'observation se rapproche des dimensions moléculaires, la nature discrète de la matière entre en jeu dans les processus physiques. C'est le cas par exemple lorsque la taille d'un appareil électronique s'approche du libre parcours moyen de l'électron, ou lorsque la taille d'un ensemble ionique atteint les distances entre ions de la solution.

Bien que le développement de structures nanométriques se soit sophistiqué seulement récemment, il existe déjà depuis longtemps dans la nature un grand nombre de structures de cette taille. Parmi elles, les canaux ioniques situés dans la membrane des cellules nerveuses sont à l'origine de la création et de la transmission des signaux électriques chez les êtres vivants.

Les nanopores, c'est-à-dire des trous de taille nanométrique, sont des structures dont la taille s'approche de l'échelle moléculaire. Ils peuvent être naturels, comme les canaux ioniques évoqués, ou bien artificiels. Dans tous les cas, ils forment la jonction entre deux solutions séparées par une membrane. Au cours des dernières dizaines d'années, les progrès scientifiques ont permis l'étude du signal électrique fourni par ces nanopores. De nombreuses études se servent de ce signal essentiellement avec deux objectifs. Tout d'abord, il est intéressant de comprendre les mécanismes de transport des ions porteurs de ce signal. Ensuite, ce signal peut être utilisé pour réaliser une détection d'objets plus grands que les ions.

Cette thèse s'inscrit dans ce contexte. Elle est centrée sur un type particulier de nanopores artificiels, obtenus par la technique de l'attaque de trace. Les travaux s'appuient essentiellement sur l'emploi de pores uniques. L'enjeu est de taille puisque ce type de pores n'a été utilisé auparavant que par une seule autre équipe dans le monde. Le but est de caractériser les pores sur lesquels les travaux se font, puis d'utiliser le signal électrique pour explorer les comportements physiques à l'échelle nanométrique.

La thèse s'articule en quatre chapitres, partant d'une description du système pour aller à son emploi comme détecteur, en passant par une analyse critique de la littérature le concernant et en présentant un phénomène n'ayant pas encore été remarqué, le confinement des ions dans un nanopore.

Le CHAPITRE 1 est une présentation détaillée des nanopores. Il suit l'ordre chronologique pour décrire les avancées technologiques et la compréhension progressive des nanopores. Il décrit les différents types de pores existant, naturels et artificiels, en évoquant leurs avantages et leurs inconvénients. Ainsi, les nanopores artificiels obtenus par attaque de trace, principaux objets de l'étude menée dans cette thèse, sont situés par rapport au domaine général des nanopores.

Le CHAPITRE 2 donne une description aussi complète que possible des nanopores utilisés. Il commence par une présentation du processus de fabrication. Ensuite, il expose plusieurs techniques expérimentales permettant d'obtenir des informations sur les différents aspects des pores, comme leur géométrie ou les propriétés de leur surface. Ainsi, la connaissance du système utilisé permet une étude approfondie des signaux dans la suite de la thèse.

Le CHAPITRE 3 s'intéresse au transport des ions à travers un nanopore. L'intérêt est porté tout d'abord sur la rectification, phénomène déjà largement étudié dans la littérature. Ensuite, un regard nouveau sur le confinement des ions est apporté, qui quant à lui n'a pas encore été évoqué chez d'autres équipes. Il affecte notamment les mesures destinées à la caractérisation géométrique des pores, ainsi que les mesures électriques destinées à la détection de molécules.

Enfin, le CHAPITRE 4 s'attache à un sujet plus classique dans le domaine des nanopores, à savoir le transport d'objets biologiques ou synthétiques, ainsi que la translocation de molécules linéaires. Une première partie présente le succès d'une expérience réalisée avec un nanopore naturel. La seconde évoquera de multiples expériences menées avec des nanopores artificiels en s'interrogeant sur les échecs d'observation de signaux analogues à ceux obtenus avec le pore naturel.

La thèse se finalise par une conclusion qui présente la portée des résultats obtenus et de leurs conséquences dans le domaine scientifique des nanopores, et, plus généralement, des matériaux à l'échelle nanométrique.

Chapitre 1

Historique et état de l'art

On présente dans ce chapitre les différents résultats déjà obtenus ces dernières années afin de situer le contexte du travail de cette thèse.

Sommaire

1.1	Historique de la détection de molécule unique . . .	4
1.1.1	Pourquoi étudier une molécule unique ?	4
1.1.2	Observation de particules sub-millimétriques	6
1.1.3	De particule unique à molécule unique	8
1.2	Le nanopore naturel α-hémolysine	11
1.2.1	Présentation de l' α -hémolysine	11
1.2.2	Translocation de macromolécules	13
1.2.3	Translocation de polymères biologiques	15
1.2.4	Avantages et limitations des nanopores naturels . . .	17
1.3	Les nanopores sur support silicium	21
1.3.1	Développement	21
1.3.2	Translocation dans des pores sur support silicium .	24
1.4	Les nanopores à trace attaquée	31
1.4.1	Présentation	31
1.4.2	Translocation de macromolécules	34

1.1 Historique de la détection de molécule unique

1.1.1 Pourquoi étudier une molécule unique ?

La physique et la biologie étaient originellement deux domaines distincts de la science. Le siècle dernier a été témoin d'un rapprochement de ces deux champs d'étude. La biologie a pu profiter des techniques d'expérimentation de la physique pour mieux comprendre les systèmes vivants. Un exemple particulièrement probant est la découverte de la structure en double-hélice de la molécule d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), par J. D. Watson et F. H. C. Crick en 1953 [1]. Il s'agissait des débuts de la biophysique.

Dans sa revue « Biological physics » de 1999 [2], H. Frauenfelder annonce que de nos jours, les expériences sur molécules uniques sont devenues centrales dans la physique de la biologie. Comme l'explique F. Ritort [3], ces expériences apportent une perspective différente et complémentaire pour comprendre les processus moléculaires. Contrairement aux expériences réalisées en solution, aucune moyenne n'est faite. On étudie une seule molécule au lieu d'une population de molécules identiques.

Pour illustrer la différence fondamentale entre molécule (ou signal) unique et population de molécules, voici l'exemple d'un système simple et fictif.

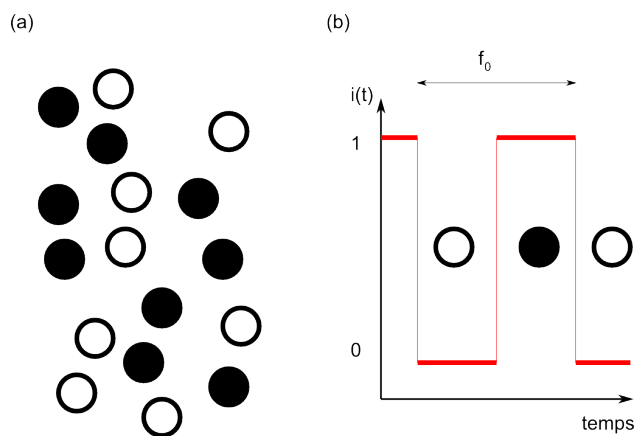


FIGURE 1.1 – Schéma du système étudié.

-
- [1] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356) :737–738, 1953.
 - [2] H. Frauenfelder, P. G. Wolynes, and R. H. Austin. Biological physics. *Reviews of Modern Physics*, 71(2) :S419–S430, March 1999.
 - [3] F. Ritort. Single-molecule experiments in biological physics : methods and applications. *Journal of Physics-condensed Matter*, 18(32) :R531–R583, August 2006.

On étudie un système composé d'oscillateurs, qui se trouvent soit à l'état 1 soit à l'état 0 (cf. figure 1.1, schéma (a)). Chaque oscillateur change d'état à une fréquence f_0 (cf. figure 1.1, schéma (b)). La fréquence f_0 est choisie intrinsèque au comportement de l'oscillateur, elle est la même pour chaque élément. En revanche, la phase peut varier d'un élément à un autre, car ils sont choisis indépendants les uns des autres.

Si un seul oscillateur est présent, on obtient un signal simple traduisant directement le comportement de cet élément. Si un deuxième oscillateur vient s'ajouter au système, son signal va s'additionner au premier (cf. figure 1.2). La mesure permet encore de différencier les signaux provenant de chaque élément, car le système est encore très simple. Si d'autres oscillateurs viennent encore s'ajouter, il devient de plus en plus difficile de pouvoir déduire de la mesure le comportement d'un unique élément. La figure montre également la simulation d'un signal pour 512 oscillateurs dans le système. La perte d'informations est plus visible.

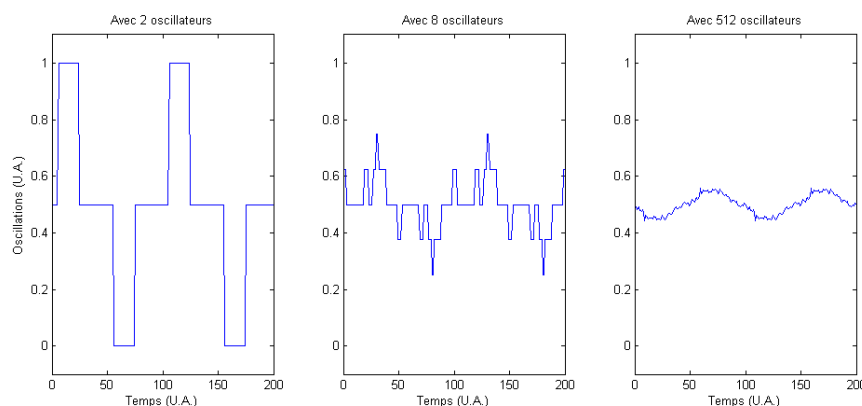


FIGURE 1.2 – Signal obtenu pour 2, 8, et 512 oscillateurs.

Le signal montre encore une composante oscillante à f_0 , mais elle peut facilement disparaître si le signal est bruité, ou si le nombre d'éléments continue d'augmenter. Cette situation est exposée sur la figure 1.3. Un bruit blanc a été ajouté à la simulation. Pour le système à un oscillateur, le signal est suffisant pour déterminer la fréquence f_0 . Cependant, cela n'est pas possible pour un système à 10 000 éléments, car le signal est devenu inférieur au bruit.

Cet exemple montre que l'observation d'un système comportant un nombre très grand d'éléments, comme c'est le cas pour les méthodes classiques de physique, ne donne pas toujours accès aux mécanismes à l'échelle moléculaire. Les expériences à molécule ou signal unique sont donc complémentaires aux méthodes traditionnelles.

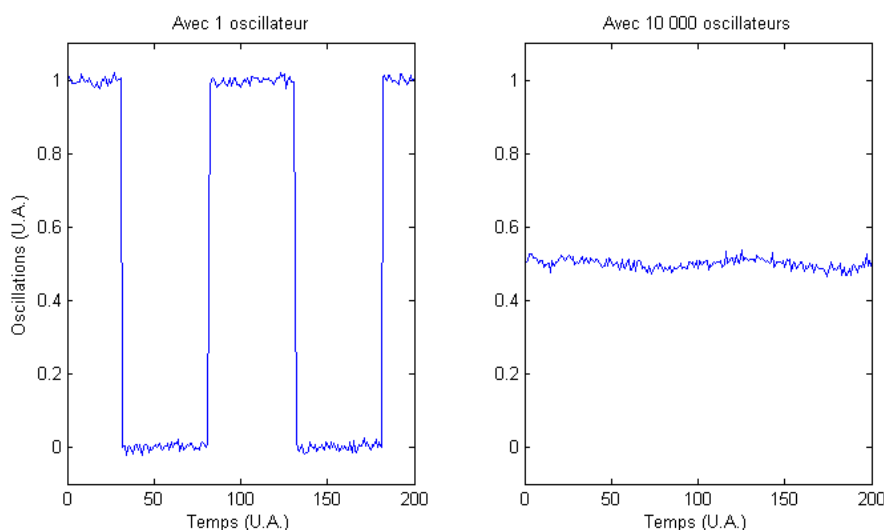


FIGURE 1.3 – Signal obtenu pour 1 et 10 000 oscillateurs, avec du bruit.

Plusieurs méthodes permettent actuellement de manipuler et d'analyser une molécule unique, telles que la microscopie à force atomique, les pinces optiques à laser, les pinces magnétiques, et le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes. La méthode la plus ancienne est le transport dans un pore nanométrique, il s'agit de la technique utilisée dans le travail de cette thèse, et dont l'historique est exposé ci-dessous.

1.1.2 Observation de particules sub-millimétriques

Au cours des années 1950, l'ingénieur et homme d'affaires Wallace H. Coulter (1913-1998) met au point le compteur qui portera son nom. Cet instrument, breveté en 1953 [4], sert à analyser des objets en solution. Il permet d'observer de très petites particules, comme des cellules humaines par exemple, de manière individuelle. Il se perfectionnera par la suite, et trouvera sa principale application en médecine. En 1960, des scientifiques utilisent déjà le compteur de Coulter de manière automatisée afin d'analyser les cellules du sang [5].

Le principe de fonctionnement est présenté sur la figure 1.4. Une solu-

[4] W. H. Coulter. Means for counting particles suspended in a fluid, 1953.

[5] G. Ruhenstroth-Bauer and D. Zang. [automatic counting method : the coulter particle counting apparatus.]. *Blut*, 6(Suppl) :446-62, 1960.

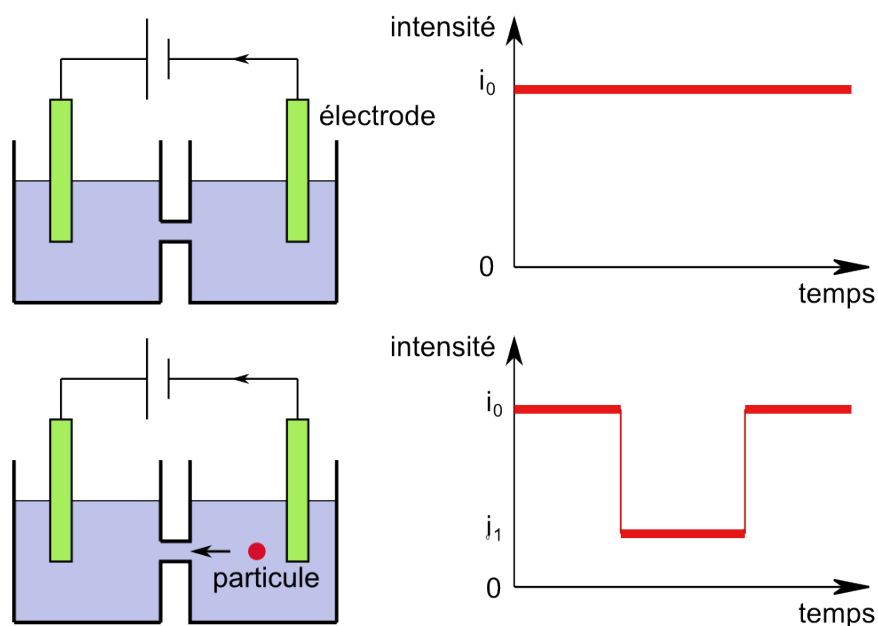


FIGURE 1.4 – Principe du compteur de Coulter.

tion conductrice immerge deux compartiments reliés par un petit trou. Deux électrodes sont placées de chaque côté. Elles sont reliées à un générateur de tension continue et à un appareil de mesure de l'intensité électrique. On peut ainsi mesurer le courant électrique traversant le petit trou. Ce courant est dû aux ions de la solution conductrice. On étudie ses variations dans le temps. Dans le premier cas, en l'absence de particules, le courant électrique possède une valeur i_0 , constante. Si une particule, comme une cellule sanguine par exemple, de taille comparable aux dimensions du trou, passe au travers du trou, elle va gêner le passage des ions. Ainsi, durant son passage dans le trou, on observe une chute de l'intensité électrique vers la valeur i_1 . Une fois la particule passée, le courant reprend sa valeur initiale i_0 .

Comme la chute de courant est directement liée à la particule qui traverse le pore, l'évolution du courant électrique peut être interprétée comme une signature. Les caractéristiques suivantes vont influencer sur le signal enregistré :

La taille de la particule. Plus la particule est grosse, plus elle va gêner le passage des ions dans le trou, et plus le saut d'intensité, Δi , sera grand (cf. figure 1.5, cas (a) et (b)).

La forme de la particule. Plus la particule est longue, plus elle va gêner longtemps le passage des ions dans le trou, et plus la durée du saut

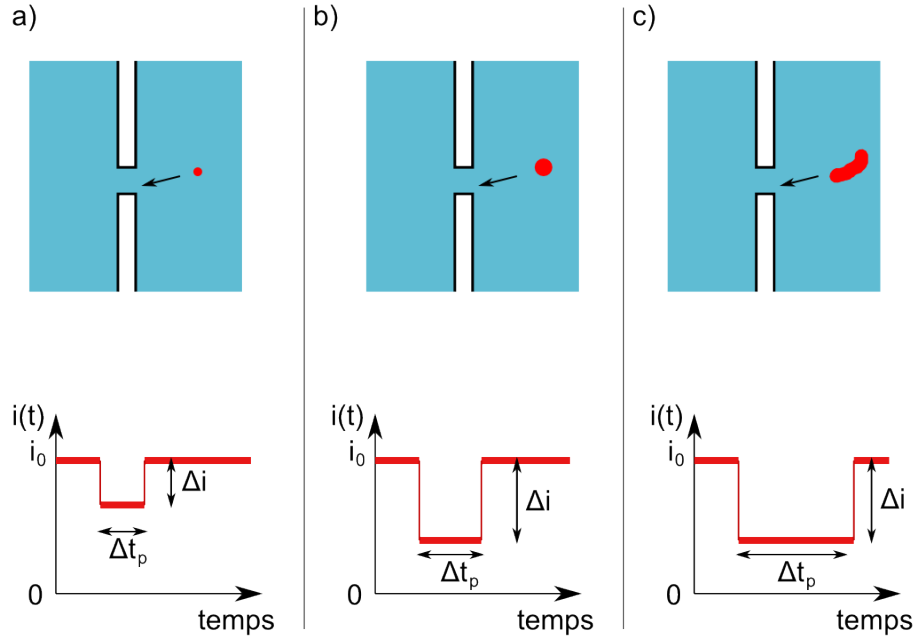


FIGURE 1.5 – Influence de la forme géométrique de la particule.

d'intensité, Δt_p , sera longue (cf. figure 1.5, cas (c)).

La concentration en particules. Plus les particules sont concentrées, plus les sauts d'intensité sont fréquents, et plus le temps intermédiaire entre deux sauts, Δt_i , aura une moyenne courte (cf. figure 1.6).

Bien sûr, d'autres facteurs entrent en jeu, comme par exemple les interactions entre les particules et les parois du trou, et la force motrice des particules. Tout cela complexifie le signal observé.

1.1.3 De particule unique à molécule unique

Le compteur de Coulter permet de détecter une particule de petite taille, de l'ordre du dixième de millimètre. Pour pouvoir prétendre à la détection d'un objet aussi petit qu'une molécule, il faut trouver un trou de taille comparable. Dans les années 1970, personne n'est capable de créer un tel trou. Cependant, les progrès réalisés en biologie libèrent de nouveaux horizons pour la progression vers les échelles nanométriques. En effet, on sait que les cellules nerveuses communiquent par l'échange de neurotransmetteurs. La réception de ceux-ci s'effectue par des canaux nanométriques, sensibles au passage d'une unique molécule de neurotransmetteur. Étant présents en grand nombre à la surface d'une cellule, il n'était jusqu'alors possible que

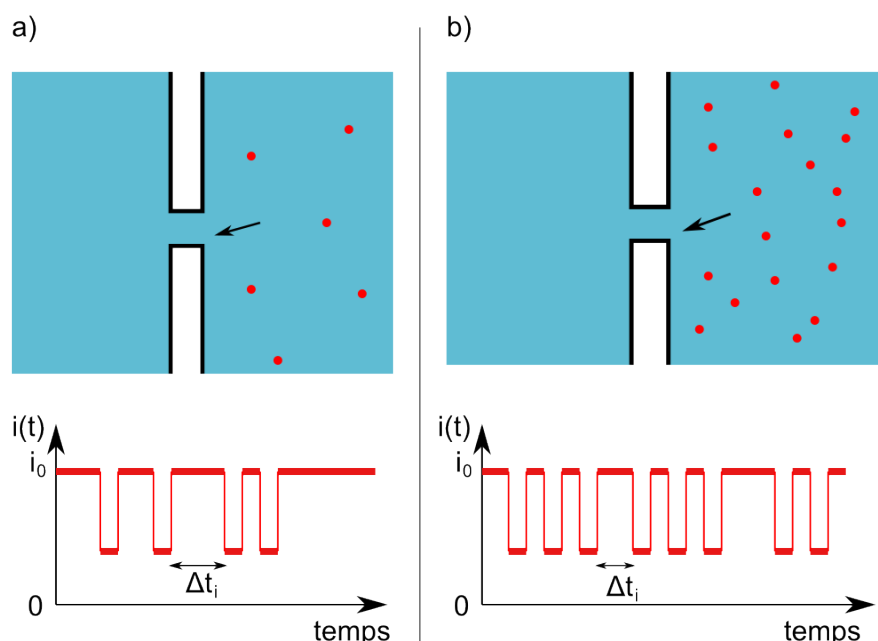


FIGURE 1.6 – Influence de la concentration en particules.

d'observer le signal provenant d'un nombre macroscopique de ces canaux [6]. Ainsi, l'intensité électrique était la somme de nombreuses intensités électriques correspondant à chaque canal. En observant uniquement la moyenne, on perdait une grande partie de l'information microscopique.

En 1976, E. Neher et B. Sakmann, déjà spécialistes des canaux ioniques ([7], [8], [9]), développent la méthode du « patch-clamp » [10] qui rend possible l'observation du signal électrique d'un unique canal. Ces deux chercheurs confirment l'observation de signaux de conductance discrets par S. B. Hladky

-
- [6] E. Neher and B. Sakmann. Noise-analysis of drug-induced voltage clamp currents in denervated frog muscle-fibers. *Journal of Physiology-london*, 258(3) :705–729, 1976.
 - [7] W. Betz and B. Sakmann. Disjunction of frog neuromuscular synapses by treatment with proteolytic enzymes. *Nature-new Biology*, 232(29) :94, 1971.
 - [8] B. Sakmann. Noise-analysis of acetylcholine induced currents in normal and denervated rat muscle-fibers. *Pflugers Archiv-european Journal of Physiology*, 359 :R89–R89, 1975.
 - [9] E. Neher and B. Sakmann. Voltage-dependence of drug-induced conductance in frog neuromuscular-junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6) :2140–2144, 1975.
 - [10] E. Neher and B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers. *Nature*, 260(5554) :799–802, 1976.

et D. A. Haydon en 1970 [11]. Il s'agit d'un pas immense dans l'histoire de l'électro-physiologie, et ils obtiendront pour cela le prix Nobel en 1991. Pour la première fois, il est possible d'observer un signal de même nature que celui présenté précédemment pour le compteur de Coulter, mais à une échelle nanométrique, pour un canal ionique détectant des molécules d'acétylcholine ($M = 142 \text{ g.mol}^{-1}$).

Les expériences de patch-clamp vont se répandre dans les laboratoires. Différents canaux ioniques naturels vont être testés avec différentes molécules. Cette technique va intéresser principalement le domaine de la biologie.

[11] S. B. Hladky and D. A. Haydon. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in presence of certain antibiotics. *Nature*, 225(5231) :451–&, 1970.

1.2 Le nanopore naturel α -hémolysine

1.2.1 Présentation de l' α -hémolysine

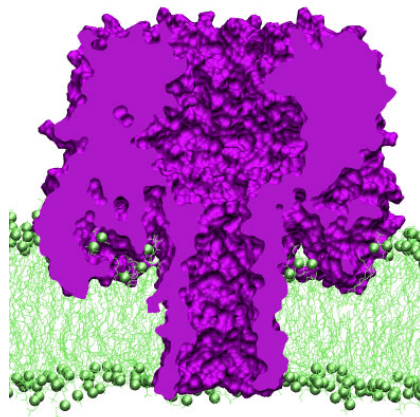


FIGURE 1.7 – Vue en coupe d'un pore d' α -hémolysine inséré dans une bicouche lipidique [12].

L' α -hémolysine est une exotoxine de la bactérie *Staphylococcus Aureus*. Elle se présente sous la forme d'un heptamère à géométrie cylindrique s'insérant dans une bicouche lipidique (cf. figure 1.7 [12]). A l'état naturel, elle est produite par la bactérie, ce qui a pour effet de crever les globules rouges et de les vider des nutriments dont celle-ci a besoin. En laboratoire, l' α -hémolysine s'avère être un pore utilisable avec la méthode du patch-clamp. Sa taille, plus grande que la plupart des canaux ioniques existants, permet le passage de molécules plus volumineuses que les neurotransmetteurs.

En 1968, l'équipe de J. H. Freer s'intéresse au mode d'action de la toxine sur les membranes cellulaires [13]. De nombreux clichés MEB (Microscopie Électronique à Balayage) montrent une toxine de forme annulaire et qui sectionne les membranes en forte concentration (cf. figure 1.8 [13]). Freer continuera d'étudier les mécanismes d'action de la toxine sur les globules rouges. De nouvelles techniques s'ajouteront à ses diagnostics, comme le « freeze-etching »

-
- [12] Theoretical and computational biophysics group, university of illinois at urbana-champaign, 2006. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/hemolysin/>.
- [13] J. H. Freer, J. P. Arbuthno, and A. W. Bernheim. Interaction of staphylococcal alpha-toxin with artificial and natural membranes. *Journal of Bacteriology*, 95(3) :1153–&, 1968.

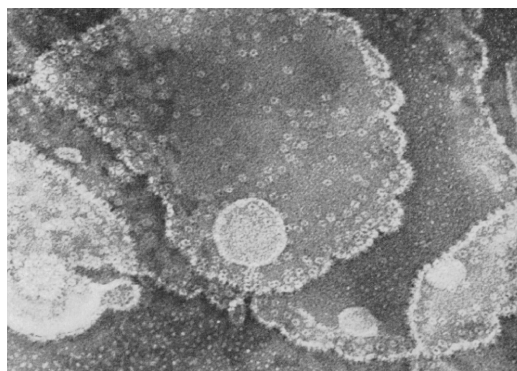


FIGURE 1.8 — Des toxines α -hémolysines s'attaquent à une membrane cellulaire. Les anneaux mesurent 85 à 90 Å de diamètre. Grossissement $\times 300\,000$ [13].

et des méthodes biochimiques [14]. Plus tard, la structure de l' α -hémolysine sera connue grâce aux rayons X. À l'heure actuelle, on dispose d'une précision de 1,9 Å sur cette structure [15], [16].

En 1987, la technique du patch-clamp est utilisée pour étudier les mécanismes d'insertion de la toxine dans une membrane lipidique [17]. L'équipe de G. Belmonte utilise un grand nombre de toxines et des membranes bilipidiques synthétiques, et observe des sauts consécutifs de courant, correspondant aux insertions successives des pores dans la membrane. Il étudie ensuite l'évolution temporelle du courant en fonction de la température et de la concentration en α -hémolysine.

La stabilité du pore en fonction de la protonation est étudiée par l'équipe de Kasianowicz [18]. Ce travail montre que le pK_a de la surface interne du

-
- [14] J. H. Freer, J. P. Arbuthno, and Billcliff B. Effects of staphylococcal alpha-toxin on structure of erythrocyte-membranes - biochemical and freeze-etching study. *Journal of General Microbiology*, 75(APR) :321–332, 1973.
 - [15] L. Z. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294) :1859–1866, December 1996.
 - [16] E. Gouaux. [alpha]-hemolysin from staphylococcus aureus : An archetype of [beta]-barrel, channel-forming toxins. *Journal of Structural Biology*, 121(2) :110–122, 1998.
 - [17] G. Belmonte, L. Cescatti, B. Ferrari, T. Nicolussi, M. Ropele, and G. Menestrina. Pore formation by staphylococcus-aureus alpha-toxin in lipid bilayers - dependence upon temperature and toxin concentration. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, 14(6) :349–358, 1987.
 - [18] J. J. Kasianowicz and S. M. Bezrukov. Protonation dynamics of the alpha-toxin ion-channel from spectral-analysis of ph-dependent current fluctuations. *Biophysical*

pore est de 5,5 et il étudie les différences de comportement entre un milieu $^1\text{H}_2\text{O}$ et $^2\text{H}_2\text{O}$.

1.2.2 Translocation de macromolécules

La translocation en biologie

Le terme « translocation » désigne le passage séquentiel d'une molécule linéaire au travers d'un nanopore, situé au sein d'une membrane séparant deux milieux.

En biologie, les macromolécules linéaires présentes dans les cellules sont l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), l'ARN (Acide RiboNucléique) et les protéines.

La translocation de l'ADN n'est pas un processus naturel pour une cellule eucaryote, car cette molécule reste à l'intérieur du noyau. En revanche, certains virus infectent leur cellules cibles par injection d'un brin d'ADN, ceci se fait par translocation.

L'ARN messager résulte de la transcription de l'ADN dans le noyau. C'est lui qui communique la séquence génétique au réticulum endoplasmique, situé en dehors du noyau, pour y permettre la synthèse des protéines. Ainsi, l'ARN messager est l'objet d'une translocation à travers la membrane nucléaire.

Les protéines, quant à elles, peuvent subir de nombreuses translocations avant d'acquérir leur structure tertiaire. En effet, leur site de destination peut être très éloigné du réticulum endoplasmique, là où la plupart sont synthétisées. Le cas de la mitochondrie est un exemple particulièrement intéressant. Il s'agit d'une organelle gérant les apports énergétiques de la cellule. Elle est située dans le cytoplasme de la cellule. Elle possède son propre ADN, appelé ADN mitochondrial. Pourtant, 99 % des protéines qu'elle possède proviennent du réticulum endoplasmique [19]. Une protéine utilisée dans le lumen de la mitochondrie a donc subi des translocations successives à travers la paroi du réticulum endoplasmique, ainsi qu'à travers des parois externes et internes de la mitochondrie.

Le schéma général de la translocation d'une protéine dans une cellule, pro-caryote ou eucaryote, est schématisé sur la figure 1.9. La protéine est conduite jusqu'à la membrane, où elle se lie à un récepteur. Elles sont transférées à un translocon inséré dans la membrane. Elles sont relâchées soit latéralement dans la membrane, soit complètement à travers la membrane avec l'aide de chaperones situées sur la surface de l'autre côté de la membrane.

Journal, 69(1) :94–105, July 1995.

- [19] W. Wickner and R. Schekman. Protein translocation across biological membranes. *Science*, 310(5753) :1452–1456, December 2005.

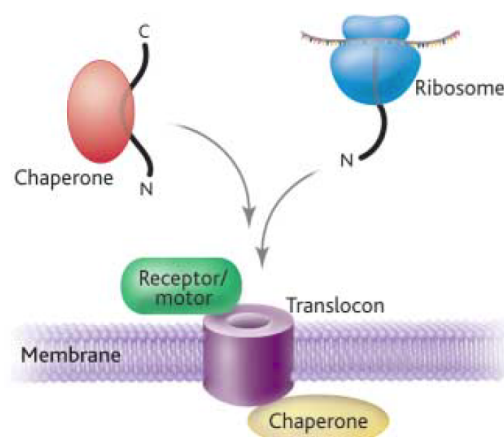


FIGURE 1.9 – Modèle général de la translocation d'une protéine dans une cellule [19].

Translocation de macromolécules non biologiques dans l' α -hémolysine

Le nanopore naturel qu'est l' α -hémolysine se révèle particulièrement adapté à la translocation, puisque le diamètre intérieur de son lumen est d'environ 16 Å [16].

Les premiers résultats de translocation à travers l' α -hémolysine ont été obtenus avec des polymères en solution, tels que le PEG (PolyÉthylène Glycol) ou des sucres. L'équipe de Krasilnikov, en 1992, utilise du PEG pour déterminer la taille interne du pore [20].

L'utilisation de polymères tels que le PEG permet aussi d'étudier d'autres pores que l' α -hémolysine. C'est ce que réalise l'équipe de Bezrukov en 1996 [21].

En 1995, l'équipe de Korchev s'aperçoit que la différence de conduction entre les états ouverts et fermés du pore ne peut pas s'expliquer uniquement par des arguments géométriques [22]. En effet, lorsqu'un polymère occupe la moitié de la surface du lumen, le courant électrique transmembranaire

-
- [16] E. Gouaux. $[\alpha]$ -hemolysin from staphylococcus aureus : An archetype of $[\beta]$ -barrel, channel-forming toxins. *Journal of Structural Biology*, 121(2) :110–122, 1998.
 - [20] O. V. Krasilnikov, R. Z. Sabirov, V. I. Ternovsky, P. G. Merzliak, and J. N. Muratkhodjaev. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol Immunol*, 5(1-3) :93–100, September 1992.
 - [21] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, and V. A. Parsegian. Counting polymers moving through a single-ion channel. *Nature*, 370(6487) :279–281, July 1994.
 - [22] Y. E. Korchev, C. L. Bashford, G. M. Alder, J. J. Kasianowicz, and C. A. Pasternak. Low-conductance states of a single-ion channel are not closed. *Journal of Membrane Biology*, 147(3) :233–239, October 1995.

est diminué d'un facteur supérieur à 10. D'autres éléments entrent donc en compte sur le rapport de conduction ouvert/fermé.

Moins d'un an plus tard, Bezrukov et Kasianowicz s'associent pour s'intéresser à la dynamique et à l'aspect énergétique de la translocation de polymères [23]. Dans cette étude, notamment, le bruit du signal est analysé en fréquence. Les translocations de molécules de PEG de différentes longueurs mettent en exergue un phénomène nouveau : pour une longueur de 2 000 monomères, le bruit du signal est plus important que pour n'importe quelle autre longueur de chaîne. La translocation de polymères ou polyélectrolytes reste actuellement un moyen de mieux comprendre les mécanismes généraux de la translocation dans un nanopore [24].

Toutes ces études ont permis de mieux interpréter un signal, en terme de temps de passage, fréquence des sauts d'intensité appelés « événements », et différence d'intensité électrique entre les états ouvert et fermé.

1.2.3 Translocation de polymères biologiques

Pour la première fois de l'histoire, en 1996, l'équipe de Kasianowicz réalise la translocation de molécules d'ADN, dans un pore d' α -hémolysine [25]. Un nanopore unique est d'abord préparé sur une membrane lipidique. Ensuite, l'ajout de molécules d'ADN ou d'ARN (Acide RiboNucléique) provoque des événements, enregistrés sur bande magnétique (cf. figure 1.10). L'étude qui est faite présente deux résultats principaux :

- La durée de translocation d'un brin d'ADN est proportionnelle au nombre de ses nucléotides.
- Seul l'ADN simple brin, par opposition à l'ADN double brin, peut transloquer à travers l' α -hémolysine.

J. Kasianowicz annonce : « With further improvements, the method could in principle provide direct, high-speed detection of the sequence of bases in single molecules of DNA or RNA. [Grâce à de futures améliorations, la

-
- [23] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, and J. J. Kasianowicz. Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore. *Macromolecules*, 29(26) :8517–8522, December 1996.
- [24] G. Oukhaled, L. Bacri, J. Mathe, J. Pelta, and L. Auvray. Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores. *Epl*, 82(4) :48003, May 2008.
- [25] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24) :13770–13773, November 1996.

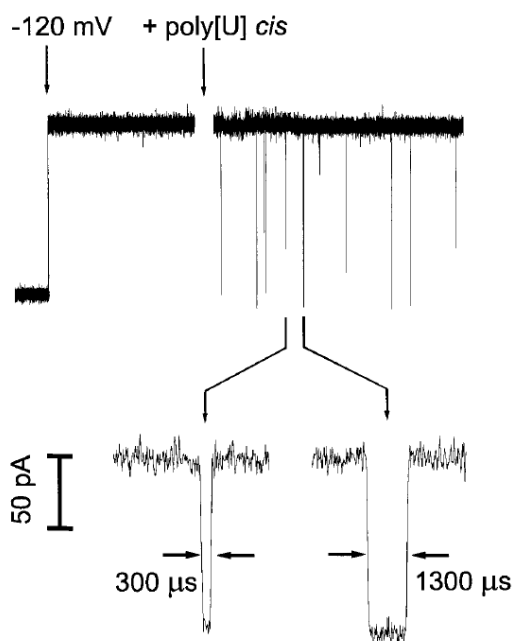


FIGURE 1.10 – Observation de blocages de courant lors du passage de brins homopolymères d'ARN [25].

méthode pourrait en principe donner une détection directe et rapide de la séquence de bases de molécules uniques d'ADN ou d'ARN.] »

L'idée est d'observer les variations de l'intensité électrique dans le temps, en espérant trouver une valeur différente pour chaque base de l'acide nucléique (cf. figure 1.11).

La découverte importante de Kasianowicz va être la première étape de nombreux efforts pour la course au séquençage par translocation. Les résultats obtenus se révèlent très prometteurs.

L'équipe de Kasianowicz, en 1999, utilise différents brins d'ARN et parvient à faire la distinction entre des brins qui ne diffèrent que par leur séquence [26]. Ainsi, l'acide polycytidylique, l'acide polyadénylique, et l'acide polyuridylique peuvent être identifiés, en tant qu'homopolymères ou même en tant que segments d'une unique molécule d'ARN. Cette distinction nécessite un échantillonnage du signal de l'ordre de la microseconde.

[26] M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, and D. W. Deamer. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single rna molecules. *Biophysical Journal*, 77(6) :3227–3233, December 1999.

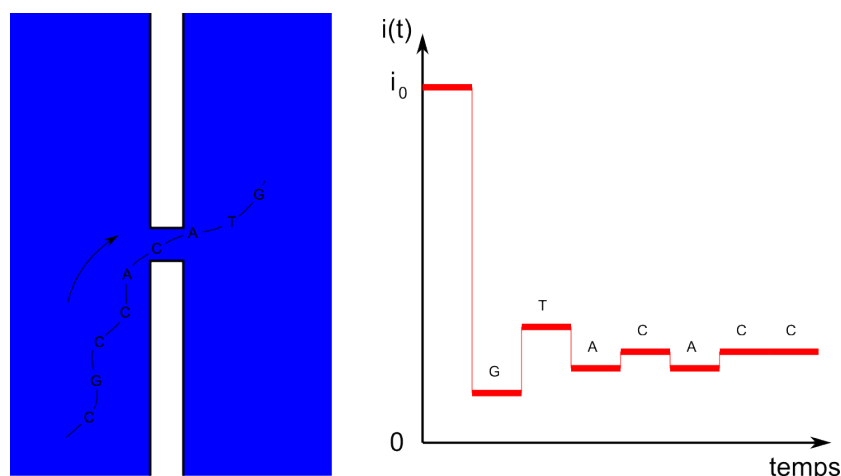


FIGURE 1.11 – Théorie du séquençage par translocation.

De leur côté, en 2000, J. Golovchenko et son équipe tentent aussi de différencier les bases du génôme. Ils parviennent à faire la distinction d'homopolymères d'ADN d'une centaine de monomères, ainsi que des hétéropolymères séquencés d'une cinquantaine de bases [27].

Les expériences se poursuivent, et l'année suivante, de nouveaux résultats sont obtenus pour des brins d'ADN plus courts [28]. La vitesse de translocation dépend de la longueur du brin. L'équipe s'aperçoit que pour une longueur inférieure à la longueur du nanopore, c'est-à-dire 12 bases, le comportement change sensiblement et la vitesse de passage augmente beaucoup, alors qu'elle reste environ constante pour des brins plus longs.

1.2.4 Avantages et limitations des nanopores naturels

Avantages

La principale qualité de l' α -hémolysine est la reproductibilité des expériences. Chaque monomère qui la constitue est identique, et par conséquent chaque heptamère constitué est assemblé de la même façon. Pour une concentration en KCl de 1 M, la conductance du pore est de 1 nS [25], et cette valeur

-
- [27] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, and D. Branton. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3) :1079–1084, February 2000.
 - [28] A. Meller, L. Nivon, and D. Branton. Voltage-driven dna translocations through a nanopore. *Physical Review Letters*, 86(15) :3435–3438, April 2001.
 - [25] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the*

reste toujours la même.

De plus, comme ce pore est naturel, il est possible d'intervenir artificiellement sur le code génétique, afin de lui ajouter de nouvelles fonctionnalités. Ceci a été fait notamment par l'équipe de Braha en 1997 [29]. L'idée était d'ajouter des acides aminés spécifiques à l'intérieur du lumen, par mutagenèse dirigée. Ceux-ci réagissent spécifiquement avec les ions métalliques divalents présents en solution. En jouant sur les différentes combinaisons d'heptamères possibles avec des monomères sauvages et mutants (cf. figure 1.12), il est possible d'analyser précisément la solution.

(a)	Possible permutations	Percent occurrence at mixing ratio of:		
		5:1	1:1	1:5
WT ₇		27.9	0.78	0.0003
WT ₆ MUT ₁		39.1	5.47	0.013
WT ₅ MUT ₂		23.4	16.4	0.19
WT ₄ MUT ₃		7.81	27.3	1.56
WT ₃ MUT ₄		1.58	27.3	7.81
WT ₂ MUT ₅		0.19	16.4	23.4
WT ₁ MUT ₆		0.013	5.47	39.1
MUT ₇		0.0003	0.78	27.9

FIGURE 1.12 – Étude des combinaisons possibles de monomères sauvages et mutants [29].

Limitations

Tout d'abord, les nanopores naturels sont des protéines. Dans le cas particulier de translocation de protéines, un agent chimique dénaturant, tel que la guanidine ou un sel de guanidinium, doit être ajouté à la solution. Il a pour effet de détruire, selon sa concentration, les structures quaternaire, tertiaire voire secondaire des protéines. Ainsi, sous forme linéaire, elles peuvent pénétrer dans le vestibule de l' α -hémolysine sans être bloquées stériquement. La limitation, dans ce cas, correspond à la dénaturation du vestibule du pore lui-même, qui conduit à forte concentration de dénaturant à son instabi-

National Academy of Sciences of the United States of America, 93(24) :13770–13773, November 1996.

- [29] O. Braha, B. Walker, S. Cheley, J. J. Kasianowicz, L. Z. Song, J. E. Gouaux, and H. Bayley. Designed protein pores as components for biosensors. *Chemistry & Biology*, 4(7) :497–505, July 1997.

lité [30], [31].

De plus, l'inconvénient principal des nanopores naturels reste leur faible longévité. En effet, ils sont étudiés par insertion dans une membrane bilipidique synthétique. Le problème provient non pas des nanopores naturels eux-mêmes, mais de cette membrane qui leur sert de support. En effet, cette dernière est aussi fragile qu'une bulle de savon, et peut éclater à la moindre perturbation. Elle est sensible à la température, au pH et à la force ionique. De plus, sa durée de vie est de l'ordre de l'heure.

Pour combler les insuffisances des pores biologiques, et pour ouvrir de nouvelles possibilités dans le monde de la translocation, d'autres types de nanopores, dits artificiels, ont été mis au point. En voici une brève description, inspirée par les revues de Bayley et Martin de 2000 [32], et celle de Howorka et Siwy de 2009 [33].

Les nanopipettes de verre. C'est avec des nanopipettes que Neher et Sakmann ont réussi à isoler des canaux biologiques. Elles sont obtenues par échauffement laser et étirement d'une pipette millimétrique. Récemment, l'équipe de Karhanek a réussi à observer des pics de résistivité correspondant aux passages de brins d'ADN liés à des nanoparticules d'or [34]. On peut obtenir des tailles de pores aussi faibles qu'environ 25 nm de rayon.

Les nanopores sur support silicium. C'est en 2001 qu'est créé le premier nanopore sur support solide, par l'équipe de Golovchenko [35]. Ils nomment la technique « ion-beam sculpting », c'est-à-dire sculpture par faisceau d'ions. Le matériau utilisé est le nitrure de silicium. Des pores

-
- [30] M. Pastoriza-Gallego, G. Oukhaled, J. Mathe, B. Thiebot, J. M. Betton, L. Auvray, and J. Pelta. Urea denaturation of alpha-hemolysin pore inserted in planar lipid bilayer detected by single nanopore recording : Loss of structural asymmetry. *Febs Letters*, 581(18) :3371–3376, July 2007.
 - [31] R. K. Bortoleto and R. J. Ward. A stability transition at mildly acidic pH in the alpha-hemolysin (alpha-toxin) from staphylococcus aureus. *Febs Letters*, 459(3) :438–442, October 1999.
 - [32] H. Bayley and C. R. Martin. Resistive-pulse sensing - from microbes to molecules. *Chemical Reviews*, 100(7) :2575–2594, July 2000.
 - [33] S. Howorka and Z. Siwy. Nanopore analytics : sensing of single molecules. *Chemical Society Reviews*, 38(8) :2360–2384, 2009.
 - [34] M. Karhanek, J. T. Kemp, N. Pourmand, R. W. Davis, and C. D. Webb. Single dna molecule detection using nanopipettes and nanoparticles. *Nano Letters*, 5(2) :403–407, February 2005.
 - [35] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, and J. A. Golovchenko. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*, 412(6843) :166–169, July 2001.

très petits peuvent être obtenus, avec des rayons inférieurs à 2 nm [36]. Ce type de nanopore est étudié plus précisément dans la section 1.3, page 21.

Les nanopores à trace attaquée. C'est ce type de pores qui est majoritairement utilisé dans cette thèse. Il est réalisé à partir d'un film polymère. Après l'irradiation par un ou plusieurs ions lourds, on réalise une attaque chimique qui perce le pore. Cette méthode fournit des pores également très petits, pouvant atteindre un rayon inférieur au nanomètre [37]. Ce type de nanopores est décrit plus amplement dans la section 1.4, page 31.

Les nanotubes de carbone et les pores de graphène. Une équipe a récemment réussi à observer des signaux correspondant au passage de brins d'ADN dans des nanotubes de carbone à simple épaisseur [38], ainsi que dans un nanopore percé dans un plan de graphène [39].

-
- [36] D. M. Stein, C. J. McMullan, J. L. Li, and J. A. Golovchenko. Feedback-controlled ion beam sculpting apparatus. *Review of Scientific Instruments*, 75(4) :900–905, April 2004.
 - [37] J. E. Wharton, P. Jin, L. T. Sexton, L. P. Horne, S. A. Sherrill, W. K. Mino, and C. R. Martin. A method for reproducibly preparing synthetic nanopores for resistive-pulse biosensors. *Small*, 3(8) :1424–1430, August 2007.
 - [38] Z. S. Siwy and M. Davenport. Biosensors making nanopores from nanotubes. *Nature Nanotechnology*, 5(3) :174–175, March 2010.
 - [39] Z. S. Siwy and M. Davenport. Nanopores graphene opens up to dna. *Nature Nanotechnology*, 5(10) :697–698, October 2010.

1.3 Les nanopores sur support silicium

1.3.1 Développement

C'est à l'équipe de Golovchenko que l'on doit le développement des premiers nanopores sur support silicium, en 2001 [35]. Dès le début, il est possible d'observer des pics de résistivité attribués à la translocation de brins d'ADN.

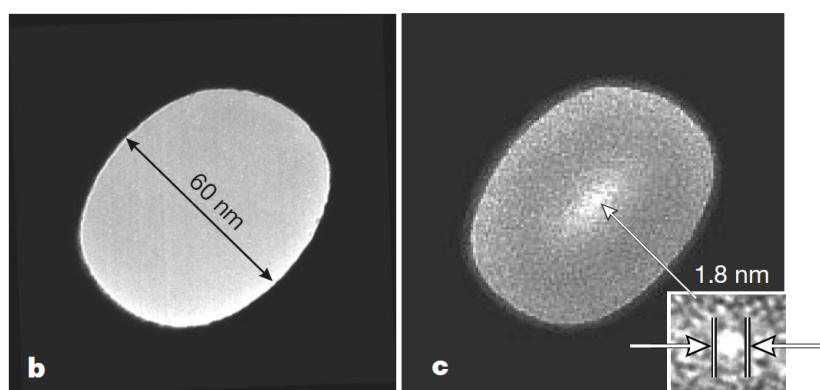


FIGURE 1.13 – Processus de fabrication d'un nanopore par sculpture par faisceau d'ions [35].

La technique de fabrication, nommé « ion-beam sculpting », c'est-à-dire sculpture par faisceau d'ions, se présente en deux temps. Tout d'abord, un faisceau focalisé d'ions de gaz rares, d'énergie de l'ordre du keV, ouvre un pore dans la membrane de nitrure de silicium, Si_3N_4 (cf. figure 1.13, cliché (b)). Ensuite, un faisceau défocalisé d'ions irradie toute la surface, provoquant la diffusion de matière et le rétrécissement du pore obtenu (cf. figure 1.13, cliché (c)). Le processus est observé par microscopie électronique sur le même montage, donnant accès à une précision d'observation d'environ 1 nm. La technique se développe et fait l'objet d'une description précise en 2004 [36]. Certains paramètres de la réalisation sont étudiés, comme notamment l'influence du gaz rare employé pour l'irradiation [40].

-
- [35] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, and J. A. Golovchenko. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*, 412(6843) :166–169, July 2001.
 - [40] Q. Cai, B. Ledden, E. Krueger, J. A. Golovchenko, and J. L. Li. Nanopore sculpting with noble gas ions. *Journal of Applied Physics*, 100(2) :024914, July 2006.

En 2003, une équipe hollandaise parvient à adapter cette méthode à un faisceau d'électrons, plus facile à manipuler, au lieu d'ions [41]. La matrice utilisée n'est plus le nitrure de silicium, mais le silicium pur recouvert d'une couche d'oxyde de silicium SiO_2 . On utilise un microscope électronique à transmission pour simultanément creuser et observer le pore (cf. figure 1.14). Ainsi, la précision spatiale de contrôle dépend du microscope électronique employé, et peut atteindre le nanomètre. De plus, cette méthode ne modifie pas la composition chimique du matériau. En (a), la vue en coupe montre

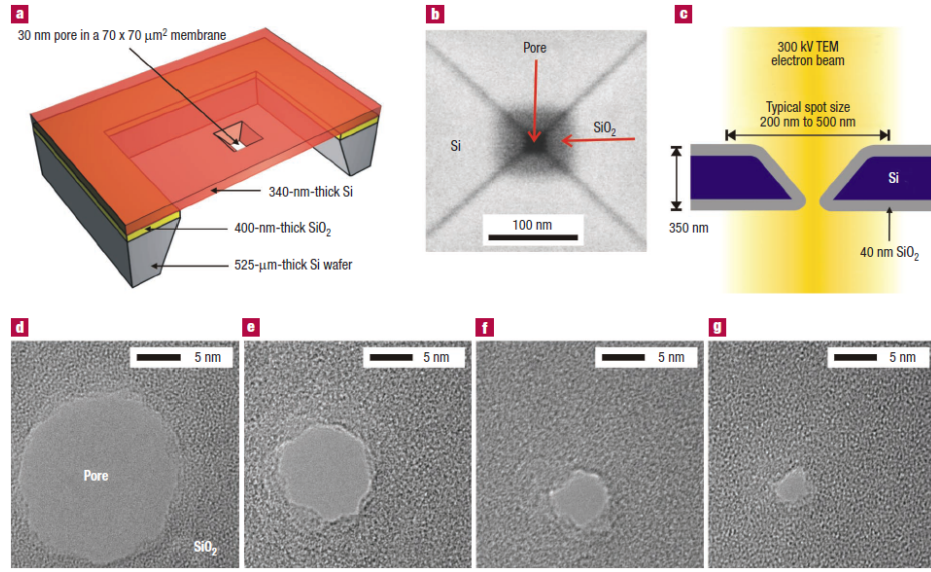


FIGURE 1.14 – Processus de fabrication d'un nanopore d'oxyde de silicium par faisceau d'électron [41].

l'ouverture initiale de 30 μm . Sa forme d'entonnoir pyramidal est due à une attaque par voie chimique dans un matériau monocristallin. En (b), une vue de haut par microscopie électronique montre la zone oxydée du silicium. Le schéma (c) montre une vue en coupe. Les clichés de microscopie électronique (d) à (g) décrivent le rétrécissement du pore dans le temps.

A. J. Storm propose une autre méthode, inspirée par les résultats de l'équipe de Chen en 1998 [42]. Elle consiste à utiliser directement une couche

-
- [41] A. J. Storm, J. H. Chen, X. S. Ling, H. W. Zandbergen, and C. Dekker. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision. *Nature Materials*, 2(8) :537–540, August 2003.
 - [42] G. S. Chen, C. B. Boothroyd, and C. J. Humphreys. Electron-beam-induced damage in amorphous SiO_2 and the direct fabrication of silicon nanostructures. *Philosophical Magazine A-physics of Condensed Matter Structure Defects and Mechanical Properties*, 78(2) :491–506, August 1998.

de silice très fine, que l'on va percer par lithographie électronique. Ensuite, l'irradiation d'un faisceau plus diffus va rétrécir le pore formé, tout en diminuant la quantité d'oxygène dans la silice.

La technique de fabrication de nanopores sur support silicium est améliorée en 2006 par l'équipe de Kim [43]. Le temps de fabrication est réduit à une trentaine de secondes, grâce à un faisceau d'électrons plus dense. Le support utilisé est de nouveau le nitrure de silicium Si_3N_4 , avec un faisceau d'électrons pour le perçement et le rétrécissement du pore. La réalisation du pore se fait par des étapes consécutives d'expansion et de réduction du pore, avec des faisceaux respectivement de 10^6 et 10^8 e.nm^{-2} .

L'année suivante, la même équipe caractérise la géométrie des pores obtenus par tomographie de microscopie électronique à transmission [44]. Le

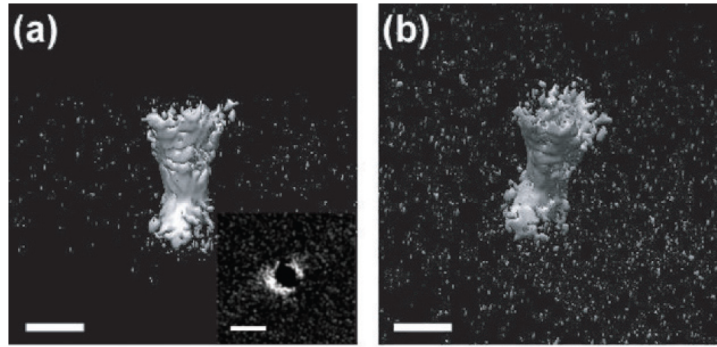


FIGURE 1.15 – Reconstitution par tomographie d'un nanopore sur support silicium [44]. Les barres d'échelle indiquent 5 nm.

résultat est présenté sur la figure 1.15. On y voit une vue en coupe (a), une vue de haut (*implant* (a)), et une vue inclinée de 25° (b).

Une autre méthode de préparation de nanopores sur nitrure de silicium consiste à réaliser une attaque chimique contrôlée par conductimétrie [45]. Une pointe fine est utilisée pour creuser un côté de la membrane, une pyramide tronquée pour creuser l'autre côté. L'attaque chimique arrive après ces étapes. Elle crée une forme en entonnoir pyramidal également, à cause de la

-
- [43] M. J. Kim, M. Wanunu, D. C. Bell, and A. Meller. Rapid fabrication of uniformly sized nanopores and nanopore arrays for parallel dna analysis. *Advanced Materials*, 18(23) :3149–+, December 2006.
 - [44] M. J. Kim, B. McNally, K. Murata, and A. Meller. Characteristics of solid-state nanometre pores fabricated using a transmission electron microscope. *Nanotechnology*, 18(20) :205302, May 2007.
 - [45] S. R. Park, H. B. Peng, and X. S. S. Ling. Fabrication of nanopores in silicon chips using feedback chemical etching. *Small*, 3(1) :116–119, January 2007.

nature cristalline de Si_3N_4 . Après oxydation à chaud, des pores d'un rayon de 10 nm environ peuvent être obtenus. Cette méthode a l'avantage de ne pas utiliser de faisceau d'ions ou d'électrons pour la fabrication.

1.3.2 Translocation dans des pores sur support silicium

De nombreux travaux ont été effectués dans le cadre de la translocation de brins d'ADN dans de tels nanopores. Le séquençage était la principale motivation.

Des pics de résistivité ont été observés aussi bien dans des pores faits dans Si_3N_4 [35] que dans SiO_2 [46].

Structure secondaire de l'ADN

Ce paragraphe présente des expériences réalisées avec des nanopores sur support silicium avec des tailles de plus en plus grandes, pour étudier différentes conformations de l'ADN.

L'équipe de Heng [47] a utilisé des pores de rayon 0,3 à 0,7 nm dans Si_3N_4 , pour y faire passer des brins d'ADN simple et double brin. Par électrophorèse sur gel, il est possible de vérifier si l'ADN introduit d'un côté de la membrane est passé de l'autre côté. La conclusion est la suivante : pour un pore de rayon inférieur à 0,5 nm, l'ADN double brin ne passe pas, alors que l'ADN simple brin peut encore passer à travers.

Avec un pore de cette taille, une autre équipe s'est intéressée au dépliement de structures en épingle à cheveux sur des molécules d'ADN simple brin [48]. La figure 1.16 montre les signaux obtenus et les histogrammes de durée de passage correspondants, pour différentes structures de brins d'ADN. Pour la structure en épingle à cheveux, l'auteur interprète les événements courts comme des collisions sur le pore, et les événements longs comme des translocations et déploiements des brins. L'étude se poursuit en faisant varier la longueur du brin, sa séquence, ainsi que la température. La translocation

-
- [35] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, and J. A. Golovchenko. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*, 412(6843) :166–169, July 2001.
 - [46] A. J. Storm, J. H. Chen, H. W. Zandbergen, and C. Dekker. Translocation of double-strand dna through a silicon oxide nanopore. *Physical Review E*, 71(5) :051903, May 2005.
 - [47] J. B. Heng, C. Ho, T. Kim, R. Timp, A. Aksimentiev, Y. V. Grinkova, S. Sligar, K. Schulten, and G. Timp. Sizing dna using a nanometer-diameter pore. *Biophysical Journal*, 87(4) :2905–2911, October 2004.
 - [48] B. McNally, M. Wanunu, and A. Meller. Electromechanical unzipping of individual dna molecules using synthetic sub-2 nm pores. *Nano Letters*, 8(10) :3418–3422, October 2008.

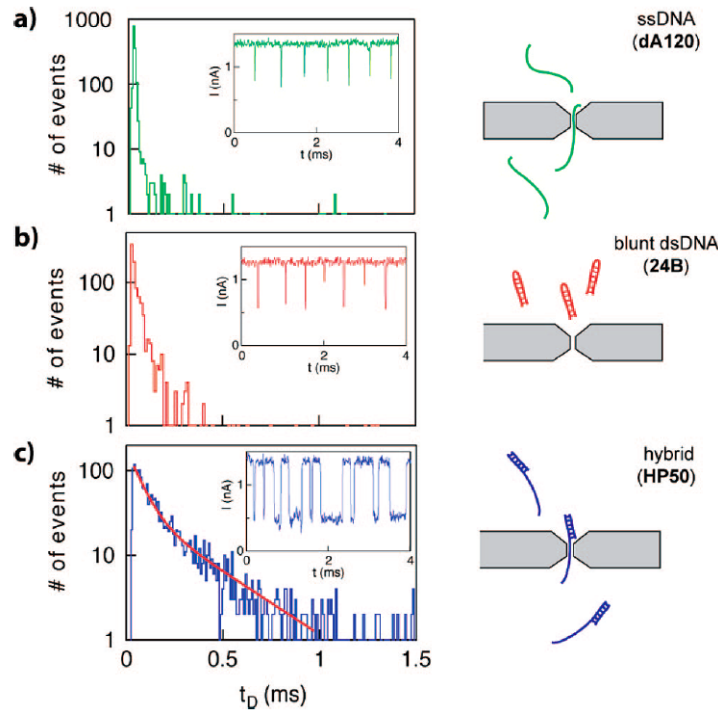


FIGURE 1.16 – Histogramme de la durée des événements de translocation pour différentes structures de molécules d'ADN simple brin [48].

de brins en épingles à cheveux a été également étudiée la même année par l'équipe de Zhao [49]. Un phénomène intéressant est mis en évidence : pour un pore de rayon compris entre 0.8 et 1.2 nm, la tension nécessaire pour faire passer le brin est plus grande que pour un pore plus petit, de rayon compris entre 0.5 et 0.8 nm. L'interprétation proposée s'appuie sur les forces correspondant à l'étirement de l'épingle à cheveux et au dépliement de cette structure, la première étant plus importante que la seconde. L'auteur note également la présence de signaux où le courant électrique transmembranaire possède des valeurs supérieures à celle du pore ouvert, à certains instants de la translocation de molécules d'ADN.

[49] Q. Zhao, J. Comer, V. Dimitrov, S. Yemenicioglu, A. Aksimentiev, and G. Timp. Stretching and unzipping nucleic acid hairpins using a synthetic nanopore. *Nucleic Acids Research*, 36(5) :1532–1541, March 2008.

Avec des pores plus larges que les derniers, il est également possible d'observer l'état de repliement d'un double brin d'ADN. J. Li et son équipe [50] parviennent à différencier les passages correspondant au passage de doubles brins simples et pliés en deux, grâce à l'amplitude du saut de courant électrique.

Un travail de même nature est mené par l'équipe de P. Chen [51]. Avec un pore encore plus grand, il est même possible d'observer des signaux correspondant à des doubles brins pliés plusieurs fois sur eux-mêmes (cf. figure 1.17).

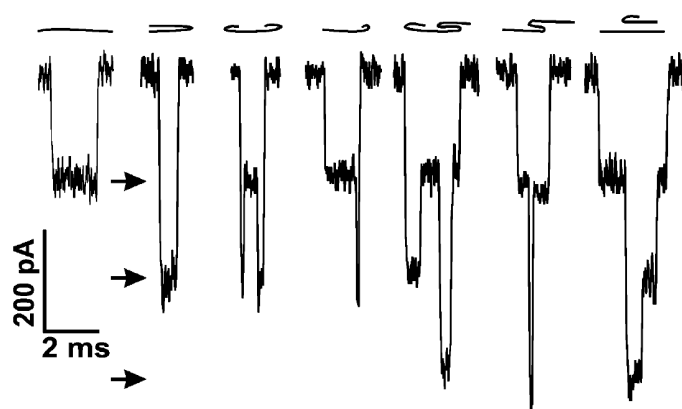


FIGURE 1.17 – Différents signaux de courant observés et schéma de l'état de repliement des molécules d'ADN correspondant [51].

Avec un pore encore plus grand, d'un diamètre d'environ 5 nm, l'équipe de A. J. Storm [46] parvient à observer des translocations simultanées de 5 brins d'ADN (cf. fig 1.18). Les sommets de l'histogramme sont régulièrement espacés en intensité électrique, ce qui confirme que dans ce cas, les sauts de courant sont bien proportionnels à la surface occupée par la molécule qui traverse le pore. L'équipe obtient des résultats semblables avec de l'ADN circulaire.

-
- [50] J. L. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J. A. Golovchenko. Dna molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope. *Nature Materials*, 2(9) :611–615, September 2003.
 - [51] P. Chen, J. J. Gu, E. Brandin, Y. R. Kim, Q. Wang, and D. Branton. Probing single dna molecule transport using fabricated nanopores. *Nano Letters*, 4(11) :2293–2298, November 2004.
 - [46] A. J. Storm, J. H. Chen, H. W. Zandbergen, and C. Dekker. Translocation of double-strand dna through a silicon oxide nanopore. *Physical Review E*, 71(5) :051903, May 2005.

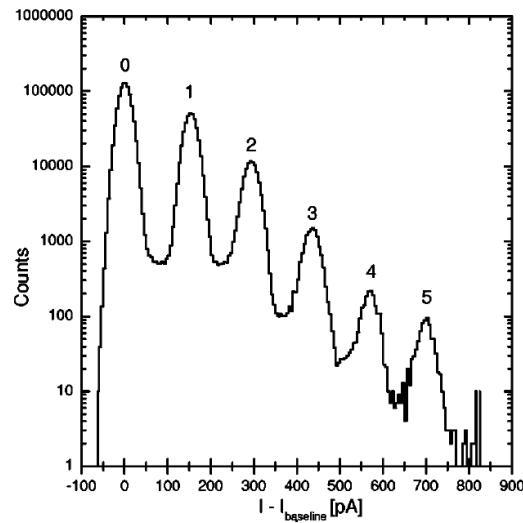


FIGURE 1.18 – Histogramme de l'amplitude du courant des événements [46].

Avec un nanopore encore plus large, d'un rayon de 8 nm, D. Fologea et son équipe [52] ont réussi à différencier des molécules d'ADN pour trois conformations : linéaire, circulaire détendu et circulaire enroulé. Le principe est d'utiliser l'amplitude des événements ainsi que leur durée pour déterminer la conformation. En effet, sur un histogramme des courants, le saut est double pour une molécule circulaire par rapport à la même molécule linéaire. L'équipe est également capable de différencier les longueurs des brins d'ADN, en utilisant la valeur de l'intensité électrique du saut intégrée dans le temps. En effet, cette valeur reste constante quelle que soit la conformation du brin observé.

Sens de variation de la conductance pendant la translocation

Différentes équipes se sont intéressées à l'interprétation du signal de conductance électrique lors du passage d'une molécule double brin d'ADN. Dans un long nanotube, le brin d'ADN peut entrer entièrement. Il est alors possible d'avoir des variations positives et négatives de la conductance lors de la translocation, selon la force ionique. En effet, le pore n'interagit pas seulement avec l'ADN mais aussi avec les contre-ions qui sont transportés avec

[52] D. Fologea, E. Brandin, J. Uplinger, D. Branton, and J. Li. Dna conformation and base number simultaneously determined in a nanopore. *Electrophoresis*, 28(18) :3186–3192, September 2007.

lui [53]. Deux autres équipes [54], [55] expliquent le sens de variation des sauts de conduction par la charge surfacique à l'intérieur du nanopore (cf. figure 1.19).

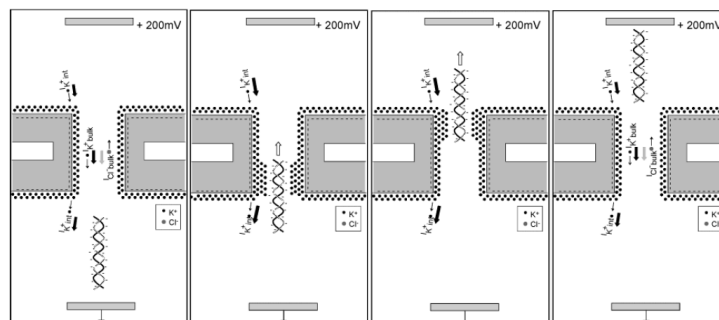


FIGURE 1.19 – Schéma expliquant le courant surfacique à l'intérieur du nanopore au cours de la translocation [54].

Réduction de la vitesse de translocation

En 2008, 25 spécialistes des nanopores s'associent pour écrire une revue traitant des horizons possibles pour le séquençage par translocation [56]. L'obstacle majeur reste la vitesse de translocation. En effet, la vitesse typique de translocation d'un brin d'ADN dans un pore d' α -hémolysine est de 1 à 20 μ s par nucléotide [57]. Pour les nanopores sur support silicium, cette vitesse est encore plus grande [54]. Les fréquences d'échantillonnage sont de l'ordre de la dizaine de kHz, ce qui n'est donc pas suffisant. Réduire le champ électrique qui tire les molécules à travers le pore, ou réduire la force ionique

-
- [53] R. Fan, R. Karnik, M. Yue, D. Y. Li, A. Majumdar, and P. D. Yang. Dna translocation in inorganic nanotubes. *Nano Letters*, 5(9) :1633–1637, September 2005.
 - [54] H. Chang, F. Kosari, G. Andreadakis, M. A. Alam, G. Vasmatazis, and R. Bashir. Dna-mediated fluctuations in ionic current through silicon oxide nanopore channels. *Nano Letters*, 4(8) :1551–1556, August 2004.
 - [55] R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, D. Krapf, M. Y. Wu, N. H. Dekker, and C. Dekker. Salt dependence of ion transport and dna translocation through solid-state nanopores. *Nano Letters*, 6(1) :89–95, January 2006.
 - [56] D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. H. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, and J. A. Schloss. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10) :1146–1153, October 2008.
 - [57] A. Meller. Dynamics of polynucleotide transport through nanometre-scale pores. *Journal of Physics-condensed Matter*, 15(17) :R581–R607, May 2003.

du milieu, peut en effet réduire la vitesse de passage, mais ceci diminue également le courant électrique mesuré et affaiblit le rapport signal/bruit de la mesure. Plusieurs autres méthodes ont été développées pour ralentir le passage des molécules d'ADN.

En 2005, D. Fologea [58] fait varier la température, la tension appliquée, la viscosité et la force ionique. Dans des pores en nitrure de silicium de 2 à 4 nm de rayon, son équipe parvient à faire passer des molécules de 3 000 paires de bases à la vitesse de 0,33 μ s par paire.

La taille du nanopore est un paramètre déterminant pour la vitesse de passage. L'équipe de M. Wanunu [59] décrit les effets liés à un diamètre plus faible : le temps de passage est plus court, ceci étant interprété comme une conséquence des interactions entre l'ADN et les parois du pore. Cependant, même si la vitesse moyenne de translocation diminue quand le rayon augmente, elle est moins régulière, et elle peut varier d'un ordre de grandeur pour une même molécule.

L'équipe de E. Trepagnier [60] utilise une pince optique pour saisir un brin d'ADN à proximité d'un pore synthétique. Cette méthode a pour effet de diminuer la vitesse de translocation à 7 μ s par paire de base. Un avantage majeur de cette technique réside dans la possibilité d'effectuer des va-et-vient avec la molécule, permettant d'observer plusieurs fois le signal correspondant aux mêmes séquences (cf. figure 1.20). L'inconvénient majeur de la pince optique est le bruit important généré par le faisceau laser. L'idée

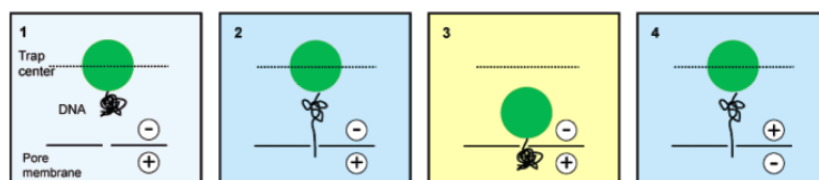


FIGURE 1.20 – Translocations en va-et-vient par capture optique et force électromagnétique [60].

de translocation en va-et-vient est notamment exploitée sans pince optique

-
- [58] D. Fologea, J. Uplinger, B. Thomas, D. S. McNabb, and J. L. Li. Slowing dna translocation in a solid-state nanopore. *Nano Letters*, 5(9) :1734–1737, September 2005.
 - [59] M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, and A. Meller. Dna translocation governed by interactions with solid-state nanopores. *Biophysical Journal*, 95(10) :4716–4725, November 2008.
 - [60] E. H. Trepagnier, A. Radenovic, D. Sivak, P. Geissler, and J. Liphardt. Controlling dna capture and propagation through artificial nanopores. *Nano Letters*, 7(9) :2824–2830, September 2007.

par M. Gershow et J. A. Golovchenko [61]. Ceux-ci inversent la polarité du champ électrique juste après le passage de molécules pour pouvoir observer la translocation de la même molécule dans l'autre sens.

Y. R. Kim et son équipe [62] revêtent la surface d'un nanopore avec une couche d'aminosilane. Ceci a pour effet d'augmenter considérablement la charge surfacique et ainsi la durée de passage. Ainsi, il est possible d'observer la translocation de fragments d'ADN de moins de 1 000 paires de bases.

Plus récemment, une équipe a utilisé un pore de 1,5 nm de rayon pour ralentir le passage de l'ADN [63]. En appliquant une tension élevée, il est possible de capturer une molécule double brin. Une fois à l'intérieur du pore, la tension est diminuée, ce qui diminue la vitesse de passage jusqu'à 2 ms par paire de bases.

-
- [61] M. Gershow and J. A. Golovchenko. Recapturing and trapping single molecules with a solid-state nanopore. *Nature Nanotechnology*, 2(12) :775–779, December 2007.
 - [62] Y. R. Kim, J. Min, I. H. Lee, S. Kim, A. G. Kim, K. Kim, K. Namkoong, and C. Ko. Nanopore sensor for fast label-free detection of short double-stranded dnas. *Biosensors & Bioelectronics*, 22(12) :2926–2931, June 2007.
 - [63] U. Mirsaidov, J. Comer, V. Dimitrov, A. Aksimentiev, and G. Timp. Slowing the translocation of double-stranded dna using a nanopore smaller than the double helix. *Nanotechnology*, 21(11536799) :395501 (10 pp.), October 2010.

1.4 Les nanopores à trace attaquée

1.4.1 Présentation

La méthode de l'attaque de trace consiste à creuser un pore dans un film polymère ou un matériau cristallin. Le processus de fabrication est schématisé sur la figure 1.21.

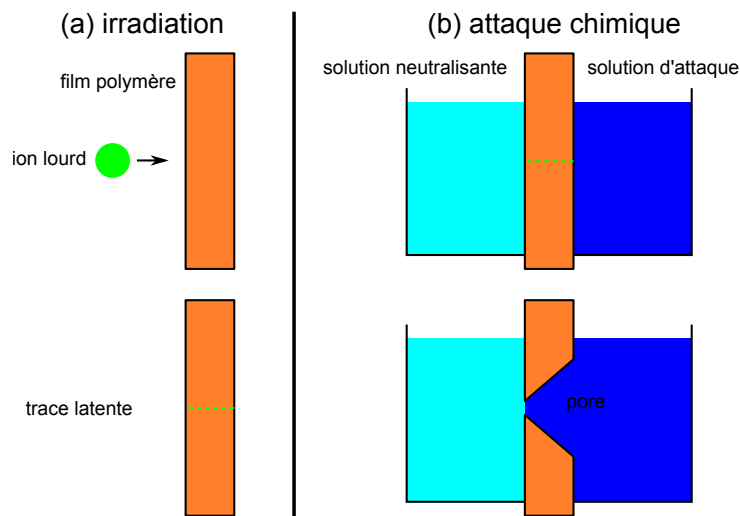


FIGURE 1.21 – Synthèse d'un pore à trace attaquée.

Il se déroule en deux étapes :

- (a) **Irradiation.** Un film polymère (ou un matériau cristallin) est placé en sortie d'un accélérateur d'ions lourds. Les ions, en traversant le film, y déposent de l'énergie sous forme de collisions. Ceci ne crée pas de pore, mais laisse une « trace latente », c'est-à-dire une zone d'endommagement du polymère le long de la trajectoire de l'ion. Chacun des ions laisse une trace latente.
- (b) **Attaque chimique.** Après l'irradiation, on fait subir au film polymère une « révélation » de la trace par voie chimique. Une solution corrosive, parfois chauffée, est placée d'un côté. Elle attaque le film sur toute sa surface, mais la vitesse d'attaque est beaucoup plus importante à l'intérieur de la trace que dans le polymère non fragilisé. Ainsi, cette attaque est anisotrope et donne naissance à un pore. Une solution neutralisante est placée de l'autre côté pour ralentir l'attaque lors de la percée. Plus le film est placé longtemps en présence de la solution d'attaque, plus le pore s'agrandit. Pour arrêter totalement la réaction, la solution d'attaque est ôtée et le film rincé.

Les traces sont habituellement obtenues en utilisant des ions tels que Xe, Pb, Au et U, accélérés à des énergies de l'ordre du GeV. La particularité de cette technique est que chaque ion passant à travers le film donne lieu à une seule trace latente, qui à son tour ne donne qu'un seul pore. Le nombre de pores final est donc identique au nombre d'ions qui ont traversé le film.

Les traces d'ions ont été découvertes en 1958 [64]. Initialement, la technique de l'attaque de trace était utilisée dans les domaines du nucléaire et de la géophysique [65], afin de détecter et de quantifier des radiations. On plaçait des films de polymères à l'endroit sondé, puis on révélait les traces afin d'obtenir des pores de taille micrométrique que l'on observait ensuite au microscope. Dans certains cas, il est préférable de sensibiliser les cibles par un rayonnement ultraviolet avant la révélation des traces [66].

De nos jours, l'attaque de trace est notamment employée pour la création de membranes filtrantes. On trouve dans le commerce des membranes destinées à l'ultra-filtration, possédant des pores avec un rayon de l'ordre de 30 nm, et une densité de pores de l'ordre de 10^8 pores.cm⁻².

Taille et forme des pores

La trace latente correspond à la trace rectiligne de l'ion lourd qui a irradié la cible. La forme et la taille finale du pore est déterminée par l'étape de révélation de la trace. Une attaque asymétrique, comme décrite sur la figure 1.21, donne une forme générale conique. La conicité du pore est directement liée au rapport entre les vitesses d'attaque dans la trace et dans le volume, c'est-à-dire dans le polymère non irradié. Une attaque symétrique de trace peut également produire un pore, donnant une géométrie de type biconique, avec une conicité donnée par le même rapport. L'ajout d'un tensio-actif permet d'obtenir des formes modifiées par rapport aux cônes. Y. Apel et son équipe ont notamment créé des nanopores en forme de tête d'obus [67]. La figure 1.22 montre des images MEB de tels pores : (a) et (b), coupes transversales, (c) vue du gros côté, (d) vue du petit côté. De telles formes peuvent éga-

-
- [64] D. A. Young. Etching of radiation damage in lithium fluoride. *Nature*, 182(4632) :375–377, 1958.
 - [65] L. Fleischer, P. B. Price, and R. M. Walker. Solid-state track detectors - applications to nuclear science and geophysics. *Annual Review of Nuclear Science*, 15 :1–&, 1965.
 - [66] W. T. Crawford, W. Desorbo, and J. S. Humphrey. Enhancement of track etching rates in charged particle-irradiated plastics by a photo-oxidation effect. *Nature*, 220(5174) :1313–&, 1968.
 - [67] P. Y. Apel, I. V. Blonskaya, S. N. Dmitriev, O. L. Orelovitch, A. Presz, and B. A. Sartowska. Fabrication of nanopores in polymer foils with surfactant-controlled longitudinal profiles. *Nanotechnology*, 18(30) :305302, August 2007.

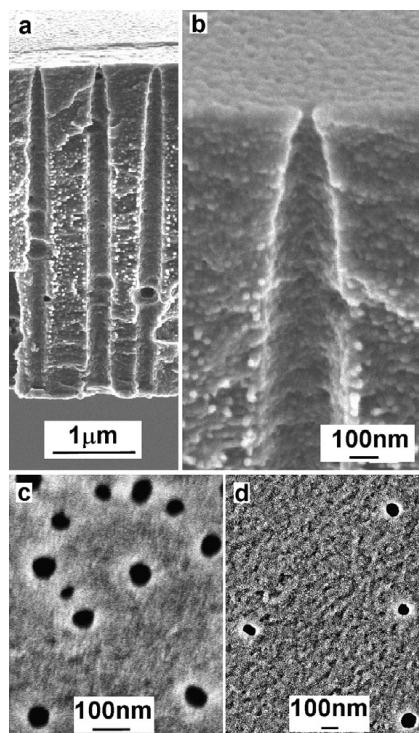


FIGURE 1.22 – Nanopores en forme de tête d’obus [67].

lement être obtenues en imposant une tension forte (jusqu’à 30 V) pendant l’attaque [68].

De manière générale, les paramètres intervenants dans la forme du pore sont ceux de l’attaque, à savoir : la nature et la concentration de la solution d’attaque, celles de la solution neutralisante si elle existe, la température, le temps d’attaque, et à moindre échelle, l’énergie et la nature des ions utilisés lors de l’irradiation et la tension appliquée entre les deux côtés du film lors de l’attaque.

Un pore unique

Le développement technique de l’étape d’irradiation a permis d’obtenir un nombre très faible d’ions lourds traversant la cible, par défocalisation et balayage du faisceau. Cette méthode a été brevetée par R. Spohr [69] en 1983. Elle n’est appliquée à l’heure actuelle qu’au GSI (Gesellschaft für

[68] C. C. Harrell, Z. S. Siwy, and C. R. Martin. Conical nanopore membranes : Controlling the nanopore shape. *Small*, 2(2) :194–198, February 2006.

[69] Reimar Spohr. Method for producing nuclear traces or microholes originating from nuclear traces of an individual ion, 1983.

SchwerIonenforschung [centre de recherche sur les ions lourds]) de Darmstadt, en Allemagne, et au GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds) de Caen.

Les nanopores uniques peuvent être introduits dans une cellule de conductimétrie, du même type que celles employées pour les pores naturels ou sur support silicium. Le suivi par conductimétrie est par ailleurs indispensable pour l'obtention de pores nanométriques, le courant électrique traversant la membrane donnant des indications sur la taille du pore en cours de création.

La caractérisation des nanopores peut se faire par microscopie électronique à balayage, pour des pores de rayon supérieurs à 15 nm. Il n'est pas possible d'utiliser la microscopie électronique à transmission, malgré sa meilleure résolution, car les énergies électroniques sont trop importantes et endommageraient le film polymère. Pour des rayons plus petits, il devient nécessaire de caractériser le pore par conductimétrie, en émettant des hypothèses quant à sa géométrie.

La figure 1.23 montre des exemples de pores uniques obtenus par l'équipe de Z. Siwy, dans des membranes polymères de PET (polyéthylène téréphthalate) et de PI (polyimide) [70].

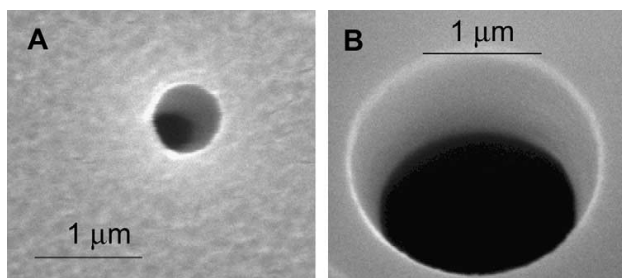


FIGURE 1.23 – Nanopores uniques dans des membranes de PET (a) et de PI (b) [70].

1.4.2 Translocation de macromolécules

Comme il est possible d'obtenir des ouvertures de pore de quelques nanomètres de rayon avec la méthode de trace attaquée, différentes équipes ont tenté de faire passer des molécules à travers de tels pores. Même si la plupart des travaux étaient dirigés vers des macromolécules biologiques, l'équipe de

[70] Z. Siwy, P. Apel, D. Dobrev, R. Neumann, R. Spohr, C. Trautmann, and K. Voss. Ion transport through asymmetric nanopores prepared by ion track etching. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 208 :143–148, August 2003.

E. Heins a réussi à détecter des molécules uniques de porphyrine [71] (cf. figure 1.24).

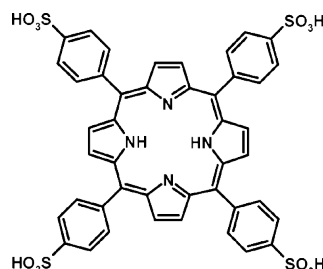


FIGURE 1.24 – Formule développée de la porphyrine [71].

ADN

Les premiers passages de molécules d'ADN à travers un nanopore à trace attaquée est publiée en 2004 [72]. D'autres travaux ([73], [74]) parviendront ensuite au même type de résultat. L'équipe de Kececi a aussi fait passer de l'ADN double brin dans un nanopore à trace attaquée [75]. La particularité des nanopores à trace attaquée par rapport aux autres pores artificiels sur support silicium est principalement la différence de dimension géométrique. Alors que la longueur des derniers est de l'ordre du nanomètre ou de la dizaine de nanomètres, celle des nanopores à trace attaquée atteint quelques micromètres, longueur correspondant à l'épaisseur de la membrane. Certes, il ne s'agit pas d'un pore cylindrique mais bien conique, mais de manière générale le passage de l'ADN est ralenti, ce qui permet d'observer des fragments de quelques centaines de bases, un ordre de grandeur plus courts que les pores sur support silicium [72]. La figure 1.25 montre les signaux obtenus :

-
- [71] E. A. Heins, Z. S. Siwy, L. A. Baker, and C. R. Martin. Detecting single porphyrin molecules in a conically shaped synthetic nanopore. *Nano Letters*, 5(9) :1824–1829, September 2005.
 - [72] A. Mara, Z. Siwy, C. Trautmann, J. Wan, and F. Kamme. An asymmetric polymer nanopore for single molecule detection. *Nano Letters*, 4(3) :497–501, March 2004.
 - [73] K. Healy, B. Schiedt, Z. Siwy, A. P. Morrison, and R. Neumann. Single-molecule dna transport through individual conical polymer nanopores. *Biophysical Journal*, 88(1) :660A–660A, January 2005.
 - [74] B. Schiedt, K. Healy, A. P. Morrison, R. Neumann, and Z. Siwy. Transport of ions and biomolecules through single asymmetric nanopores in polymer films. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 236 :109–116, July 2005.
 - [75] K. Kececi, L. T. Sexton, F. Buyukserin, and C. R. Martin. Resistive-pulse detection of short dsdnas using a chemically functionalized conical nanopore sensor. *Nanome-*

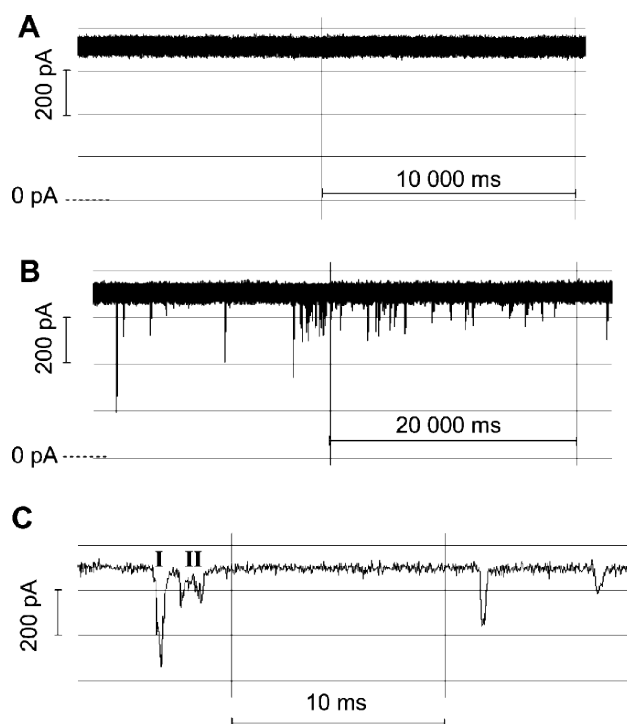


FIGURE 1.25 – Signaux obtenus [72].

- (A) Signal témoin, sans ajout d'ADN.
- (B) Signal obtenu après ajout d'ADN de 248 et de 4 100 paires de bases.
- (C) Enregistrement à plus haute résolution. On y voit différents types d'événements.

Protéines

Quelques travaux quant au transport de protéines ont été effectués avec des nanopores à trace attaquée. Le premier est celle de l'équipe de Z. Siwy en 2005 [76]. Néanmoins, il ne s'agit pas de molécule unique. La stratégie est de tapisser le nanopore d'une couche d'or, pour y déposer ensuite des anticorps réagissant à un certain type de protéines. Ainsi, en l'absence de ces protéines, le courant ionique possède une valeur non nulle. Mais quand des protéines spécifiques sont introduites dans la solution, elles sont adsorbées

dicine, 3(6) :787–796, December 2008.

- [76] Z. Siwy, L. Trofin, P. Kohli, L. A. Baker, C. Trautmann, and C. R. Martin. Protein biosensors based on biofunctionalized conical gold nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(14) :5000–5001, April 2005.

par les anticorps et bloquent ainsi le passage du courant. Finalement, il s'agit bien d'un détecteur de protéines, mais à usage unique.

Comme les protéines ont tendance à s'adsorber non spécifiquement sur tous types de surface, l'étape de neutralisation par déposition d'un film d'or paraît indispensable pour l'utilisation de protéines en solution. Deux autres travaux, menés par l'équipe de L. Sexton, ont permis d'observer le passage de protéines. Pour éviter l'adsorption non spécifique sur les surfaces du nanopore, du PEG est déposé sur la couche d'or, ce qui rend la surface inerte aux protéines. Dans le premier travail de ce type [77], il est possible de faire la distinction entre une protéine seule, la BSA (Bovine Serum Albumin) et un complexe formé de la BSA et d'un anticorps qui s'y est adsorbé.

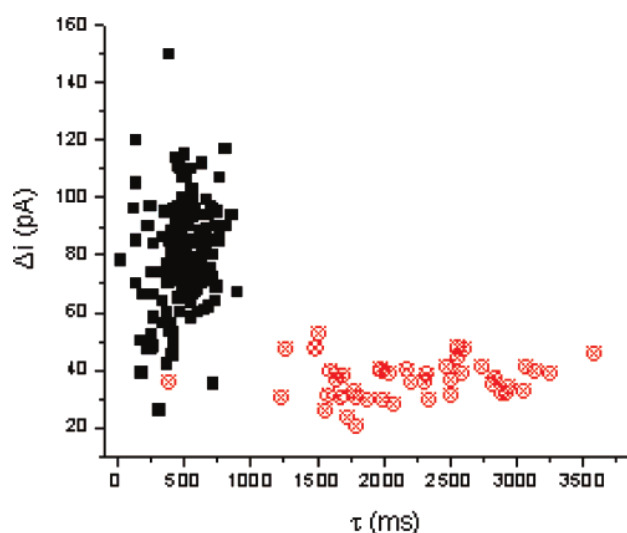


FIGURE 1.26 – Graphique des événements classés en courant et en temps [77].

La figure 1.26 montre le résultat obtenu. Chaque événement y est répertorié par un point désignant sa durée en abscisses et l'amplitude du saut de courant en ordonnées. Les points noirs correspondent à des événements observés avec de la BSA uniquement, et les symboles rouges correspondent à la même concentration de BSA placée dans un excès d'anticorps. Il est visible que ces derniers sont plus longs et provoquent des sauts d'amplitude moindre.

[77] L. T. Sexton, L. P. Horne, S. A. Sherrill, G. W. Bishop, L. A. Baker, and C. R. Martin. Resistive-pulse studies of proteins and protein/antibody complexes using a conical nanotube sensor. *Journal of the American Chemical Society*, 129(43) :13144–13152, October 2007.

Le deuxième travail du même type [78] s'intéresse plus particulièrement au temps de passage. Il s'appuie sur les différences entre les événements correspondant à trois tailles de protéines croissantes. Les durées des événements indiqueraient que les protéines s'adsorbent et se désorbent de nombreuses fois au cours de leur passage. Le modèle développé explique les durées plus longues qu'attendues, la forme triangulaire des événements, et l'augmentation de la variance dans la durée des événements avec les tailles de protéines croissantes.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre a montré l'état actuel des connaissances dans le domaine de la détection de macromolécules par des nanopores, qu'ils soient naturels ou artificiels. Les chapitres suivants exposent les travaux réalisés au cours de cette thèse, s'inscrivant dans la lignée de l'étude qui vient d'être faite.

[78] L. T. Sexton, H. Mukaibo, P. Katira, H. Hess, S. A. Sherrill, L. P. Horne, and C. R. Martin. An adsorption-based model for pulse duration in resistive-pulse protein sensing. *Journal of the American Chemical Society*, 132(19) :6755–6763, May 2010.

Chapitre 2

Préparation et caractérisation des nanopores obtenus par attaque de trace

Le but est ici de fabriquer des nanopores aptes au transport d'ions et à la translocation de macromolécules biologiques. L'attention est portée aux caractéristiques géométriques, comme la taille par exemple, ainsi qu'aux propriétés de la paroi du pore. Ces deux aspects seront déterminants pour le passage des ions et des macromolécules.

Sommaire

2.1	Méthode de l'attaque de traces	40
2.1.1	Nature du polymère	40
2.1.2	Irradiation aux ions lourds	43
2.1.3	Attaque chimique	49
2.2	Caractérisation de la géométrie	57
2.2.1	Contexte	57
2.2.2	Microscopie électronique	57
2.2.3	Conductimétrie	62
2.3	Caractérisation de la paroi du pore	68
2.3.1	Phénomène de rectification	68
2.3.2	Comportement en milieu acide	69
2.3.3	Potentiel d'écoulement	72

2.1 Méthode de l'attaque de traces

La méthode de l'attaque de trace a été brièvement décrite dans le chapitre précédent, dans la section 1.4, page 31. Elle comporte deux étapes principales, qui sont l'irradiation d'un film polymère avec des ions lourds, suivie de la révélation des traces obtenues, par voie chimique. Ces deux étapes sont présentées ici plus précisément, après la description des films polymères utilisés en tant que cibles.

2.1.1 Nature du polymère

Les deux polymères utilisés dans cette thèse sont le polycarbonate (PC) et le polyimide (PI), sous forme de films d'une dizaine de micromètres d'épaisseur. Ceci leur confère une robustesse adéquate à la manipulation directe, sans gêner l'irradiation par une longueur de traversée de l'ion trop grande. La figure 2.1 montre l'aspect d'une membrane de polycarbonate.

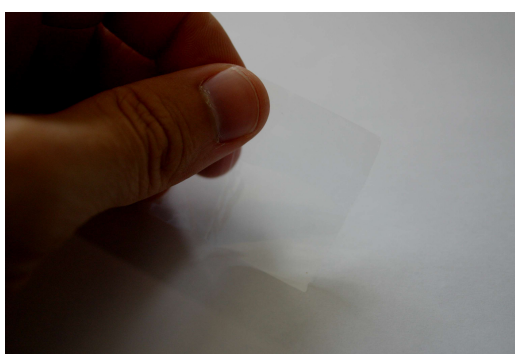


FIGURE 2.1 – Photographie d'une membrane de PC.

Polycarbonate

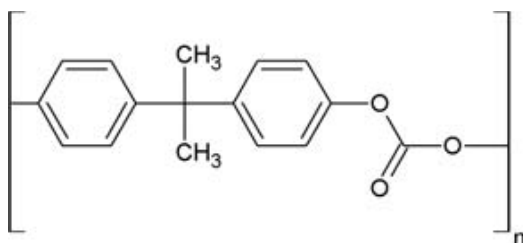


FIGURE 2.2 – Formule développée du polycarbonate.

Le polycarbonate est un polymère très courant dans de multiples utilisations. Il est très transparent et résistant, ce qui lui vaut des applications telles que dans la fabrication des verres de vue, des CD et DVD, ou encore des vitres de phare de voiture.

Il s'agit d'un des polymères les plus utilisés pour l'attaque de trace. Sa structure chimique est présentée sur la figure 2.2. Les solutions d'attaque sont généralement des bases fortes telles que KOH ou NaOH à forte concentration ($\approx 1 \text{ mol.L}^{-1}$), et les solutions neutralisantes des acides faibles, tels que l'acide formique (HCOOH). Le tableau 2.1 résume quelques conditions expérimentales utilisées pour l'attaque de traces dans le polycarbonate. Dans cette thèse, les films de polycarbonate, d'épaisseur 6 ou 10 μm , ont été exclusivement traités avec NaOH 2 M, à 70 °C. La plupart des attaques étaient symétriques. Quand elles ne l'étaient pas, la solution de neutralisation généralement employée était NaCl 2 M.

Attaque	Neutralisation	Température	Réf.
NaOH 2 M	HCOOH 1 M	de 20 à 60 °C	[79]
NaOH 0,5 M		70 °C	[80]
KOH 9 M		ambiante	[68]

TABLEAU 2.1 – Conditions d'attaque pour des films PC utilisées dans la littérature.

Un inconvénient majeur du polycarbonate est sa forte hydrophobie. En effet, il est difficile de mouiller les parois des pores les plus petits. Les membranes de polycarbonate nanoporeuses commerciales sont généralement vendues après un traitement de surface destiné à les rendre plus hydrophiles.

Le polycarbonate nanoporeux est notamment utilisé industriellement pour l'ultrafiltration, procédé permettant de purifier l'eau.

Polyimide

Le polyimide est un polymère très résistant, tant mécaniquement que thermiquement et chimiquement. Il est généralement utilisé dans les do-

-
- [79] G. Guillot and F. Rondelez. Characteristics of sub-micron pores obtained by chemical etching of nuclear tracks in polycarbonate films. *Journal of Applied Physics*, 52(12) :7155–7164, 1981.
 - [80] E. Ferain and R. Legras. Pore shape control in nanoporous particle track etched membrane. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 174(1-2) :116–122, March 2001.
 - [68] C. C. Harrell, Z. S. Siwy, and C. R. Martin. Conical nanopore membranes : Controlling the nanopore shape. *Small*, 2(2) :194–198, February 2006.

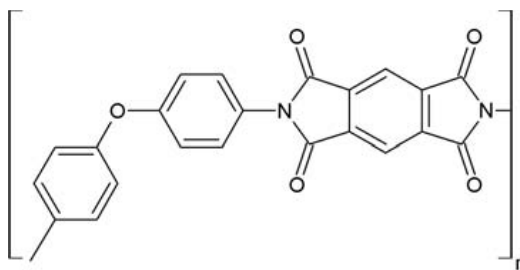


FIGURE 2.3 – Formule développée du polyimide.

maines de pointe, tels que l'aérospatiale et les circuits imprimés.

Sa structure chimique est exposée sur la figure 2.3.

L'attaque de ce polymère s'effectue généralement avec une solution de NaOCl, avec un taux de chlore actif de 13 %, à 50 °C. La solution de neutralisation couramment utilisée est l'iodure de potassium (KI). Le tableau 2.2 montre les différentes conditions d'attaque rencontrées dans la littérature. En utilisant la solution de NaOCl directement, le pH vaut 12,6 et l'attaque donne alors des pores coniques [81]. Pour un pH plus bas, comme par exemple à pH = 8, tamponné par l'acide borique, l'attaque forme des pores quasiment cylindriques.

Attaque	Neutralisation	Température	Réf.
NaOCl 13 %	KI 1 M	50 °C	[70]
KMnO ₄			[82]

TABLEAU 2.2 – Conditions d'attaque pour des films PI utilisées dans la littérature.

Pour les attaques réalisées dans cette thèse, exclusivement asymétriques, les conditions d'attaque étaient celles décrites par Z. Siwy [70], à savoir :

- Solution d'attaque : NaOCl à 13 % de chlore actif.
- Solution de neutralisation : KI, de concentration 1 M.

-
- [81] C. Trautmann, W. Bruchle, R. Spohr, J. Vetter, and N. Angert. Pore geometry of etched ion tracks in polyimide. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 111(1-2) :70–74, April 1996.
- [70] Z. Siwy, P. Apel, D. Dobrev, R. Neumann, R. Spohr, C. Trautmann, and K. Voss. Ion transport through asymmetric nanopores prepared by ion track etching. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 208 :143–148, August 2003.
- [82] R. L. Fleischer, P. B. Price, and R. M. Walker. Citation classic - nuclear tracks in solids - principles and applications. *Current Contents/physical Chemical & Earth Sciences*, (5) :20–20, 1982.

- Température : 55 °C.

L'avantage du polyimide est sa grande stabilité dans le signal électrique enregistré sur un nanopore [70].

2.1.2 Irradiation aux ions lourds

Les films utilisés dans cette thèse ont été exclusivement irradiés au GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds) de Caen. Deux lignes ont été utilisées :

IRRSUD, ligne de faible énergie (0,5 à 1 MeV/uma¹), pour certains pores de polycarbonate.

SME (Sortie Moyenne Énergie), ligne de moyenne énergie (≈ 10 MeV/uma), pour irradier tous les films de PI (polyimide) et la plupart des films de PC (polycarbonate).

La figure 2.4 est une photographie d'une partie du dispositif expérimental de la ligne SME. On y voit le support métallique où sont fixés les films de polyimide. Il est percé d'une fente linéaire qui permet la détection des ions après leur traversée du film, grâce à un détecteur placé en aval. Ce support peut être déplacé verticalement à distance, ce qui évite des changements de support trop fréquents.

Des particules chargées pénétrant un solide peuvent perdre leur énergie par différents types d'interactions, tels que ([83] d'après [84]) :

- Excitation et ionisation des électrons de la cible (perte d'énergie électronique)
- Excitation et ionisation du projectile
- Capture d'électron
- Collision élastique avec les atomes de la cible (perte d'énergie nucléaire)
- Rayonnement électromagnétique (Bremsstrahlung, effet Cherenkov)

Dans le cas des ions lourds, les effets majoritaires sont les pertes d'énergie nucléaires et électroniques. Ils sont respectivement dominants aux basses ($\leq 0,1$ MeV/uma) et hautes ($> 0,1$ MeV/uma) énergies cinétiques. Ce n'est qu'aux vitesses extrêmement grandes, quand les effets relativistes ne peuvent plus être négligés, que les processus radiatifs commencent à jouer un rôle. Les pertes d'énergie électroniques et nucléaires, pour un ion de Krypton irradiant

1. uma : unité de masse atomique

[83] Birgitta Schiedt. *Characterization and application of ion track-etched nanopores*. PhD thesis, Ruperto-Caola University of Heidelberg, Germany, May 2007.

[84] P. Sigmund. *Stopping of heavy ions - a theoretical approach*, 2004.

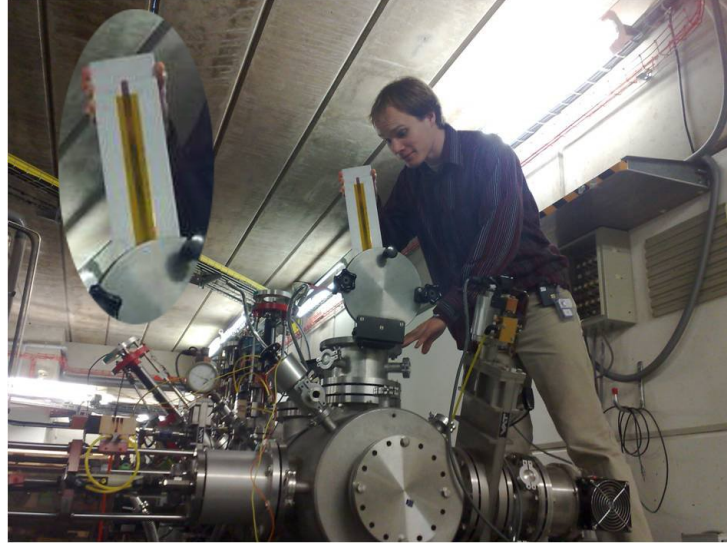


FIGURE 2.4 – Insertion de films de polyimide en terminaison de ligne SME, au GANIL. L'agrandissement présente la plaque métallique sur laquelle sont fixés les films.

du polycarbonate, sont représentées sur la figure 2.5. Cette courbe a été calculée avec le logiciel SRIM-2008.04 [85].

La courbe de perte d'énergie possède un maximum pour une certaine énergie. Il s'agit d'une caractéristique des ions rapides, pour qui ce maximum est atteint avant que l'ion soit stoppé. En effet, leur section efficace d'interaction augmente au fur et à mesure que leur vitesse diminue. Ce maximum est appelé pic de Bragg et il est exploité en radiothérapie, où le maximum d'énergie est déposé dans la tumeur et non dans les tissus sains par lesquels les ions passent.

La figure 2.6 montre qu'avec les énergies utilisées pour les irradiations au GANIL, il est bien possible de superposer plusieurs couches de films de polycarbonate de 10 μm d'épaisseur.

La perte d'énergie électronique d'un projectile dans une cible est décrite de manière générale par la formule de Bethe-Bloch [83] :

$$\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 Z_{\text{eff}}^2 Z_t N}{m_e v^2} \left[\ln \left(\frac{2m_e v^2}{I} \right) - \beta^2 - \delta - U \right] \quad (2.1)$$

dont les paramètres sont les suivants :

- e : charge élémentaire

[85] J. F. Ziegler. Srim-2003. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 219 :1027–1036, June 2004.

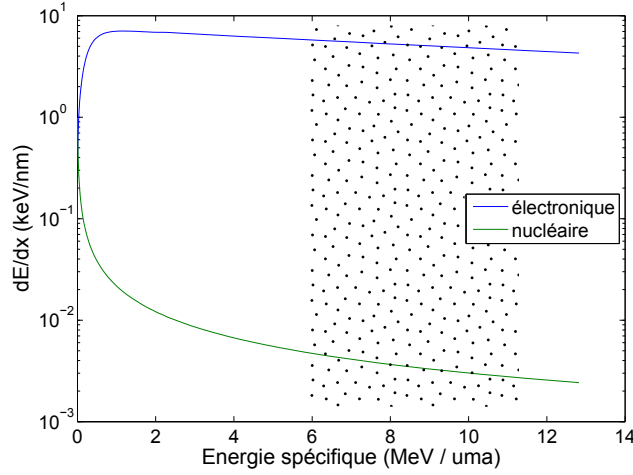


FIGURE 2.5 – Pertes d'énergie d'un ion Krypton irradiant du polycarbonate. La zone marquée correspond aux énergies utilisées pour les irradiations au GANIL.

- Z_{eff} : charge effective du projectile
- Z_t : numéro atomique
- N : nombre d'atomes de la cible par unité de volume
- m_e : masse de l'électron
- v : vitesse de l'ion
- I : énergie d'ionisation
- $\beta : v/c$
- δ : correction relativiste
- U : correction prenant en compte les effets d'écrantage des électrons des couches internes

La charge effective, qui est déterminante pour la perte d'énergie, dépend des interactions entre le projectile et la cible. Si la vitesse de l'ion incident est supérieure aux vitesses orbitales de ses électrons, les électrons les plus lents sont arrachés et l'ion change donc son état de charge. Pour les vitesses très rapides, l'ion perd tous ses électrons et alors $Z_{\text{eff}} = Z$, où Z est le numéro atomique de l'ion. Z_{eff} peut être décrit par la formule empirique de Barkas[82] :

$$Z_{\text{eff}} = Z \left[1 - \exp \left(-\frac{130\beta}{Z^{2/3}} \right) \right] \quad (2.2)$$

[82] R. L. Fleischer, P. B. Price, and R. M. Walker. Citation classic - nuclear tracks in solids - principles and applications. *Current Contents/physical Chemical & Earth Sciences*, (5) :20–20, 1982.

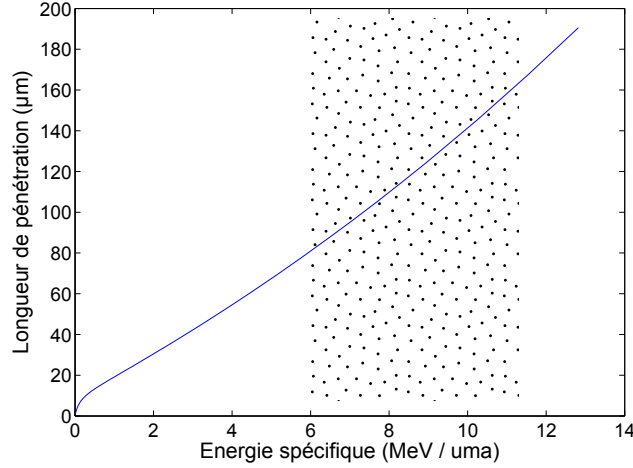


FIGURE 2.6 – Longueur de pénétration d'un ion Krypton irradiant du polycarbonate, en fonction de son énergie spécifique. La zone marquée correspond aux énergies utilisées pour les irradiations au GANIL.

Ainsi, les ions plus lourds ont une charge effective plus grande et par conséquent une perte d'énergie plus importante. Ceci les rend particulièrement adaptés pour créer des traces continues et attaquables. En effet, si la perte d'énergie est inférieure à une certaine limite dépendant du matériau, la révélation de la trace ne sera pas homogène ([86], cf. figure 2.7 pour le polyimide). Cette limite est de l'ordre de 2 à 5 keV.nm⁻¹ pour les polymères. La figure 2.5 montre que l'énergie transmise au film de polycarbonate est légèrement supérieure à cette valeur.

Les ions utilisés au GANIL étaient généralement ¹³⁶Xe et ⁷⁸Kr. Les films polymères pouvaient être placés en plusieurs couches, selon l'énergie du faisceau et la longueur de pénétration. Cette dernière grandeur, R , correspond à la distance que peut parcourir le projectile tant qu'il possède de l'énergie :

$$R = \int_0^{E_0} \left(\frac{dE}{dx} \right)^{-1} dE \quad (2.3)$$

Par exemple, pour une irradiation d'ions Xe à 7,5 MeV/uma, la longueur de pénétration est de 108 μm. Cette valeur a été calculée au GANIL, elle est confirmée par la figure 2.6. On peut donc superposer 6 couches de films, chacune épaisse de 10 μm. L'énergie des ions en sortie de ces 10 couches est

[86] C. Trautmann, S. Bouffard, and R. Spohr. Etching threshold for ion tracks in polyimide. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 116(1-4) :429–433, August 1996.

de 3,5 MeV/uma. Les pertes d'énergie nucléaires sont négligeables, tant que l'ion n'est pas stoppé dans le film.

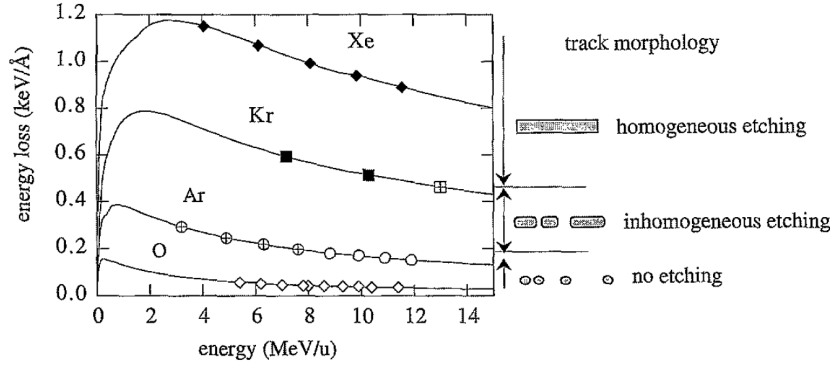


FIGURE 2.7 – Perte d'énergie d'un ion irradiant du polyimide, calculée en fonction de la nature et de l'énergie de l'ion concerné [86].

La figure 2.7 montre qu'il existe un seuil d'énergie en deçà duquel les dégâts ne sont pas répartis de manière uniforme [86]. Les irradiations effectuées dans cette thèse correspondaient à des énergies supérieures à ce seuil, pour la ligne SME. Ce n'était néanmoins pas le cas pour les irradiations faites sur la ligne IRRSUD.

La figure 2.8 montre les spectres expérimentaux mesurés lors de l'irradiation de films de polycarbonate dans la ligne SME du GANIL. La perte

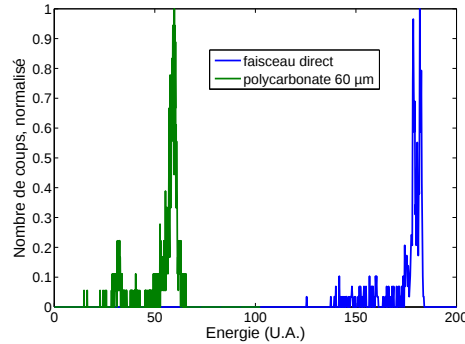


FIGURE 2.8 – Spectres d'énergie du faisceau d'irradiation, avant et après irradiation de 6 couches de polycarbonate de 10 µm d'épaisseur.

d'énergie est importante, et les dernières couches irradiées ne sont pas comprises au-dessus du seuil.

L'ion lourd incident produit des ionisations et des excitations électriques. Dans les polymères, ceci conduit à la destruction de liaisons covalentes [87] [88]. Il peut aussi se produire la vaporisation de fragments, ce qui diminue la densité du matériau [89] [90].

Il est possible de choisir entre une irradiation avec un ion unique, pour obtenir un pore unique, ou bien une irradiation avec de nombreux ions, pour obtenir une membrane nanoporeuse sur laquelle des expériences de statistique ou d'imagerie pourront être menées. Dans ce dernier cas, des irradiations de l'ordre de 10^7 à 10^9 ions.cm⁻² sont choisies. Cette possibilité de choisir entre une membrane à pore unique ou multiple est un avantage majeur de la technique d'attaque de trace. En effet, les autres types de pores, tels que l' α -hémolysine ou les pores sur support silicium, n'ont pas cette souplesse.

Irradiation avec un ion unique

Dans cette thèse, les irradiations avec un ion unique ont été réalisées au GANIL. La méthode utilisée est celle présentée dans la section 1.4.1, page 33, elle est décrite sur la figure 2.9.

Le faisceau d'ions lourds est tout d'abord balayé, grâce à un champ magnétique intense et oscillant. Le faisceau est également défocalisé par des lentilles magnétiques. Un diaphragme permet de réduire le flux d'ions à moins d'un ion par seconde. Un détecteur placé en aval du film polymère permet de détecter chaque passage d'ion. Il est relié à un compteur qui actionne automatiquement le coupe-faisceau lorsque le nombre d'ions souhaité (généralement un seul) est atteint.

-
- [87] Y. M. Sun, Z. Y. Zhu, Z. G. Wang, Y. F. Jin, J. Liu, M. D. Hou, and Q. X. Zhang. Swift heavy ion induced amorphisation and chemical modification in polycarbonate. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 209 :188–193, August 2003.
 - [88] F. Dehaye, E. Balanzat, E. Ferain, and R. Legras. Chemical modifications induced in bisphenol a polycarbonate by swift heavy ions. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 209 :103–112, August 2003.
 - [89] D. Albrecht, P. Armbruster, R. Spohr, M. Roth, K. Schaupert, and H. Stuhmann. Small-angle scattering from oriented latent nuclear tracks. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 2(1-3) :702–705, 1984.
 - [90] V. Picq, J. M. Ramillon, and E. Balanzat. Swift heavy ions on polymers : Hydrocarbon gas release. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 146(1-4) :496–503, December 1998.

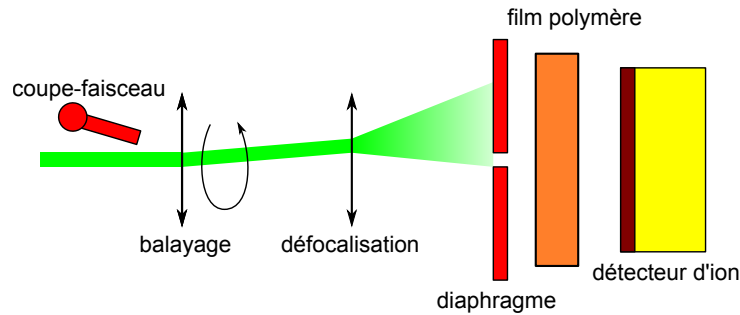


FIGURE 2.9 – Schéma expérimental de l'irradiation d'un film polymère avec un ion unique.

2.1.3 Attaque chimique

La révélation des traces permet de transformer par voie chimique la trace de l'ion en un pore. Le film possédant une ou plusieurs traces latentes est placé dans une solution corrosive qui peut être chauffée. Si la solution est présente des deux côtés, l'attaque est dite symétrique. En revanche, si une solution de neutralisation non corrosive est placée de l'autre côté du film, elle est dite asymétrique. L'irradiation et l'attaque sont les deux étapes de synthèse des pores, mais seule l'étape de l'attaque en détermine la géométrie.

Le principe fondamental de l'attaque réside dans le fait que la révélation n'attaque pas le polymère à la même vitesse dans le volume et dans la trace. Là où l'ion lourd est passé, le polymère est fragilisé, d'autant plus que dE/dx est grand, et la matière sera plus vite rongée.

Modèle à deux vitesses d'attaque

Dans un modèle à deux vitesses, on note $v_{\perp}$ la vitesse dans le volume et $v_{//}$ dans la trace. La forme géométrique obtenue est donc un cône, de demi-angle au sommet α , déterminé, par le rapport entre $v_{//}$ et $v_{\perp}$. Plus la trace est fragilisée, plus $v_{//}$ est grand devant $v_{\perp}$, et plus le pore aura une forme cylindrique.

La figure 2.10 décrit les relations entre R , le diamètre du côté de l'attaque, l'angle α , $v_{\perp}$ et $v_{//}$, ainsi que les surfaces du film avant et après l'attaque.

Suivi par conductimétrie

Pour révéler une trace unique et obtenir un pore unique de taille nanométrique, il est nécessaire de suivre l'attaque par conductimétrie, afin d'observer en temps réel l'évolution de la taille du pore pour l'arrêter au bon moment. Le schéma de l'expérience est présenté sur la figure 2.11.

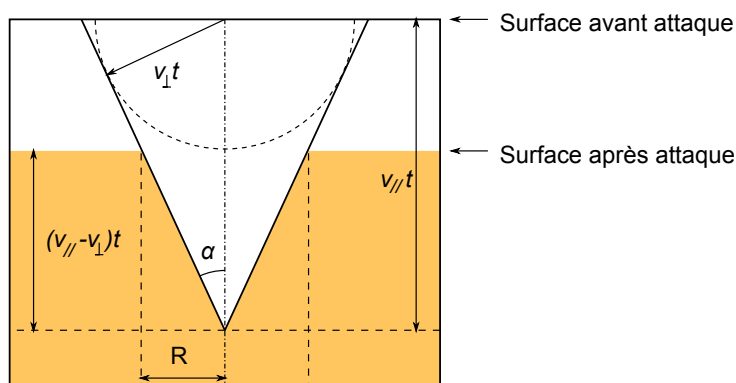


FIGURE 2.10 – Coupe transversale schématisée du film polymère durant l'attaque.

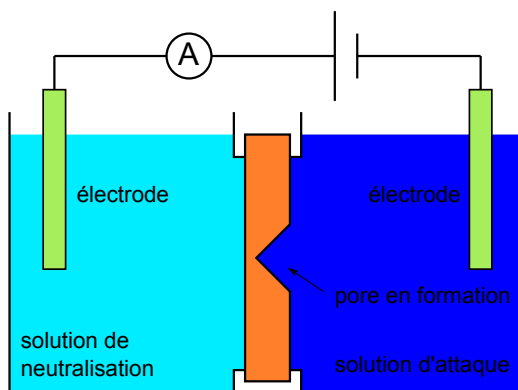


FIGURE 2.11 – Suivi d'une attaque par conductimétrie.

Une tension constante $U = 1$ V est appliquée entre les deux compartiments de la cellule de conductimétrie, grâce à des électrodes Ag/AgCl. Ces électrodes sont obtenues par l'immersion préalable pendant plusieurs heures de fils d'argent dans de l'eau de Javel. L'amplitude du courant électrique est suivie au cours de l'attaque. Un amplificateur Axopatch 200B permet de mesurer des courants de l'ordre du picoampère. L'enregistrement est effectué par un logiciel développé au laboratoire.

Dans un premier temps, même si les solutions d'attaque et de neutralisation sont conductrices, le film polymère est isolant et aucun courant électrique mesurable n'est observé. Le pore, de forme conique, continue de grandir, et la trace continue de se faire attaquer par la solution d'attaque.

Lorsque le pore s'agrandit suffisamment, et que les solutions des deux compartiments entrent en contact, les ions qu'elles contiennent sont libres de passer à travers le pore, et un courant électrique est enregistré. L'attaque

se poursuit et le pore grandit. Le courant électrique augmente alors avec le temps.

Attaque symétrique de trace unique dans le polycarbonate

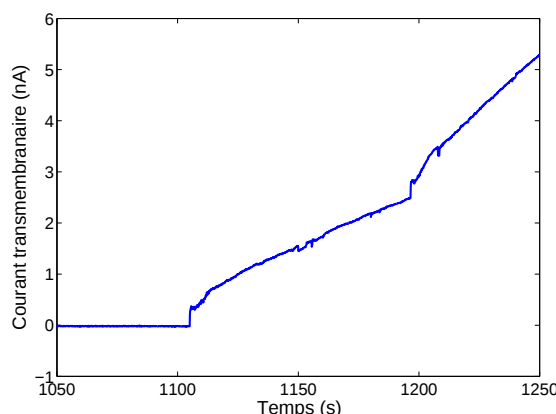


FIGURE 2.12 – Attaque symétrique d'un film de polycarbonate, suivie par conductimétrie.

Allure générale des courbes d'attaque. La figure 2.12 présente les variations du courant électrique dans le temps durant l'attaque. Le film est en polycarbonate, possédant une trace latente unique d'ion lourd. L'attaque est faite dans NaOH 2 M, des deux côtés du film, à 70 °C. Le temps de percement, c'est-à-dire le temps nécessaire à l'éclosion du pore, est ici d'environ 1 100 s. Les attaques symétriques sur polycarbonate donnent des résultats de temps de percements très variables. Le tableau 2.3 présente différents temps de percements obtenus.

La grande disparité observée montre que la reproductibilité est un enjeu de taille pour la préparation des nanopores. La différence d'énergie d'irradiation entre les couches de polycarbonate explique certainement une partie de cette disparité (cf. figure 2.8, page 47, qui montre les spectres d'énergie du faisceau d'irradiation avant et après l'empilement des films). Mais même à énergie d'irradiation égale, des variations existent toujours pour l'attaque de traces. C'est pour cela que certaines équipes cherchent à développer des processus expérimentaux permettant des attaques reproductibles [37].

[37] J. E. Wharton, P. Jin, L. T. Sexton, L. P. Horne, S. A. Sherrill, W. K. Mino, and C. R. Martin. A method for reproducibly preparing synthetic nanopores for resistive-pulse biosensors. *Small*, 3(8) :1424–1430, August 2007.

Échantillon	Temps de percement (s)
441	200
442	100
451	96
452	100
455	160
460	430
461	180
462	500

TABLEAU 2.3 – Temps de percement observés pour des attaques symétriques de traces uniques, dans des films de polycarbonate de $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, avec NaOH 2 M à $70\ ^\circ\text{C}$, par conductimétrie.

Phénomène des petits sauts de courant. Une caractéristique intéressante des courbes d'attaques de films en polycarbonate suivies par conductimétrie est la présence de petits sauts de courant. Un exemple est présenté sur la figure 2.13. De tels sauts ont été observés même pour des attaques de

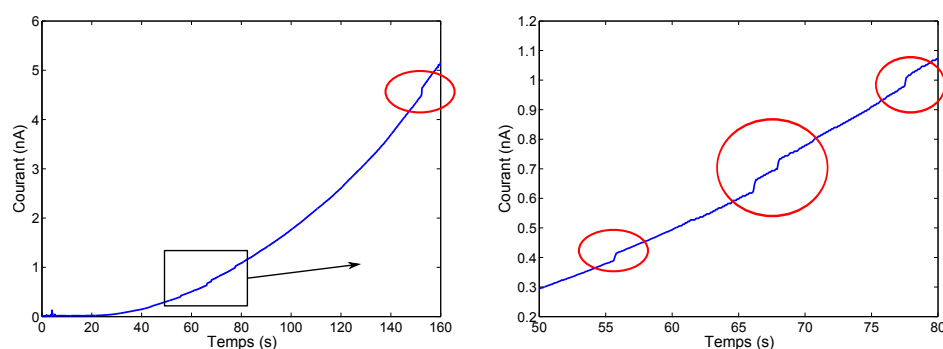


FIGURE 2.13 – Évolution temporelle du courant électrique lors de l'attaque d'un film de polycarbonate de $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, attaqué avec NaOH 2 M à $70\ ^\circ\text{C}$. La partie encadrée à gauche est agrandie à droite. Il s'agit ici de l'échantillon n° 455.

traces uniques, ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'éclosions successives de traces. L'hypothèse la plus simple semble être la présence d'amas de matière partant en bloc lors de l'attaque, expulsés par le champ électrique.

Interprétation de l'allure générale des courbes d'attaque. Ce paragraphe cherche à relier les mécanismes nanométriques de l'attaque à la courbe

d'évolution temporelle de l'intensité mesurée pour des attaques symétriques. Il utilise des notions développées dans des chapitres ultérieurs, auxquels il faudra se référer pour plus de détails, tels que :

- la conductimétrie : cf. section 2.2.3, page 62.
- le confinement : cf. section 3.2, page 92.

Une hypothèse simple qui est formulée ici s'appuie uniquement sur des arguments géométriques, d'après le modèle de l'attaque à deux vitesses. Le pore a donc une forme biconique. L'origine des temps est choisie arbitrairement au moment où les deux cônes se rejoignent. Le temps d'éclosion est nommé t_0 , l'attaque commence donc à $t = -t_0$ (cf. figure 2.14).

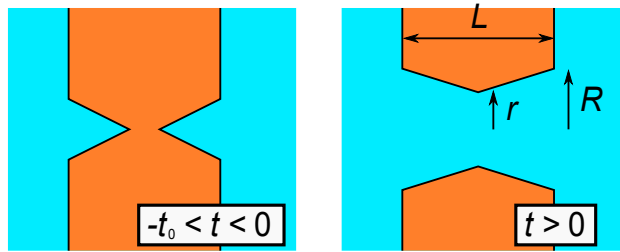


FIGURE 2.14 – Schéma de la géométrie du pore avant et après éclosion.

L'intensité électrique mesurée est $I = G \times U$, où la conductance G s'exprime par :

$$G = \sigma \frac{\pi r R}{L}, \quad (2.4)$$

où σ est la conductivité de la solution, r et R les petit et grand rayons, et L l'épaisseur de la membrane, ici supposée indépendante du temps. Cette relation s'appuie sur une conduction ohmique de la solution, elle est démontrée dans la section de caractérisation de la géométrie par conductimétrie (cf. section 2.2.3, page 62). Dans le volume, le pore s'accroît à la vitesse $v_{\perp}$, donc les rayons valent :

$$r = v_{\perp} t \quad (2.5)$$

$$R = v_{\perp} (t + t_0) \quad (2.6)$$

Ainsi la conductance est :

$$G(t) = \frac{\sigma \pi}{L} v_{\perp}^2 t_0^2 \left(\frac{t^2}{t_0^2} + \frac{t}{t_0} \right) \quad (2.7)$$

En prenant la variable réduite $\tau = t/t_0$, on obtient :

$$I_{\text{biconique}}(t) \propto \tau^2 + \tau \quad (2.8)$$

D'autre part, il est également possible de modéliser le courant dans le cas où les pores sont considérés cylindriques. Dans ce cas, on utilise la limite $v_{//} = \infty$ du modèle à deux vitesses d'attaque. Les rayons r et R sont alors tous deux égaux à $v_{\perp}t$, et ainsi :

$$G(t) = \frac{\sigma\pi}{L} v_{\perp}^2 t_0^2 \left(\frac{t^2}{t_0^2} \right), \quad (2.9)$$

et l'intensité est donc proportionnelle à $(t/t_0)^2$:

$$I_{\text{cylindrique}}(t) \propto \tau^2 \quad (2.10)$$

La figure 2.15 présente différentes courbes d'attaque, ainsi que les interpolations obtenues avec les deux modèles cylindrique et biconique.

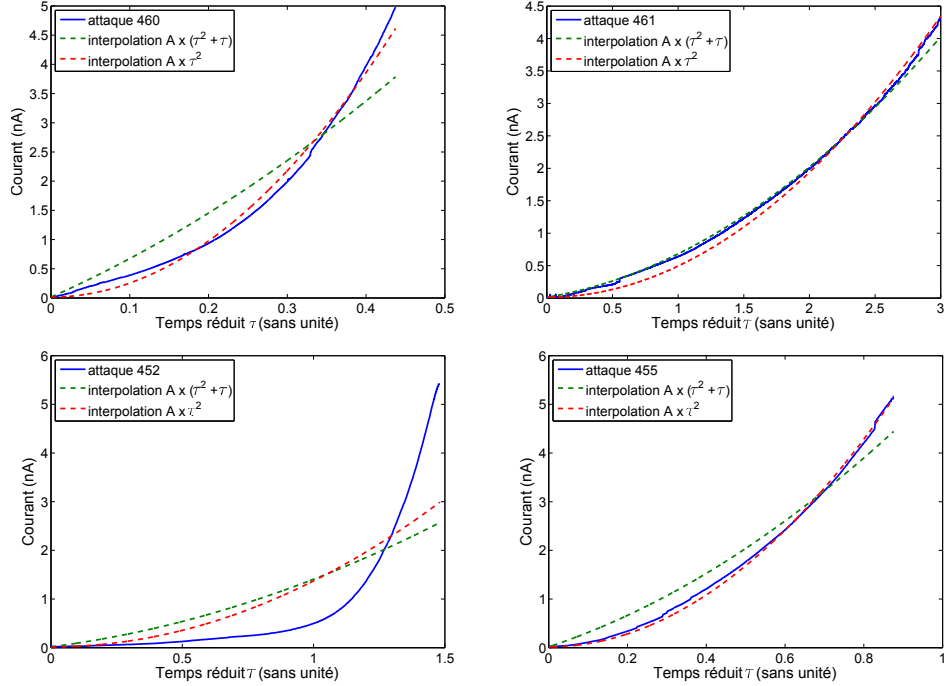


FIGURE 2.15 – Courbes d'attaque pour différents films de polycarbonate. Les courbes en pointillés correspondent aux interpolations des modèles biconique ($I \propto \tau^2 + \tau$) et cylindrique ($I \propto \tau^2$).

Elle montre que ces modèles ne peuvent pas correspondre aux cas réels. La prise en compte de la géométrie seule ne suffit pas à expliquer l'allure des courbes. Deux autres effets peuvent influencer sur l'évolution temporelle du courant :

- La vitesse d'attaque $v_{\perp}$ peut varier selon la distance à la trace. En effet, l'irradiation peut fragiliser le matériau autour de la trace. Cet argument est utilisé pour expliquer la décroissance de l'évolution du rayon des pores en fonction du temps d'attaque (cf. figure 2.20, page 60), mais uniquement pour les rayons importants dans ce cas. Il se peut aussi que les dégâts présentent des disparités locales au niveau de la trace, ayant des conséquences sur les temps d'attaque très faibles.
- Le confinement des ions dans un nanopore en formation, donc encore très petit, peut jouer un rôle important sur la conductivité de la solution, qui dépendrait alors du rayon du pore. Néanmoins, cet effet n'est pas quantifiable. Le phénomène de confinement est présenté dans la section 3.2, page 92.

Attaque asymétrique de trace unique dans le polyimide

Les films de polyimide ont été exclusivement attaqués de manière asymétrique dans cette thèse, avec NaOCl et KI. L'ouverture du pore était suivie par conductimétrie, afin de stopper l'attaque à la taille de pore souhaitée. La figure 2.16 montre l'allure typique de l'évolution temporelle du courant électrique.

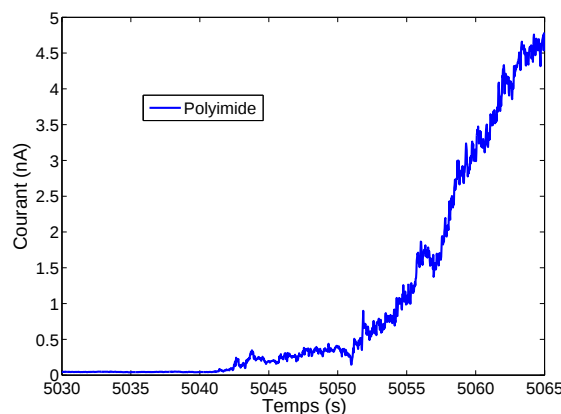


FIGURE 2.16 – Suivi par conductimétrie d'une attaque d'un film de polyimide. L'éclosion a lieu vers $t = 5\,040$ s, soit après 1 h 24 min d'attaque.

Arrêt de l'attaque. Lorsque le courant atteint une valeur correspondant à une taille de pore souhaitée, l'attaque est stoppée en rinçant les compartiments avec de la solution de neutralisation puis de l'eau purifiée, à tempéra-

ture ambiante. La baisse de température et le retrait de la solution d'attaque arrêtent le processus d'attaque.

Comme le temps caractéristique de l'attaque d'un pore après l'éclosion est de l'ordre de la dizaine de secondes pour les rayons les plus faibles, à la minute pour des pores plus grands, il est important de ralentir au maximum le processus après l'éclosion. Ceci est réalisé par deux méthodes : la solution de neutralisation et l'électro-stoppage.

Dans le cas des films de polyimide, la solution de neutralisation est une solution électrolytique d'ions K^+ et I^- . Dès que le pore éclot, la solution d'attaque entre en contact avec elle. Immédiatement, les ions I^- réduisent les ions OCl^- , responsables de l'attaque, ce qui entre en compétition avec leur réaction sur les parois internes du pore pour l'agrandir.

Le procédé d'*électro-stoppage* a été utilisé pour l'attaque des monopores dans le polyimide. Il s'agit du choix judicieux du sens de la polarité imposée afin de ralentir l'agrandissement du pore juste après l'éclosion du pore. Les ions responsables de l'attaque sont les ions hypochlorite, OCl^- , chargés négativement. En utilisant l'électrode chargée positivement du côté de la solution d'attaque, ces ions sont donc repoussés en arrière par la force électrique. Cet effet s'ajoute au précédent, car les ions réducteurs I^- sont également attirés du côté de l'attaque, vers l'anode.

2.2 Caractérisation de la géométrie

2.2.1 Contexte

Un nanopore unique permet théoriquement de réaliser des expériences de transport et de translocation. Avant cela, il est nécessaire de caractériser ce qui peut entrer en jeu pour de telles expériences. La géométrie en est l'aspect majeur. Toutefois, il est difficile d'observer précisément un nanopore du fait même de sa très petite taille. Le tableau 2.4 propose quelques moyens usuels d'exploration à l'échelle nanométrique, et y confronte les contraintes dues aux nanopores.

Technique	Contrainte
Microscopie à force atomique	nécessite une pointe très fine
Microscopie électronique à transmission	film polymère trop fragile
Rayons X	pores multiples uniquement
Neutrons	pores multiples uniquement
Microscopie confocale	résolution trop faible

TABLEAU 2.4 – Quelques techniques d'observation aux échelles nanométriques.

La principale difficulté d'observation d'un pore unique, du côté du petit rayon, reste sa localisation. En effet, l'irradiation permet d'obtenir une trace latente unique par placement d'un diaphragme devant le film polymère, mais la précision sur l'endroit exact n'est que de l'ordre du millimètre. Or, le rayon d'un pore est généralement de l'ordre de 10 nm. Ainsi, le rapport entre la surface du pore (100 nm²) et la surface de recherche (1 mm²) vaut environ 10¹⁰. À titre de comparaison, ceci est égal au rapport entre la taille d'une balle de golf (de diamètre 42,67 mm) et de 2 000 terrains de football (chacun de dimensions 105 m × 68 m). Ainsi, même avec une technique d'observation suffisamment précise, qui serait théoriquement possible d'observer le petit rayon, la recherche prendrait beaucoup de temps.

2.2.2 Microscopie électronique

Au cours de cette thèse, les membranes nanoporeuses ont été exclusivement observées au FESEM (*Field Emission Scanning Electron Microscope*, Microscope Électronique à Balayage à Émission de Champ). Il s'agit d'un microscope électronique ayant une résolution améliorée par rapport à un microscope électronique à balayage habituel.

Aucun pore unique n'a été observé, pour les raisons exposées précédemment. Les fluences² utilisées pour les observations de membranes multipores étaient 10^7 et 10^9 pores.cm⁻². Une fluence élevée est préférée pour des rayons plus faibles, car elle donne plus d'images de pores par microscopie. Une fluence plus faible est utilisée pour les rayons plus élevés, pour éviter le recouvrement des pores. Le phénomène de recouvrement est illustré sur la figure 2.17, où la plupart des pores correspondent à l'attaque de plusieurs traces latentes.

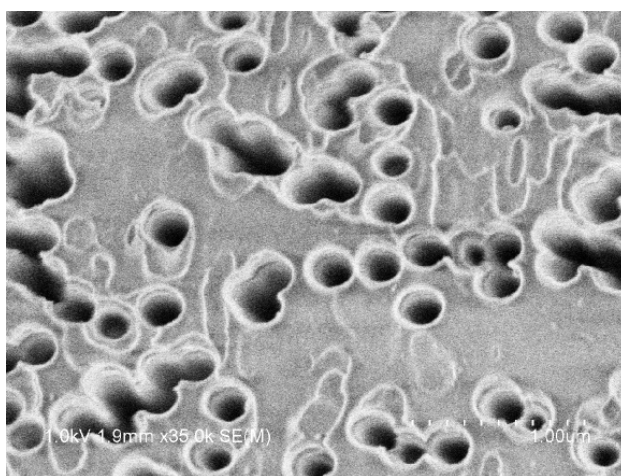


FIGURE 2.17 – Membrane de PC, attaquée symétriquement pendant 10 min dans NaOH 2 M à 70 °C.

Détermination de $v_{\perp}$ dans le polycarbonate

La vitesse d'attaque dans le volume, $v_{\perp}$, peut être mesurée par microscopie. Pour cela, on attaque des films de polycarbonate irradiés, dont les traces sont révélées grâce à NaOH 2 M, à 70 °C. Plusieurs temps d'attaque sont choisis pour obtenir des rayons de pores différents. Deux fluences sont utilisées pour pouvoir observer suffisamment de pores par image, tout en évitant le recouvrement.

Les membranes obtenues sont ensuite séchées puis observées au FESEM. On voit que les rayons des pores augmentent avec le temps d'attaque, cf. figure 2.18.

En prenant de nombreux clichés, il est ensuite possible de traiter les images de manière automatique, afin d'obtenir des statistiques sur les tailles

2. La fluence est le nombre d'ions ayant traversé le film durant l'irradiation par unité de surface. Elle est égale au nombre de pores obtenus par unité de surface.

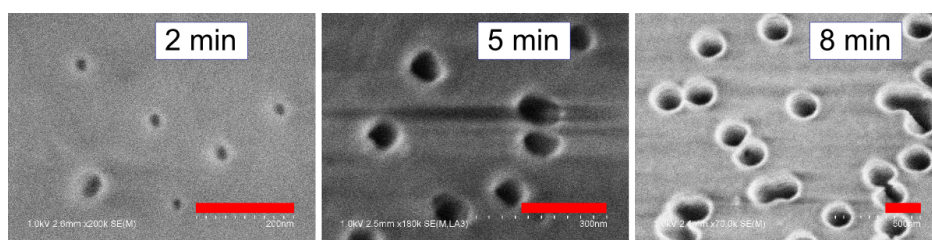


FIGURE 2.18 – Membrane de PC, attaquée symétriquement pendant 2, 5 et 8 min dans NaOH 2 M à 70 °C. Les barres rouges représentent 200 nm.

de pore. Le logiciel de traitement d'images Visilog [91] a été utilisé ici. Le principe de l'analyse d'image est présenté sur la figure 2.19.

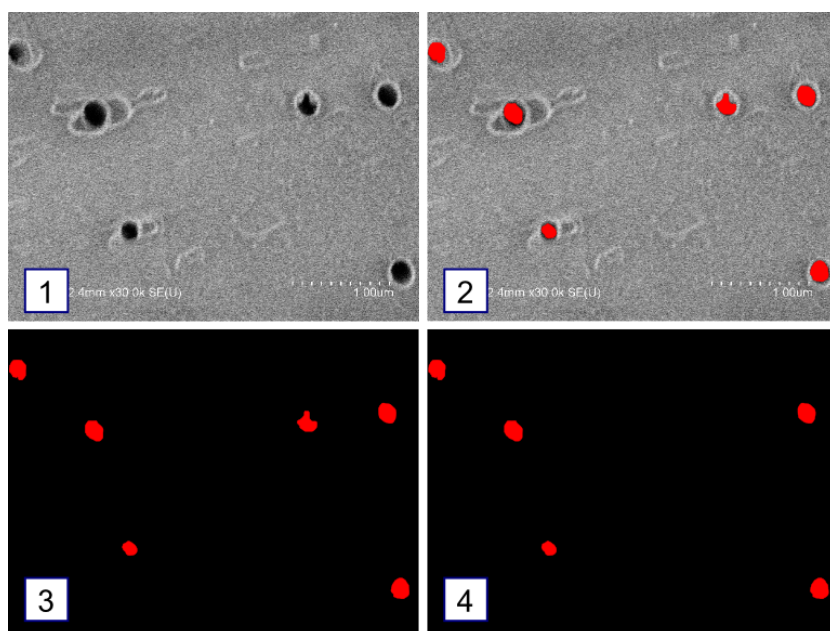


FIGURE 2.19 – Principe de l'analyse d'images FESEM.

Les différentes étapes sont les suivantes :

1. L'image FESEM est importée, les nuances de gris sont indexées. Un léger flou gaussien est appliqué afin d'éviter des pixels isolés.
2. Une valeur seuil de nuance de gris est choisie, de telle façon que les pixels sombres correspondant à l'intérieur des pores soient sélectionnés, mais pas les pixels clairs de la surface de la membrane. Les limites blanches des pores sont en général prises comme référence.

[91] Visilog, logiciel de noesis. <http://www.noesisvision.com/fr/visilog.html>.

3. L'image est binarisée suite au choix de la valeur seuil. On obtient des formes correspondant à l'intérieur des pores.
4. Le programme filtre les formes obtenues selon deux paramètres. On supprime les formes trop petites pour être des pores, pour ne pas prendre en compte les artefacts. On supprime également les formes d'excentricité trop importante, pour ne pas prendre en compte les phénomènes de recouvrement et les pores anormaux.

Le reste des opérations est entièrement automatique. Le logiciel calcule la taille de chaque forme. Comme elles ne sont pas exactement rondes, le logiciel calcule la longueur maximale séparant deux points de chaque forme. Cette distance est retenue comme diamètre du pore. Le traitement de nombreuses images permet d'obtenir un rayon moyen des pores, noté R , pour chaque durée d'attaque, ainsi que l'écart-type de la distribution. Les résultats sont présentés sur la figure 2.20.

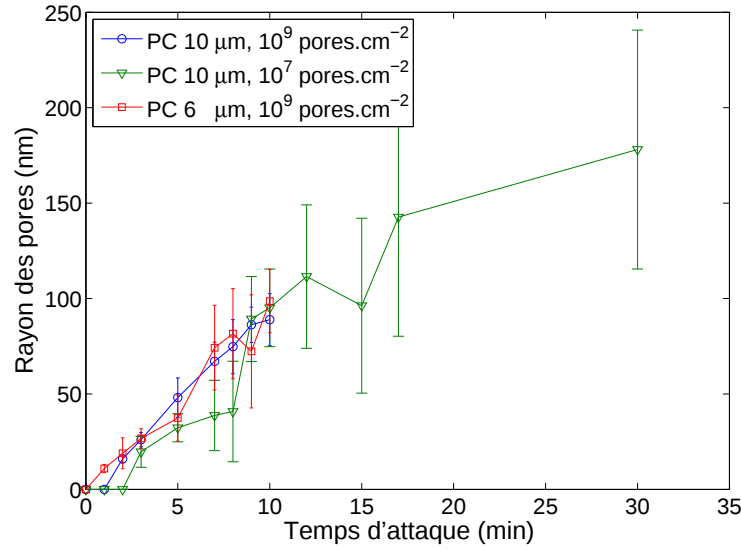


FIGURE 2.20 – Évolution du rayon des nanopores supposés cylindriques selon le temps d'attaque.

La vitesse d'attaque dans le volume, pour le polycarbonate dans NaOH 2 M à 70 °C, est donc de :

$$(v_{\perp})_{PC} = \frac{dR}{dt} = 10 \pm 1,5 \text{ nm.min}^{-1} \quad (2.11)$$

Cette valeur est correcte pour les 10 premières minutes d'attaque. $v_{\perp}$ diminue légèrement ensuite, car au fur et à mesure que le rayon grandit,

l'attaque se fait de plus en plus loin de la trace, et les dégâts dus à l'irradiation sont de moins en moins présents. La vitesse $v_{\perp}$ dépend ainsi légèrement de la distance à la trace et n'est donc pas constante. Dans la suite, elle sera tout de même considérée comme constante, la plupart des attaques durant moins de 10 minutes.

Grand rayon des pores coniques dans le polyimide

Au cours de cette thèse, toutes les traces latentes dans le polyimide ont subi une attaque asymétrique, afin d'obtenir des pores coniques avec un faible rayon du côté de la solution de la neutralisation. Ce type de pore est plus apte à la translocation de macromolécules, car il est possible d'obtenir des rayons de l'ordre du nanomètre, contrairement aux pores symétriques où un arrêt rapide de l'attaque pose beaucoup plus de problèmes pratiques.

Il est donc souhaitable de caractériser le rayon le plus faible des pores coniques. Cela ne peut se faire par une observation directe au FESEM, ce rayon étant inférieur à la résolution de l'appareil. Mais il est néanmoins possible d'obtenir la valeur du petit rayon par conductimétrie, si celle du grand rayon est connue. C'est donc pour cela que la grande ouverture du pore est observée au FESEM. La situation est résumée sur la figure 2.21. La technique de conductimétrie et la méthode de détermination du petit rayon sont présentées dans la section 2.2.3, page 62.

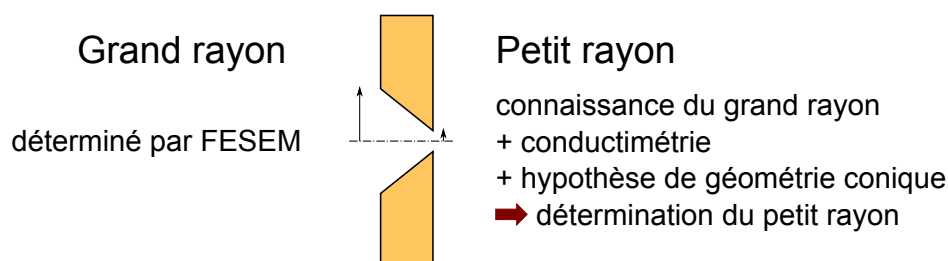


FIGURE 2.21 – Méthode de détermination des petit et grand rayons.

Un film de polyimide multipore est donc attaqué dans les mêmes conditions que les autres films à trace unique, c'est-à-dire dans NaOCl, à 50 °C, avec KI comme solution de neutralisation. La fluence est suffisamment faible pour que les pores soient bien éloignés les uns des autres. Des clichés FESEM sont présentés sur la figure 2.22. La valeur de 500 nm est donc retenue pour la valeur du grand rayon, dans une membrane de 8 μm d'épaisseur.

Le rayon des grandes ouvertures dépend du temps d'attaque. L'éclosion du pore et son agrandissement sont suivis par conductimétrie. Néanmoins,

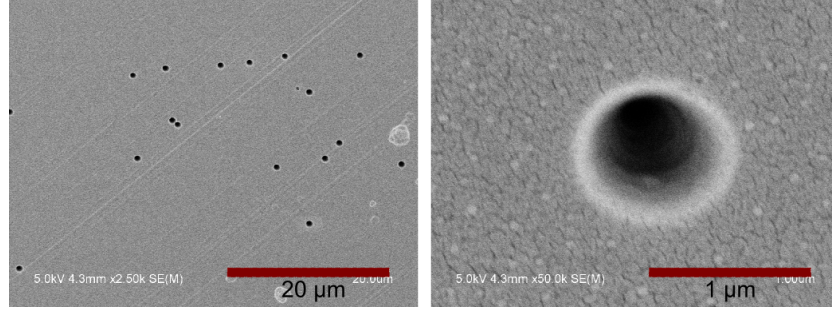


FIGURE 2.22 – Observation d’une membrane nanoporeuse en polyimide de 8 μm d’épaisseur.

comme le temps nécessaire à l’éclosion (> 100 min) est beaucoup plus grand que le temps d’attaque après éclosion (< 3 min), la valeur obtenue est supposée constante pour toutes les membranes à pore unique et de même épaisseur, quel que soit le temps d’attaque final.

Il est également possible de tirer de cette observation une estimation de $v_{\perp}$ dans le polyimide. Comme l’attaque de ces membranes varie généralement entre 1h15 et 1h45, on en déduit :

$$(v_{\perp})_{\text{PI}} = 5,5 \pm 1,2 \text{ nm.min}^{-1} \quad (2.12)$$

2.2.3 Conductimétrie

Afin de vérifier la compatibilité d’un pore unique avec la translocation de macromolécules, il est nécessaire de connaître la taille de son ouverture. Comme l’observation par microscopie ne peut pas renseigner sur la taille des petits rayons, la conductimétrie s’avère nécessaire.

Le schéma général de la technique de conductimétrie est présenté sur la figure 2.23.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est présenté sur les photographies de la figure 2.24. Les différents éléments utilisés sont les suivants :

1. La cellule de mesure. Elle consiste en deux parties serrées par des vis. La membrane (ici en polyimide) est placée entre les deux compartiments. Chaque compartiment est percé d’un trou vertical et d’un trou horizontal, donnant accès à la solution respectivement aux électrodes et à la membrane.

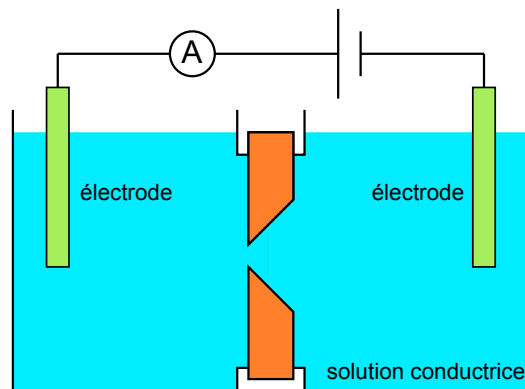


FIGURE 2.23 – Schéma du montage de conductimétrie.

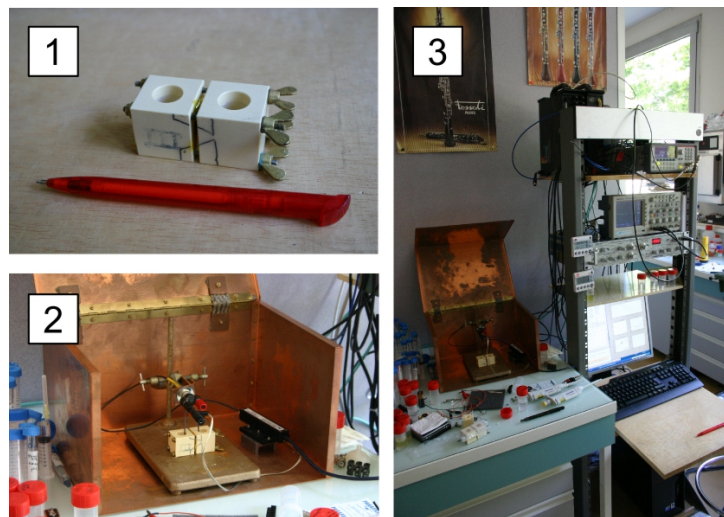


FIGURE 2.24 – Dispositif expérimental pour la conductimétrie.

2. La photographie montre les électrodes plongées dans la cellule. Elles sont reliées à une tête d'amplificateur. Le tout est inséré dans une boîte de cuivre utilisée comme cage de Faraday. Cette dernière sert à éliminer les perturbations électriques extérieures, dont la majeure partie correspond au 50 Hz du secteur. Un orifice est destiné à laisser passer le fil de la tête d'amplificateur, seul élément faisant le lien entre l'intérieur et l'extérieur de la cage de Faraday.
3. Voici les différents éléments visibles sur la photographie, de bas en haut :
 - un ordinateur, utilisant Matlab et un logiciel développé au laboratoire, permettant un traitement des données en temps réel.

- un amplificateur de courant Axopatch 200B [92], permettant de mesurer des courants de l'ordre du picoampère.
- un oscilloscope.
- un générateur de tension basses fréquences, permettant des balayages en tension.
- une carte d'acquisition permettant un échantillonnage jusqu'à 100 kHz.

La solution conductrice est généralement une solution de chlorure de potassium, de concentration 1 M ou 0,1 M. En imposant une tension entre les électrodes, typiquement de l'ordre de 100 mV ou 1 V, un courant ionique se crée dans la solution. La résistance due à la solution elle-même en dehors du pore est négligée. La conductance mesurée, c'est-à-dire le rapport entre le courant mesuré et la tension imposée, est attribuée uniquement à la conductance des ions dans le nanopore.

Détermination du petit rayon

La solution ionique présente dans un pore conique a la forme d'un cône tronqué. Voici les symboles utilisés :

- G : conductance électrique du pore.
- Λ : résistance électrique du pore.
- σ_{bulk} : conductivité électrique de la solution ionique.
- λ : conductivité molaire de cette solution.
- r : rayon de la petite extrémité du pore.
- R : rayon de la grande extrémité du pore.
- L : épaisseur de la membrane.
- α : demi-angle au sommet du cône.

Pour les calculs, ce cône tronqué est modélisé par une infinité de cylindres de rayon ϕ , d'épaisseur dx dans le sens de la longueur du cylindre. Chacun possède une résistance $d\Lambda$, qui s'exprime par :

$$d\Lambda = \frac{1}{\sigma_{\text{bulk}}} \frac{dx}{\pi\phi^2} \quad (2.13)$$

La conductivité de la solution contenue dans le pore est considérée ici comme égale à la conductivité dans le volume, σ_{bulk} . Cette hypothèse sera discutée dans la suite.

La résistance totale du pore, Λ , s'obtient par calcul de la somme de ces résistances $d\Lambda$, placées en série.

$$\Lambda = \frac{1}{G} = \int d\Lambda \quad (2.14)$$

[92] Axopatch 200b produit par molecular devices.

L'intégration donne :

$$\Lambda = \frac{1}{\pi\sigma_{\text{bulk}} \sin \alpha} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{R} \right) \quad (2.15)$$

Finalement, la conductance du pore cylindrique est donnée par cette formule, obtenue de manière exacte :

$$G = \frac{\pi\sigma_{\text{bulk}}rR}{L} \quad (2.16)$$

Ainsi, il est possible de déterminer le petit rayon r par cette formule traduisant l'hypothèse d'un pore parfaitement conique :

$$r = \frac{LG}{\pi\sigma_{\text{bulk}}R} \quad (2.17)$$

La valeur de σ peut se calculer d'après les tables. Les valeurs des conductivités molaires pour les ions K^+ , Na^+ et Cl^- sont les suivantes à 25°C.

$$\lambda_{\text{K}^+}^0 = 7,35 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1} \quad (2.18)$$

$$\lambda_{\text{Na}^+}^0 = 5,01 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1} \quad (2.19)$$

$$\lambda_{\text{Cl}^-}^0 = 7,63 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1} \quad (2.20)$$

Ainsi, pour des concentrations très faibles, les conductivités molaires du chlorure de sodium et du chlorure de potassium sont les suivantes :

$$\lambda_{\text{KCl}}^0 = 15,0 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1} \quad (2.21)$$

$$\lambda_{\text{NaCl}}^0 = 12,6 \times 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1} \quad (2.22)$$

Pour des concentrations de l'ordre de 1 M et supérieures, les ions sont fortement concentrés et la relation $\sigma = \text{concentration} \times \lambda^0$ n'est pas applicable. Pour les calculs de cette thèse, la conductivité de la solution de KCl a été calculée par une formule empirique, s'appuyant sur les résultats de l'équipe de Della Monica [93]. La conductivité molaire d'une solution concentrée de KCl, à 25 °C, de concentration $[\text{KCl}]$, est :

$$\frac{\sigma_{\text{bulk}}}{X^2} = 10^{-4} (-4,98X^5 + 32,3X^4 - 85,9X^3 + 116X^2 - 95,4X + 150), \quad (2.23)$$

exprimée en $\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$ et où $X = \sqrt{[\text{KCl}]}$.

L'évolution de la conductivité molaire d'une solution de KCl est illustrée sur la figure 2.25. Des écarts supérieurs à 30 % existent entre une solution diluée et concentrée.

[93] M. Dellamonica, A. Ceglie, and A. Agostiano. Extension of the falkenhagen equation to the conductivity of concentrated electrolyte-solutions. *Journal of Physical Chemistry*, 88(10) :2124-2127, 1984.

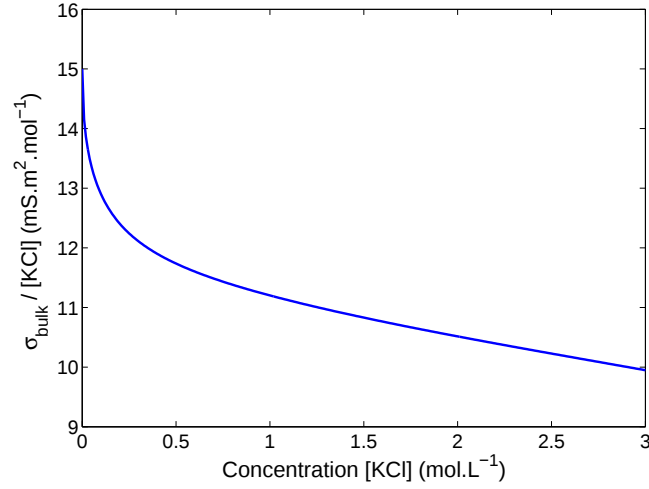


FIGURE 2.25 – Évolution de la conductivité molaire λ_{bulk} d'une solution de KCl en fonction de sa concentration.

Le but de ces calculs était de déterminer la conductivité σ , car elle donne accès à la valeur du petit rayon r . Désormais, tous les paramètres de l'équation 2.17,

$$r = \frac{LG}{\pi\sigma_{\text{bulk}}R}, \quad (2.24)$$

sont connus. Un exemple de valeurs rencontrées pour une membrane de polyimide dans une solution de KCl 1 M est présenté dans le tableau 2.5 :

Symbole	Grandeur	Valeur
L	épaisseur de la membrane	8 μm
G	conductance mesurée	typiquement 10 nS
σ_{bulk}	conductivité (à 1 M)	11,2 S.m ⁻¹
R	Grand rayon	0,5 μm

TABLEAU 2.5 – Les paramètres de l'équation 2.17 déterminant le petit rayon.

Ces données conduisent donc à la grandeur du petit rayon r :

$$r = 4,5 \text{ nm} \quad (2.25)$$

La conductimétrie a donc permis de déterminer le rayon de la petite ouverture du nanopore, grâce à l'observation préalable de la grande ouverture par microscopie, et en faisant l'hypothèse d'une géométrie conique parfaite. Les interactions des ions de la solution avec la paroi du pore ont également été négligées.

Limites de la conductimétrie

Premièrement, aux faibles concentrations, les effets liés à l'écrantage insuffisant des charges de surface peut provoquer des effets de rectification, qui rendent difficile la détermination de la conductance G du pore, et par conséquent, celle du petit rayon d'après la relation 2.17.

De plus, aux concentrations élevées, des effets de confinement peuvent exister. En effet, le rayon du pore est très faible, et les ions ne peuvent pas s'y déplacer aussi librement que dans le volume. Ces effets ne sont pas pris en compte dans la littérature, et l'usage de la formule 2.17 est communément admis pour l'estimation du rayon d'un pore conique. Pourtant, le confinement peut diminuer nettement la conductivité de la solution dans le pore. Celle-ci n'est plus σ_{bulk} mais σ_{conf} , la conductivité de la solution confinée. Pour les cas étudiés dans cette thèse, σ_{conf} peut être jusqu'à 5 fois inférieure à σ_{bulk} . Ainsi, la relation 2.17 peut surestimer la valeur du rayon.

Ces deux limites aux mesures par conductimétrie sont présentées dans le chapitre suivant. La rectification est présentée dans la section 3.1, page 84, et les effets de confinement dans la section 3.2, page 92.

2.3 Caractérisation de la paroi du pore

Certaines expériences ont montré que la paroi du pore pouvait causer des phénomènes mesurables. Elles sont présentées dans cette section, afin d'évaluer les effets que cela pourrait impliquer lors de la translocation de macromolécules.

2.3.1 Phénomène de rectification

La rectification est un phénomène qui a pour principale conséquence l'impossibilité de définir une conductance de membrane. Ainsi, l'équation 2.17 n'est plus applicable et il est alors difficile d'estimer la taille du pore. La rectification n'est présentée ici que brièvement, dans l'unique but de la définir. Une discussion plus poussée sur ses mécanismes est faite dans la section 3.1, page 84.

Courbe intensité-tension

Une courbe intensité-tension, appelée courbe I-V, présente la réponse en courant face à la tension imposée entre les deux côtés d'un nanopore. Elle dépend de la nature de la solution et de sa concentration, ainsi que de la température.

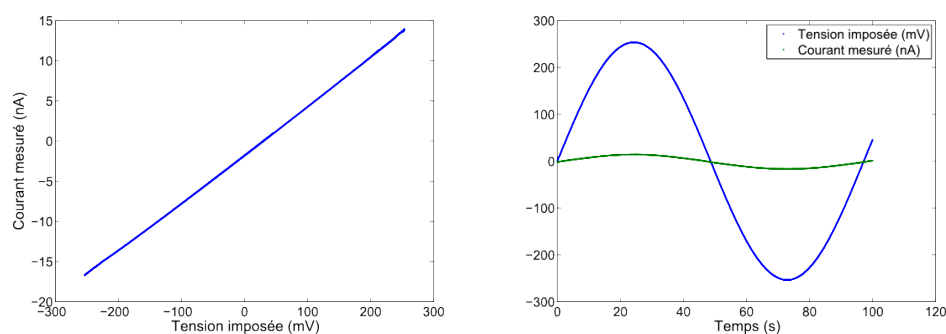


FIGURE 2.26 — À gauche : exemple de courbe I-V pour une membrane de polyimide, placée dans KCl 1 M, à pH neutre. À droite : Evolution dans le temps du courant mesuré en fonction de la tension imposée, correspondant à cette courbe I-V.

La figure 2.26 montre un exemple de courbe I-V obtenue avec un nanopore dans une membrane de polyimide. La solution est composée de KCl concentré à 1 M, de pH neutre. La courbe est obtenue en balayant la tension imposée dans le temps, comme décrit sur le graphique de droite.

Un comportement quasiment linéaire est observé. La pente de la courbe donne le rapport entre le courant mesuré et la tension imposée, c'est-à-dire la conductance du pore. Ici, elle est d'environ 60 nS.

Non-linéarité des courbes I-V

Dans certains cas, la courbe I-V correspondant à la conductance d'un pore n'est pas symétrique et s'écarte de la linéarité. Un exemple est présenté sur la figure 2.27.

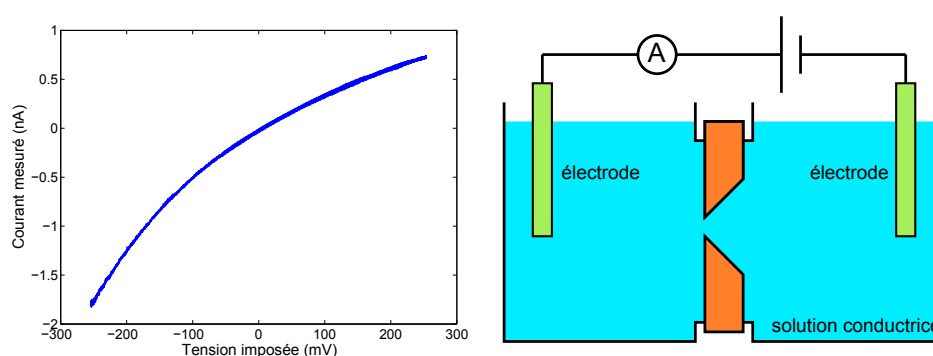


FIGURE 2.27 – Exemple de courbe I-V non symétrique. La polarité est présentée sur le schéma de droite. Le pore est dans une membrane de polyimide de 6 μm d'épaisseur, dans KCl 0,1 M à pH neutre.

Ce phénomène d'asymétrie est appelé *rectification*. Il existe une polarité où le passage des ions est favorisé par rapport à l'autre polarité. Il est à noter que la rectification est aussi observée dans les canaux ioniques naturels, comme c'est le cas avec l' α -hémolysine. Expérimentalement, la rectification a été observée dans cette thèse essentiellement pour des concentrations de l'ordre de 0,1 M ou inférieures, et à pH neutre.

De plus amples informations sur le phénomène de rectification et sur ses causes sont présentées dans le chapitre suivant, dans la section 3.1, page 84.

2.3.2 Comportement en milieu acide

Afin de s'affranchir du phénomène de rectification, il est possible de réduire le pH de la solution. Ceci a pour effet de protoner les groupements chimiques de la paroi du pore, et d'obtenir une courbe I-V linéaire. Ainsi, la détermination de la conductance du pore est simple.

Toutefois, en milieu acide, les nanopores utilisés dans cette thèse, qu'ils soient dans une matrice de polycarbonate ou de polyimide, ont tendance à perdre leur conductance ionique. La figure 2.28 montre l'évolution du courant ionique traversant un nanopore de polycarbonate, dans une membrane de 10 μm d'épaisseur, sous une tension de 2 V. Chaque saut correspond à

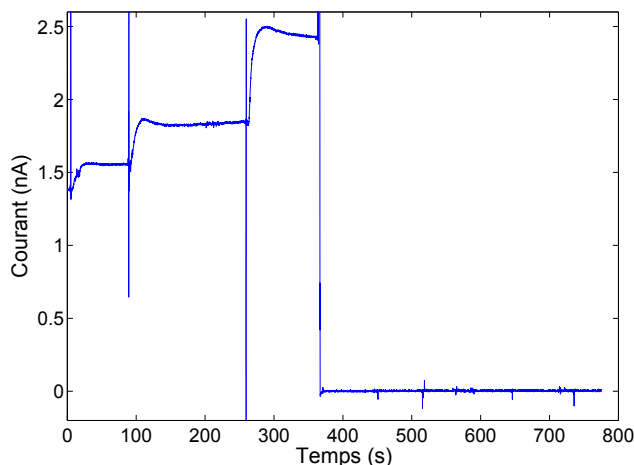


FIGURE 2.28 – Ajout progressif d'acide chlorhydrique (HCl 2 M) dans un nanopore de polycarbonate, avec NaCl 2M.

l'ajout d'une goutte de solution acide (HCl 2 M). Trois sauts de ce type se succèdent. À chaque fois, le courant augmente après l'ajout de la goutte. Cela est dû à l'augmentation de la conductivité de la solution par l'ajout d'ions H^+ , beaucoup plus mobiles que les ions Na^+ déjà en solution ($\lambda_{\text{H}^+}^0 = 7\lambda_{\text{Na}^+}^0$). Le courant se stabilise ensuite. Mais après le troisième ajout, lorsque le pH devient très acide ($\text{pH} \approx 2$), le courant devient nul. Ce phénomène d'annulation de la conductance est certainement lié à la neutralisation de la paroi, mais son caractère soudain n'est pas encore compris.

L'évolution de la conductance en fonction du pH a été étudiée plus précisément. Des membranes de polycarbonate d'épaisseur 10 μm ont été placées dans des solutions de sel (NaCl 2 M) de différents pH. À chaque solution, la même tension de polarisation est appliquée. La conductance du pore de la membrane est alors mesurée. La figure 2.29 présente le résultat pour deux membranes différentes.

Il s'agit de membranes de polycarbonate, percées d'un pore unique de manière symétrique avec NaOH 2M à 70 °C. Dans le premier cas, à gauche, la conductance reste constante tout d'abord. Mais à $\text{pH} \approx 9$, la conductance s'annule. Ce phénomène est alors irréversible, même lors du retour à des

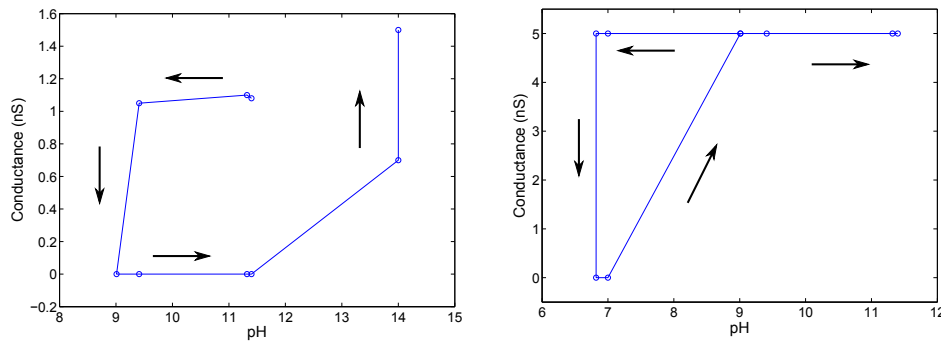


FIGURE 2.29 – Évolution de la conductance de membranes de polycarbonate avec le pH. En faisant l'hypothèse d'une forme cylindrique, pour une solution de NaCl 2 M, le rayon estimé des pores est de 12 nm pour 1 nS et 25 nm pour 5 nS.

valeurs de pH plus élevées. Il faut alors immerger la membrane dans une solution extrêmement basique pour que la conductance reprenne une valeur non nulle. Elle continue d'augmenter, mais cela est sans doute dû au fait que le pore subit une légère attaque à température ambiante, pour une telle valeur de pH.

À droite, la membrane possède un pore plus large que la précédente, comme l'indique la valeur plus élevée de la conductance. Dans ce cas, l'annulation de la conductance est réversible, et le pore peut reprendre sa valeur initiale après un retour aux conditions précédentes.

Il a été notamment observé que pour des pores encore plus grands, la conductance reste constante même en milieu acide. C'est le cas pour la membrane présentée dans la figure 2.30, avec une membrane de même type que les précédentes.

Pour les pores de polyimide, cette tendance à s'annuler pour la conductance a été également observée. Tous les pores créés étaient coniques, avec une grande ouverture de l'ordre de $0,5\ \mu\text{m}$. L'annulation de la conductance en milieu acide prouve que les interactions entrant en jeu sont localisées du côté de la petite ouverture, car les dimensions sont trop grandes de l'autre côté. La figure 2.31 montre les derniers instants de conduction pour un nanopore dans une membrane de polyimide, conique, de $6\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, placé dans une solution de KCl 1 M à $\text{pH} = 2,8$ depuis plusieurs heures. Dans l'hypothèse d'un pore de forme parfaitement conique, le petit rayon est estimé à 2 nm.

Les mécanismes entraînant l'arrêt de la conduction à l'intérieur d'un nanopore en milieu acide ne sont pas encore compris. La charge de la paroi est

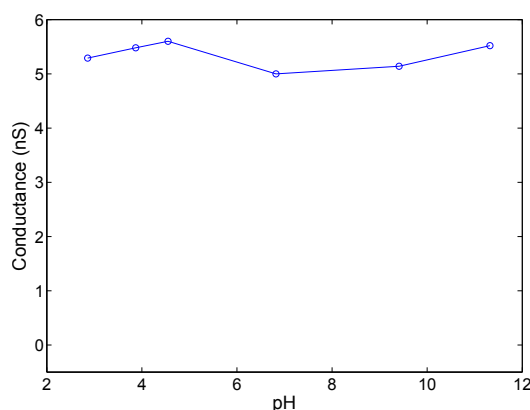


FIGURE 2.30 – Évolution de la conductance d’une membrane de polycarbonate avec le pH. En faisant l’hypothèse d’une forme cylindrique, pour une solution de NaCl 2 M, le rayon du pore est d’environ 27 nm.

nécessairement responsable, mais l’effet peut être couplé à des phénomènes mécaniques. L’hydrophobicité entre également en jeu, car une paroi neutre devient beaucoup plus hydrophobe qu’une paroi chargée.

2.3.3 Potentiel d’écoulement

La mesure du potentiel d’écoulement est une méthode de caractérisation d’une interface, ici la paroi d’un nanopore. Elle a pour but de déterminer quantitativement la charge surfacique de la paroi, car celle-ci possède une influence sur le transport de macromolécules à travers un nanopore. Ce paragraphe s’inspire de J. Lyklema [94].

Double couche électrique et potentiel ζ

Au contact d’une paroi chargée, une solution d’électrolyte voit l’organisation spatiale des ions changer, car ces derniers sont soit attirés soit repoussés par la paroi. Certains d’entre eux vont s’adsorber directement. Comme la charge de la surface n’est pas alors totalement écrantée, l’électroneutralité de la solution est perturbée localement, sur une distance correspondant à la longueur de Debye. Ces deux comportements ioniques forment la *double couche électrique*. La figure 2.32 présente un schéma de l’agencement des ions.

En plus des considérations électriques liées aux ions de la solution, il faut prendre en compte les effets hydromécaniques. En effet, si un écoulement est

[94] J. Lyklema. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, volume 2.

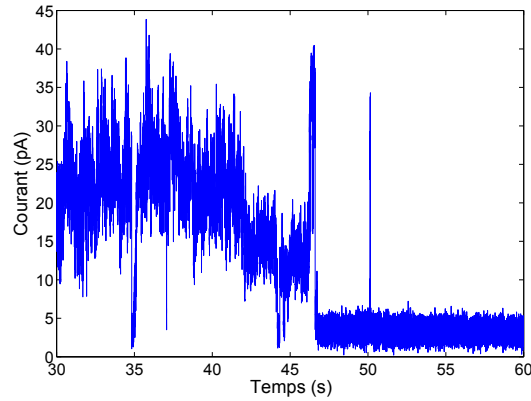


FIGURE 2.31 – Évolution dans le temps du courant ionique dans un nanopore de polyimide placé à $\text{pH} = 2,8$.

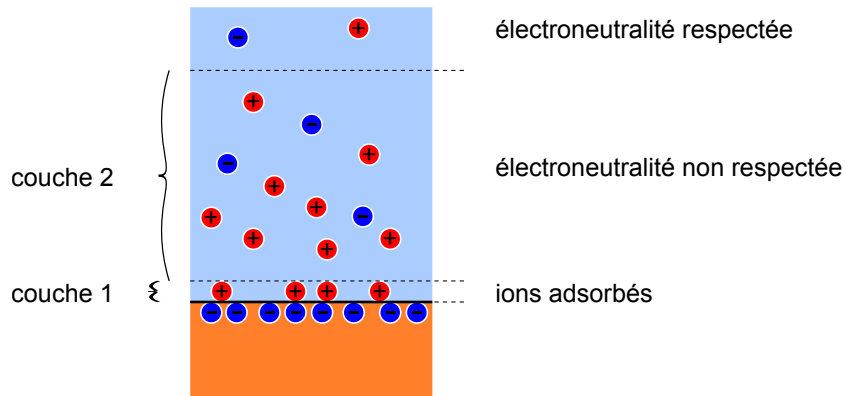


FIGURE 2.32 – Schéma de la double couche électrique.

créé grâce à une différence de pression par exemple, une partie de la solution où l'électroneutralité n'est pas respectée entre en mouvement, créant un courant électrique. Localement, au contact de la paroi, les molécules d'eau ne peuvent entrer en mouvement, c'est le phénomène de couche limite. Le potentiel électrocinétique, appelé potentiel ζ , est le potentiel électrique ressenti par la partie de la solution qui entre en mouvement. Un schéma est présenté sur la figure 2.33, il montre l'évolution spatiale du profil des vitesses et du potentiel électrique, au bord de la paroi du nanopore.

Ainsi, lorsqu'une solution ionique circule dans un nanopore, un courant électrique est créé. Le potentiel électrique qui en découle est appelé *potentiel d'écoulement*. C'est par sa mesure qu'il va être possible de déterminer le potentiel ζ .

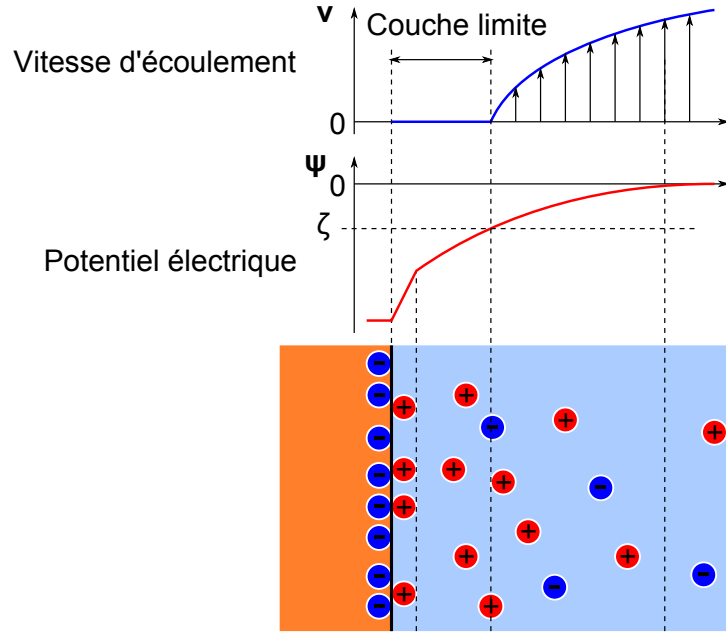


FIGURE 2.33 – Évolution spatiale du profil des vitesses et du potentiel électrique dans un nanopore.

Calcul du potentiel d'écoulement

Le système étudié ici est un pore cylindrique. D'après les équations d'hydrodynamique pour un écoulement de Poiseuille, le profil des vitesses est parabolique, comme l'indique la figure 2.34.

Le profil des vitesses est donc le suivant :

$$v(r) = -\frac{a^2}{4\eta} \left[1 - \left(\frac{r}{a} \right)^2 \right] \frac{\Delta p}{L}, \quad (2.26)$$

avec :

- r , la coordonnée radiale
- $v(r)$, la vitesse de l'écoulement au point de rayon r
- a , le rayon du pore
- η , la viscosité de la solution
- Δp , la différence de pression qui provoque l'écoulement
- L , la longueur totale du nanopore. Celui-ci est très long donc $L \gg a$.

L'équation peut être écrite en utilisant alors $\text{grad } p$, le gradient de pression.

$$v(r) = -\frac{a^2}{4\eta} \left[1 - \left(\frac{r}{a} \right)^2 \right] \text{grad } p, \quad (2.27)$$

Le courant d'écoulement, noté $I_{\text{écoulement}}$, est la somme sur toute la section

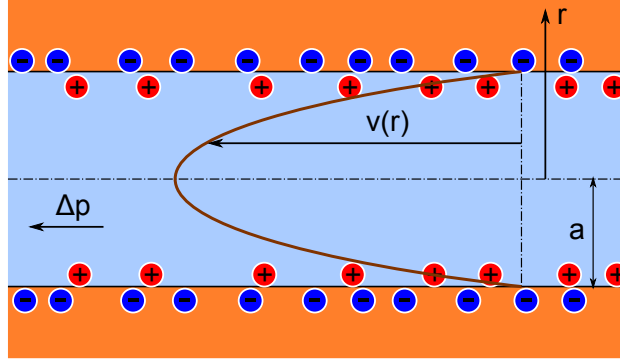


FIGURE 2.34 – Profil des vitesses pour un écoulement dans un nanopore à paroi chargée.

des charges emportées par le mouvement de la solution.

$$I_{\text{écoulement}} = 2\pi \int_0^a v(r) \rho(r) r dr, \quad (2.28)$$

où $\rho(r)$ représente la charge électrique des ions situés à r . On obtient ainsi :

$$I_{\text{écoulement}} = -\frac{\pi \text{grad } p}{2\eta} \int_0^a (a^2 - r^2) \rho(r) r dr \quad (2.29)$$

Pour progresser dans cette équation, il est ensuite nécessaire de connaître la charge électrique dans la solution ionique, résultant du déséquilibre entre ions positifs et négatifs. Son expression est obtenue en faisant l'hypothèse d'un nanopore de grand diamètre ou à fort écrantage, c'est-à-dire $a \gg \lambda_D$, où λ_D est la longueur de Debye. Dans ce cas, l'équation de Poisson donne son lien avec le potentiel électrique :

$$\rho(r) = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{d^2 \psi}{dz^2}, \quad (2.30)$$

avec les paramètres suivants :

- ε_0 : permittivité électrique du vide.
- ε_r : permittivité relative du milieu, pour l'eau $\varepsilon_r = 80$.
- $\psi(z)$: potentiel électrique dans la solution. Il s'exprime en fonction de z , distance à la surface.

Comme l'électroneutralité est respectée loin de la paroi, seules les valeurs de ρ près de la surface, c'est-à-dire r proche de $r = a$, comptent. Le terme $a^2 - r^2$ peut donc être approximé à $2a(a - r)$ soit $2az$. Ainsi, l'équation 2.29 devient :

$$I_{\text{écoulement}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \pi a}{\eta} \text{grad } p \int_0^a z \frac{d^2 \psi}{dz^2} dz \quad (2.31)$$

$$I_{\text{écoulement}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \pi a^2}{\eta} \text{grad } p \int_0^a z \frac{d^2 \psi}{dz^2} dz \quad (2.32)$$

L'intégrale peut être calculée en intégrant par parties :

$$\int_0^a z \frac{d^2 \psi}{dz^2} dz = \left[z \frac{d\psi}{dz} \right]_0^a - \int_0^a \frac{d\psi}{dz} dz \quad (2.33)$$

Le terme de gauche est nul, car pour $r = 0$, la symétrie donne $d\psi/dz = 0$, et $r = a$ donne $z = 0$. Le terme de droite vaut donc :

$$- \int_0^a \frac{d\psi}{dz} dz = \psi(r = 0) - \psi(r = a) = \zeta, \quad (2.34)$$

qui est le potentiel électrocinétique. Ainsi,

$$I_{\text{écoulement}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r A \zeta}{\eta} \text{grad } p, \quad (2.35)$$

formule dans laquelle $A = \pi a^2$ est la section du nanopore. Le courant d'écoulement $I_{\text{écoulement}}$ est compté positivement lorsque la solution s'écoule depuis les hautes pressions vers les basses.

Ce courant d'écoulement créé par une différence de pression est mis à profit dans certains travaux qui visent à générer une énergie électrique avec des membranes nanoporeuses ([95], [96]).

Il existe en théorie une conduction de surface, qui utilise les charges de la double couche électrique [97]. Par souci de simplicité, elle est négligée ici, et seule la conduction de la solution entre en jeu. Il est alors possible de déterminer le potentiel d'écoulement.

$$E_{\text{écoulement}} = \frac{I_{\text{écoulement}}}{G_{\text{pore}}}, \quad (2.36)$$

où G_{pore} est la conductance du pore. Elle s'exprime ainsi :

$$G_{\text{pore}} = \sigma \frac{A}{L} \quad (2.37)$$

-
- [95] Y. B. Xie, X. W. Wang, J. M. Xue, K. Jin, L. Chen, and Y. G. Wang. Electric energy generation in single track-etched nanopores. *Applied Physics Letters*, 93(16) :163116, October 2008.
- [96] J. Yang, F. Z. Lu, L. W. Kostiuik, and D. Y. Kwok. Electrokinetic microchannel battery by means of electrokinetic and microfluidic phenomena. *Journal of Micro-mechanics and Microengineering*, 13(6) :963–970, November 2003.
- [97] J. Lyklema. Electrokinetics after smoluchowski. *Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects*, 222(1-3) :5–14, July 2003.

En reprenant l'équation 2.35, le potentiel d'écoulement s'exprime donc ainsi :

$$E_{\text{écoulement}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r A \zeta}{\sigma A \eta} \text{grad } pL \quad (2.38)$$

$$E_{\text{écoulement}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta \Delta p}{\sigma \eta} \quad (2.39)$$

Contrairement à l'expression du courant d'écoulement, cette formule a l'avantage de ne pas faire intervenir a ou A , dépendant de la géométrie des pores.

Ainsi, le potentiel ζ est obtenu à partir des mesures expérimentales par :

$$\zeta = \frac{\eta \sigma}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \frac{E_{\text{écoulement}}}{\Delta p}, \quad (2.40)$$

équation appelée formule de Smoluchovski.

Expériences

Expérimentalement, le potentiel électrocinétique ζ a été mesuré sur des membranes nanoporeuses commerciales, de polycarbonate. La figure 2.35 montre la surface d'une telle membrane observée par microscopie électronique à balayage à effet de champ.

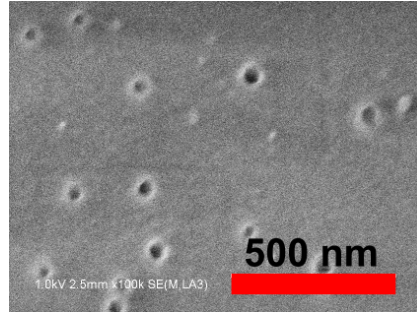


FIGURE 2.35 – Cliché FESEM d'une membrane commerciale SPI semblable à celles utilisées pour les mesures de potentiel électrocinétique. Le rayon des pores est environ 25 nm.

La cellule de conductimétrie est adaptée en y incorporant des tuyaux et une colonne verticale où la solution saline est insérée. Des différences de pression correspondant à une élévation de 50 cm sont imposées à des membranes nanoporeuses. La pression générée est de l'ordre de la dizaine de millibar. La tension mesurée est obtenue en utilisant le mode d'annulation de courant électrique de l'amplificateur Axopatch, qui donne la tension nécessaire pour imposer un courant nul entre les deux compartiments de la cellule. La

figure 2.36 montre une photographie du montage expérimental. Une pression hydrostatatique est imposée grâce à des gobelets contenant une solution de NaCl. La figure présente également une mesure directe de la tension, en fonction du déplacement des gobelets.

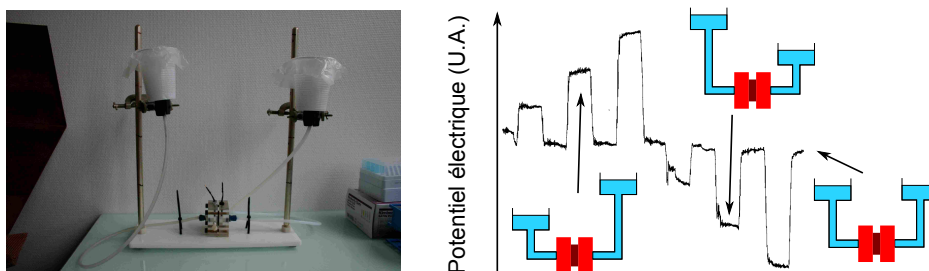


FIGURE 2.36 – Photographie, mesure directe et schéma du montage expérimental pour la détermination du potentiel d'écoulement. Sur la photographie, les électrodes ne sont pas connectées à l'amplificateur de courant.

La figure 2.37 montre des mesures du potentiel d'écoulement en fonction de la pression imposée, obtenue à partir d'une mesure directe semblable à celle de la figure 2.36. Le résultat est négatif, correspondant bien à une charge négative de la paroi, due aux groupements carbonyle.

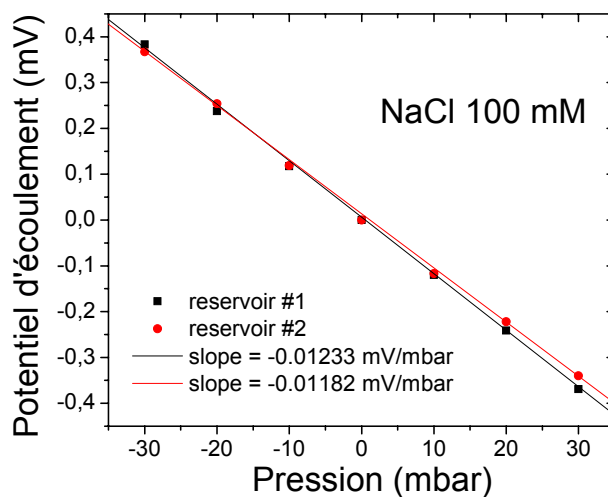


FIGURE 2.37 – Évolution du potentiel d'écoulement en fonction de la pression imposée.

Le potentiel électrocinétique ζ est calculé à partir de la pente obtenue en utilisant la formule 2.40. Pour les membranes commerciales, le résultat est de -18 mV pour des concentrations de NaCl entre 10 et 100 mM.

La figure 2.38 résume de nombreuses mesures effectuées avec des membranes de polycarbonate attaquées au laboratoire, contrairement aux mesures précédentes qui concernaient des membranes commerciales. Ainsi, il est possible de faire varier le temps d'attaque et donc le rayon des pores, supposés cylindriques. Les rayons mesurés par microscopie sont respectivement de 18, 26, 37 et 82 nm pour les temps d'attaque de 2, 3, 5 et 8 minutes.

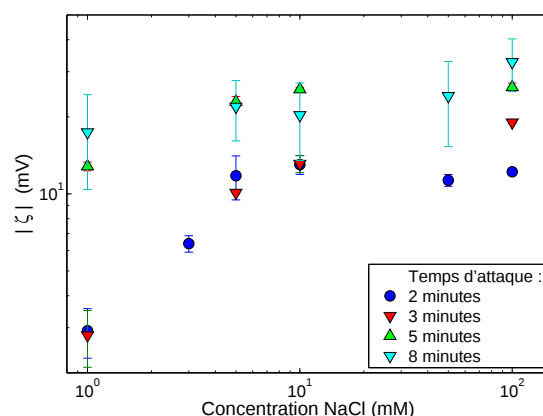


FIGURE 2.38 – Évolution du potentiel ζ selon la concentration de la solution et le temps d'attaque des membranes. Le signe du potentiel mesuré est toujours négatif.

Variations attendues du potentiel ζ avec la concentration

Voici comment les paramètres suivants vont être influencés par les variations de concentration en sel.

Couche limite La couche limite est un paramètre ne dépendant que des caractéristiques physiques de la paroi et de la solution. Si la concentration en sel varie, la solution reste constituée principalement d'eau. Il paraît donc vraisemblable de considérer que l'écoulement du liquide ne change pas selon la concentration en sel, et par conséquent que l'épaisseur de la couche limite reste inchangée.

Charge surfacique La charge de la paroi résulte du processus d'attaque, elle ne dépend donc pas a priori de la solution contenue dans le pore.

Charge des contre-ions Par conséquent, la charge totale des ions en solution, écrantant cette charge de surface, sera elle aussi constante même si la concentration en ions évolue. En revanche, leur répartition spatiale varie.

Longueur de Debye La longueur de Debye, qui caractérise l'écrantage de la charge de surface, varie avec la concentration en sel c selon $\lambda_D \propto c^{-\frac{1}{2}}$.

L'évolution spatiale du potentiel électrique est donc une fonction de la concentration en sel de la solution. La longueur de Debye est la distance caractéristique de sa décroissance. La charge totale des contre-ions est proportionnelle à la surface sous la courbe. Ainsi, si A est l'amplitude du potentiel électrique, elle est liée à λ_D par :

$$A \times \lambda_D = \text{constante} \quad (2.41)$$

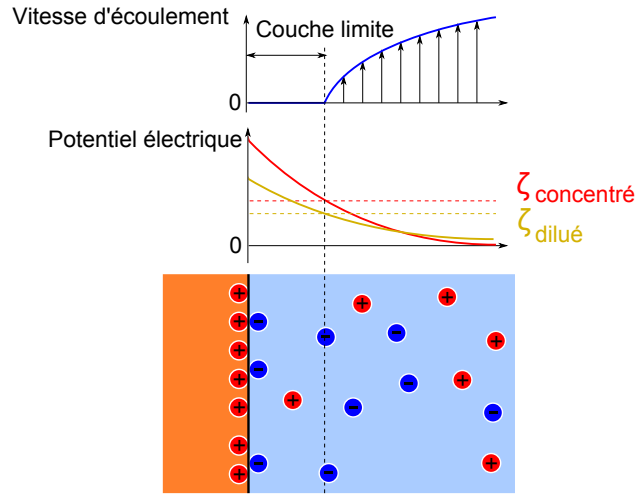


FIGURE 2.39 – Effets de la dilution sur l'écoulement et le potentiel électrique dans la solution ionique.

Comme l'épaisseur de la couche limite est supposée inférieure à la longueur de Debye aux concentrations étudiées, le potentiel ζ est proportionnel à A . Il suit donc une évolution décrite dans la figure 2.39 et exprimée par ces relations :

$$\zeta \propto \lambda_D^{-1} \quad (2.42)$$

$$\zeta \propto c^{\frac{1}{2}} \quad (2.43)$$

La figure 2.40 présente cette évolution en plus des résultats précédents. Elle montre que les hypothèses précédentes peuvent expliquer qualitativement l'évolution du potentiel ζ en fonction de la concentration en sel, pour des tailles intermédiaires de pores.

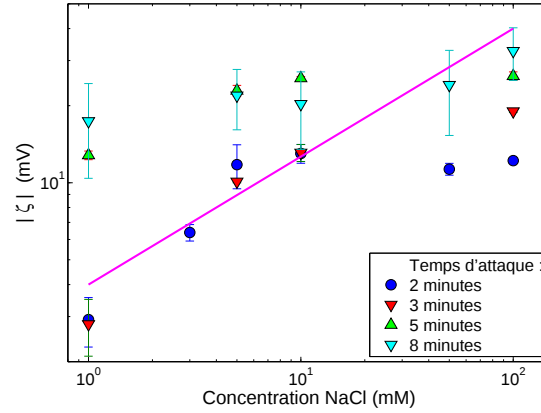


FIGURE 2.40 – Évolution du potentiel ζ selon la concentration de la solution et le temps d'attaque des membranes. Le signe du potentiel mesuré est toujours négatif. La ligne droite est un guide pour les yeux, pour $\zeta \propto c^{1/2}$.

Variations du potentiel ζ avec la taille du pore

Tout d'abord, les potentiels électrocinétiques ζ sont du même ordre de grandeur que celui mesuré pour les membranes commerciales. Ils sont assez stables sur au moins une décade de concentrations. Pour les concentrations de l'ordre de 10 mM, le potentiel ζ augmente avec le rayon des pores. Deux types de comportement sont observés : pour les plus petits rayons (temps d'attaque de 2 et 3 minutes), et pour les rayons plus grands (5 et 8 minutes), la valeur du potentiel ζ ainsi que son évolution selon la concentration n'est pas la même.

Une étude réalisée sur des membranes nanoporeuses de poly(éthylène téréphtalate) reporte des potentiels ζ de l'ordre de -40 mV [98], avec une tendance de l'évolution selon le rayon contraire à celle observée ici. Le potentiel est de -47,3 mV pour des rayons inférieurs à 70 nm, et -36,2 mV pour les rayons supérieurs.

Une étude plus approfondie nécessiterait des mesures de résonance de spin électronique, sans lesquelles il n'est pas possible de caractériser la conduction de surface [99].

-
- [98] P. Dejardin, E. N. Vasina, V. V. Berezkin, V. D. Sobolev, and V. I. Volkov. Streaming potential in cylindrical pores of poly(ethylene terephthalate) track-etched membranes : Variation of apparent zeta potential with pore radius. *Langmuir*, 21(10) :4680–4685, May 2005.
 - [99] V. V. Berezkin, V. I. Volkov, O. A. Kiseleva, N. V. Mitrofanova, and V. D. Sobolev.

Les valeurs obtenues pour le potentiel électrocinétique ζ confirment que la paroi est réellement chargée, ce qui peut influencer le transport ou la translocation de macromolécules.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre a montré les méthodes utilisées pour caractériser les nanopores qui ont été employés dans cette thèse. Les deux principales sont l'observation par microscopie électronique à balayage à effet de champ (FESEM) et la conductimétrie. Il a été possible de déterminer la géométrie des pores et le potentiel électrocinétique de la paroi. D'autres caractéristiques de la paroi, comme notamment le comportement à pH acide, n'ont pas été élucidées.

Chapitre 3

Transport des ions

Le chapitre précédent a permis de connaître certains aspects géométriques et structuraux des nanopores. Il est donc maintenant possible d'étudier le comportement des ions à l'intérieur d'un nanopore. Le confinement des ions est un phénomène qui n'avait pas encore été remarqué dans la littérature. Il s'agit du résultat le plus important de cette thèse ; ses effets sont présentés ici.

Sommaire

3.1	Rectification	84
3.1.1	Charge surfacique sur la paroi interne	84
3.1.2	Longueur de Debye	86
3.1.3	Modélisation	87
3.1.4	La rectification dans le cadre de cette thèse	90
3.2	Effets de confinement	92
3.2.1	Exemple de l' α -hémolysine	92
3.2.2	Le confinement dans un pore à trace attaquée	94
3.3	Bruit de conduction électrique	99
3.3.1	Densité spectrale de puissance	99
3.3.2	Variations du bruit selon l'intensité	102
3.3.3	Origines du bruit rose	103
3.3.4	Liquides ioniques	105
3.3.5	Les liquides ioniques et le bruit rose	107
3.3.6	Bruit rose et confinement	109

3.1 Rectification

La rectification a été brièvement présentée dans la section 2.3.1, page 68. Il s'agit d'une asymétrie et d'une non-linéarité présente sur une courbe I-V.

3.1.1 Charge surfacique sur la paroi interne

La rectification ne peut être expliquée par la seule géométrie du nanopore. En effet, si l'on néglige toute interaction avec la paroi interne du pore, les ions en solution, K^+ et Cl^- , ont un rôle équivalent ($Z = 19$ et 17 , respectivement, et $\lambda^0 = 7,3$ et $7,6$ mS.m².mol⁻¹, respectivement), et donc une asymétrie géométrique n'a aucun effet sur leur transport.

Il est donc nécessaire de prendre en compte les interactions dues à la paroi interne du nanopore. À cause de la révélation de la trace latente pendant l'attaque, des chaînes de polymères sont dégradées, et à leur extrémité peuvent se trouver des groupements chargés. Le caractère oxydant de l'attaque donne naissance à des groupes carboxylates, comme illustré sur la figure 3.1.

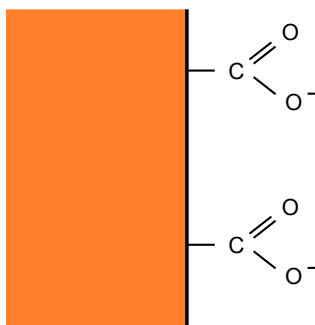


FIGURE 3.1 – Schéma de la paroi interne d'un nanopore à trace attaquée, en milieu neutre ou basique.

Ces groupements chimiques modifient le champ électrique local et créent une charge de surface sur la paroi interne du pore. De nombreuses études ont été faites pour tenter de mieux comprendre ce phénomène.

Cette charge de surface a été rapidement identifiée comme responsable du phénomène de rectification. En 1993, l'équipe de Pasternak en arrive à cette conclusion, en utilisant des cations bivalents dans une membrane de polyéthylène téréphtalate multipore [100]. Ce matériau a d'ailleurs été utilisé

[100] C.A. Pasternak, C. L. Bashford, Y.E. Korchev, T.K. Rostovtseva, and A. A. Lev. Modulation of surface flow by divalent-cations and protons. *Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects*, 77(2) :119–124, September 1993.

pour la plupart des études portant sur la rectification. L'équipe de Wolf [101] découvre qu'en plus de la conduction ionique dans un nanopore s'ajoute une conduction de surface, due aux charges de la paroi interne. L'équipe de Siwy relate le phénomène de rectification pour les pores de polyéthylène téréphtalate, attaqués selon la méthode de l'électro-stoppage [102]. La densité de ces charges est estimée à une charge élémentaire par nanomètre carré [103]. L'équipe de Siwy parvient à changer la polarité de la rectification observée en modifiant la paroi interne [104]. Pour cela, une couche d'or est déposée à l'intérieur du pore, puis des composés chimiques avec des terminaisons ammonium (de charge positive, contrairement aux groupes carboxylates) sont adsorbés sur l'or.

Il a été confirmé que pour une géométrie symétrique, les pores ne rectifient pas, comme c'est le cas pour des nanopores cylindriques de polyéthylène téréphtalate [105]. Du côté des pores sur support silicium, des charges surfaciques sont également présentes bien que le processus de création soit différent des pores à trace attaquée. Il est néanmoins possible d'annihiler la rectification en déposant une couche de Al_2O_3 sur le pore [106]. L'équipe de Wang utilise la propriété rectifiante de la paroi interne d'un pore de polyimide pour détecter une molécule à analyser : comme la surface est hydrophobe et chargée négativement, et que le composé à détecter est hydrophobe et chargé positivement, la paroi se neutralise au contact de ce composé, et la rectification disparaît, traduisant la présence du composé [107].

-
- [101] A. Wolf, N. Reber, P. Y. Apel, B. E. Fischer, and R. Spohr. Electrolyte transport in charged single ion track capillaries. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 105(1-4) :291–293, November 1995.
 - [102] P. Y. Apel, Y. E. Korchev, Z. Siwy, R. Spohr, and M. Yoshida. Diode-like single-ion track membrane prepared by electro-stopping. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 184(3) :337–346, November 2001.
 - [103] Z. Siwy, Y. Gu, H. A. Spohr, D. Baur, A. Wolf-Reber, R. Spohr, P. Apel, and Y. E. Korchev. Rectification and voltage gating of ion currents in a nanofabricated pore. *Europhysics Letters*, 60(3) :349–355, November 2002.
 - [104] Z. Siwy, E. Heins, C. C. Harrell, P. Kohli, and C. R. Martin. Conical-nanotube ion-current rectifiers : The role of surface charge. *Journal of the American Chemical Society*, 126(35) :10850–10851, September 2004.
 - [105] C. C. Harrell, S. B. Lee, and C. R. Martin. Synthetic single-nanopore and nanotube membranes. *Analytical Chemistry*, 75(24) :6861–6867, December 2003.
 - [106] P. Chen, T. Mitsui, D. B. Farmer, J. Golovchenko, R. G. Gordon, and D. Branton. Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores. *Nano Letters*, 4(7) :1333–1337, July 2004.
 - [107] J. Wang and C. R. Martin. A new drug-sensing paradigm based on ion-current rectification in a conically shaped nanopore. *Nanomedicine*, 3(1) :13–20, February

Toutes les études confirment des variations dans le même sens pour ces paramètres [108] :

pH. Lorsque le pH diminue, les groupements de la paroi interne (carboxylate) se protonent. La paroi est de moins en moins chargée, et la rectification diminue.

Diamètre du pore. Plus le diamètre est petit, plus les effets électrostatiques dus à la charge de la paroi se font ressentir par rapport à la taille du nanopore.

Concentration en sel. Plus la solution à l'intérieur du pore est concentrée, plus la charge de la surface est écrantée.

3.1.2 Longueur de Debye

En effet, le phénomène de rectification est dû au fait qu'à des dimensions de l'ordre du nanomètre, la longueur d'écrantage des charges n'est plus négligeable devant les dimensions du nanopore. La longueur de Debye caractérise cette distance d'écrantage. Elle est notée λ_D et elle est obtenue par cette formule :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{\sum_i q_i^2 c_i}}, \quad (3.1)$$

avec les paramètres suivants :

- ϵ_0 : permittivité électrique du vide.
- ϵ_r : permittivité relative du milieu, pour l'eau $\epsilon_r = 80$.
- k_B : constante de Boltzmann.
- T : température.
- q_i : charge des électrolytes en solution.
- c_i : concentration des électrolytes en solution.

Le tableau 3.1 donne des ordres de grandeur pour la longueur de Debye, pour une solution de KCl à température ambiante.

Afin d'expliquer la rectification, une hypothèse électromécanique a été émise. Dans cette hypothèse, des « bras pendants », restes de chaînes de polymère résultant du processus d'attaque chimique, peuvent fluctuer dans l'espace [109]. Ils sont chargés à leur extrémité, comme schématisé sur la figure 3.2.

2008.

- [108] M. L. Kovarik, K. M. Zhou, and S. C. Jacobson. Effect of conical nanopore diameter on ion current rectification. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(49) :15960–15966, December 2009.
- [109] Z. S. Siwy. Ion-current rectification in nanopores and nanotubes with broken symmetry. *Advanced Functional Materials*, 16(6) :735–746, April 2006.

[KCl]	λ_D
1 M	0,3 nm
100 mM	1 nm
10 mM	3 nm

TABLEAU 3.1 – Évolution de la longueur de Debye pour une solution de KCl à température ambiante.

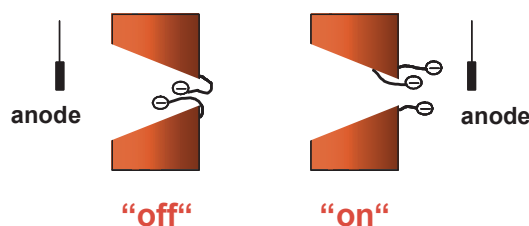


FIGURE 3.2 – Schéma des bras pendants, d'après [109].

3.1.3 Modélisation

Des études théoriques ont cherché à modéliser la rectification. En 2005, l'équipe de Cervera [110] utilise conjointement les équations de Poisson et de Nernst-Planck pour caractériser le champ électrique dans un nanopore conique aux parois chargées. Ce modèle est en très bonne corrélation avec des données expérimentales pour des pores en polyéthylène téréphtalate [111]. Il prédit les concentrations respectives en anions et cations, et la rectification prédite correspond à celle observée (cf. figure 3.3).

Les schémas de la figure 3.4 présentent le principe des résultats obtenus. Les parois du pore sont chargées négativement. Ainsi, dans tous les cas (a) à (d), les cations sont toujours plus nombreux que les anions dans le pore. En revanche, la répartition de ces cations, dits « ions majoritaires », n'est pas homogène.

Dans le cas général, même sans tension imposée, les cations se rapprochent des parois, attirés par les charges surfaciques. L'épaisseur de la couche de cations, ici symbolisée en rouge, est de l'ordre de grandeur de la longueur de Debye. Pour respecter l'électro-neutralité, les anions les suivent, et leur

[110] J. Cervera, B. Schiedt, and P. Ramirez. A poisson/nernst-planck model for ionic transport through synthetic conical nanopores. *Europhysics Letters*, 71(1) :35–41, July 2005.

[111] J. Cervera, B. Schiedt, R. Neumann, S. Mafe, and P. Ramirez. Ionic conduction, rectification, and selectivity in single conical nanopores. *Journal of Chemical Physics*, 124(10) :104706, March 2006.

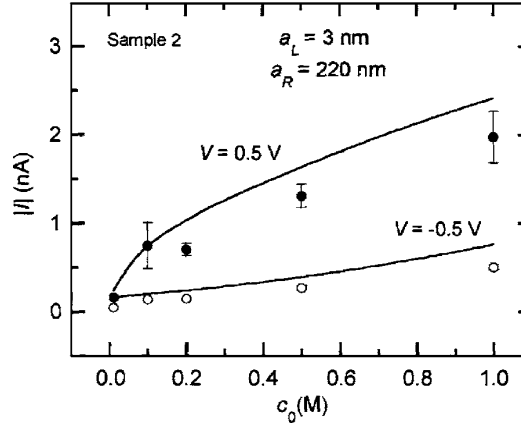


FIGURE 3.3 – Valeur absolue du courant électrique en fonction de la concentration en sel c_0 , pour des tensions imposées de $V = 0,5$ V et $-0,5$ V. Les points correspondent aux données expérimentales et les lignes continues aux résultats théoriques [111].

répartition suit sensiblement la même forme que celle des cations. Ainsi, la partie rouge représente une zone où la concentration totale en ions est plus importante que celle de la solution en volume.

En (a) et (b), une tension est imposée. Elle a pour effet de « pousser » les cations vers le côté du plus bas potentiel. Les anions, minoritaires, suivent les cations. Ainsi, en (a), le côté droit contient plus d'ions au total que le côté gauche. La conductance de la solution, liée à la concentration totale en ions, est donc plus grande à droite qu'à gauche. Cependant, même si la répartition géométrique de la conductance diffère entre les cas (a) et (b), la symétrie du pore impose une conductance totale du pore de même valeur.

En (c), le pore est conique. La tension imposée pousse les ions majoritaires vers la droite, ce qui entraîne également les anions. Ainsi, la zone étroite du pore se trouve plus pauvre en ions que s'il n'y avait pas de tension imposée.

En (d), la tension est de sens opposé au cas précédent. La partie étroite du pore est donc enrichie en ions positifs et négatifs, ce qui accroît la conductance de cette zone. Comme la conductance totale du pore est essentiellement déterminée par la conductance de la zone étroite, la conductance du pore est plus importante dans le cas (d) que dans le cas (c). Ceci explique le phénomène de rectification, c'est-à-dire une conductance dont la valeur dépend de la polarité de la tension imposée.

L'équipe a développé son modèle afin de le valider pour des géométries plus complexes que les nanopores coniques, à savoir des formes en tête d'obus ou

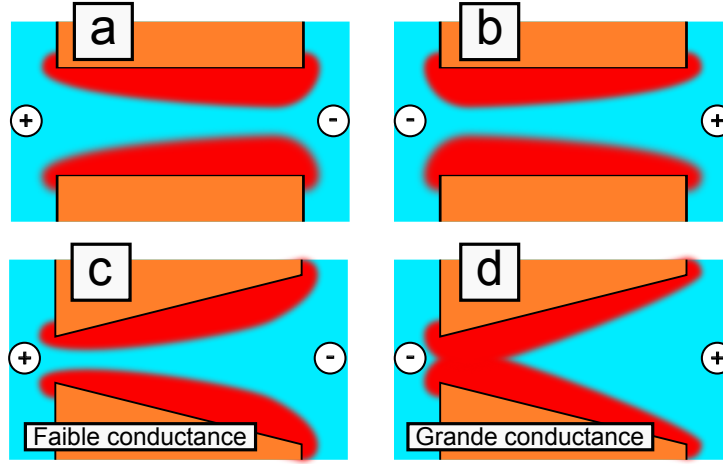


FIGURE 3.4 – Schéma présentant les résultats obtenus par le modèle de l'équipe de Cervera [111]. Les parois du pore sont chargées négativement. La zone rouge représente les endroits où la concentration en cations est plus élevée. (a) : Pore cylindrique, avec une tension imposée entre les deux côtés de la membrane. (b) : Même chose avec une tension de signe opposé. (c) : Pore conique. (d) : Même pore conique avec une tension de signe opposé.

de pavillon de trompette [112]. Les auteurs précisent que l'estimation du diamètre s'appuyant sur les résultats de conductimétrie peut être fausse si la forme du pore n'est pas exactement conique, car la forme exacte du pore à sa petite extrémité influence sensiblement ses propriétés de conduction.

Les propriétés asymétriques de conduction des nanopores ont permis à l'équipe de Z. Siwy de développer des diodes ioniques [113]. Le principe est présenté sur la figure 3.5. Un nanopore conique est modifié chimiquement pour obtenir des groupes de charges opposées de chaque côté. Ainsi, les courbes I-V obtenues correspondent à une diode. L'encart montre un agrandissement des courants négatifs. Les variations de courant y sont inférieures de trois ordres de grandeur aux tensions positives. Un modèle utilisant les équations de Poissons et Nernst-Planck permet également de modéliser ces diodes ioniques [114].

[112] P. Ramirez, P. Y. Apel, J. Cervera, and S. Mafe. Pore structure and function of synthetic nanopores with fixed charges : tip shape and rectification properties. *Nanotechnology*, 19(31) :315707, August 2008.

[113] I. Vlassiuk and Z. S. Siwy. Nanofluidic diode. *Nano Letters*, 7(3) :552–556, March 2007.

[114] D. Constantin and Z. S. Siwy. Poisson-nernst-planck model of ion current recti-

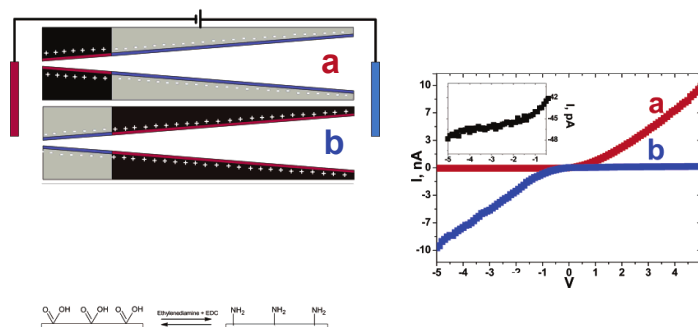


FIGURE 3.5 – Principe de la diode ionique [113].

3.1.4 La rectification dans le cadre de cette thèse

Au cours de cette thèse, le phénomène de rectification a été observé, mais le manque de reproductibilité n'a pas permis d'étude approfondie de ses mécanismes.

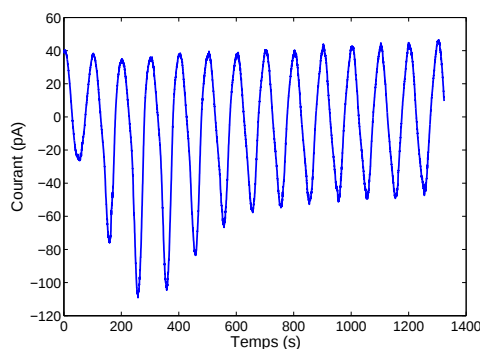


FIGURE 3.6 – Instabilité de la rectification d'un nanopore conique unique dans un film de polyimide.

La figure 3.6 montre l'exemple d'un nanopore unique et conique dans un film de polyimide de 8 μm d'épaisseur. L'évolution temporelle montre que le comportement au niveau de la conduction et de la rectification est instable. La tension imposée est de forme sinusoïdale, comme pour la figure 2.26, page 68. Par ce balayage en tension, l'évolution du courant dans le temps indique l'évolution des conductances du pore pour les tensions positives et négatives. La figure montre que la conductance pour les tensions positives reste relativement stable dans le temps durant l'expérience, alors

fication through a nanofluidic diode. *Physical Review E*, 76(4) :041202, October 2007.

que la conductance pour les tensions négatives augmente puis diminue de manière significative, alors qu'aucune condition extérieure n'évolue.

Ce type de comportement, qui apparaissait parfois, ainsi qu'un certain manque de reproductibilité dans les résultats, ont contribué à ne pas approfondir l'étude du phénomène de rectification dans cette thèse.

3.2 Effets du confinement sur la conductivité de la solution

La taille très réduite d'un nanopore implique que ses dimensions peuvent atteindre seulement 100 fois la taille d'un ion K^+ ou Cl^- . Ainsi, des comportements complexes de confinement sont à envisager.

Dans le chapitre précédent, les limites des mesures de taille de nanopore par conductimétrie étaient évoquées (section 2.2.3, page 62). Pour une géométrie simple, le petit rayon d'un pore conique est donné par :

$$r = \frac{LG}{\pi\sigma R}. \quad (3.2)$$

Le problème réside dans le fait qu'à forte concentration, la conductivité de la solution contenue dans le pore σ_{conf} peut différer de la conductivité de la solution dans le volume, σ_{bulk} , c'est-à-dire dans la solution en dehors du pore, à cause du confinement des porteurs de charge.

L'équation 3.2 est obtenue en considérant que ces deux conductivités sont les mêmes. Cela suppose donc que la conduction des ions n'est pas perturbée par la très petite taille du trou. Les paramètres géométriques ne dépendant que du pore, R et L , sont indépendants de la concentration saline. La formule 3.2 suppose qu'il en est de même pour le rapport G/σ .

Or, cela n'est pas toujours vrai, et cette hypothèse n'est valable qu'à concentration saline faible, car les ions y sont plus indépendants.

3.2.1 Exemple de l' α -hémolysine

L'exemple de l' α -hémolysine permet de prouver ceci. Les conditions expérimentales les plus courantes sont une tension appliquée de 100 mV, dans une solution de KCl 1M tamponnée à un pH de 7 à 8, avec différents tampons (HEPES, Tris, phosphate) de concentration inférieure ou égale à 50 mM. Même si certaines études donnent une mesure inférieure (0,6 nS [28], 0,7 nS [29]), la conductance G du pore habituellement mesurée est de 1 nS ([24],

-
- [28] A. Meller, L. Nivon, and D. Branton. Voltage-driven dna translocations through a nanopore. *Physical Review Letters*, 86(15) :3435–3438, April 2001.
 - [29] O. Braha, B. Walker, S. Cheley, J. J. Kasianowicz, L. Z. Song, J. E. Gouaux, and H. Bayley. Designed protein pores as components for biosensors. *Chemistry & Biology*, 4(7) :497–505, July 1997.
 - [24] G. Oukhaled, L. Bacri, J. Mathe, J. Pelta, and L. Auvray. Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores. *Epl*, 82(4) :48003, May 2008.

[27], [30], [115], [116]).

Comme la structure de l' α -hémolysine est connue avec précision, il est possible de déterminer la conductivité ionique de la solution contenue dans le lumen. Ce dernier est modélisé par un ensemble de deux cylindres, l'un de rayon $r_1 = 0,8$ nm et de longueur $L_1 = 6$ nm, l'autre de rayon $r_2 = 1,5$ nm et de longueur $L_2 = 4$ nm. La figure 3.7 expose ces deux cylindres.

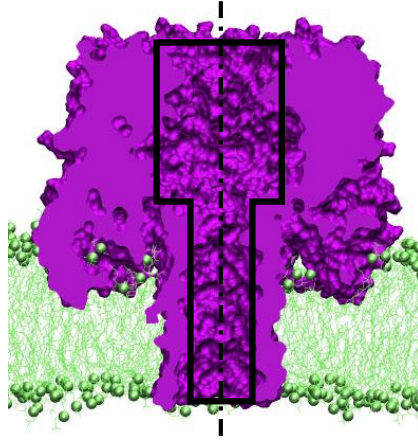


FIGURE 3.7 – Modélisation géométrique du pore d' α -hémolysine en deux cylindres.

La conductance d'un cylindre est donnée par :

$$G_{\text{cylindre}} = \frac{\sigma \pi r^2}{L}, \quad (3.3)$$

formule équivalente à 2.17 pour un pore cylindrique, où R et r sont identiques.

-
- [27] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, and D. Branton. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3) :1079–1084, February 2000.
 - [30] M. Pastoriza-Gallego, G. Oukhaled, J. Mathe, B. Thiebot, J. M. Betton, L. Auvray, and J. Pelta. Urea denaturation of alpha-hemolysin pore inserted in planar lipid bilayer detected by single nanopore recording : Loss of structural asymmetry. *Febs Letters*, 581(18) :3371–3376, July 2007.
 - [115] R. Stefureac, Y. T. Long, H. B. Kraatz, P. Howard, and J. S. Lee. Transport of alpha-helical peptides through alpha-hemolysin and aerolysin pores. *Biochemistry*, 45(30) :9172–9179, August 2006.
 - [116] R. Stefureac, L. Waldner, P. Howard, and J. S. Lee. Nanopore analysis of a small 86-residue protein. *Small*, 4(1) :59–63, January 2008.

Ainsi, la conductance du pore modélisé est :

$$\sigma_{\text{conf-}\alpha\text{-HL}} = \frac{G}{\pi} \left(\frac{L_1}{r_1^2} + \frac{L_2}{r_2^2} \right), \quad (3.4)$$

où $\sigma_{\text{conf-}\alpha\text{-HL}}$ représente la conductivité de la solution contenue dans le pore d'hémolysine, dans un état où les ions sont confinés.

En prenant une valeur de G de 1 nS, qui est mesurée habituellement, la conductivité de la solution contenue dans le lumen est donc de :

$$\sigma_{\text{conf-}\alpha\text{-HL}} = 3,5 \text{ S.m}^{-1} \quad (3.5)$$

Cette valeur est bien inférieure à la conductivité attendue pour une solution simple de KCl 1 M, c'est-à-dire $\sigma_{\text{bulk}} = 11,2 \text{ S.m}^{-1}$. Ceci prouve que le transport des ions dans un canal nanométrique est perturbé, et que l'estimation de la taille d'un pore selon des considérations géométriques et des résultats de conductimétrie peut être fausse. Bien que l' α -hémolysine soit un système très répandu, cet écart à la conduction ohmique n'a jamais été mentionné dans la littérature auparavant.

3.2.2 Le confinement dans un pore à trace attaquée

Notations

Comme il existe deux conductivités, on note σ_{bulk} la conductivité du volume, σ_{conf} la conductivité de la solution contenue dans le pore, et β_{conf} le rapport entre les deux, nombre sans dimension.

$$\beta_{\text{conf}} = \frac{\sigma_{\text{conf}}}{\sigma_{\text{bulk}}} \quad (3.6)$$

Ainsi, la conductance d'un nanopore est donnée par :

$$G = \sigma_{\text{conf}} \frac{\pi r R}{L} = \sigma_{\text{conf}} L_c \quad (3.7)$$

La longueur L_c est la longueur caractéristique du pore. Elle dépend de sa taille et de sa géométrie. Pour un pore conique, on a

$$L_c = \frac{\pi r R}{L}, \quad (3.8)$$

avec les notations utilisées précédemment pour la géométrie d'un pore conique. En règle générale, L_c reflète simplement la géométrie du pore.

L'équation 3.7 peut s'écrire ainsi :

$$\frac{G}{\sigma_{\text{bulk}}} = \beta_{\text{conf}} L_c \quad (3.9)$$

Variations avec la concentration en électrolyte

Bien que G et σ_{bulk} dépendent de la concentration en électrolyte, leur rapport reste indépendant de la concentration si le confinement n'a aucun effet. Néanmoins, l'évolution de G/σ_{bulk} en fonction de la concentration montre que le produit βL_c est une fonction décroissante de la concentration, comme indiqué sur la figure 3.8.

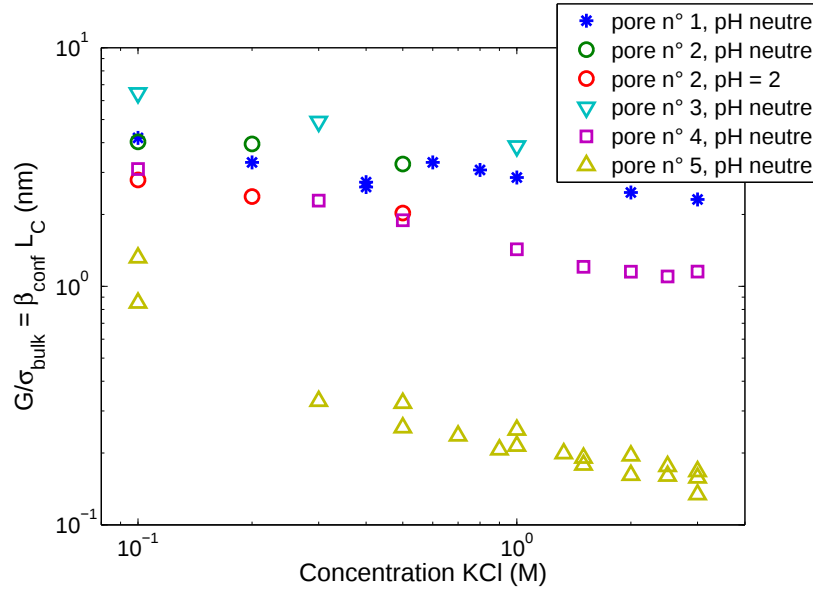


FIGURE 3.8 – Variations du rapport conductance/conductivité *bulk*, pour différents nanopores coniques de polyimide, selon la concentration. En cas de rectification pour les concentrations les plus faibles, la conductance est prise comme la pente à tension nulle de la courbe I-V. Le pore n° 1 est le pore utilisé pour les mesures suivantes avec les liquides ioniques.

Ce rapport n'est pas mesuré pour des concentrations trop faibles, c'est-à-dire inférieures à $c_{\text{min}} = 5$ mM. En effet, un calcul simple montre que cette valeur correspond à une concentration minimale attendue dans le pore. Elle est obtenue à partir de la charge surfacique γ , estimée à 1,5 charge par nm^2 pour le polyéthylène téréphtalate [111], ou 1 charge par nm^2 pour le polyéthylène téréphtalate et le polyimide [109]. La concentration minimale

[111] J. Cervera, B. Schiedt, R. Neumann, S. Mafe, and P. Ramirez. Ionic conduction, rectification, and selectivity in single conical nanopores. *Journal of Chemical Physics*, 124(10) :104706, March 2006.

[109] Z. S. Siwy. Ion-current rectification in nanopores and nanotubes with broken symmetry. *Advanced Functional Materials*, 16(6) :735–746, April 2006.

$c_{\min}$ correspond au nombre minimal d'ions de la solution nécessaires pour conserver l'électroneutralité dans le pore. Elle se calcule par cette formule :

$$c_{\min} = \gamma \frac{A}{V}, \quad (3.10)$$

où A est l'aire de la surface du pore et V son volume. Pour un pore conique, ils valent :

$$A \approx \pi RL \quad (3.11)$$

$$V = \frac{1}{3}\pi R^2 L, \quad (3.12)$$

où R et L représentent respectivement le grand rayon du pore (500 nm) et l'épaisseur du film. Ainsi, la concentration minimale est de :

$$c_{\min} = \frac{3\gamma}{R} \quad (3.13)$$

$$= 6 \times 10^{24} \text{ charges.m}^{-3} \quad (3.14)$$

$$= 5 \text{ mM}, \quad (3.15)$$

pour un sel composé de paires d'ions monovalents comme KCl.

Si le pore est placé dans une solution de sel moins concentrée que $c_{\min}$, il y aura quand même ce nombre minimum d'ions à l'intérieur du pore. La concentration de la solution en volume n'a donc pas de lien direct avec la concentration dans le pore. C'est pour cela que les mesures sont faites à des concentrations supérieures à $c_{\min}$.

Le rapport G/σ_{bulk} est décroissant en fonction de la concentration en sel. Cette évolution est notamment observée à pH acide, où la charge surfacique est négligeable, ce qui montre que les effets de surface ne peuvent pas être responsables de la décroissance observée.

Or, l'équation 3.9 montre que le rapport G/σ_{bulk} est égal au produit $\beta_{\text{conf}} L_c$. La longueur caractéristique du pore, L_c , est une caractéristique intrinsèque du pore. Dans cette thèse, elle est donc considérée comme indépendante de la concentration en électrolyte. C'est donc le paramètre β_{conf} qui diminue avec la concentration.

Les résultats obtenus sur la figure 3.8 prouvent qu'il est difficile de déterminer précisément la longueur caractéristique d'un pore, à cause des effets de confinement qui empêchent de connaître la valeur de β_{conf} . C'est pour cela qu'une mesure de taille d'un pore par conductimétrie ne peut être exacte. En revanche, pour avoir une approximation de la taille d'un pore, il est judicieux de prendre la valeur $\beta_{\text{conf}} = 1$ pour les valeurs faibles de la concentration en électrolyte, là où les effets de confinement sont les moins importants.

- À pH acide, les effets de charge surfacique sont négligeables, on peut donc approximer σ_{conf} à σ_{bulk} , pour les concentrations très faibles.
- En revanche, à pH neutre, les effets dus à la charge de surface prennent de plus en plus d'amplitude au fur et à mesure que la concentration diminue. Les courbes intensité-tension montrent des effets de rectification, rendant difficile la définition de la conductance G . Il faut donc choisir la concentration la plus faible possible où la rectification n'est pas encore trop prononcée, comme concentration choisie pour approximer σ_{conf} à σ_{bulk} .

Dans les deux cas, le paramètre β_{conf} diminue expérimentalement avec la concentration, en partant de 1 comme valeur à concentration faible. Cela signifie qu'en règle générale, $\sigma_{\text{conf}} < \sigma_{\text{bulk}}$, et qu'une mesure par conductimétrie du petit rayon d'un pore conique, sans prendre en compte les effets de confinement, surestime la valeur obtenue, car :

$$r = \frac{1}{\beta_{\text{conf}}} \frac{LG}{\pi R \sigma_{\text{bulk}}}. \quad (3.16)$$

Dans la littérature, même si les effets de la charge de surface ont été rapportés de nombreuses fois, les effets de confinement ne semblent pas avoir fait l'objet de recherches approfondies. La formule 3.16 est communément acceptée pour estimer le petit rayon d'un pore conique à trace attaquée, sans le terme correctif $1/\beta_{\text{conf}}$ ([103], [117], [70], [109]).

Les travaux de Z. Siwy [118] et [109] précisent également : « The measurements have to be performed at high electrolyte concentrations and low pH values. For these conditions the conductivity of the solution inside the pore approaches the value in the bulk. » [Les mesures doivent être faites à forte concentration d'électrolyte et à pH acide. Pour ces conditions, la conductivité de la solution à l'intérieur du pore se rapprochent de la valeur dans le

-
- [103] Z. Siwy, Y. Gu, H. A. Spohr, D. Baur, A. Wolf-Reber, R. Spohr, P. Apel, and Y. E. Korchev. Rectification and voltage gating of ion currents in a nanofabricated pore. *Europhysics Letters*, 60(3) :349–355, November 2002.
- [117] Z. Siwy and A. Fulinski. Fabrication of a synthetic nanopore ion pump. *Physical Review Letters*, 89(19) :198103, November 2002.
- [70] Z. Siwy, P. Apel, D. Dobrev, R. Neumann, R. Spohr, C. Trautmann, and K. Voss. Ion transport through asymmetric nanopores prepared by ion track etching. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 208 :143–148, August 2003.
- [109] Z. S. Siwy. Ion-current rectification in nanopores and nanotubes with broken symmetry. *Advanced Functional Materials*, 16(6) :735–746, April 2006.
- [118] Z. Siwy and A. Fulinski. A nanodevice for rectification and pumping ions. *American Journal of Physics*, 72(5) :567–574, May 2004.

volume.] Cette affirmation est vraie pour pouvoir négliger les effets de charge surfacique, mais elle ne prend pas en compte les effets de confinement.

3.3 Bruit de conduction électrique dans les nanopores

Par conductimétrie, il est possible de mesurer l'évolution temporelle du courant ionique à l'intérieur d'un nanopore. En l'absence de macromolécules, aucun évènement n'est observé. Toutefois, comme toute mesure physique, la mesure du courant électrique (équivalente à la mesure de la conduction électrique) est sujette à une perturbation par différents bruits. Afin d'optimiser le rapport signal/bruit, pour pouvoir observer un maximum d'évènements en présence de macromolécules, il est préférable d'observer tout d'abord le signal obtenu uniquement avec les ions de la solution d'électrolyte, de comprendre les origines de ces bruits pour pouvoir les réduire [119].

3.3.1 Densité spectrale de puissance

Une méthode simple d'analyse de bruit lors de la mesure d'un signal consiste en son analyse spectrale. Un signal quelconque est analysé de la sorte en utilisant sa transformée de Fourier. Le module de celle-ci est mis au carré, le tout est divisé par la durée du signal. La méthode dite du périodogramme est utilisée. Elle consiste à :

- découper le signal en intervalles de temps égaux.
- la densité spectrale de puissance est calculée pour chacun d'eux.
- la densité spectrale du signal total est obtenu par moyennage des différents spectres, pour chaque fréquence.

La figure 3.9 montre un exemple typique de densité de puissance spectrale pour un signal mesuré sur un nanopore conique de polyimide.

Le bruit rose

Le spectre obtenu dans cette figure est caractéristique des mesures faites sur des nanopores à trace attaquée. Deux zones caractéristiques se présentent.

- À haute fréquence, la puissance augmente avec la fréquence. Ce type de bruit n'est pas étudié plus profondément dans le cadre de cette thèse, car ses variations sont très réduites.
- À basse fréquence, le spectre montre un bruit variant en $1/f$, où f est la fréquence. Ce type de bruit est appelé « bruit rose ». Ce terme provient de l'analogie des signaux électriques avec les couleurs visibles. Ainsi, un

[119] R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, N. H. Dekker, and C. Dekker. Noise in solid-state nanopores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2) :417–421, January 2008.

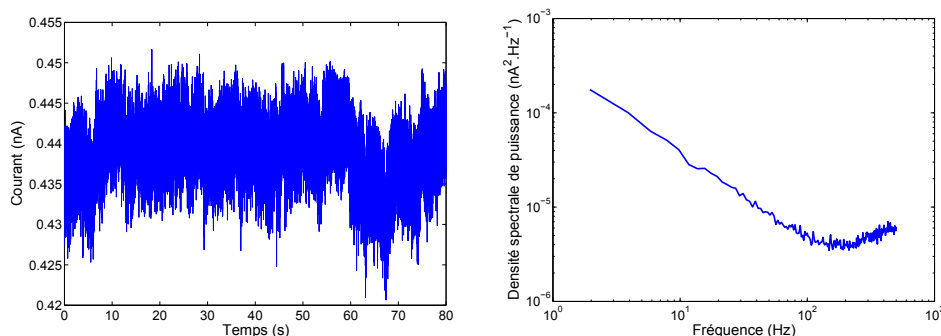


FIGURE 3.9 – Exemple de calcul de la densité spectrale de puissance. À *gauche* : Évolution temporelle du courant électrique, dans un pore de polyimide 8 μm , dans une solution de KCl 1M, à pH neutre, sous une tension de + 100 mV. À *droite* : Densité spectrale de ce signal, moyennée sur 80 spectres selon la méthode du périodogramme.

bruit *blanc* correspond à un spectre indépendant de la fréquence, et un bruit *rose* pour un spectre en $1/f^2$.

Les origines de ce bruit rose peuvent être diverses [120], mais il est reconnu pour être caractéristique de fluctuations à relaxation lente. Un bruit rose a été observé dans différents systèmes, tels que les axones de neurones [121], les peptides agissant sur les membranes lipidiques ([122], [123]), et les canaux protéiques ([124], [125]).

La présence d'un bruit rose dans un signal ne résulte pas d'un phénomène physique simple. La figure 3.10 montre quelques exemples de signaux simples

-
- [120] M. B. Weissman. $1/f$ noise and other slow, nonexponential kinetics in condensed matter. *Reviews of Modern Physics*, 60(2) :537–571, April 1988.
 - [121] H. E. Derksen and A. A. Verveen. Fluctuations of resting neural membrane potential. *Science*, 151(3716) :1388–&, 1966.
 - [122] R. Sauvé and E. Bamberg. $1-f$ noise in black lipid-membranes induced by ionic channels formed by chemically dimerized gramicidin-a. *Journal of Membrane Biology*, 43(4) :317–333, 1978.
 - [123] G. C. Fadda, D. Lairez, and G. Zalczer. Fluctuations of ionic current through lipid bilayers at the onset of peptide attacks and pore formation. *Physical Review Letters*, 103(18) :180601, October 2009.
 - [124] S. M. Bezrukov and M. Winterhalter. Examining noise sources at the single-molecule level : $1/f$ noise of an open maltoporin channel. *Physical Review Letters*, 85(1) :202–205, July 2000.
 - [125] S. Nekolla, C. Andersen, and R. Benz. Noise-analysis of ion current through the open and the sugar-induced closed state of the lamb channel of escherichia-coli outer-membrane - evaluation of the sugar binding-kinetics to the channel interior. *Biophysical Journal*, 66(5) :1388–1397, May 1994.

simulés et leur densité spectrale de puissance correspondante.

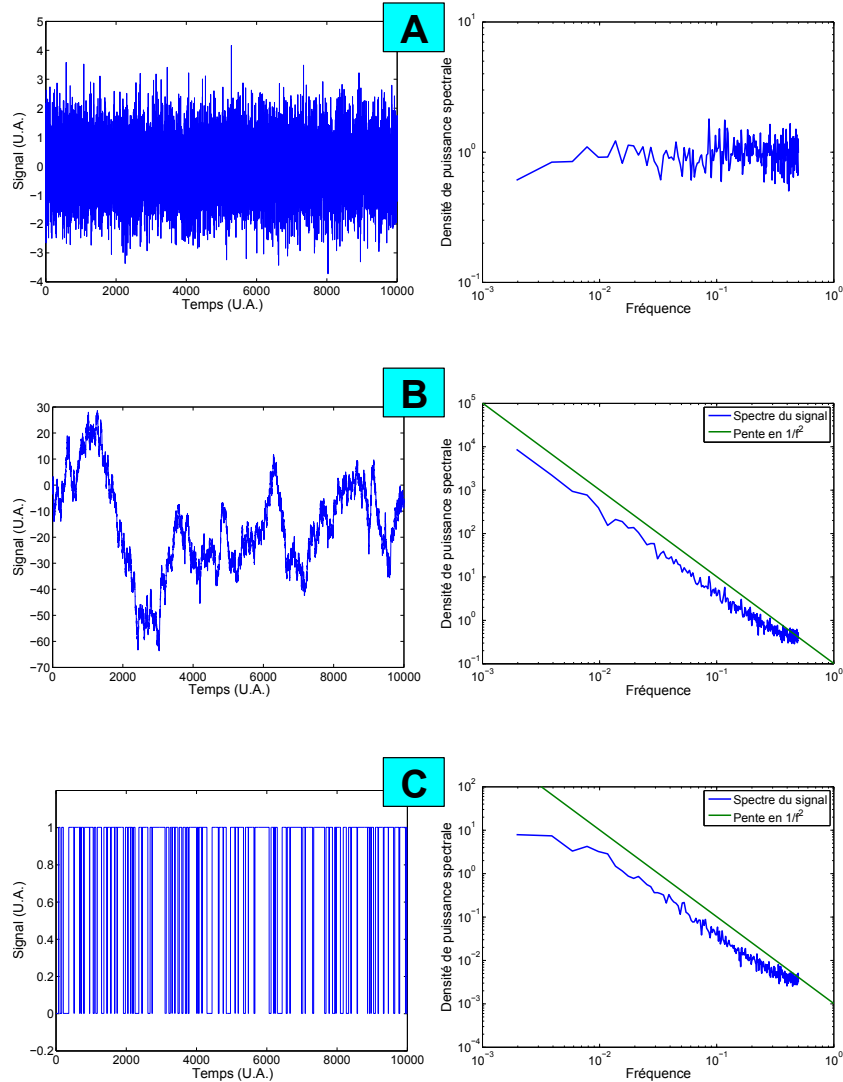


FIGURE 3.10 – Différents signaux synthétisés aléatoirement et leur spectre de densité de puissance respectif. *A* : Bruit blanc gaussien. *B* : Intégration du signal *A* dans le temps. *C* : Signal à créneaux aléatoires.

En *A*, le signal est un bruit blanc gaussien. Le spectre obtenu est donc indépendant de la fréquence. En *B*, le même signal intégré dans le temps possède un spectre différent. La pente obtenue indique qu'il s'agit d'un bruit *rouge*, en $1/f^2$. Enfin, en *C*, le signal est obtenu avec des créneaux. Ils sont répartis de manière aléatoire uniforme dans le temps, et leur largeur est une distribution gaussienne autour d'une valeur définie. Le spectre obtenu est de

nouveau en $1/f^2$. Ainsi, un système simple ne peut donner une densité de puissance spectrale telle que celle rencontrée dans le bruit de conductance ionique d'un nanopore.

3.3.2 Variations du bruit selon l'intensité

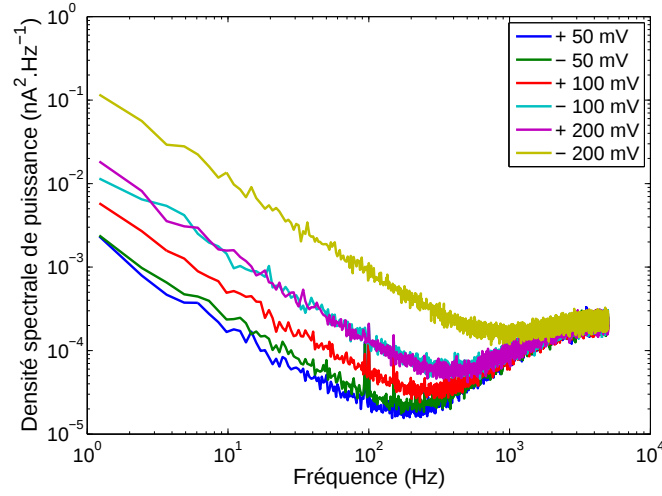


FIGURE 3.11 — Faisceau de courbes de densité spectrale de puissance, pour un nanopore conique de polyimide de 8 μm d'épaisseur, dans KCl 0,3 M, à pH neutre, pour différentes tension imposées.

La figure 3.11 montre les variations des spectres de puissance lorsque la tension imposée varie pour un pore unique. Le pore utilisé est le même que le pore n° 1 de la figure 3.8. L'allure générale du spectre ne peut pas être due aux électrodes ni au système de mesure [126]. Pour les hautes fréquences, les spectres se rejoignent. Ce type de bruit peut être attribué à l'équilibre chimique des groupements chimiques sur la paroi [126] et peut être interpolé par une fonction polynomiale [127]. Concernant les basses fréquences, la figure montre que le bruit reste rose, en $1/f$, dont seule l'amplitude varie. Comme un tel comportement est toujours observé expérimentalement, il est possible

-
- [126] D. P. Hoogerheide, S. Garaj, and J. A. Golovchenko. Probing surface charge fluctuations with solid-state nanopores. *Physical Review Letters*, 102(25) :256804, June 2009.
- [127] R. A. Levis and J. L. Rae. The use of quartz patch pipettes for low-noise single-channel recording. *Biophysical Journal*, 65(4) :1666–1677, October 1993.

de résumer l'information contenue dans le spectre en un seul point, c'est-à-dire l'amplitude du bruit rose. Pour cela, le spectre de densité de puissance spectrale S est interpolé selon la fréquence f par la fonction suivante :

$$S = S_1 \frac{1}{f} + a + bf - cf^2 + \dots, \quad (3.17)$$

où seul le paramètre S_1 , donnant l'amplitude du bruit rose en nA^2 , est étudié.

La figure 3.11 montre bien que l'évolution de S_1 en fonction de la tension imposée n'est pas simple, puisqu'une même tension ne donne pas la même valeur de bruit selon son signe.

En revanche, il est intéressant de tracer l'amplitude du bruit, S_1 , en fonction de l'intensité électrique parcourant un nanopore. En règle générale, la puissance du bruit rose est reconnue comme étant inversement proportionnelle au nombre de porteurs de charges [128].

C'est effectivement le cas pour les nanopores étudiés dans cette thèse. La figure 3.12 montre que pour un nanopore donné, les changements de concentration saline et de pH n'influent pas cette proportionnalité entre l'amplitude du bruit rose et l'intensité électrique. Cette loi est vérifiée expérimentalement sur 6 décades. Pour les courants les plus faibles, S_1 a tendance à augmenter au-delà de la valeur constante pour les courants plus grands. Cela est dû au réglage de l'offset de l'amplificateur, qui devient de plus en plus sensible pour des courants mesurés faibles.

3.3.3 Origines du bruit rose

L'intérêt est ici porté sur le bruit de la conductance électrique, équivalent à celui de l'intensité électrique directement mesurée. En régime permanent, la vitesse de chaque ion est déterminée par l'équilibre entre la force électromotrice et les frottements dus à la viscosité. L'intensité du courant est proportionnelle au produit de la charge transportée et de la vitesse des ions. Or la vitesse des ions est elle-même proportionnelle à la charge transportée, ainsi qu'au champ électrique ressenti. La conductance de la solution contenue dans le nanopore peut donc être écrite :

$$G = Q^2 C \mu L_c, \quad (3.18)$$

avec les paramètres suivants :

- Q : charge des ions

[128] F. N. Hooge, T. G. M. Kleinpenning, and L. K. J. Vandamme. Experimental studies on 1-f noise. *Reports On Progress In Physics*, 44(5) :479–532, 1981.

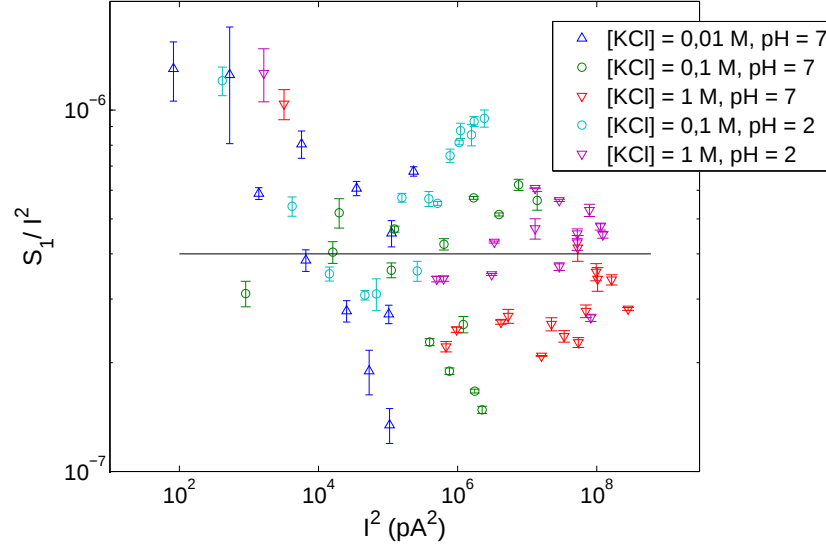


FIGURE 3.12 – Mesures de l’amplitude du bruit rose rapportée au carré de l’intensité, en fonction du carré de l’intensité, à pH et concentrations différentes, reportées sur un même graphe. Les mesures sont faites sur un même pore, dans une membrane de polyimide de 6 μm d’épaisseur. La ligne continue est un guide pour les yeux.

- C : concentration des ions (nombre d’ions par unité de volume)
- μ : mobilité effective des ions selon l’axe du pore (vitesse moyenne par unité de force)
- L_c : longueur caractéristique du pore (cf. équation 3.7, page 94)

L’équation 3.18 indique que les fluctuations de la conductance peuvent être dues au pore lui-même (L_c) ou aux transporteurs de charge ($C\mu$). Il se trouve que dans la littérature, les deux options sont envisagées. Pour le premier cas, la respiration du canal (« channel breathing ») est proposée pour les pores protéiques [124]. Les bras pendants (« pore wall dandling fragments ») ainsi que des processus d’ouverture-fermeture (« opening-closing ») sont présentés pour les pores à trace attaquée [129]. La deuxième piste est plus abordée dans le cas des nanopores dans des matrices de nitrure de silicium : les fluctuations de la conductance électrique y sont expliquées par

-
- [124] S. M. Bezrukov and M. Winterhalter. Examining noise sources at the single-molecule level : 1/f noise of an open maltoporin channel. *Physical Review Letters*, 85(1) :202–205, July 2000.
- [129] Z. Siwy and A. Fulinski. Origin of $1/f^\alpha$ noise in membrane channel currents. *Phys. Rev. Lett.*, 89(15) :158101, Sep 2002.

les fluctuations de la concentration en ions [119], en s'inspirant de la formule phénoménologique de Hooge [128] obtenue en électronique. Dans ce cas, les fluctuations de concentration sont décrites comme reliées à la charge surfacique des parois du pore.

3.3.4 Liquides ioniques

Certains liquides ioniques ont été utilisés dans cette thèse afin de mieux comprendre les origines du bruit rose dans les nanopores. Il s'agit de composés chimiques contenant exclusivement des ions, et restant liquides à des températures inférieures à 100 °C, et même à température ambiante dans le cas des deux liquides ioniques utilisés dans cette thèse. Il s'agit du thiocyanate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium (EMIM-SCN, fourni par Sigma) et du bis(trifluorosulfonyl)imide de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIM-TFSI, fourni par Solvionic). Leur structure chimique est présentée sur la figure 3.13, et leurs caractéristiques principales sont présentées dans le tableau 3.2.

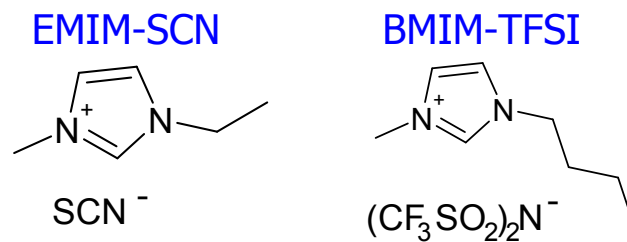


FIGURE 3.13 – Structure chimique des deux liquides ioniques utilisés dans cette thèse.

Ils ont une viscosité et une conductivité du même ordre de grandeur. Néanmoins, EMIM-SCN est complètement miscible dans l'eau, alors que BMIM-TFSI ne l'est pas du tout. Ces deux liquides ioniques sont utilisables

-
- [119] R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, N. H. Dekker, and C. Dekker. Noise in solid-state nanopores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2) :417–421, January 2008.
 - [128] F. N. Hooge, T. G. M. Kleinpenning, and L. K. J. Vandamme. Experimental studies on 1-f noise. *Reports On Progress In Physics*, 44(5) :479–532, 1981.
 - [130] M. Galinski, A. Lewandowski, and I. Stepniak. Ionic liquids as electrolytes. *Electrochimica Acta*, 51(26) :5567–5580, August 2006.
 - [131] U. Domanska, M. Krolikowska, and M. Krolikowski. Phase behaviour and physico-chemical properties of the binary systems 1-ethyl-3-methylimidazolium thiocyanate, or 1-ethyl-3-methylimidazolium tosylate plus water, or plus an alcohol. *Fluid Phase Equilibria*, 294(1-2) :72–83, July 2010.

	η (mPa.s)	σ_{bulk} (S.m ⁻¹)	σ_{conf} (S.m ⁻¹)
EMIM-SCN	20	0,2	0,23 $\pm$ 0,02
BMIM-TFSI	50	0,38	4,7 $\pm$ 0,5

TABLEAU 3.2 – Viscosité η et conductivité électrique σ_{bulk} des liquides ioniques dans le « bulk » à température ambiante, d’après [130] et [131]. σ_{conf} est la valeur de la conductivité électrique déduite des expériences de conductance dans les nanopores de polyimide.

sur une large gamme de potentiels électrochimiques, ce qui empêche toute réaction électrochimique aux électrodes pour les potentiels employés ici ([130], [132]). Les courants mesurés correspondent à la polarisation des électrodes. Les ions viennent s’adsorber à la surface des électrodes. Les charges s’accumulent donc en se répartissant sur la surface, avec un comportement semblable à la charge d’un condensateur.

Un calcul simple permet d’obtenir une estimation du temps de polarisation de l’électrode :

- $S_{\text{électrode}}$: surface de l’électrode, environ 10 mm².
- S_{ion} : surface de l’électrode occupée par un ion, environ 10 Å².
- e , charge d’un ion monovalent, $e = 1,6 \times 10^{-19}$ coul.
- I , intensité du courant mesuré, environ 1 nA.

Le nombre d’ions pouvant s’adsorber à la surface de l’électrode pendant la polarisation est donc de $S_{\text{électrode}}/S_{\text{ion}}$, et le temps caractéristique de la polarisation est :

$$t_{\text{polarisation}} = \frac{S_{\text{électrode}}e}{S_{\text{ion}}I} = 16\,000 \text{ s, soit plus de 4 heures.} \quad (3.19)$$

Ainsi, pour des courants aussi faibles que ceux mesurés, le temps de polarisation est bien plus long que la durée de l’expérience.

La figure 3.14 montre les courbes intensité-tension obtenues pour un pore conique de polyimide, pour une solution d’électrolyte KCl à pH neutre et acide, ainsi que pour les deux liquides ioniques utilisés ici. À pH neutre et à concentration de KCl de 0,1 M, le pore rectifie beaucoup. Ce phénomène est présenté dans la section 3.1, page 84. À pH = 2, la charge de surface, due aux groupements carboxylates, est neutralisée, et la rectification disparaît. Pour

-
- [130] M. Galinski, A. Lewandowski, and I. Stepniak. Ionic liquids as electrolytes. *Electrochimica Acta*, 51(26) :5567–5580, August 2006.
- [132] J. M. Pringle, J. Golding, C. M. Forsyth, G. B. Deacon, M. Forsyth, and D. R. MacFarlane. Physical trends and structural features in organic salts of the thiocyanate anion. *Journal of Materials Chemistry*, 12(12) :3475–3480, 2002.

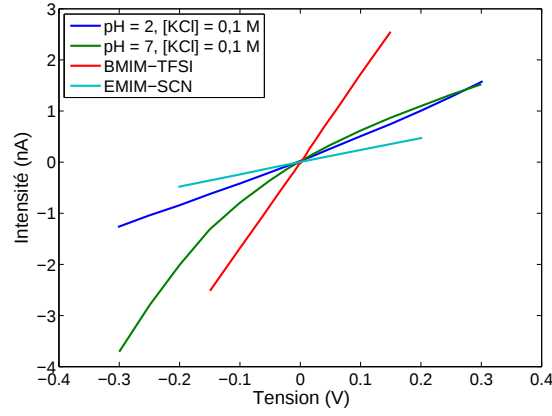


FIGURE 3.14 – Courbes intensité-tension obtenues à différents pH et concentrations, et avec les deux liquides ioniques.

une concentration de 0,1 M, les effets de confinement peuvent être négligés (cf. section 3.2, page 92) et il est possible d'approximer la conductivité de la solution dans le pore σ_{conf} à celle dans le volume σ_{bulk} . Ainsi, on peut estimer la taille du nanopore. La conductance choisie pour le calcul est celle obtenue sur la courbe intensité-tension à pH acide, où le phénomène de rectification est absent. L'équation 3.16 est rappelée ici :

$$r = \frac{1}{\beta_{\text{conf}}} \frac{LG}{\pi R \sigma_{\text{bulk}}}. \quad (3.20)$$

Les paramètres ont les valeurs suivantes :

- $\beta_{\text{conf}} \approx 1$
- $L = 8 \text{ } \mu\text{m}$
- $G = 4,7 \text{ nS}$
- $R = 500 \text{ nm}$ (valeur obtenue par microscopie)
- $\sigma_{\text{bulk}}(\text{KCl } 0,1 \text{ M}) = 1,29 \text{ S.m}^{-1}$

La valeur suivante est obtenue pour le petit rayon :

$$r = 20 \text{ nm} \quad (3.21)$$

La longueur caractéristique du pore est donc de :

$$L_c = \frac{\pi r R}{L} = 4 \text{ nm} \quad (3.22)$$

3.3.5 Les liquides ioniques et le bruit rose

Il est donc maintenant possible d'évaluer les conductivités des liquides ioniques contenus dans le nanopore. La valeur de la conductivité du liquide

ionique dans le pore est donnée par :

$$\sigma_{\text{conf}} = \frac{G}{L_c}, \quad (3.23)$$

puisque L_c est considéré comme intrinsèque au pore et indépendant de la nature du liquide qui le remplit. Les valeurs obtenues pour σ_{conf} sont reportées dans le tableau 3.2, page 106. Pour EMIM-SCN, dont l'anion est hydrophile, $\sigma_{\text{conf}} \approx \sigma_{\text{bulk}}$. Par contre, pour BMIM-TFSI, dont l'anion est hydrophobe, le résultat est très différent : $\sigma_{\text{conf}} \gg \sigma_{\text{bulk}}$. Un résultat opposé ($\sigma_{\text{conf}} \ll \sigma_{\text{bulk}}$) a été reporté pour un nanopore similaire, rempli de BMIM-sulfate de méthyle (anion amphiphile) [133]. Mais de telles différences de comportement ne sont pas inattendues, car les propriétés des liquides ioniques varient beaucoup. Ils représentent toujours un vaste domaine de recherche.

La figure 3.15 présente des spectres de densité de puissance typiques obtenus avec le même pore de polyimide que précédemment, rempli successivement avec les deux liquides ioniques. Les courbes « EMIM-SCN, 200 mV » et

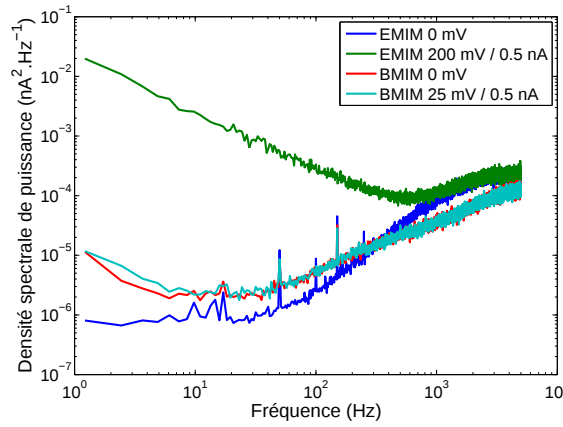


FIGURE 3.15 — Allure des spectres de densité de puissance, pour un nanopore rempli avec des liquides ioniques.

« BMIM-TFSI, 25 mV » n'ont pas la même allure, bien que le pore soit parcouru par la même intensité de courant. Il était donc intéressant de changer complètement de liquide à l'intérieur du pore, car le comportement est bien différent d'une solution d'électrolyte, pour laquelle l'amplitude du bruit rose est directement liée à la valeur du courant.

[133] M. Davenport, A. Rodriguez, K. J. Shea, and Z. S. Siwy. Squeezing ionic liquids through nanopores. *Nano Letters*, 9(5) :2125–2128, May 2009.

La figure 3.16 présente les différences d'amplitude du bruit rose, S_1 , pour des solutions de KCl et pour les liquides ioniques. Pour les solutions de KCl,

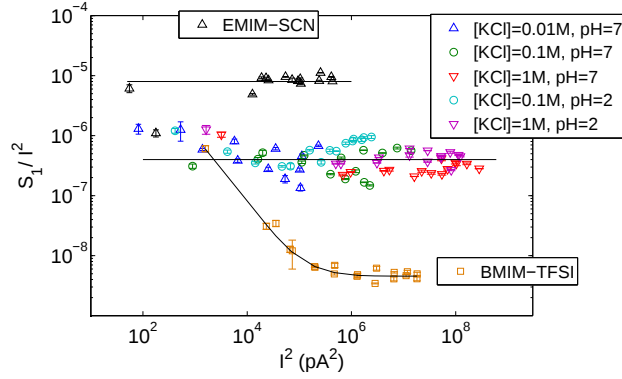


FIGURE 3.16 – Variations de l'amplitude du bruit S_1 en fonction du carré de l'intensité, pour une solution de KCl et les liquides ioniques.

quelle que soit la concentration en sel, le pH, et la tension imposée, une unique courbe maîtresse $S_1/i^2 = \text{constante}$ est obtenue sur plus de 6 ordres de grandeur. Pour les liquides ioniques, l'amplitude du bruit rose diffère significativement de cette courbe maîtresse. L'amplitude est 40 fois supérieure pour EMIM-SCN, mais elle est réduite de 2 ordres de grandeur pour BMIM-TFSI. L'origine d'une telle différence n'est pas comprise, mais elle doit certainement être reliée aux effets de confinement évoqués précédemment.

3.3.6 Bruit rose et confinement

La densité spectrale de puissance S est la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation qui doit diminuer au-delà du temps de relaxation le plus long, $\tau^* = 1/f^*$. Ici, la densité S peut s'écrire :

$$S = t_0 I^2 \frac{\langle \Delta G^2 \rangle}{G^2} \mathcal{F}(f/f^*), \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \mathcal{F}(x \ll 1) &= 1, \\ \mathcal{F}(x \gg 1) &= x^{-1}. \end{cases} \quad (3.24)$$

où t_0 est l'unité de temps. Malheureusement, le plateau attendu sur le spectre de densité de puissance n'a pas pu être atteint aux basses fréquences, avec les mesures faites dans cette thèse.

Origines du bruit rose : pore ou solution ?

Si les fluctuations de la géométrie du pore (dus à la respiration ou aux bras pendants) sont considérées comme seules responsables du bruit rose,

alors on peut écrire ainsi les fluctuations de la conductance :

$$G = \sigma L_c \quad (3.25)$$

$$\langle \Delta G^2 \rangle = \sigma^2 \langle \Delta L_c^2 \rangle \quad (3.26)$$

Ainsi, l'équation 3.24 donne :

$$S_1 \propto I^2 \frac{\langle \Delta L_c^2 \rangle}{L_c^2} f^*. \quad (3.27)$$

Il est raisonnable de faire l'hypothèse que $\langle \Delta L_c^2 \rangle$, c'est-à-dire l'amplitude des fluctuations de la géométrie du pore, est une propriété thermodynamique ou statique, qui ne dépend que peu du liquide qui remplit le pore. En revanche, la dynamique de ces fluctuations serait ralentie par la viscosité du liquide. La fréquence caractéristique serait décalée vers les basses fréquences, proportionnellement à l'augmentation de la viscosité η , c'est-à-dire $f^* \propto \eta^{-1}$. Ainsi, les fluctuations de la géométrie du pore conduiraient à $S_1 \propto I^2 \eta^{-1}$. Les résultats obtenus ici sont en désaccord avec un tel comportement. En effet, les deux liquides ioniques ont une viscosité supérieure à celle de la solution électrolytique, et pourtant l'un donne un bruit rose plus grand et l'autre plus faible.

Il apparaît donc plus probable que le bruit rose provienne des fluctuations de la conductivité ionique du liquide confiné dans le pore, c'est-à-dire des fluctuations de concentration ou de mobilité. En considérant N porteurs de charge indépendants, chacun portant un courant i , le courant total est donné par :

$$\text{Courant moyen : } \bar{I} = N\bar{i} \quad (3.28)$$

$$\text{Courant instantané : } I(t) = \sum_{k=1}^N i_k(t) \quad (3.29)$$

La variance est calculée ainsi :

$$\begin{aligned} (I(t) - \bar{I})^2 &= \left(\left(\sum_{k=1}^N i_k(t) \right) - N\bar{i} \right)^2 \\ &= \left(\sum_{k=1}^N (i_k(t) - \bar{i}) \right)^2 \\ &= \sum_{k=1}^N (i_k(t) - \bar{i})^2 + \sum_{k=1}^N \sum_{\substack{l=1 \\ l \neq k}}^N \underbrace{(i_k(t) - \bar{i})(i_l(t) - \bar{i})}_{\text{nuls en moyenne}} \end{aligned} \quad (3.30)$$

d'où

$$\begin{aligned}
\langle \Delta I^2 \rangle_t &= \left\langle (I(t) - \bar{I})^2 \right\rangle_t \\
&= \left\langle \sum_{k=1}^N (i_k(t) - \bar{i})^2 \right\rangle_t \\
&= \sum_{k=1}^N \underbrace{\left\langle (i_k(t) - \bar{i})^2 \right\rangle_t}_{\text{tous identiques en moyenne}} \\
&= N \left\langle (i(t) - \bar{i})^2 \right\rangle_t \\
&= N \langle \Delta i^2 \rangle_t
\end{aligned} \tag{3.31}$$

L'amplitude du bruit rose est donc :

$$S_1 \propto \frac{I^2}{C} \times \frac{\langle \Delta i^2 \rangle}{i^2}. \tag{3.32}$$

Pour des porteurs de charge indépendants, le rapport $\langle \Delta i^2 \rangle / i^2$ est indépendant de C et l'équation 3.32 donne :

$$S_1 \propto C^{-1}, \tag{3.33}$$

qui est la formule de Hooge. Ceci est en contradiction avec la courbe maîtresse (figure 3.16) obtenue pour les solutions de KCl. Les concentrations de ces solutions varient de 2 ordres de grandeur, ce qui est bien plus grand que la « largeur » de la courbe maîtresse. Cet aspect a déjà été remarqué [134]. Les efforts pour allier les expériences avec la formule de Hooge s'appuient sur la différence de concentration en sel entre le volume et dans le pore, à cause des charges de surface ($N \propto C$). Pourtant, à $\text{pH} = 2$, les effets de la charge de surface sont négligeables (car aucun effet de rectification n'est observable sur la figure 3.14, page 107), alors que les données de bruit rose pour ce pH restent sur la courbe maîtresse (figure 3.16, page 109). Ce résultat démontre que les fluctuations dues aux charges de la paroi du pore ne peuvent être responsables du bruit rose, comme ne peut l'être aucun mécanisme s'appuyant sur des fluctuations individuelles de la mobilité des ions.

Les résultats présentés ici donnent la preuve de l'existence de phénomènes coopératifs sur la mobilité des ions. Ces effets ne sont pas présents dans le volume car ils sont dus au confinement. Pour les solutions de KCl, ils se manifestent seulement sous la forme de fluctuations de la conductivité, mais

[134] M. R. Powell, I. Vlassiuk, C. Martens, and Z. S. Siwy. Nonequilibrium 1/f noise in rectifying nanopores. *Physical Review Letters*, 103(24) :248104, December 2009.

pas dans sa valeur moyenne qui suit, dans les barres d'erreur, la dépendance en concentration attendue. Mais pour les liquides ioniques, les mécanismes coopératifs sont plus évidents. Les liquides ioniques sont connus pour s'auto-organiser sous une structure semblable aux cristaux liquides, quand la chaîne du cation est suffisamment longue [135], comme par exemple le groupement *butyl* du BMIM-TFSI et *éthyl* du EMIM-SCN. Plus récemment, le comportement en phase s'est révélé dépendre du champ électrique externe [136], [137]. Ces effets semblent être responsables des différentes propriétés de conduction des liquides ioniques en géométrie confinée :

- Transport facilité : bruit faible, $\sigma_{\text{conf}} \gg \sigma_{\text{bulk}}$, pour BMIM-TFSI.
- Transport *bouché* (« jammedlike ») : bruit élevé, $\sigma_{\text{conf}} \ll \sigma_{\text{bulk}}$, pour EMIM-SCN, ainsi que pour le méthylsulfate de BMIM et le méthoxyéthoxyéthylsulfate de BMIM [133].

La réduction de bruit observée ici avec un liquide ionique explique probablement la réussite de travaux rapportés récemment sur la détection par nanopore de petites molécules [138] ou d'ADN [139], grâce à des liquides ioniques. Ceci est très prometteur pour de futures applications dans ce domaine. Même si le bruit en $1/f$ de la conductance ionique dans un pore unique n'est pas encore comprise, son origine doit être recherchée en relation avec la dynamique lente de l'électrolyte confinée, qui devrait présenter des caractéristiques *bouchées* [140], semblables à celles rencontrées pour le transport à quasi-1D [141].

-
- [135] K. Binnemans. Ionic liquid crystals. *Chemical Reviews*, 105(11) :4148–4204, November 2005.
- [136] Y. T. Wang. Disordering and reordering of ionic liquids under an external electric field. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(32) :11058–11060, August 2009.
- [137] G. X. Xie, J. B. Luo, D. Guo, and S. H. Liu. Nanoconfined ionic liquids under electric fields. *Applied Physics Letters*, 96(4) :043112, January 2010.
- [133] M. Davenport, A. Rodriguez, K. J. Shea, and Z. S. Siwy. Squeezing ionic liquids through nanopores. *Nano Letters*, 9(5) :2125–2128, May 2009.
- [138] D. A. Jayawardhana, J. A. Crank, Q. Zhao, D. W. Armstrong, and X. Y. Guan. Nanopore stochastic detection of a liquid explosive component and sensitizers using boromycin and an ionic liquid supporting electrolyte. *Analytical Chemistry*, 81(1) :460–464, January 2009.
- [139] Ranulu Samanthi S. de Zoysa, Dilani A. Jayawardhana, Qitao Zhao, Deqiang Wang, Daniel W. Armstrong, and Xiyun Guan. Slowing dna translocation through nanopores using a solution containing organic salts. *J Phys Chem B*, 113(40) :13332–6, October 2009.
- [140] G. Biroli. Jamming - a new kind of phase transition ? *Nature Physics*, 3(4) :222–223, April 2007.
- [141] T. Nagatani. The physics of traffic jams. *Reports On Progress In Physics*, 65(9) :1331–1386, September 2002.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre a exploré les différents phénomènes s'appliquant aux ions qui traversent un nanopore, et qui conduisent à une différence avec une simple conduction ohmique. Il s'avère que les charges de la paroi influencent sensiblement le passage des ions selon la polarité de la tension imposée. De plus, les effets de confinement affectent les mesures de courant ionique ainsi que le bruit de ces mesures.

Chapitre 4

Translocation et transport d'objets

Après s'être intéressé aux phénomènes dus à la paroi et aux ions qui peuvent gêner les mesures de courant électrique, il est maintenant possible de présenter les expériences s'appuyant sur ces mesures de courant. Ce chapitre présente les expériences de transport et de translocations qui ont été tentées.

Sommaire

4.1	Translocation de la luciférase	116
4.1.1	Présentation de l'aérolysine	116
4.1.2	La luciférase, une protéine adaptée	117
4.1.3	Aérolysine et luciférase dénaturée	122
4.2	Tentatives de transport	126
4.2.1	Protéines	126
4.2.2	ADN	127
4.2.3	Nanoparticules	128
4.2.4	Polymères et polyélectrolytes	129
4.2.5	Discussion	129

4.1 Translocation de la luciférase dans un pore biologique

Cette section présente la réalisation d'une expérience de translocation d'une protéine, la luciférase, dans un nanopore naturel, l'aérolysine.

4.1.1 Présentation de l'aérolysine

L'aérolysine est une toxine produite par la bactérie *Aeromonas Hydrophila*. Elle forme des pores dans les membranes lipidiques des cellules, comme l' α -hémolysine avec laquelle elle partage des points communs. En revanche, elle est largement moins répandue pour son utilisation en *patch-clamp*.

En 1986, l'aérolysine recombinante était déjà produite [142], et sa séquence de nucléotides était publiée l'année suivante [143]. Une étude en *patch-clamp* avec une population de pores [144] a permis de mieux comprendre les mécanismes d'insertion dans une membrane. En 1994, la structure de la proaérolysine, c'est-à-dire le monomère en solution servant à l'assemblage du pore sur une membrane, est découverte [145]. L'aérolysine est caractérisée par spectroscopie de masse en 1996 [146].

-
- [142] S. P. Howard and J. T. Buckley. Molecular-cloning and expression in escherichia-coli of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from aeromonas-hydrophila. *Molecular & General Genetics*, 204(2) :289–295, 1986.
 - [143] S. P. Howard, W. J. Garland, M. J. Green, and J. T. Buckley. Nucleotide-sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of aeromonas-hydrophila. *Journal of Bacteriology*, 169(6) :2869–2871, June 1987.
 - [144] H. U. Wilmsen, F. Pattus, and J. T. Buckley. Aerolysin, a hemolysin from aeromonas-hydrophila, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, 115(1) :71–81, April 1990.
 - [145] M. W. Parker, J. T. Buckley, J. P. M. Postma, A. D. Tucker, K. Leonard, F. Pattus, and D. Tsernoglou. Structure of the aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature*, 367(6460) :292–295, January 1994.
 - [146] M. Moniatte, F. G. vanderGoot, J. T. Buckley, F. Pattus, and A. vanDorsselaer. Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the aeromonas toxin aerolysin using maldi-tof mass spectrometry. *Febs Letters*, 384(3) :269–272, April 1996. Le site est en maintenance, il faudra y retourner pour avoir le pdf.

Deux études récentes ([115], [116]) de la même équipe utilisent l'aérolysine en tant que canal ionique afin d'y étudier le transport de polynucléotides. La figure 4.1 compare ce pore à celui de l' α -hémolysine.

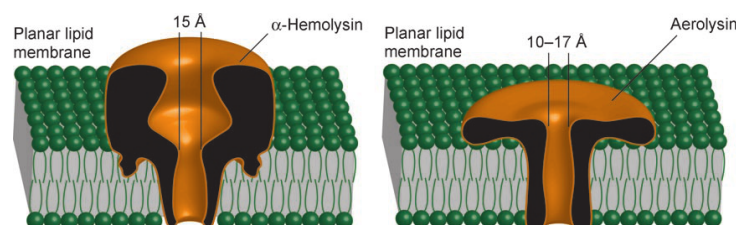


FIGURE 4.1 – Schéma des pores d' α -hémolysine et d'aérolysine [116].

Par rapport à l' α -hémolysine, l'aérolysine possède un canal légèrement plus long, et elle ne présente pas de vestibule, ce qui la rend moins sensible à la dénaturation. En effet, le vestibule est la première partie à se dénaturer en présence d'un agent chimique dénaturant en solution [30].

L'aérolysine est donc un pore comparable à l' α -hémolysine pour les propriétés de transport, mais moins sensible à la dénaturation. Elle est très donc adaptée à des expériences de translocation de protéines dénaturées.

4.1.2 La luciférase, une protéine adaptée

Présentation

Le terme « luciférase » désigne toute enzyme catalysant une réaction qui produit de la lumière. L'émission de lumière est une conséquence de la formation d'un produit ou d'un intermédiaire dans un état électronique excité. Le retour à l'état fondamental se fait par émission d'un photon lumineux. Il existe par exemple des luciférases bactériennes, mais celle étudiée dans cette thèse provient du ver luisant *Photinus pyralis*. C'est une protéine de 62 kDa.

-
- [115] R. Stefureac, Y. T. Long, H. B. Kraatz, P. Howard, and J. S. Lee. Transport of alpha-helical peptides through alpha-hemolysin and aerolysin pores. *Biochemistry*, 45(30) :9172–9179, August 2006.
 - [116] R. Stefureac, L. Waldner, P. Howard, and J. S. Lee. Nanopore analysis of a small 86-residue protein. *Small*, 4(1) :59–63, January 2008.
 - [30] M. Pastoriza-Gallego, G. Oukhaled, J. Mathe, B. Thiebot, J. M. Betton, L. Auvray, and J. Pelta. Urea denaturation of alpha-hemolysin pore inserted in planar lipid bilayer detected by single nanopore recording : Loss of structural asymmetry. *Febs Letters*, 581(18) :3371–3376, July 2007.

En présence de Mg^{2+} , d'ATP et de dioxygène, cette enzyme oxyde son substrat, la luciférine, en émettant de la lumière jaune-verte (cf. photographie de la figure 4.2).

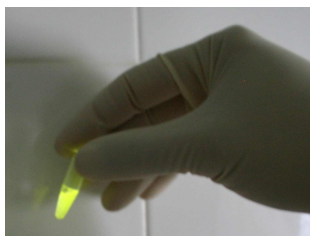


FIGURE 4.2 – Émission de lumière par la luciférase en présence de substrat.

La réaction chimique est présentée sur la figure 4.3. Les mécanismes exacts n'en sont pas encore totalement compris [147].

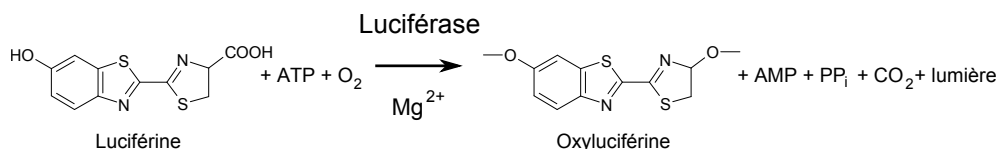


FIGURE 4.3 – Oxydation de la luciférine par la luciférase.

La structure cristalline de la luciférase est connue avec une précision de 2,0 Å [148]. Elle est présentée sur la figure 4.4.

Mesure de la concentration

La luciférase peut être détectée même en très faible quantité grâce à ses propriétés d'émission de lumière. Sa concentration peut être quantifiée en utilisant un photo-multiplicateur.

Le protocole expérimental consiste à mélanger une quantité égale de 2 solutions :

- la solution de luciférase à analyser.
- une solution commerciale, contenant un excès de luciférine et d'autres composés nécessaires à la catalyse.

[147] T. O. Baldwin. Firefly luciferase : The structure is known, but the mystery remains. *Structure*, 4(3) :223–228, March 1996.

[148] E. Conti, N. P. Franks, and P. Brick. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, 4(3) :287–298, March 1996.

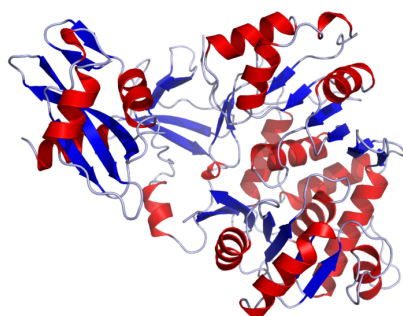


FIGURE 4.4 – Structure de la luciférase. D’après Protein Data Bank, 1LCI.

La solution concentrée ($\approx 15 \text{ mg.mL}^{-1}$) de luciférase recombinante, ainsi que la solution de réactif pour analyser la concentration, sont fournies par Promega.

Le mélange obtenu est placé dans un photo-multiplicateur, qui transcrit l’énergie lumineuse en potentiel électrique, tout en amplifiant le signal. Celui-ci est ensuite analysé par un compteur. La mesure se fait rapidement (dans un temps inférieur à la minute) car le produit de la réaction, l’oxyluciférine, inhibe l’enzyme [149].

La figure 4.5 présente l’étalonnage des mesures faites par dilutions successives d’une solution concentrée de luciférase.

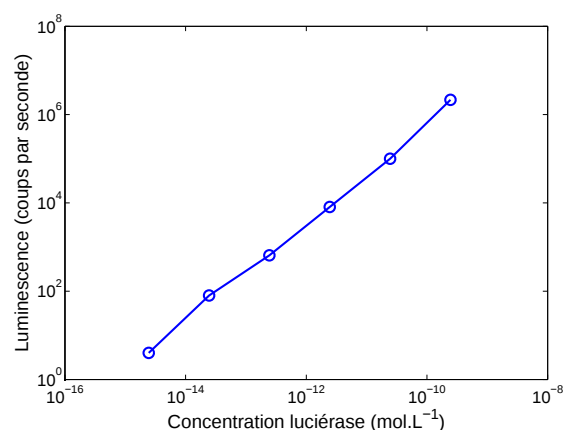


FIGURE 4.5 – Courbe d’étalonnage de la lumière émise en fonction de la dilution de la luciférase.

[149] J. J. Lemasters and C. R. Hackenbrock. Kinetics of product inhibition during firefly luciferase luminescence. *Biochemistry*, 16(3) :445–447, 1977.

La luminescence est bien proportionnelle à la concentration en luciférase. Cette loi est observée sur de nombreux ordres de grandeur, ce qui montre l'intérêt du choix d'une telle protéine comme modèle. De plus, il est possible de détecter une présence même infime (inférieure à 10^{-14} mol.L⁻¹) de luciférase .

Dénaturation de la luciférase

Contrairement aux brins d'ADN, les protéines doivent être préalablement dénaturées avant de pouvoir effectuer des translocations dans un nanopore. En effet, leur structure ternaïre ou quaternaire leur confère un arrangement tridimensionnel en solution, qui les empêche de passer dans un canal large de quelques nanomètres. Or, la compréhension des mécanismes par lesquels les protéines acquièrent leur structure restent un enjeu de taille pour la science actuelle [150].

La translocation de protéines dans des nanopores s'inscrit dans cette recherche. Il est théoriquement possible d'utiliser deux milieux différents séparés par une membrane percée d'un unique nanopore. Le premier serait dénaturant grâce à la présence d'un agent dénaturant chimique, mais pas l'autre. En appliquant un champ électrique, les protéines dénaturées seraient attirées à travers le pore, pour se renaturer de manière séquentielle. Cette méthode de renaturation serait totalement différente d'une renaturation *in vitro*, pour laquelle l'agent dénaturant est simplement dilué, ce qui provoque la renaturation simultanée de toutes les protéines présentes. Ceci génère des interactions entre différentes protéines et aussi entre différentes parties d'une même protéine. La situation est différente *in vivo*. En effet, dans ce cas, la protéine commence à se replier en même temps que les nucléotides sont assemblés, de manière séquentielle. Les protéines peuvent subir également des translocations à travers différentes membranes avant d'atteindre le lieu où elles peuvent remplir leur fonction (cf. section 1.2.2, page 13). Ainsi, la renaturation par translocation serait beaucoup plus proche du repliement naturel des protéines que les renaturations *in vitro*.

Avec une membrane dotée d'un seul pore, il serait possible de suivre le passage de protéines par conductimétrie, et avec une membrane dotée de nombreux pores, il serait possible de replier tout un échantillon de protéines. Le principe est schématisé sur la figure 4.6.

Dans le cas d'un nanopore naturel, seule l'alternative d'un unique pore est

[150] C. M. Dobson. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968) :884–890, December 2003.

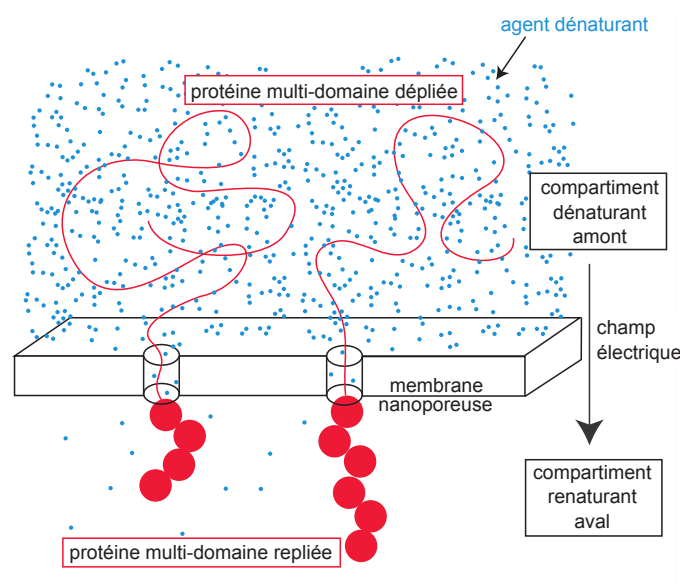


FIGURE 4.6 – Schéma de principe de la renaturation par translocation.

envisageable. De plus, il est malheureusement difficile d’obtenir deux milieux distincts de chaque côté de la membrane lipidique servant de support au pore naturel. La différence de pression osmotique aurait tendance à détruire la membrane. Pour cela, les nanopores obtenus par attaque de trace sont beaucoup plus robustes, et présentent l’avantage de pouvoir présenter un nombre très grand de pores tout comme un pore unique.

Le dépliement et le repliement de la luciférase ont déjà été étudiés en solution ([151], [152]). La protéine peut émettre de la lumière dans son état natif, mais pas dans un autre état. Ainsi, son taux de renaturation se mesure directement par l’activité lumineuse de la solution. La luciférase est une protéine multi-domaine dont il existe différents intermédiaires entre l’état natif et l’état totalement dénaturé, selon la concentration en agent dénaturant.

Le chlorure de guanidinium, de formule $C(NH_2)_3^+ Cl^-$, noté $Gdm^+ Cl^-$,

-
- [151] R. Herbst, U. Schafer, and R. Seckler. Equilibrium intermediates in the reversible unfolding of firefly (*photinus pyralis*) luciferase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11) :7099–7105, March 1997.
 - [152] R. Herbst, K. Gast, and R. Seckler. Folding of firefly (*photinus pyralis*) luciferase : Aggregation and reactivation of unfolding intermediates. *Biochemistry*, 37(18) :6586–6597, May 1998.

est utilisé ici en tant qu'agent dénaturant. La concentration employée est de 0,8 M, ce qui correspond environ au premier intermédiaire de dénaturation exposé dans [151].

4.1.3 Aérolysine et luciférase dénaturée

Cette section présente l'expérience de translocation de la luciférase dénaturée à travers un nanopore naturel, l'aérolysine, suivie par conductimétrie.

Dispositif et protocole expérimentaux

La cellule de conductimétrie utilisée ici est différente de celle employée pour les membranes à trace attaquée, dont le montage est présenté sur la figure 2.24, page 63. Pour utiliser un pore naturel, il faut tout d'abord créer une membrane lipidique servant de support au nanopore.

Dans le montage utilisé dans cette thèse, la membrane lipidique est formée dans une petite ouverture circulaire de 50 μm de rayon. Celle-ci est creusée dans un cylindre amovible. Elle est entourée de rouge sur la photographie de la figure 4.7 (a). Ce cylindre amovible est ensuite inséré dans le montage, où les solutions peuvent être ajoutées, comme présenté sur la figure 4.7 (b).

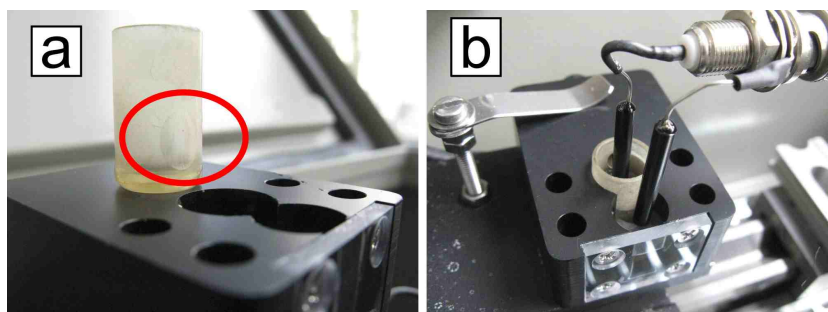


FIGURE 4.7 – Photographie du montage expérimental pour la cellule de conductimétrie d'un pore naturel. (a) : Localisation de la petite ouverture dans le cylindre amovible. (b) : Montage avec le cylindre inséré, les deux compartiments remplis et les électrodes placées dans chaque solution.

Une fois que les solutions sont ajoutées et que les électrodes sont placées de chaque côté, le lipide est ajouté localement près de la petite ouverture.

[151] R. Herbst, U. Schafer, and R. Seckler. Equilibrium intermediates in the reversible unfolding of firefly (*photinus pyralis*) luciferase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11) :7099–7105, March 1997.

L'opération est suivie directement avec un dispositif optique grossissant, à travers la plaque transparente visible sur la figure 4.7 (b). La qualité de la membrane lipidique obtenue est contrôlée électriquement. Un amplificateur Axopatch 200 B est relié aux électrodes, et une tension alternative est imposée entre les électrodes. Les mesures de résistance et de capacité indiquent si la qualité de la membrane est suffisante. Dans le cas contraire, la membrane obtenue est détruite en imposant une forte tension (1 V), puis une nouvelle membrane est formée.

Quand la membrane lipidique obtenue est satisfaisante, la proaérollysine est ajoutée d'un côté, appelé côté *cis*. Le contrôle électrique se fait maintenant en imposant une tension continue. L'ajout se fait par petite quantité, répété jusqu'à obtention d'un saut du courant électrique, qui passe d'une valeur nulle à une valeur non nulle. Ceci indique qu'un pore d'aérollysine s'est inséré dans la membrane lipidique. Il peut arriver que le courant fasse un deuxième saut qui le porte au double de la valeur initiale, cela est alors interprété comme l'insertion d'un deuxième pore d'aérollysine. Dans ce cas, la membrane est également détruite pour recommencer l'expérience à son début. Une fois qu'un pore unique d'aérollysine est inséré dans la membrane, il est possible d'ajouter la protéine dont on veut observer les translocations. La durée typique d'expérience, avant une rupture spontanée de la membrane lipidique, est d'une heure environ.

Les protéines naturelles possèdent des acides aminés à caractère acide ou basique, donc leur charge effective dépend du pH de la solution dans laquelle elles sont plongées. La figure 4.8, obtenue avec le logiciel CLC Protein Workbench, présente l'évolution de la charge nette de la luciférase en fonction du pH. À $\text{pH} = 8$, auquel les solutions utilisées ici sont tamponnées, la luciférase est donc légèrement chargée négativement. Or, la masse est choisie arbitrairement du côté *trans*. La luciférase est insérée du côté *cis*. Ainsi, la tension à imposer pour observer des translocations sera donc négative.

Observation de translocations par conductimétrie

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- Température ambiante
- Solution de chaque côté :
 - $[\text{KCl}] = 0,25 \text{ M}$
 - $[\text{Hepes}] = 5 \text{ mM}$, à $\text{pH} = 8$
 - $[\text{GdmCl}] = 0,8 \text{ M}$
 - $[\text{Luciférase}] = 3 \text{ }\mu\text{M}$, du côté *cis*

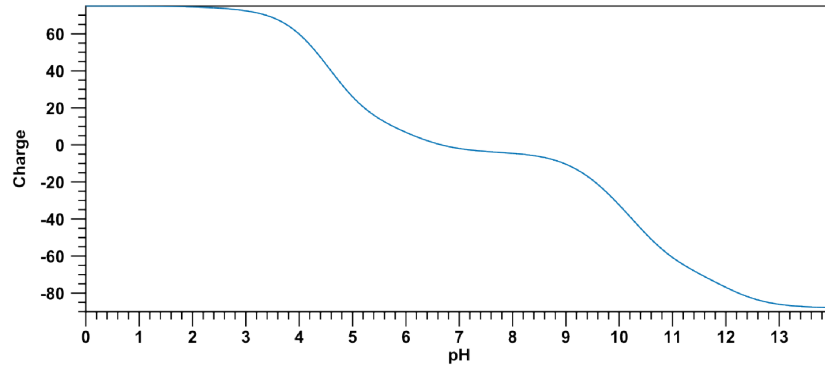


FIGURE 4.8 – Évolution de la charge de la luciférase en fonction du pH.

Des événements apparaissent alors sur l'évolution du courant en fonction du temps. Sans intervenir sur les solutions contenues dans le montage, il est possible de changer la tension imposée. En augmentant celle-ci, la fréquence des événements augmente, comme le montre la figure 4.9.

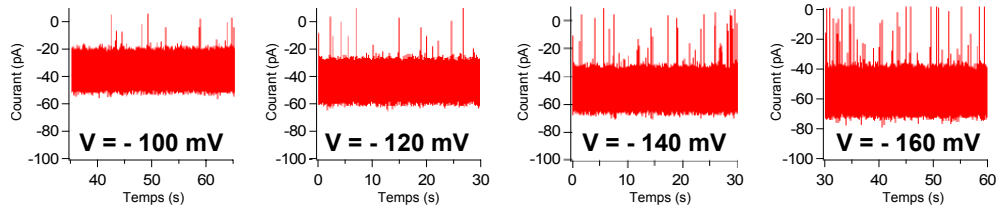


FIGURE 4.9 – Évolution temporelle du courant pendant 30 secondes, selon la tension imposée.

Pour interpréter les signaux obtenus, il est utile de tracer un histogramme des courants mesurés, ou préférentiellement de la conductance qui dépend beaucoup moins de la tension imposée. La figure 4.10 présente le courant électrique observé pour une tension de -150 mV. L'historgramme de la conductance, obtenu pour une durée de 160 secondes, est représenté sur la même figure, accompagné des histogrammes correspondant à deux autres tensions, -100 mV et -130 mV, pendant une même durée. Les histogrammes sont normalisés pour avoir une surface égale à l'unité.

Le sommet présent à droite sur les trois histogrammes, entre 300 et 400 pS environ, correspond au niveau de base de conduction du pore ouvert. Il s'agit du courant mesuré en l'absence de protéine à proximité du pore.

Sur la partie gauche de la figure, pour une tension de -150 mV, cette valeur correspond à un courant d'environ -50 pA. Le pic présent à gauche de

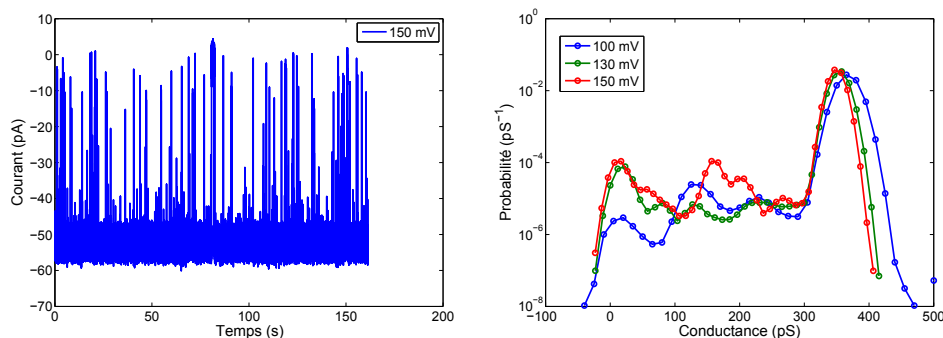


FIGURE 4.10 – Courant électrique observé dans le temps (à gauche). Histogrammes de la conductance mesurée (à droite).

l'histogramme, autour d'une conductance nulle, correspond à une annulation du courant, due à une obstruction totale du pore. Un tel phénomène est certainement dû à la translocation de protéines. Les événements de conductance nulle les plus longs traduisent certainement des translocations de protéines qui ne sont pas totalement dépliées par le dénaturant. Ainsi, la chaîne d'acides aminés est partiellement rentrée dans le pore d'aérolysine, mais une partie encore repliée sur elle-même est trop grosse pour s'introduire dans le lumen. Le processus de translocation s'arrête donc, jusqu'au dépliement final de la protéine ou l'intervention de l'expérimentateur qui inverse la polarité de la tension pendant un court instant. De telles interventions ont été supprimées du signal avant traitement.

Il existe des pics supplémentaires sur les histogrammes, entre les deux pics principaux qui viennent d'être présentés. Ces pics « secondaires » ne peuvent être expliqués simplement. Ils sont certainement dus à l'état partiellement déplié des protéines. La concentration de dénaturant utilisée ici (chlorure de guanidinium 0,8 M) ne parvient pas à dénaturer complètement les protéines de luciférase. Les événements des pics secondaires peuvent être des protéines s'approchant du pore, le bouchant partiellement, et repartant du même côté de la membrane. Néanmoins, aucun comportement systématique n'a été observé en fonction de la tension.

D'autre part, contrairement à d'autres résultats existant dans la littérature, l'analyse statistique des événements, selon leur amplitude, leur durée et l'intervalle de temps entre un événement et le suivant, n'a pas permis de conclure à des phénomènes systématiques.

4.2 Tentatives de transport dans des pores à trace attaquée

Les expériences réalisées avec l'aérolysine ont été encourageantes. À cause de leur robustesse, il aurait été avantageux de reproduire ces résultats avec des membranes nanoporeuses à trace attaquée. Malheureusement, aucun événement n'a été observé avec ce type de nanopore. Cette section présente les différentes expériences de translocation qui ont été menées.

4.2.1 Protéines

Les protéines ont été les premiers objets à être testés pour des expériences de translocation, en raison du succès de ce type d'expérience avec les nanopores naturels (cf. section précédente).

Luciférase

La luciférase a été utilisée dans les mêmes conditions expérimentales que pour les expériences de translocation au travers d'un nanopore naturel. La protéine est alors partiellement dénaturée. Aucun événement n'a été observé.

Cependant, des expériences de transport de luciférase native ont été menées avec succès, à travers des membranes de polycarbonate aux pores multiples et cylindriques. Les conditions expérimentales étaient les suivantes :

- Luciférase native, à 40 nM.
- Tampon phosphate, concentration 100 mM, à pH = 7,8.
- DTT 1 mM. Il s'agit du dithiothréitol, $C_4H_{10}O_2S_2$, destiné à empêcher l'oxydation des cystéines dans les protéines.
- EDTA 1mM. Il s'agit de l'acide éthylène diamine tétra acétique, destiné à complexer les cations divalents présents en solution, limitant la prolifération de bactéries qui peuvent nuire aux protéines.

La protéine est insérée dans un seul des deux compartiments (côté *cis*). Ceux-ci sont séparés par une membrane de polycarbonate de 6 μm d'épaisseur, avec 10^9 pores. cm^{-2} . Les pores sont supposés cylindriques, avec un rayon d'environ 50 nm. L'activité de la solution est mesurée du côté *trans*. En quelques heures, les tests de luminescence montrent que la protéine native et donc fonctionnelle a bien traversé la membrane.

La taille des pores est bien supérieure à la taille de la luciférase, dont la plus grande distance entre deux acides aminés reste inférieure à 10 nm. Cependant, pour des pores plus petits, le transport de luciférase n'a pu être observé. Ceci est sans doute dû aux interactions entre protéine et paroi du pore, d'autant plus que la longueur des pores est de 6 μm .

BSA (Bovine Serum Albumin) [Albumine de sérum bovin]

La BSA est une protéine de 65 kDa, très répandue en biophysique. Elle est habituellement utilisée pour ses propriétés d'adsorption non spécifique, pour couvrir les parois d'un récipient avant d'y placer une solution d'une autre protéine.

Des expériences de translocations ont été menées avec de la BSA native mais aussi dénaturée, dans des membranes de polyimide à pore unique, mais aucun événement n'a été observé. Dans ce cas, on utilise plutôt l'urée comme agent dénaturant au lieu du chlorure de guanidinium, car celle-ci a l'avantage d'être neutre électriquement.

Fibronectine

La fibronectine est une protéine de grande taille (460 kDa), contribuant à l'organisation de la matrice extracellulaire et à l'adhésion cellulaire. L'avantage de sa grande dimension facilite théoriquement l'observation d'événements correspondant au transport de fibronectine native. Malheureusement ceux-ci n'ont pas été observés.

4.2.2 ADN

L'ADN a été le premier polymère biologique dont les translocations ont été observées avec des pores d' α -hémolysine. La manipulation de l'ADN nécessite plus de soin que pour les protéines, à cause de sa fragilité biologique. En effet, il existe par exemple sur la peau humaine des enzymes sectionnant les molécules d'ADN.

La solution utilisée ici pour contenir l'ADN reste de composition similaire à celle employée pour les protéines :

- KCl, concentration 1 M
- Tampon Tris 10 mM (trishydroxyméthylaminométhane), à pH = 7,1
- EDTA 1 mM

Bien que les conditions expérimentales soient quasiment les mêmes que pour l'équipe de Z. Siwy [153], aucun événement n'a été observé. Les pores utilisés sont réalisés dans le même matériau, le polyimide, par attaque de trace asymétrique. Néanmoins, l'ADN utilisé ici est beaucoup plus long : il s'agit de l'ADN du phage λ , long de 48 502 bases (fourni chez Sigma). Des essais ont été faits avec l'ADN simple brin, mais aussi double brin, inséré

[153] C. C. Harrell, Y. Choi, L. P. Horne, L. A. Baker, Z. S. Siwy, and C. R. Martin. Resistive-pulse dna detection with a conical nanopore sensor. *Langmuir*, 22(25) :10837–10843, December 2006.

d'un seul côté comme des deux côtés. Les concentrations utilisées étaient de l'ordre de 1 nM.

Une amélioration du montage expérimental consiste à pouvoir imposer une pression supérieure à la pression atmosphérique pour un des deux compartiment. La différence de pression ajoute une nouvelle force motrice poussant les brins d'ADN vers le compartiment *trans*. Malheureusement, cette amélioration n'a pas permis d'observer d'événement.

4.2.3 Nanoparticules

Les nanoparticules sont des objets dont au moins une dimension est d'ordre nanométrique. Différents types de nanoparticules sphériques ont été utilisés ici en solution pour des expériences de transport à travers un nanopore unique. Contrairement aux autres objets testés, les nanoparticules sphériques n'ont pas un aspect linéaire, et il n'est pas possible de parler de translocation.

Des nanoparticules sphériques de silice ont été testées. Achetées chez Aldrich, deux tailles différentes ont été utilisées : 7,8 nm et 13,1 nm de rayon. Ces mesures sont des résultats de caractérisation par diffusion de neutrons aux petits angles [154]. Il convient de travailler à un pH suffisamment basique (la solution commerciale est à pH = 9,5) et de veiller à la force ionique de la solution. En effet, ces deux paramètres interviennent sur la charge de surface des particules et sur son écrantage. Un mauvais choix de ces paramètres conduit à l'agrégation des particules, ce qui rend impossible leur transport à travers le nanopore.

Il est possible d'utiliser des nanoparticules dotées d'un revêtement spécifique. Des particules fluorescentes ont été testées également, de différents rayons. Dans ce cas non plus, aucun événement n'a été observé.

Enfin, des particules magnétiques composées d'oxyde de fer « maghémite » (γ -Fe₂O₃) ont également été testées. Elles ont été caractérisées par diffusion de rayons X aux petits angles, leur rayon est de 3,7 nm avec une polydispersité de 0,25 [155]. L'avantage de ces nanoparticules réside dans leurs propriétés magnétiques. En effet, il est possible d'exercer sur elles une

[154] F. Cousin, J. Jestin, G. Chaboussant, S. Gautrot, A. Menelle, and F. Ott. Probing simultaneously the volume and surface structure of nanospheres adsorbed at a solid-liquid interface by gisans. *European Physical Journal-special Topics*, 167 :177–183, February 2009.

[155] A. S. Robbes, J. Jestin, F. Meneau, F. Dalmas, O. Sandre, J. Perez, F. Boue, and F. Cousin. Homogeneous dispersion of magnetic nanoparticles aggregates in a ps nanocomposite : Highly reproducible hierarchical structure tuned by the nanoparticles' size. *Macromolecules*, 43(13) :5785–5796, July 2010.

force de traction de l'autre côté de la membrane, grâce au champ magnétique permanent d'un aimant. Là encore, aucun événement n'a été observé.

4.2.4 Polymères et polyélectrolytes

Il est également intéressant de tenter l'expérience de translocation avec des longues molécules artificielles. La première utilisée ici a été le polystyrène sulfonate de sodium, un polyélectrolyte. Il est chargé négativement, comme l'ADN, et peut s'acheter de différentes tailles. Malgré les différentes tensions appliquées, les différentes concentrations utilisées, aucun événement n'a été observé lors de l'application d'un champ électrique à travers une membrane à nanopore unique à trace attaquée.

Un polymère neutre a également été testé, le Ficoll. Il s'agit d'un polysaccharide hydrophile. Sa taille a été mesurée par diffusion de neutrons aux petits angles. Le rayon de gyration du Ficoll utilisé (Ficoll 70, de masse 70 kDa, fourni chez Sigma) est d'environ 5 nm [156]. Dans ce cas, la force tirant le polymère à travers le pore ne peut être la force électrique générée par la tension appliquée entre les deux compartiments, car ce composé est neutre. Néanmoins, il est possible d'utiliser les propriétés de diffusion d'une solution diluée comme force motrice. Malheureusement, aucun événement n'a été observé dans ce cas également.

4.2.5 Discussion

L'observation d'événements correspondant à la rencontre entre un objet et le pore nécessite différentes conditions quant aux paramètres de l'expérience. Pour des polymères, M. Muthukumar [157] précise que la fréquence de telles rencontres dépend de la concentration en polymère, de sa taille, de sa séquence, de la géométrie du pore, de la nature chimique de la paroi du pore, de la force ionique, de la tension appliquée et des gradients de pression hydrostatique et de concentration en sel le long du pore. Seulement une partie de ces rencontres résulte en une translocation, et la proportion de rencontres devenant des translocations dépend elle aussi de ces paramètres.

Les paramètres principaux sont présentés ici pour être confrontés à l'absence d'observations d'événements des sections précédentes.

[156] C. Le Coeur, B. Deme, and S. Longeville. Compression of random coils due to macromolecular crowding. *Physical Review E*, 79(3) :031910, March 2009.

[157] M. Muthukumar. Theory of capture rate in polymer translocation. *Journal of Chemical Physics*, 132(19) :195101, May 2010.

Tension appliquée

La tension appliquée génère le champ électrique responsable de la force motrice de translocation, pour les objets chargés. Si elle est trop faible, les objets ne sont pas suffisamment tirés vers l'intérieur du pore, et aucune translocation n'est observée. M. Muthukumar parle de « barrière entropique ».

Une étude menée sur l' α -hémolysine [158] confirme la présence d'une tension-seuil en deçà de laquelle aucun événement n'est observé. Au-delà, la fréquence des événements observés est une fonction exponentielle de la tension imposée, ou linéaire pour des molécules d'ADN plus longues [159].

La tension appliquée lors des expériences de transport d'objet est le paramètre le plus simple à modifier. Ainsi, pour chaque expérience décrite précédemment, de nombreuses tensions ont été testées. L'absence d'observation d'événements peut être liée à une tension imposée trop faible, inférieure à la tension-seuil, ou bien trop importante, si la durée de translocation devient inférieure à l'intervalle de temps d'échantillonnage.

Concentration en objets

La fréquence des événements est proportionnelle à la concentration en objets ([158], [159]).

Dans les expériences de transport précédentes, la concentration de référence était généralement calculée pour avoir un seul objet en moyenne présent dans le pore, et les concentrations utilisées variaient de quelques ordres de grandeurs autour de cette valeur de référence.

Pour les expériences de translocation, les concentrations d'ADN étaient choisies inférieures à la concentration de semi-dilution, qui correspond à la limite d'inter-pénétration des chaînes. Les concentrations variaient sur plusieurs ordres de grandeur en dessous de cette limite.

Taille des objets et du pore

L'amplitude des pics de résistivité est reliée à la taille des objets qui passent dans le nanopore, même si la géométrie n'est pas le seul paramètre

-
- [158] S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, and J. J. Kasianowicz. Driven dna transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Physical Review Letters*, 85(14) :3057–3060, October 2000.
 - [159] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, and A. Meller. Electrostatic focusing of unlabelled dna into nanoscale pores using a salt gradient. *Nature Nanotechnology*, 5(2) :160–165, February 2010.

qui intervient [22]. Ainsi la taille relative de l'objet par rapport au pore a un rôle important. Pour cela, les pores utilisés étaient choisis de taille comparable aux objets mis en solution. Si le pore est trop grand, le pic de résistivité risque d'être noyé dans le bruit. Si le pore est trop petit, l'objet risque de ne pas pouvoir passer et aucun transport ne pourra être détecté.

De manière absolue, la taille du pore influe également à cause du phénomène de confinement qui a tendance à générer un bruit plus important pour les pores les plus petits.

Interactions avec la paroi

La paroi peut intervenir dans le processus de transport ou de translocation, essentiellement par l'adsorption de certains objets. Ce phénomène est présent surtout avec les protéines. Pour y remédier, une solution de tensio-actif neutre (Triton X-100, fourni chez Sigma) est parfois ajouté à la solution.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre a présenté les différentes expériences de translocation et de transport qui ont été menées. Celle menée sur le transport de luciférase dénaturée à travers un pore naturel d'aérolysine a fonctionné et elle a donné des résultats semblables à ceux de la littérature. Néanmoins, les autres expériences, menées avec des nanopores obtenus par attaque de trace, n'ont pas généré d'événements observables. Les raisons de cet échec ne sont pas comprises.

[22] Y. E. Korchev, C. L. Bashford, G. M. Alder, J. J. Kasianowicz, and C. A. Pasternak. Low-conductance states of a single-ion channel are not closed. *Journal of Membrane Biology*, 147(3) :233–239, October 1995.

Conclusion générale

Les nanopores ont montré leur statut particulier dans le domaine de la manipulation de molécule unique. Ce sont des outils extrêmement adaptés à la translocation de brins uniques d'ADN, et pour cela ils s'annoncent d'ores et déjà comme un moyen de séquençage dans un avenir proche. Quoiqu'il en soit, leur intérêt en science fondamentale pour l'étude de molécules isolées est indéniable.

Les nanopores naturels étaient les premiers utilisés. La technologie a permis de synthétiser des structures nanométriques en cherchant à leur conférer des propriétés analogues. De tels nanopores artificiels ont révélé certaines aptitudes des pores naturels, en y ajoutant une robustesse et une stabilité qui les dépassent largement.

Cette thèse s'est intéressée particulièrement aux pores artificiels uniques, obtenus par la méthode de l'attaque de trace. Le résultat principal de l'étude qui a été menée ici réside dans l'importance des effets de confinement, sous-estimés ou simplement non pris en compte dans les études précédentes.

Le confinement des ions dans un système de taille nanométrique, c'est-à-dire d'une dimension comparable à la distance entre ions de la solution qu'il contient, a des répercussions sur les mesures expérimentales. Celles-ci se ressentent pour deux types d'expérience.

Tout d'abord, le confinement gêne la détermination de la taille de l'ouverture d'un pore. Pour un pore conique, la caractérisation du grand rayon se fait par microscopie, et celle du petit rayon se fait en ajoutant une mesure de conductimétrie au résultat précédent. Cette méthode est habituellement acceptée dans la littérature pour la caractérisation géométrique d'un pore, même si les auteurs restent prudents en parlant d'« estimation ». Pourtant, comme le confinement diminue la conductivité de la solution contenue dans le pore par rapport à celle de la même solution dans le volume, le rayon d'un pore est surestimé par cette méthode.

Ensuite, le confinement des ions a une influence certaine sur le bruit de la conductance électrique. En effet, les travaux présentés dans le chapitre 3

montrent que les fluctuations du courant ionique ne sont pas dues principalement au pore lui-même mais bien à la solution qu'il contient. Le bruit rose généré peut perturber les expériences de détection de molécules, car elles sont fondées sur l'observation d'événements brefs et parfois d'intensité réduite. Si le bruit est trop important, les événements les plus faibles peuvent être mêlés aux fluctuations du signal, ce qui en empêche la détection.

Ainsi, la nature du liquide électrolytique présent dans le nanopore a une importance fondamentale sur le comportement des ions et sur les effets de confinement qui les influencent. Une solution ionique est généralement utilisée comme support du courant électrique. Cependant, un tout autre type de liquide est compatible avec les nanopores, il s'agit des liquides ioniques à température ambiante. Leur emploi dans le cadre de mesures conductimétriques dans des nanopores reste très jeune. Dans cette étude, ils ont permis de conclure sur l'importance du liquide contenu par rapport au pore contenant. En effet, par rapport à une solution ionique, le bruit rose peut être nettement diminué avec un certain type de liquide ionique, tout comme il peut être largement augmenté avec un autre type.

Les nanopores représentent toujours un espoir d'une meilleure compréhension des mécanismes de la physique à l'échelle nanométrique. L'application qui semble se dessiner dans un futur proche reste la translocation et le séquençage des brins d'ADN. Mais l'énorme potentiel de la manipulation de molécule unique donne accès à de nombreux aspects fondamentaux de la physique, tels que le repliement des protéines, des polymères et des polyélectrolytes. Le nanopore unique reste ainsi un outil privilégié pour explorer de nouveaux champs de la physique.

Bibliographie

- [1] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356) :737–738, 1953.
- [2] H. Frauenfelder, P. G. Wolynes, and R. H. Austin. Biological physics. *Reviews of Modern Physics*, 71(2) :S419–S430, March 1999.
- [3] F. Ritort. Single-molecule experiments in biological physics : methods and applications. *Journal of Physics-condensed Matter*, 18(32) :R531–R583, August 2006.
- [4] W. H. Coulter. Means for counting particles suspended in a fluid, 1953.
- [5] G. Ruhenstroth-Bauer and D. Zang. [automatic counting method : the coulter particle counting apparatus.]. *Blut*, 6(Suppl) :446–62, 1960.
- [6] E. Neher and B. Sakmann. Noise-analysis of drug-induced voltage clamp currents in denervated frog muscle-fibers. *Journal of Physiology-london*, 258(3) :705–729, 1976.
- [7] W. Betz and B. Sakmann. Disjunction of frog neuromuscular synapses by treatment with proteolytic enzymes. *Nature-new Biology*, 232(29) :94, 1971.
- [8] B. Sakmann. Noise-analysis of acetylcholine induced currents in normal and denervated rat muscle-fibers. *Pflugers Archiv-european Journal of Physiology*, 359 :R89–R89, 1975.
- [9] E. Neher and B. Sakmann. Voltage-dependence of drug-induced conductance in frog neuromuscular-junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(6) :2140–2144, 1975.
- [10] E. Neher and B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle-fibers. *Nature*, 260(5554) :799–802, 1976.
- [11] S. B. Hladky and D. A. Haydon. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in presence of certain antibiotics. *Nature*, 225(5231) :451–&, 1970.

- [12] Theoretical and computational biophysics group, university of illinois at urbana-champaign, 2006. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/hemolysin/>.
- [13] J. H. Freer, J. P. Arbuthno, and A. W. Bernheim. Interaction of staphylococcal alpha-toxin with artificial and natural membranes. *Journal of Bacteriology*, 95(3) :1153–&, 1968.
- [14] J. H. Freer, J. P. Arbuthno, and Billclif B. Effects of staphylococcal alpha-toxin on structure of erythrocyte-membranes - biochemical and freeze-etching study. *Journal of General Microbiology*, 75(APR) :321–332, 1973.
- [15] L. Z. Song, M. R. Hobough, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294) :1859–1866, December 1996.
- [16] E. Gouaux. [alpha]-hemolysin from staphylococcus aureus : An archetype of [beta]-barrel, channel-forming toxins. *Journal of Structural Biology*, 121(2) :110–122, 1998.
- [17] G. Belmonte, L. Cescatti, B. Ferrari, T. Nicolussi, M. Ropele, and G. Menestrina. Pore formation by staphylococcus-aureus alpha-toxin in lipid bilayers - dependence upon temperature and toxin concentration. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, 14(6) :349–358, 1987.
- [18] J. J. Kasianowicz and S. M. Bezrukov. Protonation dynamics of the alpha-toxin ion-channel from spectral-analysis of ph-dependent current fluctuations. *Biophysical Journal*, 69(1) :94–105, July 1995.
- [19] W. Wickner and R. Schekman. Protein translocation across biological membranes. *Science*, 310(5753) :1452–1456, December 2005.
- [20] O. V. Krasilnikov, R. Z. Sabirov, V. I. Ternovsky, P. G. Merzliak, and J. N. Muratkhodjaev. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol Immunol*, 5(1-3) :93–100, September 1992.
- [21] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, and V. A. Parsegian. Counting polymers moving through a single-ion channel. *Nature*, 370(6487) :279–281, July 1994.
- [22] Y. E. Korchev, C. L. Bashford, G. M. Alder, J. J. Kasianowicz, and C. A. Pasternak. Low-conductance states of a single-ion channel are not closed. *Journal of Membrane Biology*, 147(3) :233–239, October 1995.

- [23] S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, and J. J. Kasianowicz. Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore. *Macromolecules*, 29(26) :8517–8522, December 1996.
- [24] G. Oukhaled, L. Bacri, J. Mathe, J. Pelta, and L. Auvray. Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores. *Epl*, 82(4) :48003, May 2008.
- [25] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24) :13770–13773, November 1996.
- [26] M. Akeson, D. Branton, J. J. Kasianowicz, E. Brandin, and D. W. Deamer. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single rna molecules. *Biophysical Journal*, 77(6) :3227–3233, December 1999.
- [27] A. Meller, L. Nivon, E. Brandin, J. Golovchenko, and D. Branton. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3) :1079–1084, February 2000.
- [28] A. Meller, L. Nivon, and D. Branton. Voltage-driven dna translocations through a nanopore. *Physical Review Letters*, 86(15) :3435–3438, April 2001.
- [29] O. Braha, B. Walker, S. Cheley, J. J. Kasianowicz, L. Z. Song, J. E. Gouaux, and H. Bayley. Designed protein pores as components for biosensors. *Chemistry & Biology*, 4(7) :497–505, July 1997.
- [30] M. Pastoriza-Gallego, G. Oukhaled, J. Mathe, B. Thiebot, J. M. Betton, L. Auvray, and J. Pelta. Urea denaturation of alpha-hemolysin pore inserted in planar lipid bilayer detected by single nanopore recording : Loss of structural asymmetry. *Febs Letters*, 581(18) :3371–3376, July 2007.
- [31] R. K. Bortoleto and R. J. Ward. A stability transition at mildly acidic ph in the alpha-hemolysin (alpha-toxin) from staphylococcus aureus. *Febs Letters*, 459(3) :438–442, October 1999.
- [32] H. Bayley and C. R. Martin. Resistive-pulse sensing - from microbes to molecules. *Chemical Reviews*, 100(7) :2575–2594, July 2000.
- [33] S. Howorka and Z. Siwy. Nanopore analytics : sensing of single molecules. *Chemical Society Reviews*, 38(8) :2360–2384, 2009.

- [34] M. Karhanek, J. T. Kemp, N. Pourmand, R. W. Davis, and C. D. Webb. Single dna molecule detection using nanopipettes and nanoparticles. *Nano Letters*, 5(2) :403–407, February 2005.
- [35] J. Li, D. Stein, C. McMullan, D. Branton, M. J. Aziz, and J. A. Golovchenko. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*, 412(6843) :166–169, July 2001.
- [36] D. M. Stein, C. J. McMullan, J. L. Li, and J. A. Golovchenko. Feedback-controlled ion beam sculpting apparatus. *Review of Scientific Instruments*, 75(4) :900–905, April 2004.
- [37] J. E. Wharton, P. Jin, L. T. Sexton, L. P. Horne, S. A. Sherrill, W. K. Mino, and C. R. Martin. A method for reproducibly preparing synthetic nanopores for resistive-pulse biosensors. *Small*, 3(8) :1424–1430, August 2007.
- [38] Z. S. Siwy and M. Davenport. Biosensors making nanopores from nanotubes. *Nature Nanotechnology*, 5(3) :174–175, March 2010.
- [39] Z. S. Siwy and M. Davenport. Nanopores graphene opens up to dna. *Nature Nanotechnology*, 5(10) :697–698, October 2010.
- [40] Q. Cai, B. Ledden, E. Krueger, J. A. Golovchenko, and J. L. Li. Nanopore sculpting with noble gas ions. *Journal of Applied Physics*, 100(2) :024914, July 2006.
- [41] A. J. Storm, J. H. Chen, X. S. Ling, H. W. Zandbergen, and C. Dekker. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision. *Nature Materials*, 2(8) :537–540, August 2003.
- [42] G. S. Chen, C. B. Boothroyd, and C. J. Humphreys. Electron-beam-induced damage in amorphous sio₂ and the direct fabrication of silicon nanostructures. *Philosophical Magazine A-physics of Condensed Matter Structure Defects and Mechanical Properties*, 78(2) :491–506, August 1998.
- [43] M. J. Kim, M. Wanunu, D. C. Bell, and A. Meller. Rapid fabrication of uniformly sized nanopores and nanopore arrays for parallel dna analysis. *Advanced Materials*, 18(23) :3149–+, December 2006.
- [44] M. J. Kim, B. McNally, K. Murata, and A. Meller. Characteristics of solid-state nanometre pores fabricated using a transmission electron microscope. *Nanotechnology*, 18(20) :205302, May 2007.
- [45] S. R. Park, H. B. Peng, and X. S. S. Ling. Fabrication of nanopores in silicon chips using feedback chemical etching. *Small*, 3(1) :116–119, January 2007.

- [46] A. J. Storm, J. H. Chen, H. W. Zandbergen, and C. Dekker. Translocation of double-strand dna through a silicon oxide nanopore. *Physical Review E*, 71(5) :051903, May 2005.
- [47] J. B. Heng, C. Ho, T. Kim, R. Timp, A. Aksimentiev, Y. V. Grinkova, S. Sligar, K. Schulten, and G. Timp. Sizing dna using a nanometer-diameter pore. *Biophysical Journal*, 87(4) :2905–2911, October 2004.
- [48] B. McNally, M. Wanunu, and A. Meller. Electromechanical unzipping of individual dna molecules using synthetic sub-2 nm pores. *Nano Letters*, 8(10) :3418–3422, October 2008.
- [49] Q. Zhao, J. Comer, V. Dimitrov, S. Yemenicioglu, A. Aksimentiev, and G. Timp. Stretching and unzipping nucleic acid hairpins using a synthetic nanopore. *Nucleic Acids Research*, 36(5) :1532–1541, March 2008.
- [50] J. L. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J. A. Golovchenko. Dna molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope. *Nature Materials*, 2(9) :611–615, September 2003.
- [51] P. Chen, J. J. Gu, E. Brandin, Y. R. Kim, Q. Wang, and D. Branton. Probing single dna molecule transport using fabricated nanopores. *Nano Letters*, 4(11) :2293–2298, November 2004.
- [52] D. Fologea, E. Brandin, J. Uplinger, D. Branton, and J. Li. Dna conformation and base number simultaneously determined in a nanopore. *Electrophoresis*, 28(18) :3186–3192, September 2007.
- [53] R. Fan, R. Karnik, M. Yue, D. Y. Li, A. Majumdar, and P. D. Yang. Dna translocation in inorganic nanotubes. *Nano Letters*, 5(9) :1633–1637, September 2005.
- [54] H. Chang, F. Kosari, G. Andreadakis, M. A. Alam, G. Vasmatzis, and R. Bashir. Dna-mediated fluctuations in ionic current through silicon oxide nanopore channels. *Nano Letters*, 4(8) :1551–1556, August 2004.
- [55] R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, D. Krapf, M. Y. Wu, N. H. Dekker, and C. Dekker. Salt dependence of ion transport and dna translocation through solid-state nanopores. *Nano Letters*, 6(1) :89–95, January 2006.
- [56] D. Branton, D. W. Deamer, A. Marziali, H. Bayley, S. A. Benner, T. Butler, M. Di Ventra, S. Garaj, A. Hibbs, X. H. Huang, S. B. Jovanovich, P. S. Krstic, S. Lindsay, X. S. S. Ling, C. H. Mastrangelo, A. Meller, J. S. Oliver, Y. V. Pershin, J. M. Ramsey, R. Riehn, G. V. Soni, V. Tabard-Cossa, M. Wanunu, M. Wiggin, and J. A. Schloss. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10) :1146–1153, October 2008.

- [57] A. Meller. Dynamics of polynucleotide transport through nanometre-scale pores. *Journal of Physics-condensed Matter*, 15(17) :R581–R607, May 2003.
- [58] D. Fologea, J. Uplinger, B. Thomas, D. S. McNabb, and J. L. Li. Slowing dna translocation in a solid-state nanopore. *Nano Letters*, 5(9) :1734–1737, September 2005.
- [59] M. Wanunu, J. Sutin, B. McNally, A. Chow, and A. Meller. Dna translocation governed by interactions with solid-state nanopores. *Biophysical Journal*, 95(10) :4716–4725, November 2008.
- [60] E. H. Trepagnier, A. Radenovic, D. Sivak, P. Geissler, and J. Liphardt. Controlling dna capture and propagation through artificial nanopores. *Nano Letters*, 7(9) :2824–2830, September 2007.
- [61] M. Gershow and J. A. Golovchenko. Recapturing and trapping single molecules with a solid-state nanopore. *Nature Nanotechnology*, 2(12) :775–779, December 2007.
- [62] Y. R. Kim, J. Min, I. H. Lee, S. Kim, A. G. Kim, K. Kim, K. Namkoong, and C. Ko. Nanopore sensor for fast label-free detection of short double-stranded dnas. *Biosensors & Bioelectronics*, 22(12) :2926–2931, June 2007.
- [63] U. Mirsaidov, J. Comer, V. Dimitrov, A. Aksimentiev, and G. Timp. Slowing the translocation of double-stranded dna using a nanopore smaller than the double helix. *Nanotechnology*, 21(11536799) :395501 (10 pp.), October 2010.
- [64] D. A. Young. Etching of radiation damage in lithium fluoride. *Nature*, 182(4632) :375–377, 1958.
- [65] L. Fleischer, P. B. Price, and R. M. Walker. Solid-state track detectors - applications to nuclear science and geophysics. *Annual Review of Nuclear Science*, 15 :1–&, 1965.
- [66] W. T. Crawford, W. Desorbo, and J. S. Humphrey. Enhancement of track etching rates in charged particle-irradiated plastics by a photo-oxidation effect. *Nature*, 220(5174) :1313–&, 1968.
- [67] P. Y. Apel, I. V. Blonskaya, S. N. Dmitriev, O. L. Orelovitch, A. Presz, and B. A. Sartowska. Fabrication of nanopores in polymer foils with surfactant-controlled longitudinal profiles. *Nanotechnology*, 18(30) :305302, August 2007.
- [68] C. C. Harrell, Z. S. Siwy, and C. R. Martin. Conical nanopore membranes : Controlling the nanopore shape. *Small*, 2(2) :194–198, February 2006.

- [69] Reimar Spohr. Method for producing nuclear traces or microholes originating from nuclear traces of an individual ion, 1983.
- [70] Z. Siwy, P. Apel, D. Dobrev, R. Neumann, R. Spohr, C. Trautmann, and K. Voss. Ion transport through asymmetric nanopores prepared by ion track etching. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 208 :143–148, August 2003.
- [71] E. A. Heins, Z. S. Siwy, L. A. Baker, and C. R. Martin. Detecting single porphyrin molecules in a conically shaped synthetic nanopore. *Nano Letters*, 5(9) :1824–1829, September 2005.
- [72] A. Mara, Z. Siwy, C. Trautmann, J. Wan, and F. Kamme. An asymmetric polymer nanopore for single molecule detection. *Nano Letters*, 4(3) :497–501, March 2004.
- [73] K. Healy, B. Schiedt, Z. Siwy, A. P. Morrison, and R. Neumann. Single-molecule dna transport through individual conical polymer nanopores. *Biophysical Journal*, 88(1) :660A–660A, January 2005.
- [74] B. Schiedt, K. Healy, A. P. Morrison, R. Neumann, and Z. Siwy. Transport of ions and biomolecules through single asymmetric nanopores in polymer films. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 236 :109–116, July 2005.
- [75] K. Kececi, L. T. Sexton, F. Buyukserin, and C. R. Martin. Resistive-pulse detection of short dsdnas using a chemically functionalized conical nanopore sensor. *Nanomedicine*, 3(6) :787–796, December 2008.
- [76] Z. Siwy, L. Trofin, P. Kohli, L. A. Baker, C. Trautmann, and C. R. Martin. Protein biosensors based on biofunctionalized conical gold nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(14) :5000–5001, April 2005.
- [77] L. T. Sexton, L. P. Horne, S. A. Sherrill, G. W. Bishop, L. A. Baker, and C. R. Martin. Resistive-pulse studies of proteins and protein/antibody complexes using a conical nanotube sensor. *Journal of the American Chemical Society*, 129(43) :13144–13152, October 2007.
- [78] L. T. Sexton, H. Mukaibo, P. Katira, H. Hess, S. A. Sherrill, L. P. Horne, and C. R. Martin. An adsorption-based model for pulse duration in resistive-pulse protein sensing. *Journal of the American Chemical Society*, 132(19) :6755–6763, May 2010.
- [79] G. Guillot and F. Rondelez. Characteristics of sub-micron pores obtained by chemical etching of nuclear tracks in polycarbonate films. *Journal of Applied Physics*, 52(12) :7155–7164, 1981.

- [80] E. Ferain and R. Legras. Pore shape control in nanoporous particle track etched membrane. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 174(1-2) :116–122, March 2001.
- [81] C. Trautmann, W. Bruchle, R. Spohr, J. Vetter, and N. Angert. Pore geometry of etched ion tracks in polyimide. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 111(1-2) :70–74, April 1996.
- [82] R. L. Fleischer, P. B. Price, and R. M. Walker. Citation classic - nuclear tracks in solids - principles and applications. *Current Contents/physical Chemical & Earth Sciences*, (5) :20–20, 1982.
- [83] Birgitta Schiedt. *Characterization and application of ion track-etched nanopores*. PhD thesis, Ruperto-Caola University of Heidelberg, Germany, May 2007.
- [84] P. Sigmund. Stopping of heavy ions - a theoretical approach, 2004.
- [85] J. F. Ziegler. Srim-2003. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 219 :1027–1036, June 2004.
- [86] C. Trautmann, S. Bouffard, and R. Spohr. Etching threshold for ion tracks in polyimide. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 116(1-4) :429–433, August 1996.
- [87] Y. M. Sun, Z. Y. Zhu, Z. G. Wang, Y. F. Jin, J. Liu, M. D. Hou, and Q. X. Zhang. Swift heavy ion induced amorphisation and chemical modification in polycarbonate. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 209 :188–193, August 2003.
- [88] F. Dehaye, E. Balanzat, E. Ferain, and R. Legras. Chemical modifications induced in bisphenol a polycarbonate by swift heavy ions. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 209 :103–112, August 2003.
- [89] D. Albrecht, P. Armbruster, R. Spohr, M. Roth, K. Schaupt, and H. Stuhmann. Small-angle scattering from oriented latent nuclear tracks. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 2(1-3) :702–705, 1984.
- [90] V. Picq, J. M. Ramillon, and E. Balanzat. Swift heavy ions on polymers : Hydrocarbon gas release. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 146(1-4) :496–503, December 1998.

- [91] Visilog, logiciel de noesis. <http://www.noesisvision.com/fr/visilog.html>.
- [92] Axopatch 200b produit par molecular devices.
- [93] M. Dellamonica, A. Ceglie, and A. Agostiano. Extension of the falkenhagen equation to the conductivity of concentrated electrolyte-solutions. *Journal of Physical Chemistry*, 88(10) :2124–2127, 1984.
- [94] J. Lyklema. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, volume 2.
- [95] Y. B. Xie, X. W. Wang, J. M. Xue, K. Jin, L. Chen, and Y. G. Wang. Electric energy generation in single track-etched nanopores. *Applied Physics Letters*, 93(16) :163116, October 2008.
- [96] J. Yang, F. Z. Lu, L. W. Kostiuk, and D. Y. Kwok. Electrokinetic microchannel battery by means of electrokinetic and microfluidic phenomena. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13(6) :963–970, November 2003.
- [97] J. Lyklema. Electrokinetics after smoluchowski. *Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects*, 222(1-3) :5–14, July 2003.
- [98] P. Dejardin, E. N. Vasina, V. V. Berezkin, V. D. Sobolev, and V. I. Volkov. Streaming potential in cylindrical pores of poly(ethylene terephthalate) track-etched membranes : Variation of apparent zeta potential with pore radius. *Langmuir*, 21(10) :4680–4685, May 2005.
- [99] V. V. Berezkin, V. I. Volkov, O. A. Kiseleva, N. V. Mitrofanova, and V. D. Sobolev. Electrosurface properties of poly(ethylene terephthalate) track membranes. *Advances In Colloid and Interface Science*, 104 :325–331, July 2003.
- [100] C.A. Pasternak, C. L. Bashford, Y.E. Korchev, T.K. Rostovtseva, and A. A. Lev. Modulation of surface flow by divalent-cations and protons. *Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects*, 77(2) :119–124, September 1993.
- [101] A. Wolf, N. Reber, P. Y. Apel, B. E. Fischer, and R. Spohr. Electrolyte transport in charged single ion track capillaries. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 105(1-4) :291–293, November 1995.
- [102] P. Y. Apel, Y. E. Korchev, Z. Siwy, R. Spohr, and M. Yoshida. Diode-like single-ion track membrane prepared by electro-stopping. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-beam Interactions With Materials and Atoms*, 184(3) :337–346, November 2001.
- [103] Z. Siwy, Y. Gu, H. A. Spohr, D. Baur, A. Wolf-Reber, R. Spohr, P. Apel, and Y. E. Korchev. Rectification and voltage gating of ion

- currents in a nanofabricated pore. *Europhysics Letters*, 60(3) :349–355, November 2002.
- [104] Z. Siwy, E. Heins, C. C. Harrell, P. Kohli, and C. R. Martin. Conical-nanotube ion-current rectifiers : The role of surface charge. *Journal of the American Chemical Society*, 126(35) :10850–10851, September 2004.
- [105] C. C. Harrell, S. B. Lee, and C. R. Martin. Synthetic single-nanopore and nanotube membranes. *Analytical Chemistry*, 75(24) :6861–6867, December 2003.
- [106] P. Chen, T. Mitsui, D. B. Farmer, J. Golovchenko, R. G. Gordon, and D. Branton. Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores. *Nano Letters*, 4(7) :1333–1337, July 2004.
- [107] J. Wang and C. R. Martin. A new drug-sensing paradigm based on ion-current rectification in a conically shaped nanopore. *Nanomedicine*, 3(1) :13–20, February 2008.
- [108] M. L. Kovarik, K. M. Zhou, and S. C. Jacobson. Effect of conical nanopore diameter on ion current rectification. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(49) :15960–15966, December 2009.
- [109] Z. S. Siwy. Ion-current rectification in nanopores and nanotubes with broken symmetry. *Advanced Functional Materials*, 16(6) :735–746, April 2006.
- [110] J. Cervera, B. Schiedt, and P. Ramirez. A poisson/nernst-planck model for ionic transport through synthetic conical nanopores. *Europhysics Letters*, 71(1) :35–41, July 2005.
- [111] J. Cervera, B. Schiedt, R. Neumann, S. Mafe, and P. Ramirez. Ionic conduction, rectification, and selectivity in single conical nanopores. *Journal of Chemical Physics*, 124(10) :104706, March 2006.
- [112] P. Ramirez, P. Y. Apel, J. Cervera, and S. Mafe. Pore structure and function of synthetic nanopores with fixed charges : tip shape and rectification properties. *Nanotechnology*, 19(31) :315707, August 2008.
- [113] I. Vlassiuk and Z. S. Siwy. Nanofluidic diode. *Nano Letters*, 7(3) :552–556, March 2007.
- [114] D. Constantin and Z. S. Siwy. Poisson-nernst -planck model of ion current rectification through a nanofluidic diode. *Physical Review E*, 76(4) :041202, October 2007.
- [115] R. Stefureac, Y. T. Long, H. B. Kraatz, P. Howard, and J. S. Lee. Transport of alpha-helical peptides through alpha-hemolysin and aerolysin pores. *Biochemistry*, 45(30) :9172–9179, August 2006.

- [116] R. Stefureac, L. Waldner, P. Howard, and J. S. Lee. Nanopore analysis of a small 86-residue protein. *Small*, 4(1) :59–63, January 2008.
- [117] Z. Siwy and A. Fulinski. Fabrication of a synthetic nanopore ion pump. *Physical Review Letters*, 89(19) :198103, November 2002.
- [118] Z. Siwy and A. Fulinski. A nanodevice for rectification and pumping ions. *American Journal of Physics*, 72(5) :567–574, May 2004.
- [119] R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, N. H. Dekker, and C. Dekker. Noise in solid-state nanopores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2) :417–421, January 2008.
- [120] M. B. Weissman. $1/f$ noise and other slow, nonexponential kinetics in condensed matter. *Reviews of Modern Physics*, 60(2) :537–571, April 1988.
- [121] H. E. Derksen and A. A. Verveen. Fluctuations of resting neural membrane potential. *Science*, 151(3716) :1388–&, 1966.
- [122] R. Sauvé and E. Bamberg. $1/f$ noise in black lipid-membranes induced by ionic channels formed by chemically dimerized gramicidin-a. *Journal of Membrane Biology*, 43(4) :317–333, 1978.
- [123] G. C. Fadda, D. Lairez, and G. Zalczer. Fluctuations of ionic current through lipid bilayers at the onset of peptide attacks and pore formation. *Physical Review Letters*, 103(18) :180601, October 2009.
- [124] S. M. Bezrukov and M. Winterhalter. Examining noise sources at the single-molecule level : $1/f$ noise of an open maltoporin channel. *Physical Review Letters*, 85(1) :202–205, July 2000.
- [125] S. Nekolla, C. Andersen, and R. Benz. Noise-analysis of ion current through the open and the sugar-induced closed state of the lamb channel of escherichia-coli outer-membrane - evaluation of the sugar binding-kinetics to the channel interior. *Biophysical Journal*, 66(5) :1388–1397, May 1994.
- [126] D. P. Hoogerheide, S. Garaj, and J. A. Golovchenko. Probing surface charge fluctuations with solid-state nanopores. *Physical Review Letters*, 102(25) :256804, June 2009.
- [127] R. A. Levis and J. L. Rae. The use of quartz patch pipettes for low-noise single-channel recording. *Biophysical Journal*, 65(4) :1666–1677, October 1993.
- [128] F. N. Hooge, T. G. M. Kleinpenning, and L. K. J. Vandamme. Experimental studies on $1/f$ noise. *Reports On Progress In Physics*, 44(5) :479–532, 1981.

- [129] Z. Siwy and A. Fulinski. Origin of $1/f^\alpha$ noise in membrane channel currents. *Phys. Rev. Lett.*, 89(15) :158101, Sep 2002.
- [130] M. Galinski, A. Lewandowski, and I. Stepniak. Ionic liquids as electrolytes. *Electrochimica Acta*, 51(26) :5567–5580, August 2006.
- [131] U. Domanska, M. Krolikowska, and M. Krolikowski. Phase behaviour and physico-chemical properties of the binary systems 1-ethyl-3-methylimidazolium thiocyanate, or 1-ethyl-3-methylimidazolium tosylate plus water, or plus an alcohol. *Fluid Phase Equilibria*, 294(1-2) :72–83, July 2010.
- [132] J. M. Pringle, J. Golding, C. M. Forsyth, G. B. Deacon, M. Forsyth, and D. R. MacFarlane. Physical trends and structural features in organic salts of the thiocyanate anion. *Journal of Materials Chemistry*, 12(12) :3475–3480, 2002.
- [133] M. Davenport, A. Rodriguez, K. J. Shea, and Z. S. Siwy. Squeezing ionic liquids through nanopores. *Nano Letters*, 9(5) :2125–2128, May 2009.
- [134] M. R. Powell, I. Vlassiuk, C. Martens, and Z. S. Siwy. Nonequilibrium $1/f$ noise in rectifying nanopores. *Physical Review Letters*, 103(24) :248104, December 2009.
- [135] K. Binnemans. Ionic liquid crystals. *Chemical Reviews*, 105(11) :4148–4204, November 2005.
- [136] Y. T. Wang. Disordering and reordering of ionic liquids under an external electric field. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(32) :11058–11060, August 2009.
- [137] G. X. Xie, J. B. Luo, D. Guo, and S. H. Liu. Nanoconfined ionic liquids under electric fields. *Applied Physics Letters*, 96(4) :043112, January 2010.
- [138] D. A. Jayawardhana, J. A. Crank, Q. Zhao, D. W. Armstrong, and X. Y. Guan. Nanopore stochastic detection of a liquid explosive component and sensitizers using boromycin and an ionic liquid supporting electrolyte. *Analytical Chemistry*, 81(1) :460–464, January 2009.
- [139] Ranulu Samanthi S. de Zoysa, Dilani A. Jayawardhana, Qitao Zhao, Deqiang Wang, Daniel W. Armstrong, and Xiyun Guan. Slowing dna translocation through nanopores using a solution containing organic salts. *J Phys Chem B*, 113(40) :13332–6, October 2009.
- [140] G. Biroli. Jamming - a new kind of phase transition ? *Nature Physics*, 3(4) :222–223, April 2007.

- [141] T. Nagatani. The physics of traffic jams. *Reports On Progress In Physics*, 65(9) :1331–1386, September 2002.
- [142] S. P. Howard and J. T. Buckley. Molecular-cloning and expression in escherichia-coli of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from aeromonas-hydrophila. *Molecular & General Genetics*, 204(2) :289–295, 1986.
- [143] S. P. Howard, W. J. Garland, M. J. Green, and J. T. Buckley. Nucleotide-sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of aeromonas-hydrophila. *Journal of Bacteriology*, 169(6) :2869–2871, June 1987.
- [144] H. U. Wilmsen, F. Pattus, and J. T. Buckley. Aerolysin, a hemolysin from aeromonas-hydrophila, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, 115(1) :71–81, April 1990.
- [145] M. W. Parker, J. T. Buckley, J. P. M. Postma, A. D. Tucker, K. Leonard, F. Pattus, and D. Tsernoglou. Structure of the aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature*, 367(6460) :292–295, January 1994.
- [146] M. Moniatte, F. G. vanderGoot, J. T. Buckley, F. Pattus, and A. van-Dorsselaer. Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the aeromonas toxin aerolysin using maldi-tof mass spectrometry. *Febs Letters*, 384(3) :269–272, April 1996. Le site est en maintenance, il faudra y retourner pour avoir le pdf.
- [147] T. O. Baldwin. Firefly luciferase : The structure is known, but the mystery remains. *Structure*, 4(3) :223–228, March 1996.
- [148] E. Conti, N. P. Franks, and P. Brick. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, 4(3) :287–298, March 1996.
- [149] J. J. Lemasters and C. R. Hackenbrock. Kinetics of product inhibition during firefly luciferase luminescence. *Biochemistry*, 16(3) :445–447, 1977.
- [150] C. M. Dobson. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968) :884–890, December 2003.
- [151] R. Herbst, U. Schafer, and R. Seckler. Equilibrium intermediates in the reversible unfolding of firefly (photinus pyralis) luciferase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11) :7099–7105, March 1997.
- [152] R. Herbst, K. Gast, and R. Seckler. Folding of firefly (photinus pyralis) luciferase : Aggregation and reactivation of unfolding intermediates. *Biochemistry*, 37(18) :6586–6597, May 1998.

- [153] C. C. Harrell, Y. Choi, L. P. Horne, L. A. Baker, Z. S. Siwy, and C. R. Martin. Resistive-pulse dna detection with a conical nanopore sensor. *Langmuir*, 22(25) :10837–10843, December 2006.
- [154] F. Cousin, J. Jestin, G. Chaboussant, S. Gautrot, A. Menelle, and F. Ott. Probing simultaneously the volume and surface structure of nanospheres adsorbed at a solid-liquid interface by gisans. *European Physical Journal-special Topics*, 167 :177–183, February 2009.
- [155] A. S. Robbes, J. Jestin, F. Meneau, F. Dalmas, O. Sandre, J. Perez, F. Boue, and F. Cousin. Homogeneous dispersion of magnetic nanoparticles aggregates in a ps nanocomposite : Highly reproducible hierarchical structure tuned by the nanoparticles' size. *Macromolecules*, 43(13) :5785–5796, July 2010.
- [156] C. Le Coeur, B. Deme, and S. Longeville. Compression of random coils due to macromolecular crowding. *Physical Review E*, 79(3) :031910, March 2009.
- [157] M. Muthukumar. Theory of capture rate in polymer translocation. *Journal of Chemical Physics*, 132(19) :195101, May 2010.
- [158] S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, and J. J. Kasianowicz. Driven dna transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Physical Review Letters*, 85(14) :3057–3060, October 2000.
- [159] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, and A. Meller. Electrostatic focusing of unlabelled dna into nanoscale pores using a salt gradient. *Nature Nanotechnology*, 5(2) :160–165, February 2010.

Index

A

Acide désoxyribonucléique (ADN), 4, 13, 15, 127
Acide ribonucléique (ARN), 13, 15
Aérollysine, 116
 α -hémolysine, 11
Attaque de trace, 31, 49

B

Bioluminescence, 118
Bovine Serum Albumin (BSA), 37, 127
Bras pendants, 86
Bruit rose
 Modélisation, 103
 Présentation, 99
 Réduction, 107

C

Compteur de Coulter, 6
Conductivité molaire de KCl, 65
Confinement, 92
Conformation de l'ADN, 24
Courbe conductance-pH, 70
Courbe I-V (intensité-tension), 68

D

Debye, Longueur de -, 86
Dénaturation, 18, 120
Densité spectrale de puissance, 99
Diode ionique, 89
Double couche électrique, 72

E

Électro-stoppage, 56

F

FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy), 57
Fluence, 58

G

GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds), 34, 43, 48
Guanidinium, 18

I

Ion-beam sculpting, 19, 21
Irradiation avec un ion unique, 33

L

Liquide ionique, 105
Luciférase, 117

M

Microscopie électronique à balayage, 11
Microscopie électronique à transmission, 22
Mitochondrie, 13
Molécule unique, 4

N

Nanoparticule, 128
Nanopore sur support silicium, 21

P

Patch-clamp, 9
Périodogramme, 99
Poisson-Nernst-Planck, équations de -, 87

Polycarbonate, 40
Polyélectrolytes, 15
Polyéthylène glycol (PEG), 14
Polyimide, 41
Potentiel d'écoulement, 72
Potentiel électrocinétique ζ , 72

R

Rectification, 69, 84
Réticulum endoplasmique, 13

T

Trace latente, 31
Translocation, 13, 122

Table des figures

1.1	Schéma du système étudié.	4
1.2	Signal obtenu pour 2, 8, et 512 oscillateurs.	5
1.3	Signal obtenu pour 1 et 10 000 oscillateurs, avec du bruit.	6
1.4	Principe du compteur de Coulter.	7
1.5	Influence de la forme géométrique de la particule.	8
1.6	Influence de la concentration en particules.	9
1.7	Vue en coupe d'un pore d' α -hémolysine inséré dans une bi- couche lipidique [12].	11
1.8	Des toxines α -hémolysines s'attaquent à une membrane cel- laire. Les anneaux mesurent 85 à 90 Å de diamètre. Grossis- sissement x 300 000 [13].	12
1.9	Modèle général de la translocation d'une protéine dans une cellule [19].	14
1.10	Observation de blocages de courant lors du passage de brins homopolymères d'ARN [25].	16
1.11	Théorie du séquençage par translocation.	17
1.12	Étude des combinaisons possibles de monomères sauvages et mutants [29].	18
1.13	Processus de fabrication d'un nanopore par sculpture par fais- ceau d'ions [35].	21
1.14	Processus de fabrication d'un nanopore d'oxyde de silicium par faisceau d'électron [41].	22
1.15	Reconstitution par tomographie d'un nanopore sur support silicium [44]. Les barres d'échelle indiquent 5 nm.	23
1.16	Histogramme de la durée des événements de translocation pour différentes structures de molécules d'ADN simple brin [48].	25
1.17	Différents signaux de courant observés et schéma de l'état de repliement des molécules d'ADN correspondant [51].	26
1.18	Histogramme de l'amplitude du courant des événements [46]. .	27
1.19	Schéma expliquant le courant surfacique à l'intérieur du na- nopore au cours de la translocation [54].	28

1.20	Translocations en va-et-vient par capture optique et force électromagnétique [60].	29
1.21	Synthèse d'un pore à trace attaquée.	31
1.22	Nanopores en forme de tête d'obus [67].	33
1.23	Nanopores uniques dans des membranes de PET (a) et de PI (b) [70].	34
1.24	Formule développée de la porphyrine [71].	35
1.25	Signaux obtenus [72].	36
1.26	Graphique des événements classés en courant et en temps [77].	37
2.1	Photographie d'une membrane de PC.	40
2.2	Formule développée du polycarbonate.	40
2.3	Formule développée du polyimide.	42
2.4	Insertion de films de polyimide en terminaison de ligne SME, au GANIL. L'agrandissement présente la plaque métallique sur laquelle sont fixés les films.	44
2.5	Pertes d'énergie d'un ion Krypton irradiant du polycarbonate. La zone marquée correspond aux énergies utilisées pour les irradiations au GANIL.	45
2.6	Longueur de pénétration d'un ion Krypton irradiant du polycarbonate, en fonction de son énergie spécifique. La zone marquée correspond aux énergies utilisées pour les irradiations au GANIL.	46
2.7	Perte d'énergie d'un ion irradiant du polyimide, calculée en fonction de la nature et de l'énergie de l'ion concerné [86]. . .	47
2.8	Spectres d'énergie du faisceau d'irradiation, avant et après irradiation de 6 couches de polycarbonate de 10 μm d'épaisseur.	47
2.9	Schéma expérimental de l'irradiation d'un film polymère avec un ion unique.	49
2.10	Coupe transversale schématisée du film polymère durant l'attaque.	50
2.11	Suivi d'une attaque par conductimétrie.	50
2.12	Attaque symétrique d'un film de polycarbonate, suivie par conductimétrie.	51
2.13	Évolution temporelle du courant électrique lors de l'attaque d'un film de polycarbonate de 10 μm d'épaisseur, attaqué avec NaOH 2 M à 70 °C. La partie encadrée à gauche est agrandie à droite. Il s'agit ici de l'échantillon n° 455.	52
2.14	Schéma de la géométrie du pore avant et après éclosion.	53

2.15	Courbes d'attaque pour différents films de polycarbonate. Les courbes en pointillés correspondent aux interpolations des modèles biconique ($I \propto \tau^2 + \tau$) et cylindrique ($I \propto \tau$).	54
2.16	Suivi par conductimétrie d'une attaque d'un film de polyimide. L'éclosion a lieu vers $t = 5\,040$ s, soit après 1 h 24 min d'attaque.	55
2.17	Membrane de PC, attaquée symétriquement pendant 10 min dans NaOH 2 M à 70 °C.	58
2.18	Membrane de PC, attaquée symétriquement pendant 2, 5 et 8 min dans NaOH 2 M à 70 °C. Les barres rouges représentent 200 nm.	59
2.19	Principe de l'analyse d'images FESEM.	59
2.20	Évolution du rayon des nanopores supposés cylindriques selon le temps d'attaque.	60
2.21	Méthode de détermination des petit et grand rayons.	61
2.22	Observation d'une membrane nanoporeuse en polyimide de 8 μm d'épaisseur.	62
2.23	Schéma du montage de conductimétrie.	63
2.24	Dispositif expérimental pour la conductimétrie.	63
2.25	Évolution de la conductivité molaire λ_{bulk} d'une solution de KCl en fonction de sa concentration.	66
2.26	À gauche : exemple de courbe I-V pour une membrane de polyimide, placée dans KCl 1 M, à pH neutre. À droite : Evolution dans le temps du courant mesuré en fonction de la tension imposée, correspondant à cette courbe I-V.	68
2.27	Exemple de courbe I-V non symétrique. La polarité est présentée sur le schéma de droite. Le pore est dans une membrane de polyimide de 6 μm d'épaisseur, dans KCl 0,1 M à pH neutre.	69
2.28	Ajout progressif d'acide chlorhydrique (HCl 2 M) dans un nanopore de polycarbonate, avec NaCl 2M.	70
2.29	Évolution de la conductance de membranes de polycarbonate avec le pH. En faisant l'hypothèse d'une forme cylindrique, pour une solution de NaCl 2 M, le rayon estimé des pores est de 12 nm pour 1 nS et 25 nm pour 5 nS.	71
2.30	Évolution de la conductance d'une membrane de polycarbonate avec le pH. En faisant l'hypothèse d'une forme cylindrique, pour une solution de NaCl 2 M, le rayon du pore est d'environ 27 nm.	72
2.31	Évolution dans le temps du courant ionique dans un nanopore de polyimide placé à pH = 2,8.	73
2.32	Schéma de la double couche électrique.	73

2.33	Évolution spatiale du profil des vitesses et du potentiel électrique dans un nanopore.	74
2.34	Profil des vitesses pour un écoulement dans un nanopore à paroi chargée.	75
2.35	Cliché FESEM d'une membrane commerciale SPI semblable à celles utilisées pour les mesures de potentiel électrocinétique. Le rayon des pores est environ 25 nm.	77
2.36	Photographie, mesure directe et schéma du montage expérimental pour la détermination du potentiel d'écoulement. Sur la photographie, les électrodes ne sont pas connectées à l'amplificateur de courant.	78
2.37	Évolution du potentiel d'écoulement en fonction de la pression imposée.	78
2.38	Évolution du potentiel ζ selon la concentration de la solution et le temps d'attaque des membranes. Le signe du potentiel mesuré est toujours négatif.	79
2.39	Effets de la dilution sur l'écoulement et le potentiel électrique dans la solution ionique.	80
2.40	Évolution du potentiel ζ selon la concentration de la solution et le temps d'attaque des membranes. Le signe du potentiel mesuré est toujours négatif. La ligne droite est un guide pour les yeux, pour $\zeta \propto c^{1/2}$	81
3.1	Schéma de la paroi interne d'un nanopore à trace attaquée, en milieu neutre ou basique.	84
3.2	Schéma des bras pendants, d'après [109].	87
3.3	Valeur absolue du courant électrique en fonction de la concentration en sel c_0 , pour des tensions imposées de $V = 0,5$ V et $-0,5$ V. Les points correspondent aux données expérimentales et les lignes continues aux résultats théoriques [111].	88
3.4	Schéma présentant les résultats obtenus par le modèle de l'équipe de Cervera [111]. Les parois du pore sont chargées négativement. La zone rouge représente les endroits où la concentration en cations est plus élevée. (a) : Pore cylindrique, avec une tension imposée entre les deux côtés de la membrane. (b) : Même chose avec une tension de signe opposé. (c) : Pore conique. (d) : Même pore conique avec une tension de signe opposé. . .	89
3.5	Principe de la diode ionique [113].	90
3.6	Instabilité de la rectification d'un nanopore conique unique dans un film de polyimide.	90

3.7	Modélisation géométrique du pore d' α -hémolysine en deux cylindres.	93
3.8	Variations du rapport conductance/conductivité <i>bulk</i> , pour différents nanopores coniques de polyimide, selon la concentration. En cas de rectification pour les concentrations les plus faibles, la conductance est prise comme la pente à tension nulle de la courbe I-V. Le pore n° 1 est le pore utilisé pour les mesures suivantes avec les liquides ioniques.	95
3.9	Exemple de calcul de la densité spectrale de puissance. À gauche : Évolution temporelle du courant électrique, dans un pore de polyimide 8 μm , dans une solution de KCl 1M, à pH neutre, sous une tension de + 100 mV. À droite : Densité spectrale de ce signal, moyennée sur 80 spectres selon la méthode du périodogramme.	100
3.10	Différents signaux synthétisés aléatoirement et leur spectre de densité de puissance respectif. A : Bruit blanc gaussien. B : Intégration du signal A dans le temps. C : Signal à créneaux aléatoires.	101
3.11	Faisceau de courbes de densité spectrale de puissance, pour un nanopore conique de polyimide de 8 μm d'épaisseur, dans KCl 0,3 M, à pH neutre, pour différentes tension imposées. . .	102
3.12	Mesures de l'amplitude du bruit rose rapportée au carré de l'intensité, en fonction du carré de l'intensité, à pH et concentrations différentes, reportées sur un même graphe. Les mesures sont faites sur un même pore, dans une membrane de polyimide de 6 μm d'épaisseur. La ligne continue est un guide pour les yeux.	104
3.13	Structure chimique des deux liquides ioniques utilisés dans cette thèse.	105
3.14	Courbes intensité-tension obtenues à différents pH et concentrations, et avec les deux liquides ioniques.	107
3.15	Allure des spectres de densité de puissance, pour un nanopore rempli avec des liquides ioniques.	108
3.16	Variations de l'amplitude du bruit S_1 en fonction du carré de l'intensité, pour une solution de KCl et les liquides ioniques. .	109
4.1	Schéma des pores d' α -hémolysine et d'aérolysine [116].	117
4.2	Émission de lumière par la luciférase en présence de substrat. .	118
4.3	Oxydation de la luciférine par la luciférase.	118
4.4	Structure de la luciférase. D'après Protein Data Bank, 1LCI. .	119

4.5	Courbe d'étalonnage de la lumière émise en fonction de la dilution de la luciférase.	119
4.6	Schéma de principe de la renaturation par translocation. . . .	121
4.7	Photographie du montage expérimental pour la cellule de conductimétrie d'un pore naturel. <i>(a)</i> : Localisation de la petite ouverture dans le cylindre amovible. <i>(b)</i> : Montage avec le cylindre inséré, les deux compartiments remplis et les électrodes placées dans chaque solution.	122
4.8	Évolution de la charge de la luciférase en fonction du pH. . . .	124
4.9	Évolution temporelle du courant pendant 30 secondes, selon la tension imposée.	124
4.10	Courant électrique observé dans le temps (à gauche). Histogrammes de la conductance mesurée (à droite).	125

Liste des tableaux

2.1	Conditions d'attaque pour des films PC utilisées dans la littérature.	41
2.2	Conditions d'attaque pour des films PI utilisées dans la littérature.	42
2.3	Temps de percement observés pour des attaques symétriques de traces uniques, dans des films de polycarbonate de 10 μm d'épaisseur, avec NaOH 2 M à 70 °C, par conductimétrie. . . .	52
2.4	Quelques techniques d'observation aux échelles nanométriques.	57
2.5	Les paramètres de l'équation 2.17 déterminant le petit rayon. .	66
3.1	Évolution de la longueur de Debye pour une solution de KCl à température ambiante.	87
3.2	Viscosité η et conductivité électrique σ_{bulk} des liquides ioniques dans le « bulk » à température ambiante, d'après [130] et [131]. σ_{conf} est la valeur de la conductivité électrique déduite des expériences de conductance dans les nanopores de polyimide. .	106

Table des sigles et abbréviations

Courbe I-V	Courbe intensité-tension
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
FESEM	<i>Field Emission Scanning Electron Microscope</i> [Microscope électronique à balayage à émission de champ]
GANIL	Grand accélérateur national d'ions lourds
GdmCl	Chlorure de guanidinium
GSI	<i>Gesellschaft für SchwerIonenforschung</i> [centre de recherche sur les ions lourds]
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
MEB	Microscope électronique à balayage
MET	Microscope électronique à transmission
NaOCl	Hypochlorite de sodium
PC	Polycarbonate
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Polyéthylène téréphtalate
PI	Polyimide
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
uma	Unité de masse atomique

Table des matières

Introduction	1
1 Historique et état de l'art	3
1.1 Historique de la détection de molécule unique	4
1.1.1 Pourquoi étudier une molécule unique ?	4
1.1.2 Observation de particules sub-millimétriques	6
1.1.3 De particule unique à molécule unique	8
1.2 Le nanopore naturel α -hémolysine	11
1.2.1 Présentation de l' α -hémolysine	11
1.2.2 Translocation de macromolécules	13
La translocation en biologie	13
Translocation de macromolécules non biologiques dans l' α -hémolysine	14
1.2.3 Translocation de polymères biologiques	15
1.2.4 Avantages et limitations des nanopores naturels	17
Avantages	17
Limitations	18
1.3 Les nanopores sur support silicium	21
1.3.1 Développement	21
1.3.2 Translocation dans des pores sur support silicium	24
Structure secondaire de l'ADN	24
Sens de variation de la conductance pendant la trans- location	27
Réduction de la vitesse de translocation	28
1.4 Les nanopores à trace attaquée	31
1.4.1 Présentation	31
Taille et forme des pores	32
Un pore unique	33
1.4.2 Translocation de macromolécules	34
ADN	35
Protéines	36

2	Préparation et caractérisation	39
2.1	Méthode de l'attaque de traces	40
2.1.1	Nature du polymère	40
	Polycarbonate	40
	Polyimide	41
2.1.2	Irradiation aux ions lourds	43
	Irradiation avec un ion unique	48
2.1.3	Attaque chimique	49
	Modèle à deux vitesses d'attaque	49
	Suivi par conductimétrie	49
	Attaque symétrique de trace unique dans le polycarbonate	51
	Attaque asymétrique de trace unique dans le polyimide	55
2.2	Caractérisation de la géométrie	57
2.2.1	Contexte	57
2.2.2	Microscopie électronique	57
	Détermination de $v_{\perp}$ dans le polycarbonate	58
	Grand rayon des pores coniques dans le polyimide	61
2.2.3	Conductimétrie	62
	Dispositif expérimental	62
	Détermination du petit rayon	64
	Limites de la conductimétrie	67
2.3	Caractérisation de la paroi du pore	68
2.3.1	Phénomène de rectification	68
	Courbe intensité-tension	68
	Non-linéarité des courbes I-V	69
2.3.2	Comportement en milieu acide	69
2.3.3	Potentiel d'écoulement	72
	Double couche électrique et potentiel ζ	72
	Calcul du potentiel d'écoulement	74
	Expériences	77
	Variations attendues du potentiel ζ avec la concentration	79
	Variations du potentiel ζ avec la taille du pore	81
3	Transport des ions	83
3.1	Rectification	84
3.1.1	Charge surfacique sur la paroi interne	84
3.1.2	Longueur de Debye	86
3.1.3	Modélisation	87
3.1.4	La rectification dans le cadre de cette thèse	90
3.2	Effets de confinement	92

3.2.1	Exemple de l' α -hémolysine	92
3.2.2	Le confinement dans un pore à trace attaquée	94
	Notations	94
	Variations avec la concentration en électrolyte	95
3.3	Bruit de conduction électrique	99
3.3.1	Densité spectrale de puissance	99
	Le bruit rose	99
3.3.2	Variations du bruit selon l'intensité	102
3.3.3	Origines du bruit rose	103
3.3.4	Liquides ioniques	105
3.3.5	Les liquides ioniques et le bruit rose	107
3.3.6	Bruit rose et confinement	109
	Origines du bruit rose : pore ou solution ?	109
4	Translocation et transport d'objets	115
4.1	Translocation de la luciférase	116
4.1.1	Présentation de l'aérolysine	116
4.1.2	La luciférase, une protéine adaptée	117
	Présentation	117
	Mesure de la concentration	118
	Dénaturation de la luciférase	120
4.1.3	Aérolysine et luciférase dénaturée	122
	Dispositif et protocole expérimentaux	122
	Observation de translocations par conductimétrie	123
4.2	Tentatives de transport	126
4.2.1	Protéines	126
	Luciférase	126
	BSA (Bovine Serum Albumin) [Albumine de sérum bo-	
	vin]	127
	Fibronectine	127
4.2.2	ADN	127
4.2.3	Nanoparticules	128
4.2.4	Polymères et polyélectrolytes	129
4.2.5	Discussion	129
	Tension appliquée	130
	Concentration en objets	130
	Taille des objets et du pore	130
	Interactions avec la paroi	131
	Conclusion générale	133

Bibliographie	135
Index	149
Table des figures et des tableaux	151
Table des sigles et abbréviations	159

Résumé

Il existe différentes techniques de manipulation et de détection de molécules uniques. Parmi elles, la mesure du courant ionique traversant un pore nanométrique unique est la plus ancienne. Le travail effectué dans cette thèse utilise cette technique et s'articule autour de deux objectifs.

Tout d'abord, l'utilisation d'un nanopore unique obtenu par attaque de trace permet d'imiter les expériences déjà faites dans la littérature avec d'autres types de pores. Certains phénomènes, tels que la rectification par exemple, ont pu être observés, mais d'autres comme la translocation n'ont pu l'être.

Ensuite, une étude du bruit de conductance électrique démontre l'existence d'un phénomène qui n'avait jusqu'alors pas été soulevé dans la littérature. En effet, ce bruit ne peut pas être imputé aux fluctuations des caractéristiques de la géométrie du pore ou de sa paroi, mais plutôt à des effets coopératifs sur la mobilité des ions dans un milieu confiné.

Abstract

Several ways exist to handle and detect single molecules. The oldest one is to measure the ionic current going through a single nanometric pore. This thesis uses this technique. The discussion is built in two main parts.

Firstly, the use of a single track-etched nanopore is aimed to reproduce experiments already made in the literature with other kinds of pores. Some phenomena, like rectification for example, were observed, whereas others, like translocation, were not.

Secondly, the investigation of electric conductance noise proves the existence of a phenomenon which has not been pointed out before in the literature yet. Indeed, this noise can be ascribed neither to fluctuations of the pore geometry nor to the pore wall charges, but rather to a cooperative effect on ions motion in confined geometry.