



**UNIVERSITÉ EVRY VAL D'ESSONNE**

---

**Ecole doctorale : Du génome aux organismes**

**Laboratoire : LAMBE – Équipe de recherche : MPI**

# **THÈSE**

présentée et soutenue publiquement le 18 septembre 2012

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université d'Evry Val d'Essonne**

**Discipline ou Spécialité : Biophysique**

par :

**Benjamin CRESSIOT**

**Transport de protéines natives,  
partiellement et complètement  
dépliées à travers des nanopores  
protéiques et artificiels**

## COMPOSITION DU JURY

M. WINTERHALTER Mathias

Rapporteur

M. FOURMY Dominique

Rapporteur

M. HENRY Jean-Pierre

Examineur

M. LE PIOUFLE Bruno

Examineur

M. BETTON Jean-Michel

Examineur

M. PELTA Juan

Co-directeur de thèse

M. AUVRAY Loïc

Directeur de thèse



## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Loïc Auvray qui m'a accepté dans son laboratoire et m'a permis de réaliser cette thèse. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as accordé à discuter de mon travail, à tout ce que tu as pu m'apprendre en physique et sur l'histoire des sciences ainsi que ton incroyable humour et ta bonne humeur.

Je tiens à remercier, tout particulièrement, Juan Pelta qui m'a encadré durant toute ma thèse, un grand merci pour ta dévotion, pour ton humanité et ton humour très décalé que je n'oublierai jamais. Cela n'a pas toujours été facile durant ma thèse, tu as toujours été là pour moi et pour me soutenir dans chaque épreuve. Merci pour ces voyages à l'étranger un peu mouvementés. Et surtout je te remercie de m'avoir donné l'envie de continuer la recherche.

Je remercie Mathias Winterhalter et Dominique Fourmy d'avoir accepté de juger mon travail et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture du manuscrit et à sa correction.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ma thèse.

Je remercie Bénédicte Thiébot pour m'avoir donné l'envie de faire de la recherche et une thèse. Sans toi, je ne serai sûrement pas dans ce laboratoire. Je te remercie pour tous les moments passés ensemble à discuter de travail, mais aussi de choses personnelles. Tu as toujours été là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments, et aujourd'hui, tu es bien plus qu'une collègue pour moi, mais une véritable amie.

Je remercie Ghani Oukhaled pour tout ce qu'il a pu m'apporter dans mon travail, mais aussi pour les moments passés ensemble à Marcoussis, à Evry et à Cergy. Tu es quelqu'un de formidable, avec qui j'ai beaucoup appris. Merci pour « la physique avec les mains », et le « théorème de Jean-Claude ».

Je remercie Laurent Bacri qui a été un formidable compagnon de bureau. Merci pour ta gentillesse Laurent, merci pour tous les moments passés ensemble à faire du traitement de données. Nous formions une super équipe avec Juan et Ghani et vous allez me manquer.

Je remercie Manuela Pastoriza pour m'avoir enseigné toute la biologie moléculaire. Otra vez, muchas gracias por haber estado conmigo en los momentos difíciles. Has ido una compañera perfecta de despacho. Gracias por haber compartida tu experiencia profesional. Y también te agradezco por tu amistad...

Je remercie Marie-France Breton pour son aide dans le laboratoire, pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Je te remercie encore pour la partie enseignement qui n'a pas été toujours simple. Et encore merci pour tes talents en poterie.

Je remercie aussi Gilles Patriarche pour ses conseils et son implication dans ma partie sur les nanopores artificiels. Encore merci pour tout ce que tu m'as appris sur la technique de microscopie électronique et pour le perçage de nanopores.

Je remercie Mehdi Guiard avec qui j'ai passé de très bons moments et qui a toujours été là pour moi.

Je remercie Françoise Discala, Halima Darbeida, Florence Hardy et Flora Koukiou de l'université de Cergy-Pontoise pour leurs conseils, pour leur soutien et pour la gentillesse qu'elles m'ont apportée dans les bons moments, comme dans les mauvais.

Je remercie Noémie Ein-Eli pour son humour et lui souhaite beaucoup de courage pour la fin de sa thèse.

Je remercie vivement Zahra Eskandani. Merci d'avoir été là pour moi à Evry pendant le début de ma thèse. Je pense que sans toi, ça aurait été très difficile, et merci de m'avoir tant fait rire.

Je remercie tous mes amis de la MKTF, et j'espère qu'ils comprendront tout le travail que j'ai effectué pendant ma thèse, et la raison de mes absences répétées et de mon humeur massacrant à certains moments.

Je remercie mes parents d'avoir toujours cru en moi, pour leurs encouragements et leur soutien. Je vous aime.

Finalement, je remercie Matthieu. Je pense que ça n'a pas été facile tous les jours de supporter mes sautes d'humeur et je t'en remercie. Merci d'avoir été là pour moi quand j'en avais besoin.



## Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>5</b>
<b>1 Transport de protéines dans un nanopore.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Transport de protéines à travers une membrane.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Translocation co-traductionnelle.....	13
1.1.2 Translocation post-traductionnelle.....	15
Chez les Eucaryotes.....	15
Chez les Procaryotes.....	16
1.1.3 Intégration de protéines membranaires par Sec61/SecY.....	17
1.1.4 Observation électrique de la translocation.....	18
<b>1.2 Transport de protéines à l'échelle de la molécule unique dans un nanopore.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Principe de détection électrique.....	20
1.2.2 Nanopores.....	22
Nanopores protéiques.....	22
Alpha-hémolysine.....	23
Aérolysine.....	27
Nanopores artificiels.....	28
Techniques de fabrication.....	29
Modifications de surface des nanopores artificiels, nanopores hybrides.....	31
Transport de peptides et étude d'interactions.....	33
Dans les nanopores protéiques.....	34
Dans les nanopores artificiels.....	36
Transport de protéines.....	37
Dans les nanopores protéiques.....	37
Dans les nanopores artificiels.....	40
Dépliement de protéines.....	41

Phénomène d'électro-osmose dans les nanopores artificiels.....	44
<b>1.3 Rappels théoriques et outils pour l'analyse du signal électrique .....</b>	<b>45</b>
1.3.1 Résistance électrique d'un pore.....	46
1.3.2 Variation de la résistance du pore et estimation de la taille de l'objet dans le pore.	47
1.3.3 Estimation de la dimension d'une protéine .....	47
1.3.4 Effets électrostatiques.....	48
1.3.5 Dynamique de transport.....	49
Temps de translocation électrophorétique sous l'action d'un champ électrique.....	49
Temps de translocation par diffusion pure .....	50
Electro-osmose.....	51
Fréquence des événements .....	51
1.3.6 Analyse du signal.....	52
Mesure de la fréquence des évènements.....	53
Mesure de la durée des blocages de courant .....	54
 <b>2 Dépliement d'une protéine recombinante déstabilisée par transport à travers un nanopore protéique .....</b>	 <b>57</b>
 <b>3 Translocation de protéines dans des nanopores artificiels.....</b>	 <b>71</b>
3.1 Transport de protéines natives et dépliées faiblement confinées .....	73
3.2 Transport de protéines dépliées fortement confinées .....	78
 <b>Conclusion et perspectives.....</b>	 <b>105</b>
 <b>Bibliographie .....</b>	 <b>111</b>





## Introduction générale

Une cellule biologique est un milieu compartimenté par des membranes de lipides. Les échanges de molécules entre les différents compartiments s'effectuent par l'intermédiaire de canaux. C'est le cas des échanges de protéines, synthétisées dans le cytoplasme mais qui sont en partie exportées vers d'autres organites comme les mitochondries. Le transport de protéines à travers un canal inséré dans une membrane est appelé translocation. La translocation de protéines joue un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques, comme la synthèse ou la dégradation protéique, l'adressage de protéines dans les différents compartiments cellulaires et leur repliement. La translocation est effectuée grâce à des complexes protéiques membranaires actifs, nécessitant de l'énergie, appelés translocons. Ces complexes sont composés d'un canal nanométrique qui permet le passage de protéines à l'état déplié à travers la membrane, mais aussi de différents facteurs solubles qui fournissent l'énergie nécessaire à la translocation des protéines en hydrolysant de l'ATP ou du GTP et qui contrôlent le repliement. Les protéines transportées doivent en effet être repliées correctement en sortie du translocon pour acquérir leurs propriétés fonctionnelles(1, 2). Il existe donc une relation importante entre transport et repliement qu'il est intéressant d'étudier du point de vue fondamental et aussi dans un but thérapeutique. De nombreuses pathologies sont associées au mauvais transport et au mauvais repliement de protéines(3, 4). L'étude du fonctionnement du translocon et la dynamique du processus de translocation ont fait l'objet de nombreux travaux mais restent à comprendre en détail. Une stratégie d'étude est de mimer le fonctionnement d'un translocon et dans un premier temps de réaliser des expériences sur le transport de

protéines à travers des pores passifs de géométrie convenable en substituant l'énergie apportée par l'ATP par une force électrique qu'il est possible de contrôler.

L'application d'un champ électrique à travers un canal engendre un courant électrique qui permet de détecter la présence d'une macromolécule dans le pore à cause de son influence sur la résistance électrique locale. Cette méthode de détection électrique a été inventée dans un autre contexte par Coulter au début des années 50 (5). Elle a été adaptée plus tard en 1986 par Zimmerberg et Parsegian, qui ont émis l'idée de faire passer un polymère dans un nanopore protéique inséré dans une membrane lipidique, afin de mesurer le diamètre du canal(6). Lorsque l'on applique un champ électrique à travers une membrane dans laquelle est inséré un nanopore, la chute de courant induite par la molécule dans le pore dépend de sa nature chimique, de sa conformation, de sa longueur, de la largeur du canal et de la force ionique, de son interaction éventuelle avec le pore. Cette variation de courant est mesurable par les techniques modernes d'électrophysiologie si la durée du blocage dépasse quelques microsecondes.

L'étude du transport de molécules dans des nano-canaux a débuté, à l'université d'Evry, en 2001 suite à plusieurs études sur la structure de polymères confinés (7) et a abouti à la proposition de Juan Pelta d'utiliser des canaux protéiques comme capteurs de conformations de protéines partiellement ou complètement dépliées et pour contrôler le repliement de protéines en sortie de nanopore. La première partie de ce programme a été mis en oeuvre par Ghani Oukhaled au cours de sa thèse (8) en 2007.

Le laboratoire a aussi développé l'étude du transport de molécules dans des nanopores artificiels moulés dans des dispositifs élastomères (PDMS) ou percés par faisceau d'ions focalisé dans des membranes de semi-conducteurs en parallèle de l'utilisation des nanopores protéiques. Anne-Laure Biance en 2005 a développé sous la direction de

Jacques Gierak au laboratoire de Photonique et Nanostructures de Marcoussis le perçage de nanopores par faisceau d'ions focalisé (9), puis Birgitta Schiedt en 2008 a effectué dans le même laboratoire les premières expériences en France de transport d'une protéine dans un grand nanopore artificiel (10).

La majorité des études sur le transport et le dépliement de protéines à travers des nanopores a été effectuée dans des nanopores protéiques(8, 11-18). Jusqu'à présent, très peu de travaux ont été réalisés sur le transport de protéines dans des nanopores artificiels(19-21).

Le but initial de cette thèse financée par un projet européen (Nanoscience Eranet+, "NANOPORE" No. 08-NSCI-006-01), était d'étudier la translocation de protéines dans des systèmes biomimétiques passifs (pores protéiques et artificiels), de les comparer avec des systèmes naturels (reconstitution du translocon dans une membrane lipidique) et de mesurer les forces se développant pendant ce processus. Seule la première partie de ce programme ambitieux a été réalisée. J'ai étudié le transport et le dépliement de protéines dans deux types de canaux : des canaux protéiques qui commencent à être bien connus comme l'alpha-hémolysine, et des nanopores artificiels percés dans des membranes de nitrure de silicium, jusque là utilisés principalement pour étudier le transport de l'ADN.

Des questions se posent à la fois au niveau du dépliement de protéines à travers un nanopore protéique que du point de vue du transport de protéines à travers un nanopore solide. Est-il possible de suivre le dépliement d'une protéine instable à l'échelle de la molécule unique à partir de signaux électriques? Est-ce que le dépliement de la protéine dépend du sens d'entrée dans le pore protéique? Est-il possible de contrôler la translocation de protéines natives et dépliées à travers des nanopores

solides en modulant la force électrique?

Je présente dans le chapitre 1, un état de l'art sur le transport de protéines dans les nanopores biologiques, puis sur l'utilisation de nano-canaux pour la détection électrique de protéines à l'échelle de la molécule unique, par détection électrique. Je décris ensuite les outils expérimentaux qui ont été utilisés durant cette thèse. Je rappelle aussi des éléments théoriques pour la compréhension de l'étude du transport de molécules dans un milieu confiné.

Le second chapitre est consacré au dépliement d'une protéine déstabilisée, MalE219, par transport à travers un nanopore protéique d'alpha-hémolysine. J'étudie l'effet de la concentration en agent dénaturant sur le passage de la protéine dans le pore et je compare le dépliement de la protéine selon son sens d'entrée dans le pore d'alpha-hémolysine. Cette étude a été publiée dans ACS Chemical Biology en 2011 (22).

Le chapitre 3 est consacré à la translocation de protéines dans des nanopores artificiels. Je présente le transport de transport de protéines selon la force électrique appliquée dans des nanopores artificiels de différentes tailles. Je décris d'abord la dynamique dans un nanopore dont le diamètre est plus grand que celui de la protéine à l'état natif et déplié, puis le transport dans un nanopore dont le diamètre est plus petit que celui de la protéine à l'état déplié. Ce chapitre repose sur deux articles publiés dans ACS Nano en 2011 (23) et en 2012 (24).

J'ai montré que la technique de nanopore protéique couplée à une détection électrique permet de suivre le dépliement d'une protéine dont une mutation modifie sa transition de dénaturation vers les faibles concentrations en agent dénaturant. Par ailleurs, le sens d'entrée de la protéine, par le vestibule ou par la tige, à travers un pore asymétrique d'alpha-hémolysine n'influence pas la transition de dépliement. Les pores artificiels dont le diamètre est supérieur à celui de la protéine peuvent être utilisés pour distinguer

l'état natif, de l'état déplié d'une protéine. Lorsque la protéine dépliée est plus grande que le diamètre du pore. L'entrée de la chaîne dépliée dans le pore est associée à une barrière d'énergie principalement entropique. Pour des différences de potentiels modérés, les protéines pourraient interagir avec le pore sans être nécessairement transportées. En revanche, pour de fortes forces électriques appliquées, la protéine est transportée à travers le pore par un mécanisme d'électrophorèse. Ces résultats ont été appuyés sur une théorie qui permet d'interpréter l'ensemble des données expérimentales.

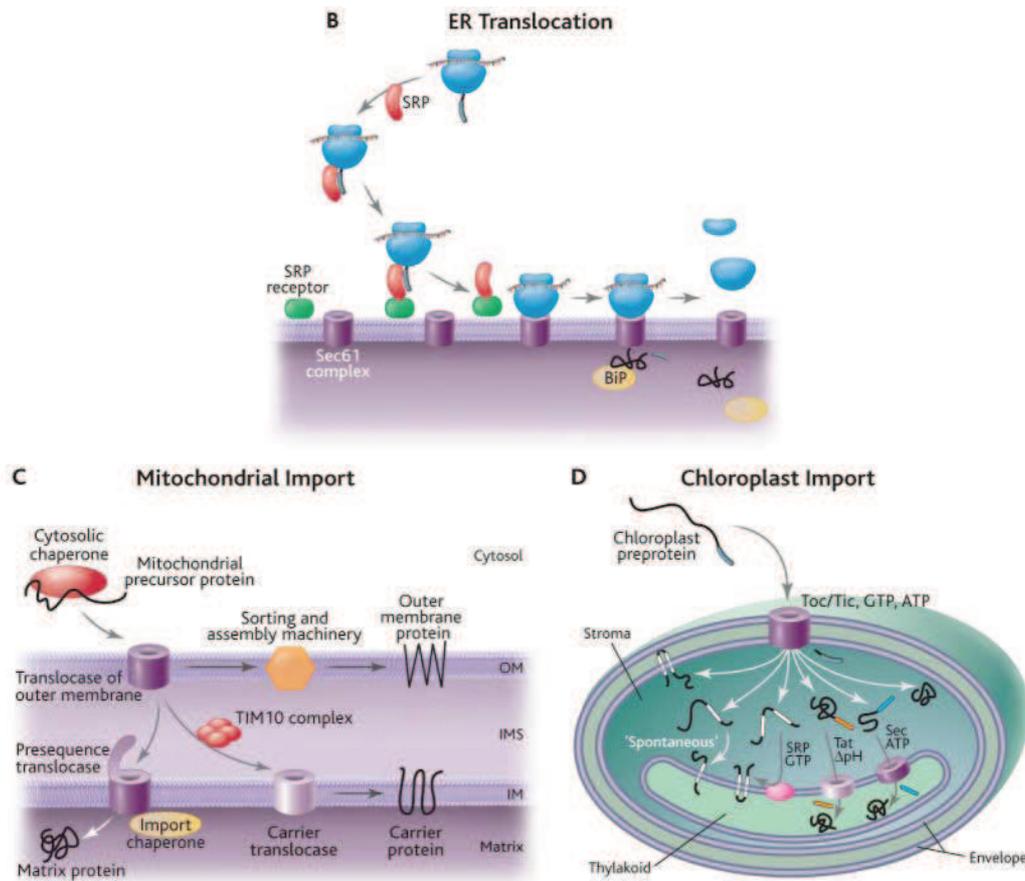


# 1 Transport de protéines dans un nanopore

## 1.1 Transport de protéines à travers une membrane

La moitié des protéines sont transportées dans un état déplié à travers des membranes pour atteindre leur destination finale due à la compartimentation de la cellule. La translocation est une étape décisive dans la biosynthèse de nombreuses protéines(1, 2) car elles doivent être correctement repliées en générale pour être fonctionnelles. De nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer sont associées au mauvais transport(3) et repliement(4) de protéines d'où l'intérêt de leur étude.

Il y a deux systèmes de transport de protéines. Le premier est localisé dans la membrane plasmique bactérienne, dans le reticulum endoplasmique (RE) et dans la membrane interne de la mitochondrie et du chloroplaste (figure 1.1). On l'associe à un système d'exportation car les protéines sont exportées du cytosol vers des compartiments intracellulaires (périplasma bactérien, lumière du RE, lumière du thylakoïde ou la membrane interne de la mitochondrie). L'autre système est localisé dans la membrane interne et externe de la mitochondrie et du chloroplaste et dans la membrane du peroxyosome. On l'associe à un système d'importation car les protéines sont importées dans des organites.

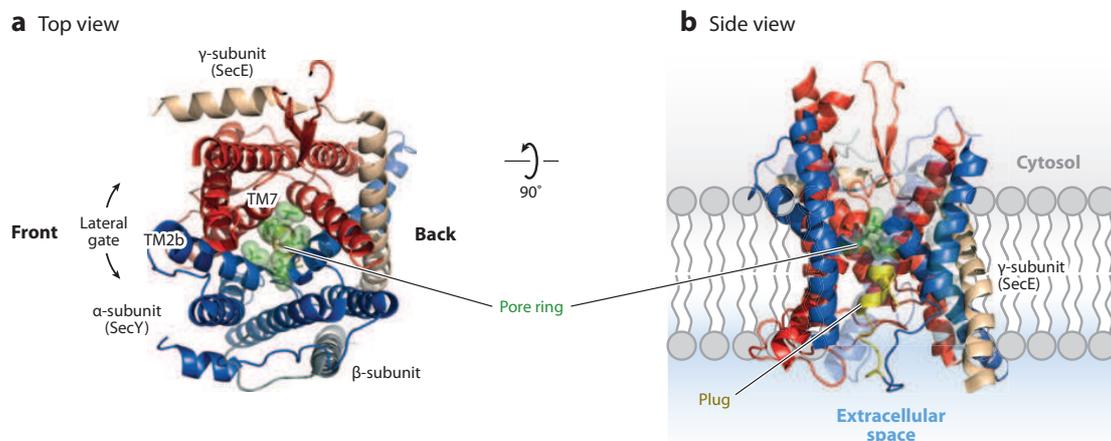


**Figure 1.1 :** B) Translocation co-traductionnelle dans le reticulum endoplasmique. C) Importation de protéines dans la mitochondrie. D) Importation de protéines dans le chloroplaste(25).

Les protéines transportées à travers une membrane cellulaire possèdent un peptide signal clivable à l'extrémité N-terminal de la chaîne(26) qui est reconnu par divers facteurs cytosoliques qui permettent l'adressage de la protéine. Le peptide signal est généralement composé d'une séquence en acides aminés avec des charges électriques. Ces protéines sont adressées dans un état déplié.

Elles utilisent une même machinerie pour leur transport à travers la membrane : le translocon. Ce canal est un complexe protéique généralement associé à un moteur fonctionnant grâce à l'hydrolyse de nucléoside triphosphate qui permet le passage de la protéine à travers la membrane.

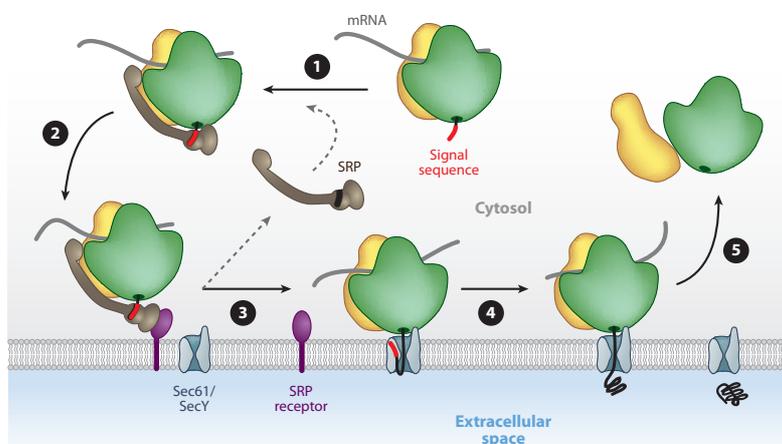
Nous nous intéresserons ici au système d'exportation de protéines. Le translocon est un complexe protéique membranaire appelé Sec61 chez les eucaryotes et SecYEG chez les procaryotes ou les archae(27) (figure 1.2). Les complexes Sec61 et SecYEG sont les composants membranaires essentiels pour la translocation de protéines chez les mammifères et les procaryotes(28-30). Le système Sec61 permet l'export de protéines vers la lumière du RE et l'insertion de protéines membranaires. Le système SecYEG permet l'export de protéines vers le périplasma et l'insertion de protéines au niveau de la membrane plasmique. Le canal a un diamètre compris entre 1.5 et 2 nm. Ce petit diamètre implique que la chaîne polypeptidique transportée soit dans une conformation dépliée(31, 32). Il existe deux modes de translocations, l'un co-traductionnelle et l'autre post-traductionnelle, ayant une source d'énergie différente pour la translocation des protéines.



**Figure 1.2 :** Structure cristalline du canal SecY de *Methanococcus jannaschii*. a) canal vu du dessus. b) canal vu de côté et inséré dans la membrane.(25)

### 1.1.1 Translocation co-traductionnelle

Lors de la translocation co-traductionnelle, le partenaire principal est le ribosome. Ce mode de translocation est retrouvé dans toutes cellules et est utilisé pour la translocation de protéines membranaires ou sécrétées. La translocation s'initie avec une phase d'adressage, pendant laquelle le ribosome approche la chaîne protéique naissante de la membrane du RE par reconnaissance avec la molécule SRP (Signal Recognition Particle) qui reconnaît le peptide signal. Ce complexe ribosome-chaîne naissante se fixe alors à la membrane par interaction entre SRP et SR qui est son récepteur membranaire, puis par interaction entre le ribosome et le translocon. La chaîne polypeptidique naissante passe alors dans le canal et c'est l'hydrolyse de GTP pour l'élongation par le ribosome qui fournit l'énergie suffisante pour le passage à travers le canal (figure 1.3). La protéine est alors progressivement repliée en passant de l'autre côté de la membrane.

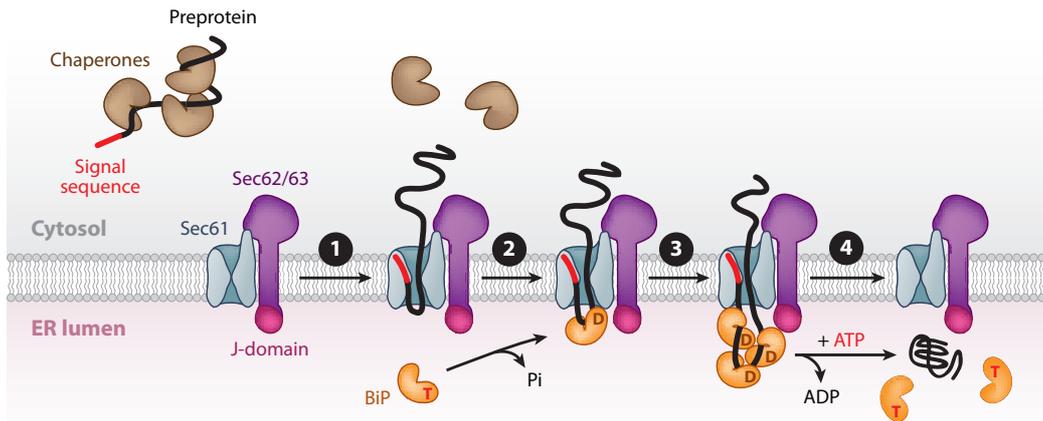


**Figure 1.3 :** Modèle de translocation co-traductionnelle. Le schéma montre les différentes étapes de la translocation co-traductionnelle. Etape 1 : Interaction de SRP avec le peptide signal de la chaîne naissante. Etape 2 : Interaction du complexe ribosome-SRP avec le récepteur membranaire SR. Etape 3 : Relargage de SRP et interaction du ribosome avec Sec61/SecYEG et transfert de la chaîne naissante dans le canal. Etape 4 : Translocation de la chaîne polypeptidique, clivage du peptide signal et repliement de la chaîne de l'autre côté de la membrane. Etape 5 : Fin de la translocation et dissociation des deux sous-unités ribosomales. (25)

### 1.1.2 Translocation post-traductionnelle

#### *Chez les Eucaryotes*

Dans la plupart des cellules, les protéines sont transportées après la fin de leur synthèse. Cette translocation post-traductionnelle utilise plusieurs mécanismes chez les eucaryotes ou les procaryotes. Chez la levure, et probablement chez tous les eucaryotes, la translocation est effectuée en coopération entre Sec61 et un canal protéique tétramérique nommé Sec62/63, mais aussi avec une protéine de la lumière du RE, la protéine BiP, membre de la famille d'ATPases des Hsp70.(33) La chaîne polypeptidique traduite est conduite jusqu'au système Sec61, et sous forme dépliée grâce à la présence de chaperones associées. Une fois que le peptide signal entre en interaction avec Sec61, les chaperones sont relarguées. Il y a alors interaction de la protéine BiP-ATP avec le domaine-J de Sec63, l'ATP est hydrolysé ce qui permet à la protéine BiP de s'approcher de la chaîne polypeptidique engagée dans Sec61. BiP interagit avec les parties hydrophobes de la chaîne polypeptidique et l'empêche de repartir vers le cytosol, tout en l'entraînant aussi vers la lumière du RE. Lorsque le mouvement est suffisant, une autre protéine BiP vient se fixer sur la chaîne. Ce processus est répété jusqu'à ce que la totalité de la chaîne soit transportée (figure 1.4). Enfin, l'échange d'un ADP en ATP permet d'ouvrir les protéines BiP, qui relâchent la chaîne polypeptidique transportée qui peut se replier.

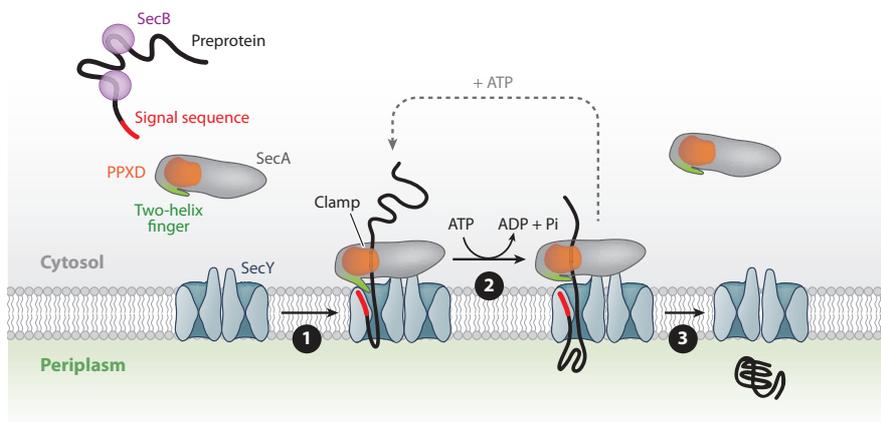


**Figure 1.4** : Modèle de translocation post-traductionnelle chez les eucaryotes. Le schéma montre les différentes étapes de la translocation post-traductionnelle pour la sécrétion de protéines. Etape 1 : Interaction de la chaîne polypeptidique au complexe Sec, constitué de Sec61 et Sec62/Sec63. Les chaperones associées à la chaîne polypeptidique sont relarguées durant son insertion dans le canal. Etape 2 : BiP-ATP interagit avec le domaine-J de Sec63. Après hydrolyse de l'ATP, BiP-ADP se lie à la chaîne polypeptidique l'empêchant de revenir dans le cytosol. Ce processus est répété jusqu'à ce que la chaîne soit totalement transportée. Etape 4 : Régénération de BiP-ATP qui se dissocie de la chaîne polypeptidique. (25)

### Chez les Procaryotes

Chez les procaryotes, la chaîne polypeptidique est « poussée » dans le translocon grâce à son partenaire, l'ATPase cytosolique SecA.(34) SecA se lie d'abord à la chaîne polypeptidique pour l'insérer dans SecYEG. Les chaperones SecB sont alors relarguées durant ce processus. SecA possède deux motifs qui glissent l'un sur l'autre grâce à l'hydrolyse de l'ATP (figure 1.5). C'est ce mouvement qui pousse la chaîne polypeptidique à l'intérieur du canal. La chaîne polypeptidique se replie petit à petit en sortie de canal, et une fois la translocation terminée, SecA se sépare de SecYEG. Des travaux de simulation ont été effectués en 2006 sur la dynamique de passage de

polypeptides à travers le complexe SecYE $\beta$ .(35) Les temps mesurés dans cette simulation sont très éloignés des temps réels de translocation. Cette étude montre que la mesure de temps de translocation par simulation n'est pas possible et qu'il y a un réel besoin d'expériences pour mesurer ces temps. Une alternative est l'utilisation d'une approche gros grains pour la simulation qui permet d'accéder à une échelle de temps plus longue(36-38).



**Figure 1.5 :** Modèle de translocation post-traductionnelle chez les procaryotes. Le schéma montre les étapes de la translocation post-traductionnelle pour la sécrétion de protéines. Etape 1 : SecA interagit avec la chaîne polypeptidique et l'insère dans SecYEG. Les chaperones cytosoliques SecB sont relarguées durant cette étape. Etape 2 : Grâce aux cycles d'hydrolyse de l'ATP, les motifs de SecA poussent la chaîne dans le canal. Etape 3 : Une fois la translocation achevée, SecA est libérée.(25)

### 1.1.3 Intégration de protéines membranaires par Sec61/SecY

La plupart des protéines membranaires sont intégrées dans la bicouche lipidique pendant la translocation co-traductionnelle. Les segments transmembranaires s'intègrent séquentiellement dans la membrane grâce à une ouverture située dans le canal qui est directement en contact avec la phase lipidique(39-42). Lorsqu'un

partenaire de la translocation est en interaction avec le canal, cet écart serait ouvert en permanence. Le mécanisme est donc simple; pendant que la chaîne polypeptidique est transportée, le segment situé dans la phase aqueuse du canal est exposé à un environnement hydrophobe dû à la présence de cette ouverture, ce qui permettrait de répartir chaque segment selon l'environnement hydrophile ou hydrophobe.

#### **1.1.4 Observation électrique de la translocation**

Fèvre *et al*(43) observent en 1990 par détection électrique des canaux mitochondriaux issus de levures qui sont reconstitués dans une membrane lipidique et le transport de peptides. C'est Simon et Blobel(26) en 1991 qui ont effectué la première observation électrique de la translocation co-translationnelle d'une protéine à travers un système reconstitué Sec61. Des microsomes pancréatiques ont été fusionnés avec une membrane lipidique plane séparant deux compartiments. En présence de puromycine, un inhibiteur de la traduction, ils ont pu voir une augmentation de la conductivité du canal associée au détachement d'une chaîne naissante de protéine. Ils ont aussi montré que le ribosome en interaction avec Sec61 permettait de garder le canal ouvert. C'est la première fois que l'on a pu corréler la traduction avec un mécanisme de sécrétion de protéines. Wirth *et al*(44) reconstituent en 2003 dans une membrane lipidique le translocon Sec61. En 2004, Woolhead *et al*(45) montrent le repliement par fluorescence d'une protéine par passage à travers le translocon et que le ribosome interagit directement avec celui-ci pour le transport.

## 1.2 Transport de protéines à l'échelle de la molécule unique dans un nanopore

Les expériences de reconstitution d'un translocon dans une membrane lipidique sont très difficiles à réaliser et à interpréter. Une première approche plus simple pour étudier le transport et le repliement de protéines est l'utilisation d'un pore passif protéique ou artificiel, à partir de membranes solides percées, pour mimer le canal. Dans ce cas, il est possible de substituer l'énergie nécessaire à la translocation *in vivo*, par un champ électrique *in vitro*.

La détection de polymères et polyélectrolytes synthétiques, biomolécules, et de complexes molécule-ligand à l'échelle de la molécule unique permet d'étudier des problématiques au niveau fondamental pour la biologie et la physique(46-48). La sensibilité de cette technique a permis le développement d'outils de bio-analyse et de diagnostique(49-51). Parmi les diverses techniques de molécule unique développées comme le FRET(52), l'AFM(53) ou les pinces optiques(54) et magnétiques(55), une nouvelle technique a été développée ces quinze dernières années : l'utilisation de nanopores protéiques ou artificiels. Cette nouvelle technique est complémentaire de la technique de FRET qui ne donne pas accès à l'ensemble des conformations et donc au paysage énergétique. Elle explore aussi un espace de conformations différent de celui exploré par la technique des pinces optiques. Il n'est pas certain que les processus de dépliement et repliement observés avec les techniques de forces soient les mêmes que les processus obtenus lors de la dénaturation thermique ou chimique, ou lors du repliement spontané de la protéine. Les nanopores protéiques ou artificiels offrent donc une autre alternative pour l'étude du dépliement ou repliement d'une protéine.

### 1.2.1 Principe de détection électrique

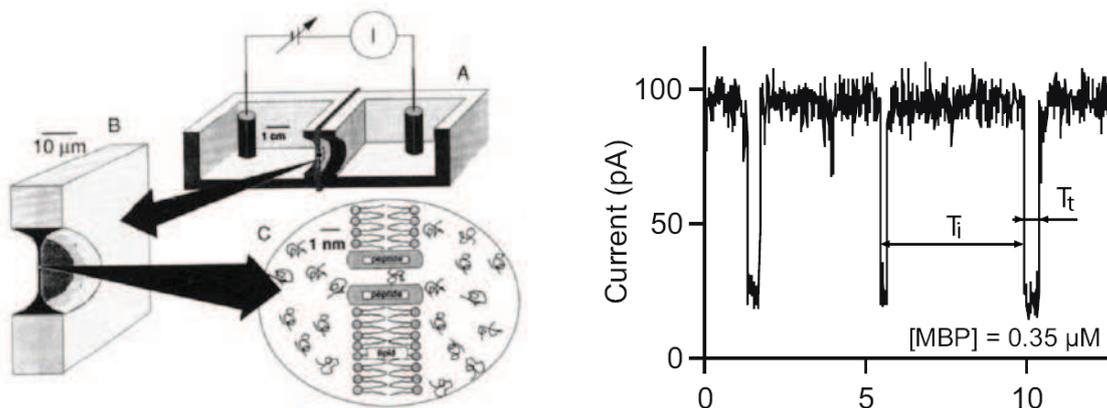
La méthode de détection électrique de particules à l'échelle unique naît dans les années 1950, avec l'ingénieur W. H. Coulter(5). Il brevète en 1953 le compteur qui porte son nom, permettant l'analyse individuelle d'objets d'une taille de l'ordre du dixième de millimètre en solution. Le principe est basé sur la mesure de variation de la résistance électrique d'un canal de taille microscopique rempli d'une solution contenant des électrolytes. Cette variation est engendrée par la présence d'un objet colloïdal ou d'une particule à l'intérieur du canal. Lorsque ce dernier est soumis à une différence de potentiel, un courant électrique circule. Un objet, ou une particule, chargés électriquement peuvent être entraînés dans le canal sous l'action d'une force électrique, de l'agitation thermique ou d'un gradient de concentration pour les objets non chargés. La présence d'une particule dans le canal le bouche partiellement et produit une brusque augmentation de résistivité associée à une chute de courant et à une impulsion que l'on peut mesurer et analyser. Le nombre d'impulsions correspond au nombre de particules ayant traversé le canal. L'amplitude de l'impulsion est reliée à la taille de l'objet et la largeur de l'impulsion est reliée au temps de séjour de la particule dans le canal.

Le compteur a été utilisé en médecine dans les années 60 pour l'analyse de cellules sanguines. Cependant afin de détecter des objets aussi petits que des molécules, il est nécessaire d'avoir des pores ou des canaux de tailles comparables.

Le dispositif de Coulter est amélioré en 1972 par Bean et DeBlois(56). La technique de Track-Etch leur permet d'obtenir des pores artificiels uniques de l'ordre de 100 nm et ainsi d'analyser des particules plus petites que les cellules.

En 1976, Neher et Sakmann développent la méthode du patch-clamp(57), grâce à laquelle ils observent le signal électrique d'un canal ionique détectant des molécules d'acétylcholine (échelle du nanomètre). Ils découvrent ainsi les fonctions des canaux ioniques isolés dans les cellules(58).

En 1986, Zimmerberg et Parsegian proposent le principe d'une expérience permettant la mesure du diamètre de canaux ioniques en y faisant passer des chaînes de polymères de taille croissante(6). Le principe est présenté figure 1.6.



**Figure 1.6:** Montage schématique pour la détection électrique en molécule unique de la translocation.(6) Une différence de tension électrique de l'ordre de 100mV est soumise à une membrane de lipides contenant un pore préalablement inséré, produisant alors un courant de quelques dizaines de pA dans celui-ci, le passage d'une molécule à travers le pore induit un bouchage partiel du pore et une chute de courant.  $T_i$  correspond au temps inter-événement, et  $T_t$  au temps de transport.

En 1994, Bezrukov, Vodyanoy et Parsegian développent le compteur Coulter à l'échelle moléculaire grâce à l'instrumentation moderne qui permet une meilleure amplification

du courant. Ils démontrent que l'analyse des fluctuations du courant permet l'estimation du coefficient de diffusion du polymère à l'intérieur du canal(59).

Enfin en 1996, Kasianowicz et son équipe mettent en évidence le passage d'un ADN simple brin à travers un pore protéique inséré dans une bicouche lipidique sous l'effet d'un champ électrique(60). Ce sont les premiers à interpréter les blocages du courant ionique à travers un pore comme des translocations de polynucléotides. En effet, une technique d'amplification de l'ADN, par PCR permet de montrer et quantifier la présence de molécules en sortie pore.

### 1.2.2 Nanopores

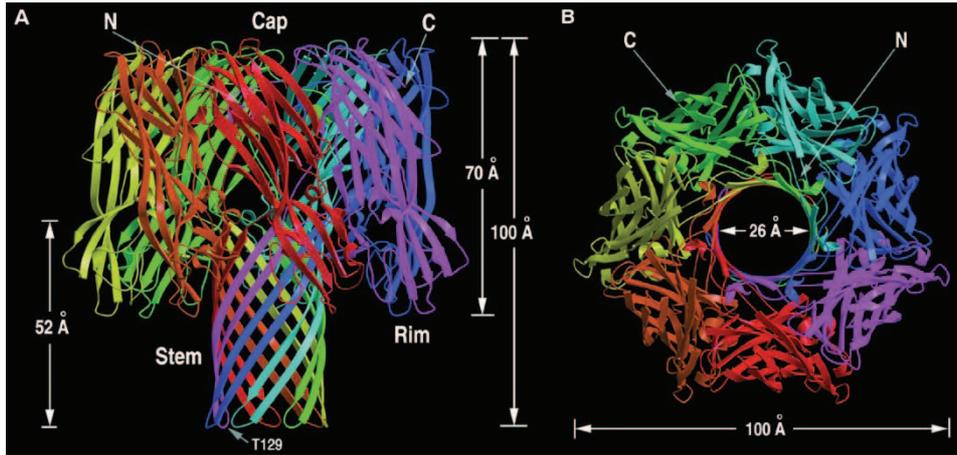
Ce sont les nanopores protéiques qui ont été utilisés les premiers(60) pour l'étude du transport à l'échelle de la molécule unique. Des chercheurs se sont ensuite intéressés aux nanopores artificiels à partir de membranes solides(61). Il y a eu un intérêt commun développé à l'étude de la dynamique de transport de molécules dans ces deux types de nanopores. Des nanopores de seconde génération ont été fabriqués, qui sont des nanopores modifiés, chimiquement pour les nanopores artificiels, par biologie moléculaire pour les nanopores protéiques, dans le but de contrôler la translocation. Enfin très récemment, les nanopores de troisième génération sont apparus, ce sont des nanopores hybrides(62-64) (insertion d'un canal d'alpha-hémolysine ou d'un origami ADN dans un nanopore artificiel) ou bio-inspirés (65, 66) (Nanopore solide recouvert d'une bicouche de lipide).

#### *Nanopores protéiques*

Des méthodes électro-physiologiques ont été utilisées pour démontrer l'existence de canaux protéiques(26, 67), ou de pores protéiques passifs, généralement des toxines(68-71). Ces expériences consistent en l'insertion d'un canal unique dans une membrane lipidique reconstituée, usuellement une bicouche d'une solution de 1% de lipides dans du décane ou un autre solvant organique, qui est déposée sur un trou de l'ordre du micromètre qui sépare deux compartiments. Il est possible de suivre l'épaisseur de la membrane en calculant la capacité. L'avantage de ces pores protéiques passifs est leur grande stabilité et une reproductibilité au cours des expériences, au niveau de la géométrie du canal. En effet, cette reproductibilité est prouvée grâce à des courbes réalisées sur de nombreux pores qui suivent le courant à travers le pore en fonction de la tension appliquée (I-V). Un autre avantage est la possibilité de fabriquer de manière recombinante ces pores, mais aussi de créer de manière ponctuelle des mutations ou des modifications chimiques(72). Nous avons fait le choix de ne présenter que deux pores protéiques, les plus utilisés avec les protéines et peptides, l'alpha-hémolysine et l'aérolysine.

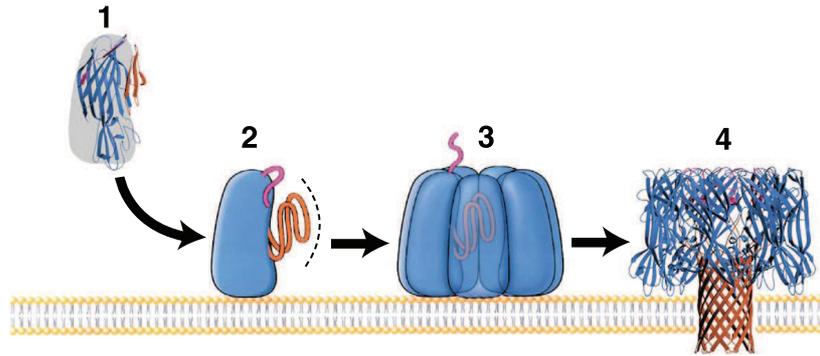
### Alpha-hémolysine

L' $\alpha$ -HL est le nanopore protéique passif le plus utilisé. Cette toxine bactérienne est sécrétée par *Staphylococcus aureus* et issue de l'assemblage de sept monomères identiques (33.2 kDa) qui forment un canal transmembranaire (232.4 kDa) au sein d'une membrane plasmique(73). Sa représentation tridimensionnelle est présentée figure 1.7 (résolution de 1.9Å).



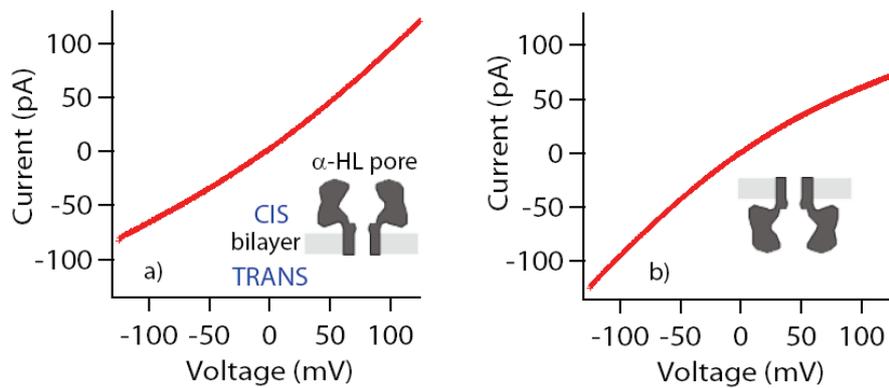
**Figure 1.7:** Représentation tridimensionnelle d'un heptamère d'alpha-hémolysine. Chaque monomère est de couleur différente. (A) Représentation transversale. (B) Représentation vue du côté cis (vue du dessus). (73)

Le mécanisme d'insertion de ce canal est encore controversé mais Montoya et Gouaux(74) et Bayley *et al*(75) ont proposé un mécanisme d'insertion dans la membrane (figure 1.8). C'est un pore asymétrique en forme de champignon et constitué de feuillettes beta. Il est divisé en trois domaines qui sont le chapeau ou vestibule, partie extramembranaire hydrophile, la couronne, domaine hydrophobe d'encrage à la membrane lipidique, et la tige, feuillet beta qui perce la membrane lipidique.



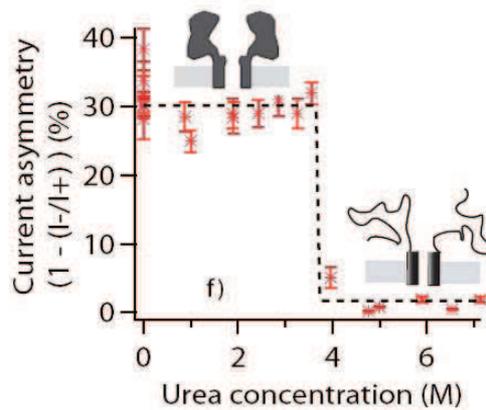
**Figure 1.8:** Proposition d'un mécanisme d'insertion de l'alpha-hémolysine dans une membrane lipidique(74, 75). (1) Représentation du monomère hydrosoluble. (2) Le monomère rentre en interaction avec la membrane. (3) Formation du pré-pore. (4) Oligomérisation du pré-pore qui s'insère dans la membrane et forme un pore d'alpha-hémolysine.

Ses dimensions externes sont de 10x10nm. Le diamètre interne du canal varie de 2.6 nm pour l'entrée du côté du chapeau, 1.4 nm pour la cavité interne, 1.3 nm au niveau de la constriction interne et 2 nm pour l'entrée du côté de la tige. A pH physiologique, le pore a une charge nette de +7<sup>e</sup> (pI = 7.94), il présente ainsi une légère sélectivité pour les anions, entraînant une rectification du courant dans les courbes (I-V). Deux courbes (I-V) d'un canal unique d'alpha-hémolysine selon son sens d'insertion dans la membrane sont présentées figure 4. Cette asymétrie a pu être mise en relation avec une asymétrie géométrique du pore car il a été montré que la dénaturation de la partie extra-membranaire, entraînait la perte d'asymétrie électrique(11) (figure 1.9). L'α-HL est un pore très stable : il a été étudié sur de grandes gammes de pH(76), de températures(77), de concentrations en sels(78), ou d'agents dénaturants comme l'urée(11).



**Figure 1.9:** Courbes courant-tension (IV) d'un pore unique d'alpha-hémolysine à 25°C dans 1M KCl 5mM HEPES pH 7.5, et inséré différemment dans la membrane.

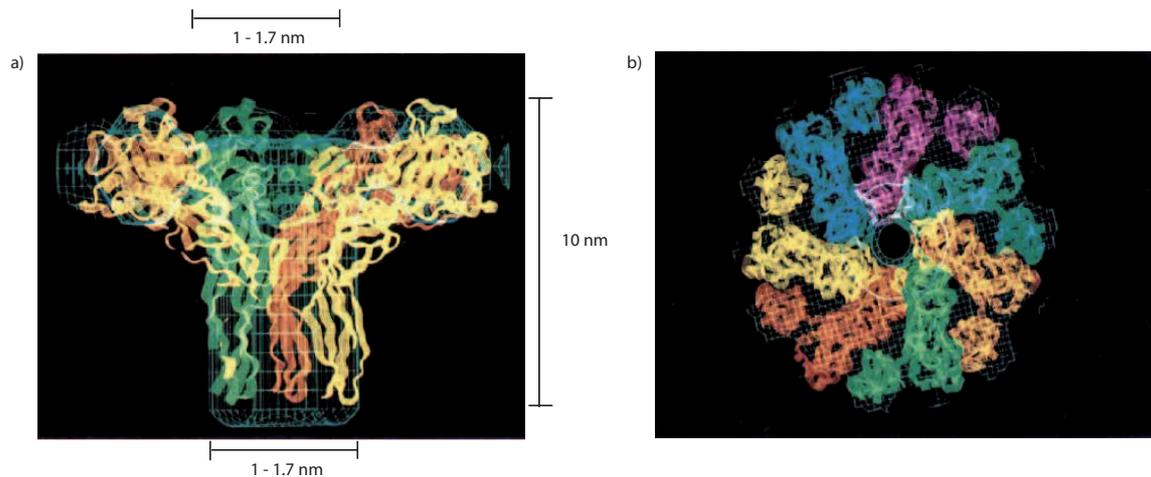
Dans des expériences de dépliage et de transport de protéines, l'utilisation d'un agent dénaturant ou de température est nécessaire. Il est donc indispensable de vérifier la stabilité du pore en fonction de ces deux paramètres(11, 77). Le pore d'alpha-hémolysine inséré reste dans la membrane jusqu'à une concentration en urée de 7.2 M et jusqu'au moins 2 M en guanidium. Une diminution sigmoïdale de l'amplitude du courant en fonction de la concentration en urée et la perte d'asymétrie caractéristique ont été montrées à partir de 4M en urée, probablement associées à la dénaturation de la partie extra-membranaire du pore (figure 1.10). D'autres expériences sur le transport de polyléctrolytes et protéines confirment cette hypothèse (12).



**Figure 1.10 :** Perte du courant d'asymétrie à 4M urée indiquant la dénaturation de la partie extra-membranaire de l'alpha-hémolysine. (11)

### Aérolysine

Cette toxine bactérienne est synthétisée par *Aeromonas hydrophila* sous la forme d'un précurseur hydrosoluble inactif appelé pro-aérolysine. Le clivage d'un peptide signal en N-terminal de 25 acides aminés est indispensable pour l'heptamérisation de ce canal(79, 80). Son modèle d'insertion dans une bicouche lipidique a été décrit par Parker en 1996(81). Contrairement à l'alpha-hémolysine, l'aérolysine ne possède pas de vestibule. Ce canal a des dimensions extérieures comparables à l'alpha-hémolysine, mais aucune structure cristalline de sa forme heptamérique à haute résolution n'existe, figure 1.11 (résolution de 25Å). Il n'y a donc qu'une approximation du diamètre interne qui est compris entre 1 et 1.7 nm, le diamètre est sensiblement plus petit que celui de l'alpha-hémolysine(82). A pH physiologique, le pore a une charge nette de  $-52^e$  (pI = 5.56) très différente de l'alpha-hémolysine ( $+7^e$ ).



**Figure 1.11:** Représentation tridimensionnelle proposée d'un heptamère d'aérollysine. Chaque monomère est de couleur différente. a) Représentation transversale. b) Représentation vue du côté cis (vue du dessus). (82)

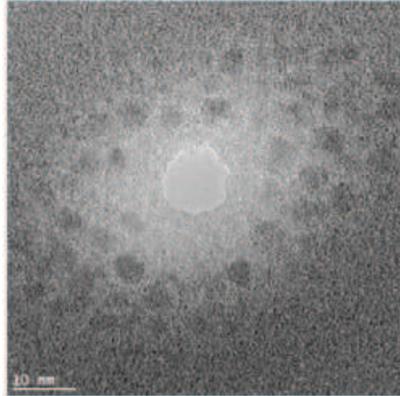
### Nanopores artificiels

Les pores protéiques tels que l'alpha-hémolysine ont l'avantage d'avoir une géométrie contrôlée et une structure chimique de l'ordre de la précision atomique connue. Chaque pore d'alpha-hémolysine inséré dans une membrane pour une expérience est exactement le même. Cela assure une reproductibilité entre différents pores et des expériences réalisées indépendantes de l'environnement. Malheureusement, les membranes lipidiques utilisées ont une durée de vie limitée de l'ordre de quelques heures. Ces membranes sont aussi sensibles à des différences de pression osmotique ou à des agents chaotropiques. Les nanopores artificiels offrent une autre alternative. Ces nanopores permettent de réaliser des expériences sur de plus grandes gammes de température, de pH et de concentrations en agent dénaturant que les pores protéiques. Leur durée de vie est de l'ordre de la semaine, ce qui est un avantage certain comparé aux nanopores protéiques. Cependant, la reproductibilité de la géométrie des pores est

très difficile ainsi que le contrôle de l'état de surface des membranes solides après perçage.

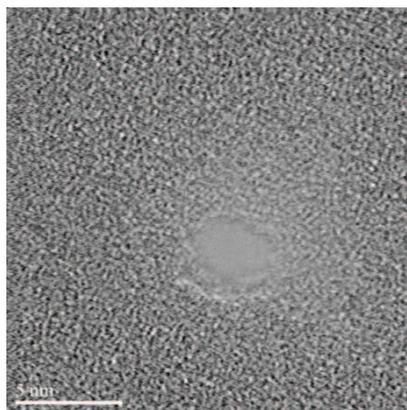
### Techniques de fabrication

Le premier nanopore artificiel utilisé pour le transport en molécule unique a été fabriqué grâce à un FIB (focus ion beam)(83). Cette technique consiste à utiliser un faisceau d'ions focalisé d'une énergie de l'ordre du keV. Ce faisceau permet d'éroder et de percer le nitrure de silicium qui est le matériau le plus utilisé pour la fabrication de nanopore. Il a été possible de fabriquer des pores de 50 à 100 nm que l'on peut reboucher grâce à un faisceau d'ions défocalisé. Le perçage d'un pore peut être réglé en temps réel avec un système de rétrocontrôle intégré au FIB, offrant une précision de 1 nm. Cette technique est principalement utilisée pour des membranes artificielles en nitrure de silicium mais aussi pour d'autres matériaux tels que la silice, l'aluminium, le chrome, le poly(methyl-methacrylate) ou le polyimide(84). Seulement, l'utilisation d'ions chargés tels que le galium par exemple, peut modifier l'état de surface initial de la membrane. Des ions peuvent s'insérer sur une épaisseur de quelques nanomètres(85) et ainsi charger de manière incontrôlée à l'intérieur du pore (figure 1.12). En revanche, l'un des avantages du FIB est la fabrication en quelques minutes de nombreux pores percés dans un réseau de membranes et la possibilité de les intégrer dans des systèmes microfluidiques(10).



**Figure 1.12 :** Image TEM d'un pore percé par FIB gallium dans une membrane de nitrure de silicium. Les taches sombres correspondent à du gallium inséré dans la membrane.

La deuxième technique de perçage est l'utilisation d'un microscope électronique à transmission (TEM). Cette méthode est actuellement la plus répandue. L'utilisation d'un faisceau d'électrons focalisé inférieur à 10nm permet de fabriquer des pores de l'ordre du nanomètre en sublimant progressivement la membrane (figure 1.13). De plus il est possible de suivre la formation du pore en direct(86). Tout comme les nanopores percés par FIB, l'utilisation d'un faisceau défocalisé permet de reboucher le pore lentement jusqu'à 0.3 nm/min avec un diamètre initial inférieur à 50 nm.



**Figure 1.13 :** Image TEM d'un nanopore fabriqué par TEM dans une membrane de nitrure de silicium.

La dernière technique est appelée « track-etch ». Elle permet de produire des pores de différentes géométries dans des membranes de polymères organiques telles que du poly(éthylènetéraphthalate) (PET), du polycarbonate ou du polyimide. Une lithographie à partir d'ions lourds de haute énergie permet de percer la membrane. Chaque ion brise des liaisons chimiques (track) dans la membrane, qui est révélée chimiquement (etch) en la plongeant dans une solution d'hydroxyde de sodium. Cette technique permet de fabriquer des pores cylindriques, coniques ou double coniques avec des tailles variant de 10 nm à 5  $\mu$ m.(87)

#### Modifications de surface des nanopores artificiels, nanopores hybrides

Des modifications chimiques sur la surface des pores permettent la suppression de propriétés physiques non désirées. Par exemple, le rapport signal sur bruit des nanopores artificiels est souvent trop important ce qui affecte la qualité des enregistrements(88-90), la ligne de base du courant à travers le pore peut beaucoup fluctuer(91). Une autre application est l'augmentation ou la diminution de la sélectivité aux ions. Il est possible d'introduire dans le canal des charges ponctuelles positives ou négatives qui auront donc une influence sur la sélectivité des ions. Enfin, l'intérêt d'une modification chimique est l'introduction d'un récepteur spécifique pour l'analyse d'interaction entre une molécule et son ligand.

Il est donc possible de déposer par évaporation une couche mince et contrôlée d' $Al_2O_3$ , pour réduire le rapport signal sur bruit(92). Cette couche mince a changé l'état de surface du nanopore qui a entraîné une diminution de la sélectivité pour les ions. Cette

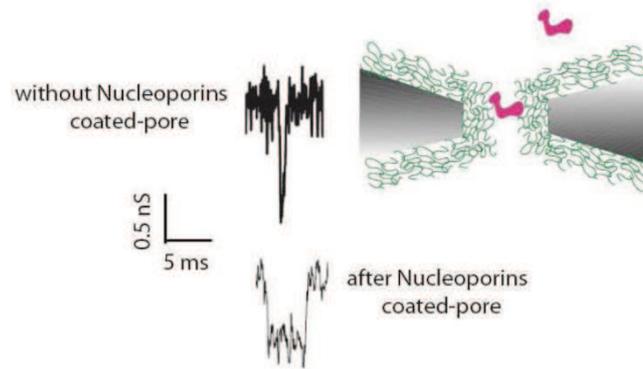
nouvelle propriété a facilité la détection d'ADN simple brin par rapport à un pore non modifié.

L'utilisation de composants organiques comme les organosilanes ont pu rendre des pores soit chargés négativement, soit chargés positivement(93).

Une autre technique est utilisée pour les pores fabriqués par track-etch, utilisant les groupements carboxyl créés durant la fabrication de ces pores. Il est possible d'attacher du (PET)(94) ou du polyimide(95) qui changent la charge de surface négative en charge positive.

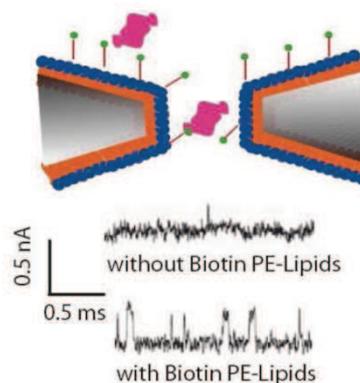
Une autre approche de modification de surface est le dépôt d'or suivi d'une absorption chimique de dérivés thiol.(96-99) Ces thiols sont très utiles pour des bio-fonctionnalisations qui permettent des liaisons entre la membrane et des biomolécules comme par exemple la biotine.(100) Ils ont pu grâce à des enregistrements visualiser des différences de blocage de courant entre liaisons biotine/streptavidine, protéine-G/streptavidine et anticorps/antigène. Plus récemment, Wei *et al*(101) ont lié une étiquette histidine à l'intérieur d'un pore grâce aux groupements thiols. Ils ont pu analyser grâce aux courants électriques des interactions protéine-pore grâce à une étiquette histidine, mais aussi des interactions entre plusieurs classes d'IgG dirigés contre une protéine.

Jovanovic *et al*(102) greffent des nucléoporines de type FG sur une membrane poreuse et comparent le transport de protéines cargo à de la BSA. Ils montrent par fluorescence la sélectivité du transport de protéines à travers un nanopore de type hybride mimant un pore nucléaire. Kowalczyk *et al*(65) étudient le même phénomène mais avec un nanopore hybride unique. Des évènements de transport sont détectés pour les récepteurs Imp $\beta$  alors que le passage de BSA est inhibé (figure 1.14).



**Figure 1.14** : Bio-nanopore synthétique. Des nucléoporines sont greffées sur un nanopore artificiel et permettent une meilleure sélectivité du transport de protéines (adapté de Kowalczyk et al(65)).

Toujours dans le même concept, il est possible de déposer uniformément une bicouche de lipides sur la surface de la membrane pour diminuer les interactions non spécifiques entre les protéines et la membrane(66). Cela a permis de différencier différents types de protéines à l'aide d'une analyse du courant. En ajoutant des ligands mobiles à cette bicouche, ils ont pu augmenter la résolution temporelle et spatiale (figure 1.15).



**Figure 1.15** : Bio-nanopore synthétique. Une bicouche lipidique est déposée sur un nanopore artificiel, ce qui permet d'augmenter la résolution temporelle et spatiale par interaction d'une protéine avec son ligand (adapté de Yusko et al(66)).

### Transport de peptides et étude d'interactions

## Dans les nanopores protéiques

Les protéines sont des polymères chargés et complexes. Ce sont les éléments de structures secondaires et tertiaires qui donnent la structure tridimensionnelle finale d'une protéine(103). Pour connaître le paysage énergétique des protéines, il faut des expériences qui puissent sonder les états intermédiaires de repliement, soit à l'équilibre le long d'une courbe de dénaturation, soit hors équilibre lors d'une étude cinétique. La plupart des expériences sur le repliement de protéines *in vitro* sont faites en volume sur des protéines relativement petites et ne sont sensibles qu'au comportement moyen d'un ensemble macroscopique de molécules. Elles ne permettent pas d'identifier précisément des intermédiaires de repliement. En revanche des expériences en molécule unique permettent de sonder les conformations des protéines. Les nanopores offrent une alternative pour sonder ces paysages énergétiques d'une protéine au cours du dépliement. Les premières expériences sur des peptides ont été réalisées pour étudier leur structure.

La première expérience de translocation avec des peptides de structures différentes est réalisée dans l'alpha-hémolysine(104) en 2004. Sutherland *et al* utilisent des peptides contenant des répétitions de séquence (Gly-Pro-Pro) de tailles différentes qui existent dans les simples, doubles et triples hélices du collagène et montrent que la structure peut être identifiée selon le temps et le niveau de blocage de courant. Stefureac *et al* analysent le transport d'hélices alpha à travers l'alpha-hémolysine et l'aérolysine. Ils montrent que les temps de transport sont proportionnels à la longueur de la chaîne et ils observent des temps longs interprétés comme des interactions entre protéine et

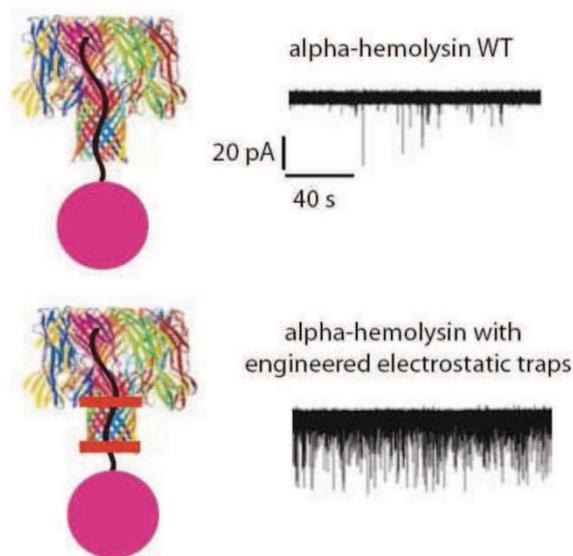
canal(105). Il a été montré récemment que le temps de blocage de courant, à travers l'aérolysine, pour une protéine dépliée doublait quand la taille de la chaîne augmentait d'un facteur deux. Cette expérience montre qu'il est possible d'associer le temps de blocage à de la translocation(13).

Jung *et al* analysent les effets de la température sur l'alpha-hémolysine contenant un polypeptide composé de boucles élastine-like (ELP) placées dans le vestibule du pore(106). Ils ont pu observer différents niveaux de bouchage dus à plusieurs conformations du peptide. Cette expérience montre que les nanopores protéiques sont sensibles à un état conformationnel.

Wolfe *et al* étudient les interactions entre résidus acide aspartique de polypeptides cationiques et le tonneau beta (tige) de l'alpha-hémolysine(107). L'intérêt d'une modification dans un nanopore protéique est d'augmenter les interactions entre la molécule passante et la nanopore dans le but de ralentir la dynamique de transport. Quand deux sites de fixation électrostatiques sont introduits à l'entrée et à la sortie du tonneau beta, les constantes d'association et de dissociation augmentent avec la barrière d'énergie libre pour la translocation. Au contraire, l'utilisation de polypeptides hydrophobes entraîne une diminution de la constante d'association et une baisse de la barrière énergétique due à la nature hydrophile de l'intérieur du pore. La modification de pores protéiques a permis d'étudier des interactions entre molécules. Le même groupe a analysé comment une protéine contenant un peptide signal en N-terminal chargé positivement, interagit avec des charges négatives à l'intérieur du canal(14). Ils étudient les interactions protéine-protéine (protéine liée à une ribonucléase barnase) grâce à l'alpha-hémolysine contenant un piège électrostatique formé par des anneaux de sept résidus acide aspartique placés à deux différentes positions dans la lumière du pore (figure 1.16). Cela leur a permis de démontrer la haute sensibilité de l'alpha-hémolysine

pour les interactions protéine-protéine en fonction de la longueur de la pré-séquence utilisée, des positions des pièges électrostatiques, de la force ionique de la phase aqueuse et du potentiel transmembranaire.

Des pores modifiés(108) contenant un site hydrophobe facilitent la translocation de peptides hydrophobes et diminue la vitesse de translocation(109) par rapport aux pores non modifiés. La même équipe utilise un nanopore pour l'analyse d'un peptide qui est clivé par réaction enzymatique à l'échelle de la molécule unique(110).



**Figure 1.16 :** Piège électrostatique à l'entrée et à la sortie de l'alpha-hémolysine interagissant avec les charges positives des protéines pour le contrôle d'interactions protéine-nanopore (adapté de (14)).

### Dans les nanopores artificiels

Grâce aux nanopores artificiels et à leur diamètre modulable, il est possible de montrer et d'analyser des interactions spécifiques comme des interactions entre un anticorps et un antigène, ou alors des interactions non spécifiques entre une protéine et une surface.

Le groupe de Martin analyse pour la première fois la différence de transport entre une protéine libre et une protéine liée à un anticorps dans un nanopore artificiel(108). Ils arrivent à distinguer deux signatures électriques dues à la conformation spatiale du complexe anticorps-antigène.

En 2008, Han *et al* utilisent un nanopore relativement plus petit(19). L'ajout d'un anticorps dirigé contre son antigène diminue la fréquence d'évènements dû à la taille du complexe qui ne peut plus traverser le pore de 28 nm.

Niedzwiecki *et al*(91) détectent par analyse du courant des temps de capture de la BSA très longs. Ils montrent alors que ces temps très longs seraient dus à des interactions non spécifiques sur la surface inorganique de nitrure de silicium et à deux orientations de la molécule dans le pore. Sexton *et al*(111) montrent aussi des temps longs de transport dus à des interactions non spécifiques entre un nanotube recouvert d'or et une protéine. Ils concluent qu'il y a des phénomènes d'absorption et de désorption des protéines sur la surface mais aussi que les petites protéines collent plus, mais moins longtemps que des protéines plus grosses.

### *Transport de protéines*

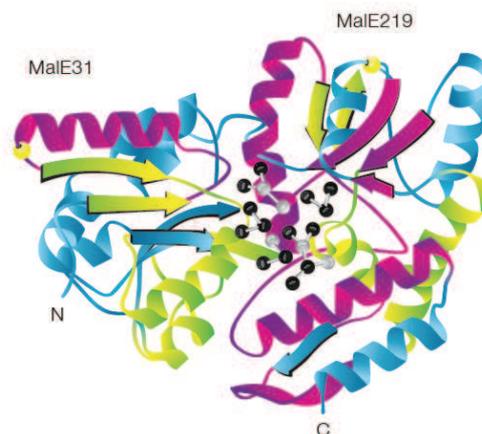
#### Dans les nanopores protéiques

Il est plus intéressant de travailler sur des protéines car les enjeux sont plus importants. En effet, en contrôlant la dynamique (vitesse) de transport d'une protéine, il serait possible de contrôler son repliement en sortie de nanopore.

La plupart des expériences publiées sur le transport de protéines dépliées à travers de nanopores protéiques ont été réalisées dans le laboratoire(11-13, 15).

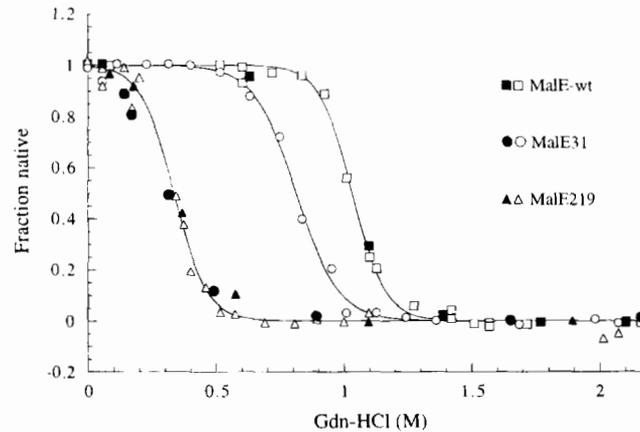
La protéine modèle utilisée dans le laboratoire pour les expériences de transport est la Maltose Binding Protein (MBP ou MalE) d'*Escherichia coli* (figure 1.17). Ce travail est réalisé en collaboration avec Jean-Michel Betton de l'Institut Pasteur. MalE est un récepteur périplasmique soluble pour le transport de malto-oligosaccharides. Cette fonction est essentielle pour les bactéries qui utilisent le maltose comme source de carbone. MalE est un excellent modèle pour la translocation et le repliement. En effet, cette protéine est naturellement transportée à travers SecYEG et son repliement est contrôlé par SecB(112).

Cette protéine est composée de 370 acides aminés et possède une charge nette négative à pH physiologique ( $Z = -8^e$ ,  $pI = 5.22$ ). Il existe deux mutants qui ont été produits par Jean-Michel Betton à l'Institut Pasteur : MalE219 qui est un mutant naturellement déficient dans la cellule pour le transport et MalE31 qui est un mutant déficient pour le repliement et qui forme des corps d'inclusion dans la bactérie(113, 114).



**Figure 1.17 :** Structure tridimensionnelle de MalE en présence de son ligand, le maltose (adapté de Raffy et al(114)).

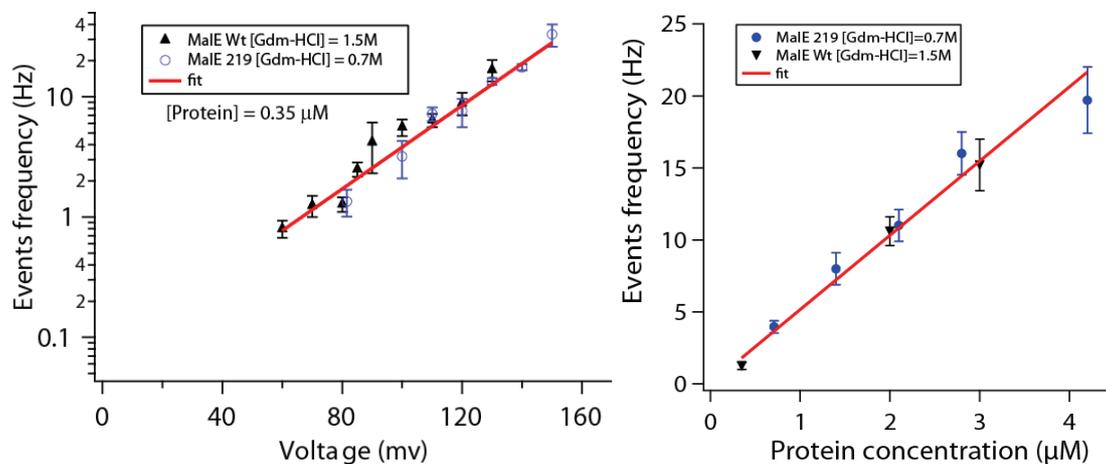
La dénaturation de ces trois protéines en fonction d'un agent dénaturant a été étudiée par fluorescence des tryptophanes. Cela a permis de montrer que MalE, MalE31 et MalE219 ont respectivement une stabilité qui décroît (figure 1.18).



**Figure 1.18** : Courbes de dénaturation de MalE, MalE 31 et MalE219 par fluorescence des tryptophanes.(114)

Les diamètres des pores d'alpha-hémolysine et d'aérolysine ne permettent pas le passage de protéines natives. Celles-ci doivent être obligatoirement dénaturées ou dépliées pour pouvoir passer au travers des pores, tout comme le transport de protéines à travers le translocon. Il a été étudié l'effet de la différence de potentiel appliquée sur la fréquence des événements de blocage de courant(8, 13) et sur le temps de résidence de protéines dépliées(13) et l'effet géométrique du pore sur la dynamique(12). Il a été observé pour l'alpha-hémolysine que la protéine dépliée (MBP) rentre du côté vestibule avec une plus haute fréquence que par la tige pour un voltage appliqué de 100 mV. Lorsque le vestibule est dénaturé à 4 M urée, la dynamique de translocation est ralentie de ce côté principalement dû à des interactions entre la protéine et la partie extramembranaire du pore dénaturée(12). La translocation de protéines dépend de la géométrie du pore. De plus, l'entrée de la protéine dépliée, quand la taille de la chaîne est plus grande que le diamètre du pore, est décrite par une loi de Van't Hoff-Arrhenius

associée à une barrière d'activation(8). Cette dépendance est en accord avec des observations ultérieures pour le transport d'ADN(115) ou de polyélectrolytes(116). Pour l'aérolysine(13), la fréquence de transport de protéines varie exponentiellement en fonction du voltage appliqué et linéairement avec la concentration en protéines utilisée (figure 1.19). Le temps de transport de protéines dépliées diminue exponentiellement lorsque le voltage appliqué augmente. Ils ont prouvé que le temps de translocation est doublé pour une double MBP (séquence tandem) comparé au temps de translocation de la simple MBP.



**Figure 1.19** : A gauche, fréquence des évènements de blocage en fonction du potentiel appliqué. A droite, fréquence de blocages en fonction de la concentration en protéine MalE.(13)

#### Dans les nanopores artificiels

C'est en 2006 que la première expérience de transport de protéines a lieu à travers un nanopore artificiel.(117) Ce groupe a étudié le passage de la Bovine Serum Albumin (BSA) dans un pore de nitrure de silicium d'une épaisseur de 20nm et de diamètre de 50nm. Ce pore a donc un diamètre bien supérieur à celui de la BSA qui n'a pas besoin

d'être dénaturée pour pouvoir être transportée d'un compartiment à un autre. Ils ont pu corrélérer chaque chute de courant au passage d'une protéine en calculant le taux de bouchage ou volume exclu.

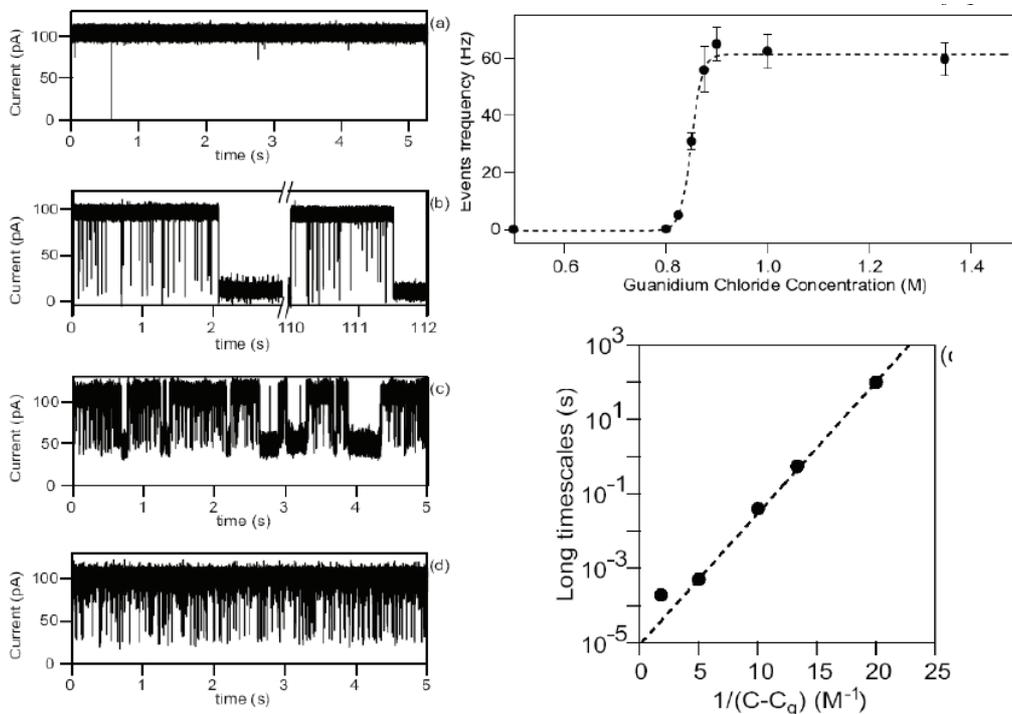
Fologea *et al*(20) analysent eux aussi les courants de blocages causés par le passage de la BSA. En calculant l'amplitude, la durée et l'intégrale des courants de blocages, ils ont pu estimer la charge relative et la taille de la protéine à l'échelle de la molécule unique. Ils ont aussi estimé la charge de la protéine à différents pH, prouver la translocation grâce à une analyse de luminescence et distinguer par analyse des courants de blocage, le fibrinogène de la BSA.

Talaga *et al*(21) étudient le passage de protéines natives, partiellement et complètement dépliées en mesurant le volume exclu. Ils suggèrent que les protéines sont transportées linéairement ou peu repliées et que le champ électrique appliqué pourrait dénaturer les protéines.

### *Déplie ment de protéines*

L'idée de regarder le dépliement de protéines à travers un nanopore a été faite dans le cadre de la thèse de Ghani Oukhaled au sein du laboratoire avec l'alpha-hémolysine. C'est en 2007 pour la première fois que la détection électrique est utilisée pour le transport et le dépliement d'une protéine, la MBP, à travers un canal unique d'alpha-hémolysine en fonction de la concentration en agent dénaturant, le guanidium-HCl(8). Il a été montré l'existence de courts et longs blocages de courant. Les blocages courts sont associés à des passages de protéines dépliées, leur durée est indépendante de la concentration en guanidium utilisée. La fréquence de ces évènements augmente lorsque

l'on augmente la concentration en agent dénaturant et suit une courbe de dénaturation de type sigmoïde. Les longs blocages eux sont dus à l'existence de conformations de protéines partiellement dépliées qui restent bloquées dans le pore. La durée de ces évènements longs diminue lorsque l'on augmente la concentration en guanidium. La variation de ces longs blocages en fonction de la concentration en agent dénaturant, suit une loi de Vogel-Tamman-Fucher, qui pourrait correspondre à une dynamique de transition vitreuse (figure 1.20).



**Figure 1.20:** Dépliement de protéines détecté par analyse à travers un nanopore protéique d'alpha-hémolysine. (a, b, c, d) Traces de courant à travers un pore d'alpha-hémolysine en fonction de la concentration en agent dénaturant croissante. On remarque que le nombre d'événements courts augmente avec la concentration d'agent dénaturant, alors que les événements longs diminuent. (en haut à droite) Fréquence d'évènements courts en fonction de la concentration en guanidium. (en bas à droite) Représentation de Vogel-Tammann-Fulsher des temps de longs blocages de courant.(8)

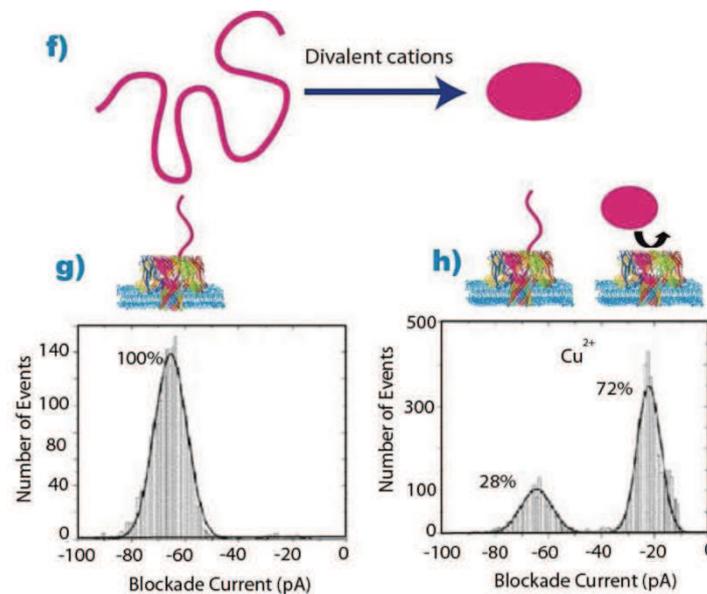
C'est dans le cadre de la thèse de Céline Merstorf en 2011, avec un nouveau canal, l'aérolysine de diamètre plus petit et de charge nette différente par rapport à l'alpha-hémolysine, qu'elle montre que le dépliement de protéines ne dépend pas de la nature du canal(22). Lorsque l'on change la nature du canal, l'étude du dépliement de la MBP par le guanidium montre l'existence également de blocages de courant courts et longs associés respectivement aux protéines dépliées ou partiellement repliées. Après normalisation, la courbe de dépliement de la protéine à travers l'aérolysine est superposable à celle obtenue avec l'alpha-hémolysine(22). Afin de montrer que les nanopores associés à une détection électrique sont performants pour étudier le dépliement de protéines, de nouvelles expériences sont réalisées en changeant la température(15).

Le même type de courbe de dénaturation sigmoïdale est trouvé pour l'évolution des fréquences des évènements de blocage de courant en fonction de la température pour chacun des pores. La température de transition déterminée par les nanopores est la même que celle trouvée avec une expérience en solution(15).

Des travaux ont été publiés sur l'étude par détection électrique du repliement de petites protéines intrinsèquement désordonnées(16, 18), c'est à dire des protéines dont une partie ou toute la chaîne ne possède pas de structure tridimensionnelle(118) mais qui n'affecte pas la fonction biologique. La même équipe utilise plus tard la Myelin Basic Protein pour suivre son repliement en présence de cations divalents par analyse de l'évolution du courant électrique à travers l'alpha-hémolysine(17). En effet, cette protéine est naturellement dépliée. Elle peut donc passer à travers l'alpha-hémolysine sans utiliser d'agent dénaturant. Le repliement de cette protéine est induit grâce à des cations divalents zinc ou cuivre. Après l'ajout de cations, ils ont pu voir une diminution du temps de transport et d'évènements par rapport à la protéine naturellement dépliée.

En effet, celle-ci étant repliée elle ne peut plus traverser le pore qui a un diamètre trop petit. Grâce à l'ajout d'EDTA qui est un chélateur d'ions, ils ont induit le dépliement de la myéline, ce qui a permis une restauration du nombre d'évènements et du temps de transport initial (figure 1.21). Toujours grâce aux cations divalents, Stefureac *et al* montrent que la conformation de la protéine de prion PrP et les peptides de prion peuvent être modulés(119).

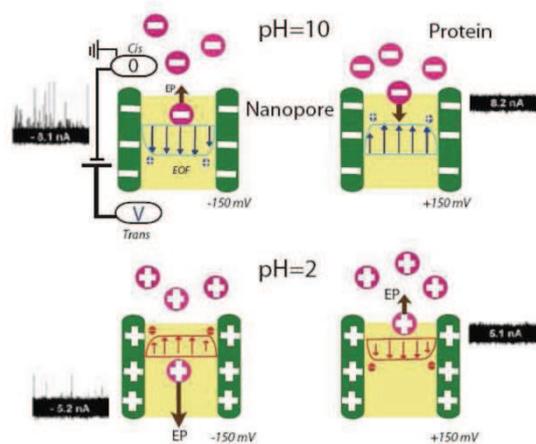
Jusqu'à présent, la dynamique de transport de protéines dépliées ou partiellement repliées a été étudiée et on espère pouvoir utiliser des nanopores passifs protéiques ou artificiels pour assister leur repliement.



**Figure 1.21 :** Des cations divalents induisent le repliement d'une protéine naturellement dépliée. La protéine complètement dépliée peut alors être transportée à travers un pore d'alpha-hémolysine. En présence de cations divalents, le proportion d'évènements de translocation diminue (adapté de Stefureac *et al*(17)).

### Phénomène d'électro-osmose dans les nanopores artificiels

Le transport de protéines dans des nanopores artificiels peut s'avérer anormal au niveau du taux de passage ou de la durée des événements comparé à la théorie. Firnkes *et al*(120) ont donc analysé le transport de l'Avidine en fonction du pH. Ils ont mis en évidence un phénomène d'électro-osmose qui peut soit être dominé ou au contraire dominant sur la force électrophorétique. Ils montrent qu'il est possible de prédire le sens de transport en fonction de la différence entre le potentiel zeta de la protéine et celui du pore, et du potentiel appliqué. Lorsque l'électrophorèse et l'électro-osmose s'annulent, ils montrent que la diffusion devient le seul phénomène qui gouverne le transport de protéines (figure 1.22).



**Figure 1.22 :** Transport de protéine contrôlé par le flux électro-osmotique et l'électrophorèse à travers un nanopore artificiel. A pH=10, l'électro-osmose domine sur l'électrophorèse. A pH=2 c'est l'électrophorèse qui domine sur l'électro-osmose (adapté de Firnkes *et al*(120)).

### 1.3 Rappels théoriques et outils pour l'analyse du signal électrique

Pour décrire les effets attendus dans nos expériences et pour fixer les ordres de grandeur nous rappelons quelques éléments de calcul de la conductance électrique de pores de différentes natures, géométries et la variation de la conductance électrique du

pore permettant d'évaluer la taille de l'objet présent dans le pore. Nous décrivons brièvement l'estimation de la dimension d'une protéine que l'on traite comme un polyélectrolyte et les phénomènes d'écrantage. Puis nous examinons les phénomènes dynamiques et électrocinétiques liés au transport de protéines à travers un pore nanométrique. Dans une dernière partie, nous traiterons l'aspect d'analyse de données et du signal électrique.

### 1.3.1 Résistance électrique d'un pore

La conductance du pore  $G$  est l'inverse de la résistance du pore  $R$ . La résistance d'un pore cylindrique ou conique de diamètre  $D$  percé dans une membrane de longueur  $L$ , est donnée par  $R(\Omega) = \rho \int dz/A(z)$ , où  $\rho$  ( $\Omega.m$ ) est la résistivité de la solution,  $A(z)$  est la section du pore et  $z$  est un axe orienté perpendiculairement à la surface de la membrane. Nous distinguons deux situations : des pores cylindriques (pores percés par FIB et pores protéiques) et des pores double coniques (pores percés par TEM).

Dans le cas des pores protéiques et des pores percés par FIB, le diamètre du pore est inférieur à l'épaisseur de la membrane  $L$  ( $D_{\text{pore}} < L_{\text{membrane}}$ ), la résistance d'accès est négligeable donc la résistance du pore est simplement donnée par  $R = 4\rho L/(\pi D^2)$ . Cette relation permet de nous donner un bon ordre de grandeur du diamètre du pore. Dans le cas contraire ( $D_{\text{pore}} > L_{\text{membrane}}$ ), la résistance d'accès  $R_{\text{acc}} = 2D/\rho$  doit être prise en compte ( $R_{\text{pore}} = 4\rho L/(\pi D^2) + 2D/\rho$ ).

Dans le cas de pores percés par TEM, il a été prouvé que la géométrie du pore ressemble à deux cônes symétriques connectés par une partie cylindrique(121). La résistance totale du pore est donc  $R_{\text{pore}} = 2R_{\text{cône}} + R_{\text{cylindre}} + R_{\text{accès}}$ .

Soit  $R_{\text{pore}} = 8\rho L_{\text{cone}}/(\pi \cdot D_{\text{pore}} \cdot D_{\text{cylindre}}) + 4\rho L_{\text{cylindre}}/(\pi D_{\text{cylindre}}^2) + 2D_{\text{cylindre}}/\rho$ .

Cette relation nous permet d'estimer la longueur effective du pore (longueur de la partie cylindrique du pore).

### 1.3.2 Variation de la résistance du pore et estimation de la taille de l'objet dans le pore

La variation d'amplitude du courant électrique due à la présence d'un objet sphérique (protéine native) dépend non seulement de la taille de l'objet mais aussi de la taille du pore. Le premier à avoir calculé la variation de résistance engendré par la présence d'un objet sphérique au sein d'un pore fut Maxwell(122).  $\Delta R/R \propto \Delta I/I \propto \text{Volume}_{\text{objet}}/\text{Volume}_{\text{pore}}$  (valide dans le cas où la taille de l'objet est très inférieure à la taille du pore).

La présence d'une protéine dans le pore (assumé sphérique) réduit le courant électrique, d'une variation mesurable  $\Delta I$ , qui est directement proportionnel au volume exclu(56) de la protéine  $\Lambda$  ( $\text{m}^3$ ). Soit  $\Delta I \cong E\Lambda/(\rho L_{\text{pore}})$ . Expérimentalement, l'histogramme de la variation de courant  $\Delta I$  donne un excellent ordre de grandeur de la dimension de la protéine.

### 1.3.3 Estimation de la dimension d'une protéine

Les protéines sont des systèmes plus complexes que les polymères et les polyélectrolytes. On les répertorie dans la classe des polyampholytes. Naïvement on peut traiter les protéines comme un polymère. La taille moyenne  $R$  du polymère dépend

du nombre de monomères  $N$  selon la loi de puissance suivante :  $R = aN^{\nu}$ ,  $a$  étant la taille d'un monomère et  $\nu$  l'exposant universel en relation avec la conformation de la chaîne. La dimension fractale du polymère est l'inverse de l'exposant  $\nu$ . Dans un bon solvant les interactions du volume exclu sont répulsives et la chaîne est gonflée ( $\nu = 3/5$ , cas des protéines complètement dépliées). Dans un mauvais solvant les interactions entre monomères sont attractives et la chaîne est compacte ( $\nu = 1/3$ , cas des protéines natives).

#### 1.3.4 Effets électrostatiques

Lorsque l'on met une protéine dans une solution d'électrolytes, chaque site chargé de la protéine peut attirer des contre ions de signe opposé. Les sites chargés de la protéine vont alors s'entourer d'une couche d'ions de signes opposés. L'épaisseur de cette couche dépend de la force ionique  $I$  (la concentration en sel) appelée couche de Debye. On la note  $\kappa^{-1}$  homogène à une longueur. C'est la distance au delà de laquelle les interactions électrostatiques sont écrantées. Soit  $\kappa^{-1} = (8\pi l_B I)^{-0.5}$  où  $l_B$  est la longueur de Bjerrum (longueur pour laquelle les interactions électrostatiques sont de l'ordre de  $k_B T$ , à  $25^\circ\text{C}$   $l_B = 7.15\text{\AA}$ ) et  $I$  est la force ionique exprimée en  $\text{ions}\cdot\text{m}^{-3}$ . On peut écrire  $\kappa^{-1} (\text{nm}) = 0.3/c^{1/2}$ ,  $c$  (M) étant la concentration en sel.

### 1.3.5 Dynamique de transport

Depuis longtemps, plusieurs théoriciens se sont intéressés à comprendre le comportement et la dynamique d'une chaîne de polymère dans un milieu confiné. On peut citer les travaux de P-G de Gennes et de F Brochard(123) concernant la dynamique d'une chaîne de polymère neutre et flexible dans un canal infiniment long. Ils ont prédits que le temps de passage de la chaîne varie comme  $\tau = (a/D)^{2/3} * (L_{\text{pore}}^2 \eta N a) / k_B T$ , avec  $\eta$  (Pa.s) la viscosité de la solution. Grâce à des expériences récentes avec des nanopores courts, plusieurs théories prédisant le temps de translocation de polymères à travers un nanopore ont vu le jour. On peut citer les travaux de Lee et Obukhov(124) où le temps de translocation d'un polymère neutre à travers un pore fin varie comme le carré du degré de polymérisation  $N$  ( $\tau \sim N^2$ ) confirmé par des simulations numériques(125). Le temps de translocation de polymères uniformément chargés comme l'ADN à travers un pore protéique (alpha-hémolysine) varie comme  $N$ .(126) Cependant à travers un pore solide, ce temps varie comme  $N^{1.27}$  du principalement à la friction du solvant sur la chaîne à l'extérieur du pore, en accord avec la prédiction théorique(127). Jusqu'à présent, très peu de travaux ont été effectués sur le transport de protéines dans des nanopores. Il n'est pas possible de décrire expérimentalement une dépendance des temps de transport en fonction de la taille de la protéine. Néanmoins, des travaux théoriques prédisent le temps de translocation(19).

#### *Temps de translocation électrophorétique sous l'action d'un champ électrique*

Une chaîne chargée soumise à un champ électrique  $E$  peut être transportée à travers un pore. Ce phénomène est appelé électrophorèse. La vitesse électrophorétique  $v$  de la chaîne est proportionnelle au champ électrique appliqué et inversement proportionnel à sa taille,  $v = |z|eE/6\pi\eta R_H$  avec  $e$  la charge élémentaire,  $z$  le nombre de charges et  $R_H$  le rayon hydrodynamique de la chaîne.

Il en découle que le temps de translocation électrophorétique  $\tau_{el} = L/v = (L^2/V)*(6\pi\eta R_H)/Q$ , avec  $Q = |z|e$ .

### *Temps de translocation par diffusion pure*

Le temps de translocation par diffusion pure est donné par  $\tau_{diff} = \frac{L^2}{D} = (6\pi\eta R_H/k_B T)*L^2 = \tau_{el} * QV/k_B T$ . Cette simple prédiction théorique ne rend pas bien compte des temps mesurés expérimentalement ni à travers un nanopore protéique ni à travers un nanopore solide. Les temps expérimentaux sont environ 1000 fois plus grands que ceux prédits théoriquement. Ce désaccord est dû principalement au fait que la prédiction théorique suppose que le transport est gouverné purement par l'électrophorèse, et ne tient pas compte d'éventuels autres effets tels que les interactions et le phénomène d'électro-osmose que nous allons décrire plus loin. Les mesures expérimentales montrent que le temps de résidence des protéines dans les pores protéiques et solides décroît exponentiellement avec la force électrique appliquée, dans une gamme de forces électriques modérée, ce qui explique en effet que le transport de protéines à travers les pores solides et protéiques n'est pas électrophorétique mais plutôt gouverné par une barrière d'énergie. Cependant, dans une gamme de force électrique relativement élevée, le temps de résidence des protéines décroît comme l'inverse de la force électrique,

favorisant ainsi le phénomène d'électrophorèse. Ce résultat est cohérent avec le mécanisme de translocation où la protéine est confinée dans le pore traversant un paysage de barrière entropique suivie par un transport électrophorétique. Par ailleurs la dynamique des systèmes chargés à travers les nanopores a été étudiée aussi numériquement par la dynamique moléculaire en utilisant le model gros grain(36-38). La simulation montre l'existence de ces deux régimes en fonction de la force électrique appliquée(128).

### *Electro-osmose*

Le flux électro-osmotique est le déplacement de solvant à travers un nanopore artificiel chargé dû à l'application d'un potentiel électrique. La vitesse du solvant est donnée par l'équation de Smoluchowski  $v_s \left(\frac{m}{s}\right) = \frac{-\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta_{pore}}{\eta} E$ , où  $\zeta_{pore}$  est le potentiel zeta de la surface du canal,  $\eta$  la viscosité du solvant,  $\varepsilon, \varepsilon_0$  ( $Fm^{-1}$ ) la constante diélectrique de l'eau et la permittivité du vide, et  $E$  le potentiel électrique appliqué. La vitesse électrophorétique de la protéine sous l'action du potentiel électrique dans la limite d'Helmholtz-Smoluchowski est donnée par  $v_{prot} \left(\frac{m}{s}\right) = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta_{prot}}{\eta} E$ . La vitesse totale de la protéine est donc  $v \left(\frac{m}{s}\right) = v_{prot} + v_s = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot E}{\eta} (\zeta_{prot} - \zeta_{pore})$ .

### *Fréquence des événements*

La fréquence de blocage  $f$  est donnée par la relation de Van't Hoff-Arrhenius

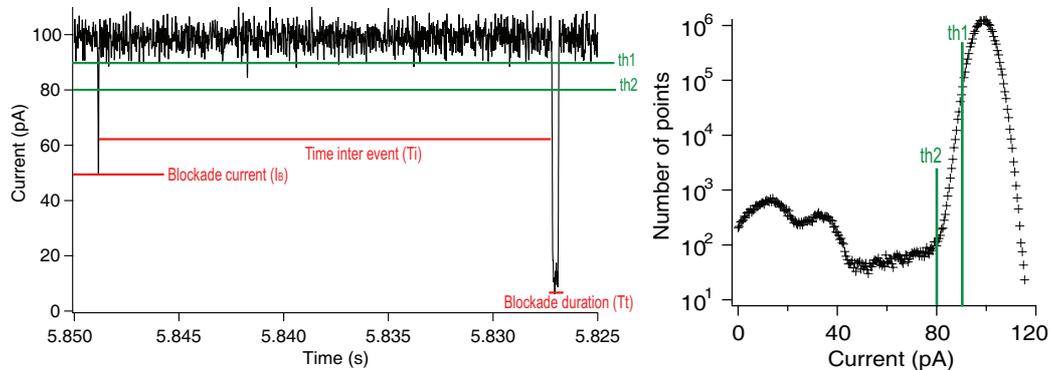
$f = p \nu \exp\{-(U^*-\Delta U)/k_B T\}$  où  $p$  est un facteur de probabilité,  $\nu$  une fréquence microscopique,  $U^*$  l'énergie libre d'activation du processus ou la hauteur de la barrière d'énergie associée et  $\Delta U$  la diminution de la hauteur de la barrière due au potentiel appliqué  $V$ .  $\Delta U = zeV$ ,  $z$  est le nombre de charges effectives. En l'absence de potentiel, la fréquence de blocage est  $f_0 = p \nu \exp(-U^*/k_B T)$ . Globalement,  $f$  s'écrit  $f = f_0 \exp(zeV/k_B T)$ . Pour obtenir une estimation de l'énergie d'activation,  $p = 1$  et  $\nu \cong C D_{\text{diff}} A/l$  où  $C$  est la concentration des protéines en volume,  $D_{\text{diff}}$  est le coefficient de diffusion,  $A$  est l'aire de la section du canal et  $l$  est la largeur de la barrière.

### 1.3.6 Analyse du signal

Les courants enregistrés durant les expériences sont de l'ordre du pico-ampère pour les nanopores protéiques au nano-ampère pour certains nanopores artificiels. Le signal est donc nécessairement amplifié avant de le traiter. On utilise un amplificateur Axopatch 200B de la société Axon Instruments. Le signal est ensuite filtré à 10kHz, puis converti en signal numérique grâce à une carte d'acquisition Digidata 1322A d'Axon Instruments. La fréquence d'échantillonnage du signal est fixée à 250kHz, soit une mesure du courant toutes les 4µs.

La mesure des passages de molécules est basée sur l'analyse statistique des traces de courant. Les données sont systématiquement vérifiées différentes fois. La difficulté principale de l'analyse des données est de séparer les impulsions du courant électrique du bruit. Un premier seuil  $th1$  est défini comme le courant moyen du pore ouvert  $\langle I_0 \rangle$  moins deux fois la déviation standard  $\sigma$  de la distribution,  $th1 = \langle I_0 \rangle - 2\sigma$ , ce qui permet

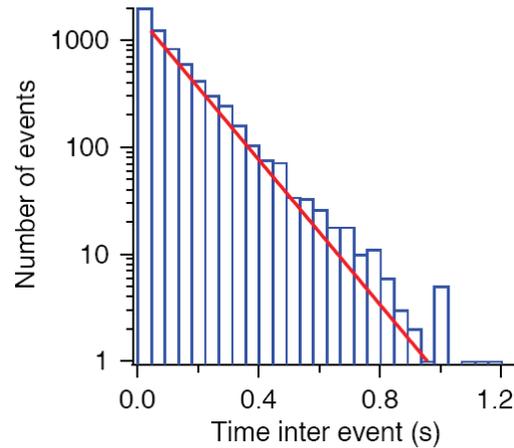
de sortir du bruit. On définit alors un second seuil  $th2$ , comme  $th2 = \langle I_0 \rangle - 3\sigma$ , qui permet de discriminer les passages de molécules des attaques (figure 1.23).



**Figure 1.23:** Exemple de seuillages. Le premier seuil  $th1$  permet de sortir du bruit. Le second seuil  $th2$  permet de discriminer les passages de molécules des attaques.

### Mesure de la fréquence des évènements

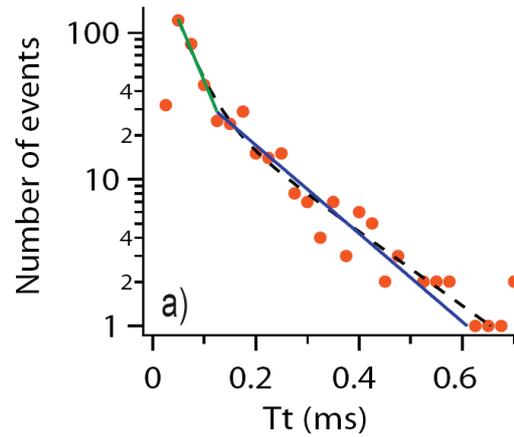
La fréquence caractérise le nombre d'évènements comptabilisés par seconde. Un bon moyen d'estimer cette fréquence est de tracer l'histogramme de la distribution de ces évènements (échelle logarithmique) en fonction de la durée entre évènements, noté  $T_i$  (figure X). Si deux évènements successifs ne sont pas corrélés, la dépendance des évènements doit être exponentielle. La fréquence des évènements  $f$  est obtenue en ajustant l'histogramme par une exponentielle décroissante,  $y = A \exp\left(\frac{-1}{\tau} \times T_i\right)$ , avec  $A$  un préfacteur exponentiel (figure 1.24).



**Figure 1.24** : Histogramme de la distribution des évènements en fonction du temps inter-évènements  $T_i$ . En rouge,  $y = A \exp\left(\frac{-1}{\tau} \times T_i\right)$ .

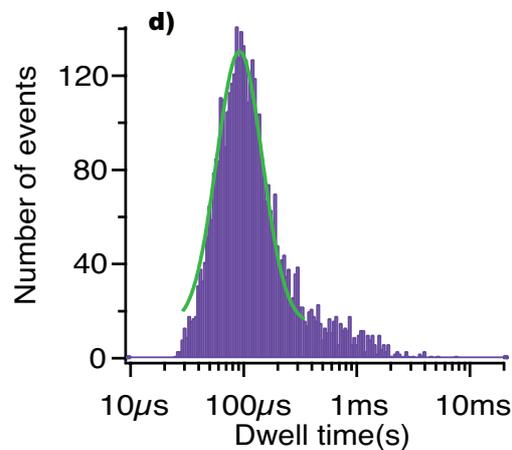
### Mesure de la durée des blocages de courant

Le calcul des temps de résidence se fait en traçant l'histogramme représentant le nombre d'évènements en fonction de leur durée  $T_t$  (Figure X). En général, deux populations d'évènements se distinguent. Des évènements de blocage courts, notés  $\tau_1$ , correspondant à des évènements d'attaque de molécules à la surface du pore, sans que la molécule soit transportée à travers le pore. Et aussi des évènements de blocage plus longs, notés  $\tau_2$ , correspondant au passage d'une molécule dans le pore. Les temps moyens  $\tau_1$  et  $\tau_2$  sont mesurés à l'aide d'une exponentielle donnée par  $y_1 = A_1 \exp\left(\frac{-T_t}{\tau_1}\right)$  et  $y_2 = A_2 \exp\left(\frac{-T_t}{\tau_2}\right)$  respectivement. Le temps moyen de translocation  $\tau$  est obtenu grâce à une double exponentielle (figure 1.25) donnée par  $y = A_1 \exp\left(\frac{-T_t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-T_t}{\tau_2}\right)$ .



**Figure 1.25:** Histogramme du nombre d'évènements en fonction de la durée des évènements. En vert,  $y_1 = A_1 \exp\left(-\frac{Tt}{\tau_1}\right)$ . En bleu,  $y_2 = A_2 \exp\left(-\frac{Tt}{\tau_2}\right)$ . En pointillés,  $y = A_1 \exp\left(-\frac{Tt}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{Tt}{\tau_2}\right)$ .

Le maximum de la distribution des histogrammes des temps (figure 1.26) nous donne le temps le plus probable.



**Figure 1.26:** Histogramme du nombre d'évènements en fonction de la durée des évènements. Le temps le plus probable est donné par le maximum de la distribution.



## 2 Dépliage d'une protéine recombinante déstabilisée par transport à travers un nanopore protéique

Les travaux réalisés durant la thèse de Ghani Oukhaled ont montré qu'il est possible de suivre le dépliage d'une protéine sauvage, MalE, à l'échelle de la molécule unique à travers un canal protéique, l'alpha-hémolysine(8). En présence de la protéine, il a été montré l'existence de blocages de courant courts et longs en fonction de la concentration en agent dénaturant. La fréquence de passage des événements de blocages courts ( $t \approx 200 \text{ ns}$ ) augmente de façon sigmoïdale avec la concentration en agent dénaturant et cette dépendance est équivalente à celle obtenue dans des expériences de dénaturation en volume(114). Il a démontré l'existence de protéines partiellement repliées dans la zone de transition de la courbe dénaturation correspondant aux blocages de courant longs associés. En augmentant la concentration en chlorure de guanidium, la durée des blocages longs (quelques secondes) diminue jusqu'à atteindre un plateau correspondant aux temps courts. Cela montre l'existence de nombreuses conformations partiellement repliées. Ces conformations coexistent également avec des conformations dépliées et natives pour une concentration donnée en agent de dénaturation. Ce comportement observé suggère l'existence d'une dynamique de transition vitreuse pour cette protéine(129, 130).

Ce travail soulève de nouvelles questions. La technique de nanopore associée à une détection électrique est-elle sensible pour explorer le dépliage d'une protéine dont une mutation pourrait modifier sa dynamique de transition de dénaturation ? Est-il possible de comparer cette transition à celle obtenue en volume ? La géométrie du pore

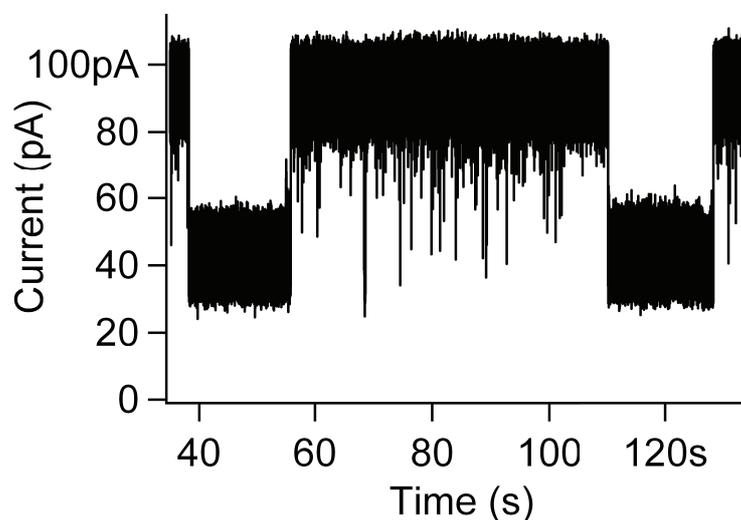
a-t-elle une influence sur la transition de dépliement d'une protéine et sur sa dynamique de transport ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé la protéine MalE219. Les acides aminés Gly220 et Glu221 de MalE ont été substitués respectivement par Asp et Pro.(114) Ces deux acides aminés se trouvent dans une boucle reliant une hélice  $\alpha$  à un brin  $\beta$  dans le domaine C-ter de la protéine ce qui diminue fortement la stabilité de la protéine. Une étude de la dénaturation de MalE219 par fluorescence des tryptophanes confirme cette hypothèse. Cette mutation entraîne également une déficience dans le transport du maltose dans la cellule.

Ma contribution dans l'article publié dans ACS Chemical Biology, porte sur l'expression et la purification de MalE219, son transport et dépliement à travers l'alpha-hémolysine. L'étude du transport et dépliement de MalE à travers l'aérolysine a été effectuée par Céline Merstorf durant sa thèse au sein du laboratoire (soutenue en décembre 2011).

Nous avons contrôlé systématiquement qu'un seul pore était inséré dans la membrane lipidique et que le guanidium ne dénaturait pas le pore par des courbes courant-tension réalisées pour les différentes concentrations en guanidium utilisées. Nous avons étudié l'évolution des traces de courant en présence de protéines en faisant varier la concentration en agent de dénaturation. En absence de protéine, nous n'observons pas de chute de courant. Pour une concentration égale à 0.35M de guanidium, nous observons des chutes de courant dépendant de la conformation de la protéine, c'est à dire des blocages courts et des blocages longs de courant (figure 2.1). Pour la protéine sauvage aucun blocage n'est observé à cette concentration en guanidium. Les temps courts ( $\langle t \rangle = 208 \pm 74 \mu\text{s}$ ) sont indépendants de la concentration en guanidium, on associe ces durées au transport de protéines dépliées. Les temps longs ( $\langle t \rangle = 75 \pm 47 \text{ s}$ )

sont associés à des conformations de protéines partiellement dépliées. Le niveau de blocage de courant est le même, pour les courtes et longues durées dans les barres d'erreurs, donc une partie de la chaîne est insérée dans l'alpha-hémolysine, et l'autre partie repliée, est à l'extérieur du pore. Ces longs temps de blocages correspondraient à la durée requise pour déplier la protéine partiellement repliée par la force électrique. La fréquence de ces blocages longs diminue lorsque l'on augmente la concentration en agent dénaturant, jusqu'à 0.42M guanidium. Nous pensons que la partie repliée à l'extérieur du nanopore est progressivement dépliée par l'augmentation de la concentration en agent dénaturant. Contrairement à ce qui a été montré dans l'étude de Ghani Oukhaled sur la protéine sauvage MalE, il a été impossible de démontrer une dynamique de transition vitreuse pour cette protéine instable. Les temps longs étant moins nombreux que pour la protéine sauvage, il n'a pas été possible de faire une analyse statistique consistante pour démontrer cette dynamique.



**Figure 2.1 :** Exemple de blocage de temps long à 0.35 M guanidium.

Pour comprendre si la géométrie de l'alpha-hémolysine aurait une influence sur le dépliement et la translocation de MalE219, nous avons étudié son transport selon

l'entrée par la tige ou le vestibule du pore. Les temps de blocages selon le sens d'entrée dans le pore sont similaires ( $\langle t_{\text{short}} \rangle = 250 \pm 14$  ns). Donc, le temps de translocation ne dépend pas du sens d'entrée du canal. Ce résultat avait déjà été observé avec des polyélectrolytes(131). En revanche, les fréquences d'entrée par le vestibule sont plus importantes que par le stem, ce qui est en accord avec des travaux déjà effectués sur des polyélectrolytes(131) et MalE.(12) La protéine dépliée MalE219 rentre plus facilement par le vestibule dont le diamètre du pore est plus grand que par la tige ( $f_{\text{vestibule}} = 32 \pm 1$  Hz et  $f_{\text{tige}} = 17 \pm 0.5$  Hz à 0.5 M guanidium).

La variation de la fréquence des événements de blocages courts en fonction de la concentration en guanidium, suit une dépendance sigmoïdale, indépendante de l'entrée de MalE dans l'alpha-hémolysine. Nous trouvons que les concentrations de demi-dénaturation pour MalE219 sont identiques :  $c_{\text{transition}} = 0.49 \pm 0.01$  M coté vestibule, et  $c_{\text{transition}} = 0.52 \pm 0.04$  M coté tige. La fréquence maximum d'évènements courts est normalisée, permettant de connaître le pourcentage de protéines complètement dépliées en fonction de la concentration en guanidium. La représentation des fréquences ainsi normalisée est une courbe de dénaturation unique de MalE219, comprenant le transport par le vestibule et par la tige. Nous trouvons alors  $c_{\text{transition}} = 0.5 \pm 0.01$  M. Pour les expériences en volumes,  $c_{\text{transition}} = 0.35 \pm 0.01$  M. La différence entre ces deux valeurs peut être due aux paramètres mesurés dans chaque technique. Les émissions de fluorescence des tryptophanes de différentes conformations de protéines ne peuvent être séparées en volume.

Nous avons montré que la technique de nanopore couplée à une détection électrique est sensible pour suivre le dépliement d'une protéine dont une mutation modifie sa dynamique de transition de dénaturation. Il est possible de comparer cette transition à

celle obtenue en volume. La géométrie du pore n'influence pas la transition de dépliement d'une protéine mais son entrée dans le pore.



# Wild Type, Mutant Protein Unfolding and Phase Transition Detected by Single-Nanopore Recording

Céline Merstorf,<sup>†,‡</sup> Benjamin Cressiot,<sup>†,‡</sup> Manuela Pastoriza-Gallego,<sup>†</sup> Abdelghani Oukhaled,<sup>†</sup> Jean-Michel Betton,<sup>‡</sup> Loïc Auvray,<sup>§</sup> and Juan Pelta<sup>\*,†</sup>

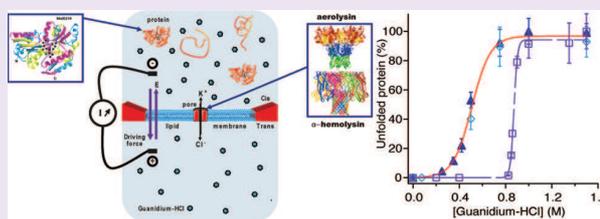
<sup>†</sup>LAMBE CNRS-UMR 8587, Université d'Evry and Université de Cergy-Pontoise, France

<sup>‡</sup>Unité de Biochimie Structurale, CNRS-URA Institut Pasteur, France

<sup>§</sup>Matière et Systèmes Complexes, CNRS-UMR 7057, Université Paris Diderot, France

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** Understanding protein folding remains a challenge. A difficulty is to investigate experimentally all the conformations in the energy landscape. Only single molecule methods, fluorescence and force spectroscopy, allow observing individual molecules along their folding pathway. Here we observe that single-nanopore recording can be used as a new single molecule method to explore the unfolding transition and to examine the conformational space of native or variant proteins. We show that we can distinguish unfolded states from partially folded ones with the aerolysin pore. The unfolding transition curves of the destabilized variant are shifted toward the lower values of the denaturant agent compared to the wild type protein. The dynamics of the partially unfolded wild type protein follows a first-order transition. The denaturation curve obtained with the aerolysin pore is similar to that obtained with the  $\alpha$ -hemolysin pore. The nanopore geometry or net charge does not influence the folding transition but changes the dynamics.



Understanding how proteins fold remains one of the fundamental problems in biology and physics.<sup>1</sup> This mechanism also has considerable medical relevance and potential applications. Many experimental methods, simulations, and theories explore protein folding mechanisms,<sup>2,3</sup> but one of the main difficulties is to access the conformational space experimentally. Two single-molecule methods have been used to study protein conformations, fluorescence spectroscopy<sup>4</sup> and AFM-based force spectroscopy,<sup>5</sup> but neither permit the complete separation of all of the conformations. We propose another method to study the protein folding at the single molecule level using nanopores and electrical detection.

Biological or synthetic macromolecules can be electrically driven through a nanopore,<sup>6–8</sup> and this kind of manipulation is now widely used and has many important potential applications.<sup>9–12</sup> Nanopores have been used to study protein transport,<sup>12–25</sup> nanopore–protein interactions,<sup>12,26–28</sup> and protein–protein interactions<sup>18,23</sup> and recently to investigate protein conformations in different conditions.<sup>20,21,28–31</sup> Nevertheless, up to now, the conformational space of native or variant proteins and their unfolding transition using single-nanopore have been less studied.

We have previously shown, using the  $\alpha$ -hemolysin pore and maltose binding protein (MBP or MalEwt), that unfolded proteins induce short current pore blockades and their frequency increases as the concentration of denaturing agent increases, following a sigmoidal denaturation curve. We have also observed very long blockades in channels associated with partially folded proteins.<sup>21</sup> Here, we study the destabilized

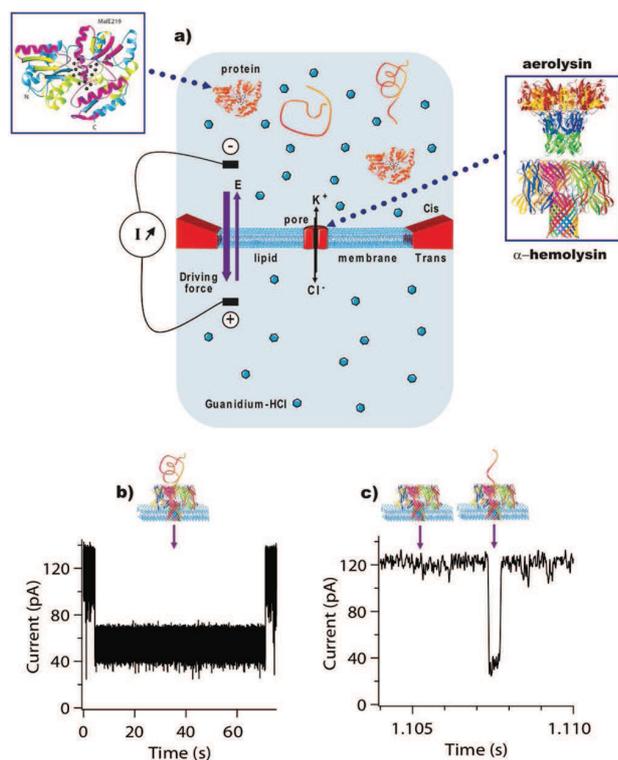
variant of maltose binding protein unfolding through the vestibule and stem side entry of the  $\alpha$ -hemolysin pore, and we compare the unfolding transition of the wild type and the destabilized variant. We study also the denaturation of MalEwt using a different channel, aerolysin, in order to probe the influence of the geometry or net charge of the channel in the folding transition.

The nanopore device used in our experiments is presented in Figure 1a. MalEwt or MBP is the maltose binding protein of *E. coli*. Its shape is ellipsoidal with overall dimensions of  $3 \times 4 \times 6.5$  nm.<sup>3,32</sup> The overall structure of MalE consists of two discontinuous domains constructed from secondary structural  $\beta\alpha\beta$  units and surrounding a cleft that forms the binding site for maltose and maltodextrins (Figure 1a). When the  $\alpha/\beta$  loop connecting  $\alpha$ -helix VII to  $\beta$ -strand J in the C-domain was modified (Gly220 and Glu221 simultaneously substituted by Asp and Pro), the resulting MalE219 variant is strongly destabilized and completely unfolded at low guanidium concentration.<sup>33</sup> The sizes and the net charges of MalEwt and the variant (MalE219) are the same: 370 residues (40707 Da) and  $-8e$ . The  $\alpha$ -hemolysin channel is characterized by a geometric asymmetry due to the presence of a large extramembrane vestibule domain<sup>34</sup> and by a slightly positive global net charge ( $Z = +7e$ ). The aerolysin pore is heptameric and

Received: November 17, 2011

Accepted: January 19, 2012

Published: January 19, 2012

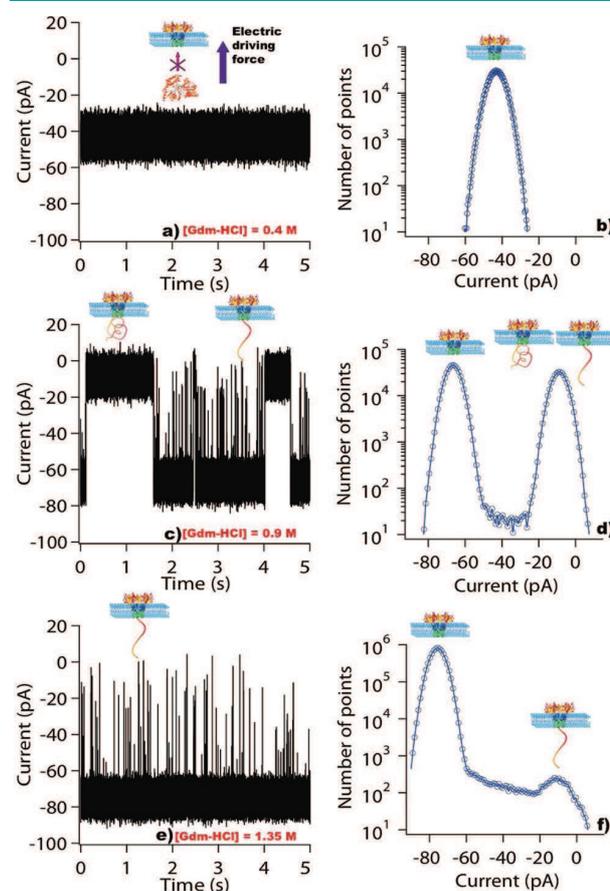


**Figure 1.** Principle of protein conformation detection using the nanopore device. Schematic representation of the nanopore device (a). One channel,  $\alpha$ -hemolysin or aerolysin, is inserted in a suspended lipid bilayer. The lipid membrane is submitted to an electrical potential difference, which induces a current in a single nanopore due to the presence of  $K^+$  and  $Cl^-$  in the bulk solution and their diffusion through the nanopore. The proteins are added to one compartment of the chamber. The denaturing agent, guanidium chloride, is in both compartments at the same concentration. The data suggest that several different protein conformations are detected: partially folded and unfolded. Two proteins are used: the wild type maltose-binding protein (MalEwt) and a destabilized variant (MalE219). In our experimental conditions, the proteins are negatively charged. Detection of partially folded protein (b) or completely unfolded (c) MalE219, transport with the  $\alpha$ -hemolysin nanopore. Part of a current trace obtained with  $V = 100$  mV,  $[Gdm-HCl] = 0.35$  M.

does not have a vestibule domain,<sup>35</sup> and its net charge is highly negative ( $Z = -52e$ ). The length of both channels is the same, 10 nm, but the aerolysin pore diameter, estimated to be between 1 and 1.7 nm,<sup>35</sup> is smaller than the  $\alpha$ -hemolysin one. In absence of protein, we do not observe any current blockade. We can measure the open pore conductance through the  $\alpha$ -hemolysin pore,  $120 \pm 6$  pA at 100 mV in the presence of 1 M KCl and 0.35 M Gdm-HCl (Figure 1c). When the destabilized MalE219 or the MalEwt proteins enter the channel, a decrease in current is observed, and the dwell time depends on the protein conformation. In the case of partially folded MalE219 protein at 0.35 M Gdm-HCl, the dwell time is very long; we observe  $\langle t \rangle = 75 \pm 47$  s (Figure 1b), and for an unfolded protein the mean blockade duration is short,  $\langle t \rangle = 208 \pm 74$   $\mu$ s (Figure 1c). With the wild type protein we do not observe any current blockade at this Gdm-HCl concentration.

We have previously studied MalEwt unfolding through an  $\alpha$ -hemolysin channel.<sup>21</sup> In order to probe the influence of channel structure, geometry, or net charge on protein unfolding detected

by single-nanopore recording, we perform the MalEwt unfolding through a different pore, the aerolysin. Typical parts of current traces are presented in Figure 2a–c showing

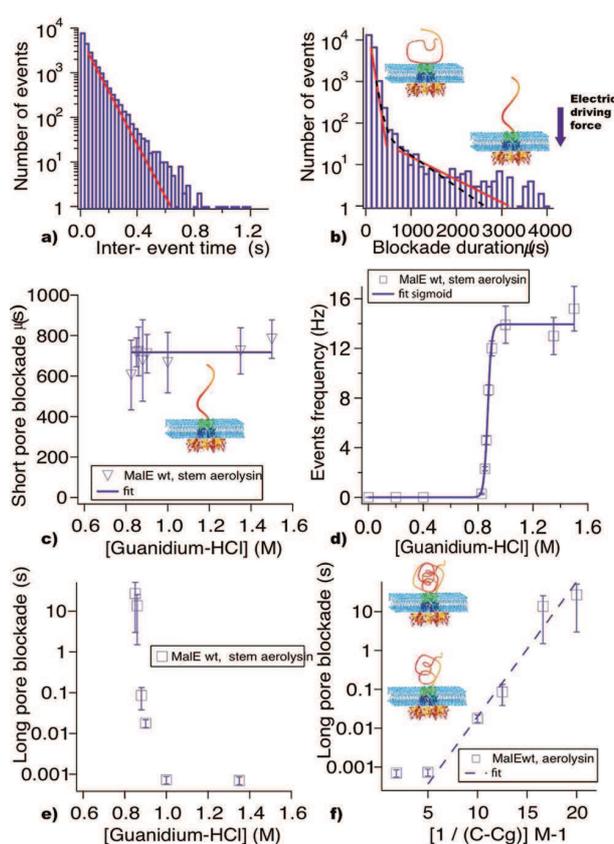


**Figure 2.** Electrical detection of protein unfolding through a single aerolysin nanopore as a function of guanidium chloride concentration. (a) At  $[Gdm-HCl] = 0.4$  M, no current blockade is observed, and the folded native protein does not enter inside the nanopore. (c) At  $[Gdm-HCl] = 0.9$  M, short current blockades coexist with long blockades for unfolded and partially folded proteins, respectively. (e) At  $[Gdm-HCl] = 1.35$  M, only short current blockades are observed, and proteins are completely unfolded. (b, d, f) Current histograms of the number of points as a function of the current; the solid line is to guide the eye. At  $[Gdm-HCl] = 0.4$  M, only one peak appears and corresponds to the open pore conductance (b). At  $[Gdm-HCl] = 0.9$  M, a new peak is observed at low current corresponding to the protein chain inside the pore, and the current of the open pore conductance increases slightly (d). At  $[Gdm-HCl] = 1.35$  M, two peaks are observed: one for an unfolded chain inside the channel and one due to the current of the empty pore (f). The applied voltage is  $V = -70$  mV. Here the proteins are added in the trans compartment of the chamber.

electrical recording in the presence of proteins (MalEwt) for different denaturing agent concentrations between 0 and 1.5 M. After adding proteins, in the absence of Gdm-HCl (data not shown), or at low concentrations (Figure 2a), we do not observe any spikes during the time of the experiment (up to 2 h long). The wild type native protein does not enter the channel. At 0.9 M Gdm-HCl, long current blockades alternate with series of short ones (Figure 2b). In the presence of 1.35 M Gdm-HCl, the long blockades disappear, and the number of short duration events increases (Figure 2c). We assume that the

long current blockades are associated with partially folded proteins and the short pore blockades with unfolded proteins. We observe an increase in the open pore conductance (Figure 2d–f) when the Gdm-HCl increases; this is due to a linear increase of solution conductivity from 0 to 1.5 M Gdm-HCl in 1 M KCl (data not shown). The mean blockade current is the same,  $I_B = 9 \pm 3$  pA, for both types of event, the long blockades and the short ones (Figure 2e). This means that the unfolded part of the chain is inside the pore and the folded part of the protein is outside the pore. The long residence times are not due to a pore exit from the lipid bilayer or to a plugged channel. These times correspond to the duration required to mechanically unfold the partially folded proteins by the electrical field. For unfolded MalEwt proteins, we observe two types of event: bumping events, when a protein diffuses close to the pore, associated with a very short blockade time and low current pore blockade; and residence events with a long blockade time and high current pore blockade (see Supporting Information). For example we find, at 1.35 M Gdm-HCl (Figure 3b),  $t_{\text{straddling}} = 66 \pm 31 \mu\text{s}$  and  $t_{\text{residence}} = 684 \pm 107 \mu\text{s}$ . This residence time is independent of the Gdm-HCl concentration used,  $\langle t_{\text{residence}}[\text{Gdm-HCl}] \rangle = 717 \pm 39 \mu\text{s}$  (Figure 3c). Above the denaturant concentration at the folding transition, the duration of short current blockades is independent of the guanidium concentration, and these events correspond to unfolded proteins. We have recently shown that at 1.5 M Gdm-HCl concentration the residence time of unfolded MalEwt through an aerolysin channel is independent of protein concentration,  $\langle t_{\text{residence}}[\text{protein}] \rangle = 732 \pm 31 \mu\text{s}$ . Furthermore, this time decreases exponentially when the applied voltage increases, and duration increases with the chain length.<sup>22</sup> All of these results might strongly suggest that this residence time is a transport time. The variation of the event frequency of short blockades as a function of Gdm-HCl concentration has a sigmoidal dependency, reminiscent of an unfolding transition curve, between folded to unfolded state (Figure 3d). The denaturing agent concentration of the half denaturation is  $C_{\text{half}} = 0.87 \pm 0.01$  M (Table 1). Unlike short blockades, the long current blockade duration decreases when the Gdm-HCl concentration increases to 1 M Gdm-HCl. The folded part of the chain, at the nanopore entry, is progressively unfolded by the denaturing agent. We show the coexistence of short and long current blockades for different Gdm-HCl concentrations, and the mean duration time scale is very large, between  $700 \pm 15 \mu\text{s}$  and  $27 \pm 24$  s. In order to take into account the possible glassy dynamics in the protein folding processes,<sup>21,36–38</sup> we have plotted the long blockade duration according to a Vogel–Tamman–Fulcher law:  $t_{\text{long}} = t_0 \exp[A/(C - C_g)]$  with  $C_g$  the denaturant concentration at the folding transition. A best fit yields  $C_g = 0.81 \pm 0.01$  M,  $\tau_0 = 38 \pm 25 \mu\text{s}$ ;  $A = 0.56 \pm 0.12$  M (Figure 3f). This protein folding is associated with a first-order transition with a possible glassy behavior. Single-molecule force spectroscopy, when MalEwt is pulled at its termini, has shown the existence of three unfolding intermediates on the mechanical unfolding pathway. Four stable structural blocks were found.<sup>39</sup>

To compare the accuracy of the unfolding transition measure, we also studied the unfolding of MalE219, a destabilized variant of the maltose binding protein. We probed the unfolding process through the  $\alpha$ -hemolysin channel; the proteins enter by the vestibule or stem side (Figure 4). We also compared its unfolding transition to that obtained with the wild type protein (MalEwt). When the protein enters the  $\alpha$ -hemolysin pore either by the vestibule or by the stem side, the short current



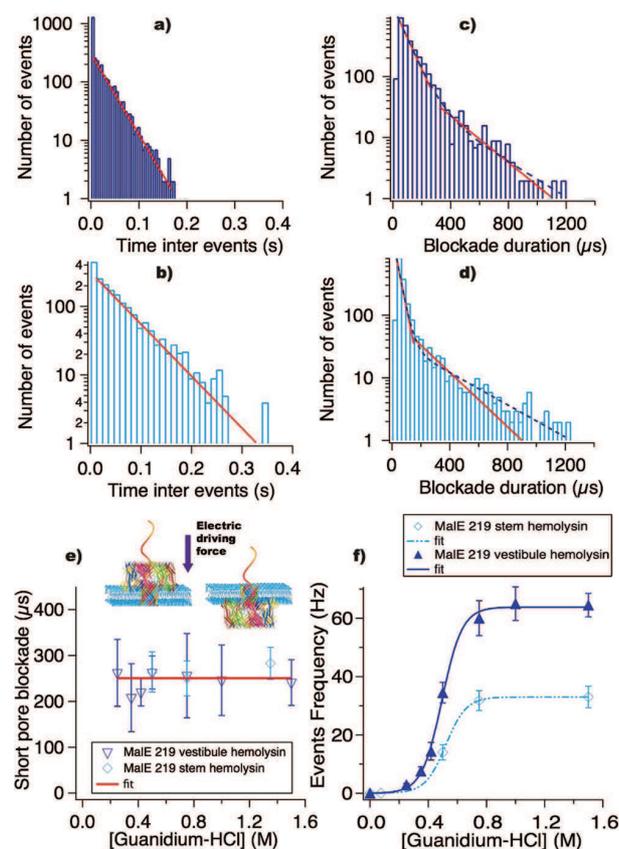
**Figure 3.** The aerolysin nanopore is a sensor to detect the unfolding of MalEwt. (a) Event frequency and (b) blockade duration determination for completely unfolded proteins at  $[\text{Gdm-HCl}] = 1.35$  M. Distribution of interevent time (a), continuous line is exponential fit, semilog scale; distribution of blockade duration for MalEwt (b), continuous lines are single exponential fits, dotted lines correspond to a double exponential fit, semilog scale. (c) Short pore blockade duration of unfolded proteins as a function of guanidium chloride concentration; we found  $\langle t_{\text{short}} \rangle = 717 \pm 39 \mu\text{s}$ . Event frequency of short blockades as a function of guanidium chloride concentration. The line is a fit using a sigmoidal function. No blockade is observed below  $[\text{Gdm-HCl}] = 0.8$  M. (d) At the unfolding transition, event frequency increases sharply with  $[\text{Gdm-HCl}]$ . (e) Long pore blockade duration of partially unfolded proteins as a function of guanidium chloride concentration; their duration decreases sharply with the increase of  $[\text{Gdm-HCl}]$  up to 1 M. (f) Vogel–Tamman–Fulcher representation of long blockade duration versus  $1/(C - C_g)$  with  $C = [\text{Gdm-HCl}]$  and  $C_g = 0.8$  M. Dotted line is the best fit of the form  $t = t_0 \exp(A/(C - C_g))$ . The applied voltage is  $V = -70$  mV.

**Table 1.** Fit Parameters of Events Frequency As a Function of Gdm-HCl Concentration (Figures 3d and 4b)<sup>a</sup>

	MalE 219 vestibule $\alpha$ -hemolysin	MalE 219 stem $\alpha$ -hemolysin	MalE wt stem aerolysin
$C_{\text{half}}$ (M)	$0.49 \pm 0.01$	$0.52 \pm 0.04$	$0.87 \pm 0.01$
$F_{\text{max}}$ (Hz)	$64 \pm 2$	$33 \pm 3.7$	$14 \pm 1.1$

<sup>a</sup> $C_{\text{half}}$  (M) is the Gdm-HCl concentration at the midpoint of the unfolding transition of the protein, and  $F_{\text{max}}$  (Hz) is the events frequency maximal.

pore blockade durations are similar. The unfolded protein was more likely to enter the pore by the vestibule domain than by the stem side (Figure 4). For example, we obtain the following



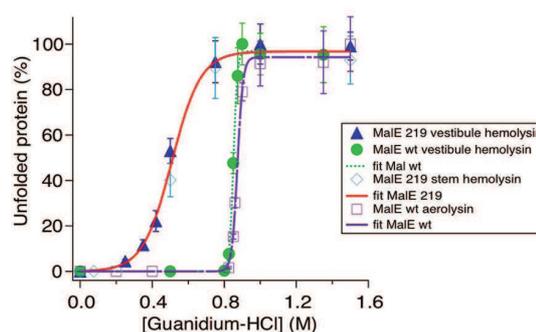
**Figure 4.** Variant protein unfolding through an  $\alpha$ -hemolysin pore by the vestibule side or by the stem side entry. Examples of distribution of time between events (a, b) and blockade duration (c, d) obtained for one channel, when the molecules enter by the vestibule (a, c) or by the stem side of the channel (b, d), continuous lines are single exponential fits, dotted lines correspond to a double exponential fit, semilog scale,  $[\text{Gdm-HCl}] = 0.5 \text{ M}$ . (e) Short pore blockade duration of unfolded MalE219 as a function of guanidium chloride concentration. The unfolded proteins enter the  $\alpha$ -hemolysin channel either by the vestibule side or by the stem side; we found  $\langle t_{\text{short}} \rangle = 250 \pm 14 \mu\text{s}$ . (f) Event frequency of short blockades as a function of guanidium chloride concentration. The line (continuous or dotted) is a fit using a sigmoidal function. No blockade is observed below  $[\text{Gdm-HCl}] = 0.075 \text{ M}$ . At the unfolding transition, event frequency increases with  $[\text{Gdm-HCl}]$ .

at  $0.5 \text{ M}$  guanidium:  $t_{\text{unfolded-vestibule}} = 265 \mu\text{s} \pm 38 \mu\text{s}$  and  $t_{\text{unfolded-stem}} = 282 \mu\text{s} \pm 55 \mu\text{s}$  (Figure 4c,d) and  $F_{\text{vestibule}} = 32 \pm 1 \text{ Hz}$  and  $F_{\text{stem}} = 17 \pm 0.5 \text{ Hz}$  (Figure 4a,b). We have previously shown that the average rate by which the unfolded protein MalEwt enters the pore depends on the side of addition,<sup>40</sup> as was shown for single-stranded DNA homopolymers and the  $\alpha$ -hemolysin channel.<sup>41</sup>

The short current blockade time is also independent of the guanidium concentration; we find  $\langle t_{\text{residence}} \rangle = 250 \pm 14 \mu\text{s}$  (Figure 4e). With MalEwt, we had previously obtained  $\langle t_{\text{residence}} \rangle = 200 \pm 100 \mu\text{s}$ <sup>21</sup> using the  $\alpha$ -hemolysin pore. This residence time could be associated with a transport time of unfolded proteins. The dynamics of unfolded proteins are the same for MalE219 and MalEwt through the  $\alpha$ -hemolysin channel, and this is also the case with the aerolysin pore.<sup>22</sup> The mean residence time of a protein is shorter with  $\alpha$ -hemolysin

than with the aerolysin channel. This is due to a different applied voltage and also to a different pore diameter. We apply  $V = 100 \text{ mV}$  and  $V = -70 \text{ mV}$  for the  $\alpha$ -hemolysin and the aerolysin pore, respectively. When the proteins enter by the hemolysin vestibule side or by the stem side, the frequency of events follows a sigmoidal variation (Figure 4e). The denaturing agent concentration of the half transition for the destabilized variant is lower than that for the wild type protein (Table 1). The maximum event frequency is higher for MalE219 than for MalEwt (Table 1) due probably to a difference in the activation energy of unfolded proteins for entry into the channel. We have previously found that the activation energy of the  $\alpha$ -hemolysin<sup>21</sup> is about half of that found for the aerolysin stem side entry.<sup>22</sup> In our experimental conditions, we observe long blockade durations only up to  $0.42 \text{ M}$  Gdm-HCl concentration for this destabilized variant protein.

Here we show that the nanopore approach associated to an electrical detection is a sensitive and powerful method to study protein folding. It allows to compare data obtained at several protein concentrations and applied voltages and using two different pores with different net charge, geometry, and structure. In order to compare all data, we have normalized the maximum event frequency to 100% of unfolded proteins. We obtain a single denaturation curve of MalE219 when the proteins enter by both sides of the  $\alpha$ -hemolysin pore (Figure 5).



**Figure 5.** Unfolding curves at the single molecule level using different nanopores and different proteins. The events frequency is normalized to obtain this curve, and the percentages are calculated from these events. MalE219 is unfolded through the  $\alpha$ -hemolysin pore when the molecules enter by the two sides of the channel, and MalEwt is unfolded through the aerolysin pore and with the  $\alpha$ -hemolysin pore. The data are adapted from previous work.<sup>21</sup>

The Gdm-HCl concentration at the midpoint of the unfolding transition of this protein is  $C_{\text{half}} = 0.5 \pm 0.01$  (Table 2). The

**Table 2.** Fit Parameters of Unfolded Protein as a Function of Gdm-HCl Concentration (Figure 4c)<sup>a</sup>

	MalE 219 $\alpha$ -hemolysin	MalE wt aerolysin	MalE wt $\alpha$ -hemolysin
$C_{\text{half}}$ (M)	$0.5 \pm 0.01$	$0.87 \pm 0.01$	$0.85 \pm 0.01$
unfolded protein maximal (%)	$97 \pm 3.5$	$94 \pm 4.5$	$97 \pm 5.6$

<sup>a</sup> $C_{\text{half}}$  (M) is the Gdn-HCl concentration at the midpoint of the unfolding transition of the protein.

unfolding process through a nanopore does not depend on the channel entry side. The denaturation curve of MalEwt obtained with the aerolysin channel is similar within the standard

deviation to that found previously with an  $\alpha$ -hemolysin pore<sup>21</sup> (Figure 5, Table 2). We obtain, with the aerolysin or  $\alpha$ -hemolysin channel, at the midpoint of the unfolding transition of MalEwt:  $C_{\text{half-aerolysin}} = 0.87 \pm 0.01$  M and  $C_{\text{half-hemolysin}} = 0.85 \pm 0.01$  M. We show that the protein unfolding process is independent of the geometry, net charge, and structure of the nanopore.

In bulk experiments, the Gdm-HCl concentrations at the midpoint of the unfolding transition of MalE219 and MalEwt are, respectively,  $C_{\text{half}} = 0.35 \pm 0.01$  M and  $C_{\text{half}} = 1.05 \pm 0.05$  M.<sup>33</sup> The difference obtained by single-nanopore recording and bulk experiments could be due to the tryptophan fluorescence emission of different protein conformations that could not be separated in the bulk. Another explanation for this difference is that at medium Gdm-HCl concentrations, the applied electrical force could be enough to unfold a small part of secondary structure inside the protein.

In the future we will perform NMR experiments as a function of Gdm-HCl concentrations in order to investigate the structure of the protein along the folding pathway in relation with the current blockades in channels.

In conclusion, we compared the unfolding transition of the wild type and a destabilized variant of maltose binding protein using two different channels,  $\alpha$ -hemolysin and aerolysin. For the two channels, unfolded proteins induce short blockades, and their frequency increases as the concentration of denaturing agent increases, following a sigmoidal unfolding curve. Their duration is constant as a function of the concentration of denaturing agent. Partially folded proteins exhibit very long blockades in nanopores. The blockade duration decrease when the concentration of denaturing agent increases. For the wild type protein, the variation of the long blockade duration as a function of denaturant concentration is well described by a Vogel–Tamman–Fulcher relationship, and this dependency could be associated to a possible glassy behavior. The MalEwt unfolding curve obtained using the aerolysin channel is similar to that previously obtained with the  $\alpha$ -hemolysin pore. We find that the unfolding denaturation curves of the destabilized variant are the same through the vestibule and stem side entry of the  $\alpha$ -hemolysin pore and are shifted toward the lower values of the denaturant agent compared to the wild type protein. We prove that the nanopore structure, geometry, and the net charge do not influence the folding transition but change the dynamics. We show a new method at single-molecule level to study protein folding and protein stability. This method is highly sensitive to obtain an unfolding curve, to detect protein mutations, to investigate protein stability as a function of environment, and to observe different protein conformations along the folding pathway. The nanopore device also provides prospects concerning the protein unfolding by other denaturing agents or the interaction between proteins. The control of protein unfolding through a nanopore is also a crucial step for a potential application concerning ultrafast sequencing of proteins.

## METHODS

Membrane lipid bilayers were made by using the previously described method.<sup>42</sup> In brief, a film of a 1% solution of diphytanoylphosphatidylcholine-lecithin (Avanti) in decane is spread across a 150  $\mu\text{m}$  wide hole drilled in a polysulfone wall separating the two compartments of a chamber. Each compartment contains 1 mL of 1 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7.5. After thinning of the decane film and formation of a planar bilayer, one channel is inserted by adding monomeric  $\alpha$ -hemolysin (Sigma) or recombinant aerolysin from a stock solution in one compartment. Aerolysin was produced in *E. coli* as proaerolysin

as described before<sup>43</sup> and was activated by digestion with trypsin for 10 min at RT to eliminate the propeptide sequence, allowing monomers to polymerize.<sup>44</sup>

The production and purification of the recombinant maltose binding protein of *E. coli* (MalE) and the strongly destabilized variant MalE219 have been described previously.<sup>45</sup> In the experiments, the final protein concentrations are 0.35  $\mu\text{M}$  with the  $\alpha$ -hemolysin channel or 3  $\mu\text{M}$  with the aerolysin channel.

The ionic current through a single  $\alpha$ -hemolysin or aerolysin channel was measured using an Axopatch 200B amplifier. Data were filtered at 10 kHz (100  $\mu\text{s}$ ) and acquired at 250 kHz intervals (4  $\mu\text{s}$ ) using the DigiData 1322A digitizer with Clampex software (Axon Instruments, Union City, CA, USA). The measurements of the transients were based on the statistical analysis of the current traces. Data were systematically checked for reproducibility with several pores. The main difficulty of data analysis is to separate the pulses of electric current from the noise. We define a first threshold  $\text{th1}$  as the mean current of the open pore  $\langle I_0 \rangle$  minus twice the standard deviation  $\sigma$  of its distribution,  $\text{th1} = \langle I_0 \rangle - 2\sigma$ . We define a second threshold  $\text{th2}$  as the end of this distribution. The average frequency of blockades is deduced from the distribution of the time intervals  $T_i$  between two successive blockades. The average duration of blockades is deduced from the distribution of blockade duration  $T_i$ . The two blockade time distributions of independent events are adjusted with 2 separate exponential functions,  $y = A_1 \exp(-t/\tau_1)$  and  $y = A_2 \exp(-t/\tau_2)$  and with a double exponential function,  $y = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$ . Each blockade duration is the average of the two characteristic times. All statistical analyses were performed using Igor Pro software (WaveMetrics Inc.).

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [jpelta@univ-evry.fr](mailto:jpelta@univ-evry.fr).

### Author Contributions

#These authors contributed equally to this work.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant funding from the Action Thématique Incitative Genopole, PCV prise de risques CNRS and ANR Blanche “TRANSFOLDPROT” BLAN08-1\_339991. We thank Gisou Van der Goot (Ecole Polytechnique Lausanne) for the gift of the vector for recombinant aerolysin production and Marie Wagmann for the figure design graphics. We thank Kari Foster for kindly correcting the language of the manuscript.

## REFERENCES

- (1) Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884–890.
- (2) Bartlett, A. I., and Radford, S. E. (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 582–588.
- (3) Freddolino, P. L., Harrison, C. B., Liu, Y., and Schulten, K. (2010) Challenges in protein-folding simulations. *Nat. Phys.* 6, 751–758.
- (4) Michalet, X., Weiss, S., and Jager, M. (2006) Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics. *Chem. Rev.* 106, 1785–1813.

- (5) Fisher, T. E., Marszalek, P. E., and Fernandez, J. M. (2000) Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* 7, 719–724.
- (6) Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D. W. (1996) Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13770–13773.
- (7) Reiner, J. E., Kasianowicz, J. J., Nablo, B. J., and Robertson, J. W. F. (2010) Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12080–12085.
- (8) Robertson, J. W. F., Rodrigues, C. G., Stanford, V. M., Rubinson, K. A., Krasnik, O. V., and Kasianowicz, J. J. (2007) Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8207–8211.
- (9) Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., Jovanovich, S. B., Krstic, P. S., Lindsay, S., Ling, X. S., Mastrangelo, C. H., Meller, A., Oliver, J. S., Pershin, Y. V., Ramsey, J. M., Riehn, R., Soni, G. V., Tabard-Cossa, V., Wanunu, M., Wiggins, M., and Schloss, J. A. (2008) The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1146–1153.
- (10) Howorka, S., and Siwy, Z. S. (2009) Nanopore analytics: sensing of single molecules. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2360–2384.
- (11) Kasianowicz, J. J., Robertson, J. W. F., Chan, E. R., Reiner, J. E., and Stanford, V. M. (2008) Nanoscopic porous sensors. *Ann. Rev. Anal. Chem.* 1, 737.
- (12) Movileanu, L. (2009) Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. *Trends Biotechnol.* 27, 333–341.
- (13) Han, A., Schurmann, G., Mondin, G., Bitterli, R. A., Hegelbach, N. G., de Rooij, N. F., and Staufer, U. (2006) Sensing protein molecules using nanofabricated pores. *Appl. Phys. Lett.* 88, 093901–093903.
- (14) Sutherland, T. C., Long, Y. T., Stefureac, R. I., Bediako-Amoa, I., Kraatz, H. B., and Lee, J. S. (2004) Structure of peptides investigated by nanopore analysis. *Nano Lett.* 4, 1273–1277.
- (15) Ammenti, A., Cecconi, F., Marini Bettolo, M. U., and Vulpiani, A. (2009) A statistical model for translocation of structured polypeptide chains through nanopores. *J. Phys. Chem. B* 113, 10348–10356.
- (16) Firnkes, M., Pedone, D., Knezevic, J., Dobliger, M., and Rant, U. (2010) Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis. *Nano Lett.* 10, 2162–2167.
- (17) Fologea, D., Ledden, B., McNabb, D. S., and Li, J. (2007) Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore. *Appl. Phys. Lett.* 91, nihp38991.
- (18) Han, A., Creus, M., Schürmann, G., Linder, V., Ward, T. R., de Rooij, N. F., and Staufer, U. (2008) Label-free detection of single protein molecules and protein–protein interactions using synthetic nanopores. *Anal. Chem.* 80, 4651–4658.
- (19) Makarov, D. E. (2008) Computer simulations and theory of protein translocation. *Acc. Chem. Res.* 42, 281–289.
- (20) Oukhaled, A., Cressiot, B., Bacri, L., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J. M., Bourhis, E., Jede, R., Gierak, J., Auvray, L., and Pelta, J. (2011) Dynamics of completely unfolded and native proteins through solid-state nanopores as a function of electric driving force. *ACS Nano* 5, 3628–3638.
- (21) Oukhaled, G., Mathe, J., Bianca, A. L., Bacri, L., Betton, J. M., Lairez, D., Pelta, J., and Auvray, L. (2007) Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording. *Phys. Rev. Lett.* 98, 158101–158104.
- (22) Pastoriza-Gallego, M., Rabah, L., Gibrat, G., Thiebot, B., van der Goot, F. G., Auvray, L., Betton, J. M., and Pelta, J. (2011) Dynamics of unfolded protein transport through an aerolysin pore. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2923–2931.
- (23) Sexton, L. T., Horne, L. P., Sherrill, S. A., Bishop, G. W., Baker, L. A., and Martin, C. R. (2007) Resistive-pulse studies of proteins and protein/antibody complexes using a conical nanotube sensor. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 13144–13152.
- (24) Yusko, E. C., Johnson, J. M., Majd, S., Prangkio, P., Rollings, R. C., Li, J., Yang, J., and Mayer, M. (2011) Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls. *Nat. Nanotechnol.* 6, 253–260.
- (25) Kowalczyk, S. W., Kapinos, L., Blosser, T. R., Magalhaes, T., van Nies, P., Lim, R. Y., and Dekker, C. (2011) Single-molecule transport across an individual biomimetic nuclear pore complex. *Nat. Nanotechnol.* 6, 433–438.
- (26) Niedzwiecki, D. J., Grazul, J., and Movileanu, L. (2010) Single-molecule observation of protein adsorption onto an inorganic surface. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 10816–10822.
- (27) Sexton, L. T., Mukaibo, H., Katira, P., Hess, H., Sherrill, S. A., Horne, L. P., and Martin, C. R. (2010) An adsorption-based model for pulse duration in resistive-pulse protein sensing. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 6755–6763.
- (28) Christensen, C., Baran, C., Krasniqi, B., Stefureac, R. I., Nokhrin, S., and Lee, J. S. (2011) Effect of charge, topology and orientation of the electric field on the interaction of peptides with the  $\alpha$ -hemolysin pore. *J. Peptide Sci.* 17, 726–734.
- (29) Freedman, K. J., Jurgens, M., Prabhu, A., Ahn, C. W., Jemth, P., Edel, J. B., and Kim, M. J. (2011) Chemical, thermal, and electric field induced unfolding of single protein molecules studied using nanopores. *Anal. Chem.* 83, 5137–5144.
- (30) Stefureac, R., Waldner, L., Howard, P., and Lee, J. S. (2008) Nanopore analysis of a small 86-residue protein. *Small* 4, 59–63.
- (31) Talaga, D. S., and Li, J. (2009) Single-molecule protein unfolding in solid state nanopores. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 9287–9297.
- (32) Spurlino, J. C., Lu, G. Y., and Quijcho, F. A. (1991) The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 266, 5202–5219.
- (33) Raffy, S., Sassoon, N., Hofnung, M., and Betton, J. M. (1998) Tertiary structure-dependence of misfolding substitutions in loops of the maltose-binding protein. *Protein Sci.* 7, 2136–2142.
- (34) Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J. E. (1996) Structure of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274, 1859–1866.
- (35) Parker, M. W., Buckley, J. T., Postma, J. P., Tucker, A. D., Leonard, K., Pattus, F., and Tsernoglou, D. (1994) Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* 367, 292–295.
- (36) Bruijic, J., Hermans, Z., Walther, K. A., and Fernandez, J. M. (2006) Single-molecule force spectroscopy reveals signatures of glassy dynamics in the energy landscape of ubiquitin. *Nat. Phys.* 2, 282–286.
- (37) Frauenfelder, H., Sligar, S. G., and Wolynes, P. G. (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science* 254, 1598–1603.
- (38) Iben, I. E., Braunstein, D., Doster, W., Frauenfelder, H., Hong, M. K., Johnson, J. B., Luck, S., Ormos, P., Schulte, A., Steinbach, P. J., Xie, A. H., and Young, R. D. (1989) Glassy behavior of a protein. *Phys. Rev. Lett.* 62, 1916–1919.
- (39) Bertz, M., and Rief, M. (2008) Mechanical unfoldons as building blocks of maltose-binding protein. *J. Mol. Biol.* 378, 447–458.
- (40) Pastoriza-Gallego, M., Gibrat, G., Thiebot, B., Betton, J. M., and Pelta, J. (2009) Polyelectrolyte and unfolded protein pore entrance depends on the pore geometry. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1377–1386.
- (41) Henrickson, S. E., Misakian, M., Robertson, B., and Kasianowicz, J. J. (2000) Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore. *Phys. Rev. Lett.* 85, 3057–3060.
- (42) Montal, M., and Mueller, P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3561–3566.
- (43) Moniatte, M., van der Goot, F. G., Buckley, J. T., Pattus, F., and van Dorsselaer, A. (1996) Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. *FEBS Lett.* 384, 269–272.

(44) Cabiaux, V., Buckley, J. T., Wattiez, R., Ruyschaert, J. M., Parker, M. W., and van der Goot, F. G. (1997) Conformational changes in aerolysin during the transition from the water-soluble protoxin to the membrane channel. *Biochemistry* 36, 15224–15232.

(45) Betton, J. M., and Hofnung, M. (1996) Folding of a mutant maltose-binding protein of *Escherichia coli* which forms inclusion bodies. *J. Biol. Chem.* 271, 8046–8052.



### **3 Translocation de protéines dans des nanopores artificiels**

La majorité des études sur le transport et le dépliement de protéines à travers des nanopores a été effectuée avec des nanopores protéiques(8, 11-18). Il a été montré en particulier qu'il est possible de contrôler la translocation de protéines dépliées en faisant varier le voltage, la concentration en protéines ou le sens d'entrée de la protéine dans le pore. Jusqu'à présent, très peu de travaux ont été réalisés sur le transport de protéines dans des nanopores artificiels(19-21).

Le premier travail répertorié concerne le passage d'une protéine standard, la BSA, dans un pore de diamètre supérieur à celui de la protéine. A cette échelle, on obtient peu d'informations sur la conformation de la protéine, et les données peuvent être interprétées en terme de charge électrique et de volume apparent occupé par une protéine dans le pore. On distingue néanmoins les protéines compactes à l'état natif, des protéines dépliées sous l'action du pH ou d'un agent dénaturant. Le manque de contrôle de leur état de surface rend difficile les études sur les protéines. En effet, plusieurs auteurs ont déjà observé des interactions protéine-pore qui pouvaient ralentir le transport de protéines(21, 91). De plus, la surface de ces nanopores solides étant très chargée, des phénomènes d'électro-osmose peuvent aussi modifier la dynamique de transport(120).

Ces études portent généralement sur la compréhension des mécanismes physiques de la translocation et rarement sur une problématique biologique. Quand j'ai commencé ce travail, nous souhaitons utiliser les nanopores artificiels pour l'étude du dépliement et/ou repliement de protéines à l'échelle de la molécule unique. Si nous arrivons à contrôler la dynamique de transport et la géométrie du pore, il serait alors possible

d'assister le repliement d'une protéine en sortie de pore. Il est encore difficile de fabriquer des petits pores dont le diamètre se rapproche de celui du translocon, de l'ordre du nanomètre, et dont la géométrie est contrôlée pour réaliser ce type d'expérience.

Une collaboration avec le Laboratoire de Photonique et Nanostructures (LPN) de Marcoussis nous permet de fabriquer des nanopores artificiels percés par les deux techniques présentées dans le 1<sup>er</sup> chapitre ; par faisceau d'ions focalisé (collaboration avec Jacques Gierak) ou par microscopie électronique à transmission (collaboration avec Gilles Patriarche). Cette collaboration a commencé pendant les post-doctorats de Anne-Laure Biance (2005) et Birgitta Schiedt (2008), dans le cadre d'un projet ANR. Elles ne travaillaient à l'époque qu'avec des pores percés par FIB gallium. Leurs efforts se sont concentrés sur la fabrication de nanopores percés dans des membranes de SiC et des membranes de SiN pour l'analyse de biomolécules à l'échelle de la molécule unique. Elles ont dû abandonner rapidement les pores percés dans des membranes de SiC qui avaient un comportement de conduction électrique mal compris, au profit de membranes de SiN. Birgitta Schiedt a effectué les premières expériences, en France, de transport d'une protéine de grande taille, la fibronectine(132) de rayon hydrodynamique 11,5 nm, dans un nanopore artificiel de 24 nm de diamètre(10) percé par FIB. Elle a observé des blocages de courant en présence de protéines et montré pour deux voltages différents que les temps de blocages diminuaient lorsque le potentiel augmentait. Mais nous avons observé une instabilité du nanopore, caractérisée par de grandes fluctuations du courant ionique. Cela n'a pas permis de continuer l'étude.

Après le travail sur le dépliage d'un mutant instable à travers l'alpha-hémolysine, j'ai ensuite exploré le transport de protéines dans des nanopores artificiels en 2010, avec

des membranes solides de SiN percées par FIB. Le FIB gallium ne nous a pas permis d'obtenir des pores de diamètre suffisamment petit sauf exception, c'est à dire des pores dont le diamètre est inférieur à 20 nm. Nous avons pu, une seule fois, obtenir un pore de diamètre 4nm, comparable à celui de la MBP. Il n'y avait aucune étude, en France et dans le monde, sur la dynamique de transport de protéines natives ou dépliées dans un nanopore solide en fonction du voltage appliqué. Ce type d'étude est très important car il permet d'accéder à des informations sur la dynamique : comme les temps de transport, la fréquence de passage, la conformation des protéines en solution et dans le pore, la barrière à franchir pour rentrer dans le pore, et également d'arriver à contrôler la vitesse de translocation.

Nous présentons dans les articles qui suivent deux études sur le transport de protéines en fonction du voltage appliqué dans deux nanopores de diamètre différent. La première étude a été publiée dans ACS Nano en 2011 et porte sur le transport d'une protéine dont le diamètre est plus petit que celui du pore. Nous comparons le transport de la protéine dans des conformations natives et dépliées. La deuxième étude a été publiée dans ACS Nano en 2012 et porte sur le transport d'une protéine à l'état déplié dont le diamètre est plus grand que celui du pore.

### 3.1 Transport de protéines natives et dépliées faiblement confinées

Pour étudier la dynamique de transport en fonction du voltage appliqué, nous avons utilisé comme protéine modèle MalE native et dépliée en présence d'une concentration en agent de dénaturation pour laquelle les protéines sont toutes dénaturées (1.44 M guanidium). La gamme de voltages utilisée varie entre 50 et 250 mV, afin de pouvoir comparer nos données à celles obtenues avec les nanopores protéiques(8, 13). Le

nanopore utilisé a un diamètre de 20 nm pour permettre le passage des protéines natives d'environ 6.5 nm de diamètre et dépliées d'environ 13nm de diamètre.(133)

Nous allons résumer les résultats principaux obtenus. Nous observons des blocages de courant après l'ajout de protéines natives ou dépliées. Le courant de blocage normalisé  $(\langle I_0 \rangle - \langle I_b \rangle) / \langle I_0 \rangle$  nous donne des informations sur le volume occupé par une molécule dans le pore. Nous avons comparé les taux de blocage de courant (à 250 mV) observés à ceux attendus en tenant compte de la géométrie de la protéine. La protéine native a une géométrie ellipsoïdale. En supposant que la chute de courant est proportionnelle à la fraction volumique de la protéine occupée dans le pore on a :  $\Delta I / I = V_{\text{prot}} / V_{\text{pore}} = (4/3 \pi abc) / (\pi r_{\text{pore}}^2 L_{\text{pore}}) = 3.5\%$ . Expérimentalement, le taux de blocage est indépendant du voltage appliqué pour la protéine native. Ce taux est d'environ  $4.5\% \pm 0.7\%$  ce qui est du même ordre de grandeur que celui que nous avons calculé. La conformation de la protéine native n'apparaît pas affectée par les expériences. En revanche, nous observons une diminution du courant de blocage normalisé pour la protéine dénaturée quand la force électrique augmente. L'approximation du volume occupé par une chaîne dont la géométrie est cylindrique est  $V_{\text{prot}} / V_{\text{pore}} = r_{\text{prot}}^2 / r_{\text{pore}}^2 = 1.69\%$ . Expérimentalement, ce taux est d'environ  $1.8\% \pm 0.7\%$ . Le volume apparent occupé par la protéine dans le pore semble diminuer lorsque la force électrique augmente, indiquant que la protéine dénaturée est progressivement étirée dans le pore.

La fréquence des événements de blocage de courant est proportionnelle à la concentration en protéines, et augmente exponentiellement avec le potentiel appliqué, en suivant une loi de Van't Hoff-Arrhenius. Cela signifie qu'il est nécessaire que les protéines franchissent une barrière pour passer dans le pore. A concentration égale, la fréquence de blocage est plus grande pour la protéine native que pour la protéine

dépliée. Notons que la fréquence observée est beaucoup plus petite que celle qu'on déduirait à partir d'un simple modèle de capture par diffusion d'après Smoluchowski,  $f = 2\pi D_{\text{diff}} c r_{\text{pore}} = (k_B T c) / (3\eta) r_{\text{pore}} / r = 4000 \text{ Hz}$ . Dans le cas des protéines natives, cette fréquence est deux ordres de grandeur plus importante que celle mesurée,  $f \approx 10 \text{ Hz}$ . Cela fournit une seconde raison d'introduire une barrière de potentiel.

La hauteur de barrière déduite des données est  $U^* \approx 7.4 k_B T$  pour la protéine native alors que pour la protéine dépliée,  $U^* \approx 10.4 k_B T$ . Ces barrières sont élevées en comparaison avec celles observées avec des pores protéiques dix fois plus petits. Pour MalE et l'alpha-hémolysine,  $U^* \approx 2k_B T$ , pour l'aérolysine  $U^* \approx 4 k_B T$ . Ces observations apparaissent paradoxales car les effets de confinement sont plus importants dans les nanopores protéiques et nous nous attendions à une diminution de la barrière d'entrée en passant des pores protéiques aux pores artificiels de plus grand diamètre. Une partie de la différence entre la fréquence de passage des protéines natives et dépliées peut être due à des phénomènes de frictions hydrodynamiques déjà observés dans les nanopores artificiels(127). La friction hydrodynamique sur la protéine dépliée est plus grande que sur la protéine native, car elle est proportionnelle au rayon hydrodynamique de la protéine, plus grand pour la protéine dépliée. Un autre facteur est dû aux interactions de volume exclu entre le pore et les protéines. Le volume accessible d'un pore est plus petit pour les protéines dépliées que pour les protéines natives. Nous observons aussi un effet de saturation des événements à l'entrée du pore pour les protéines dépliées à partir de 150mV, la fréquence n'augmente plus avec le potentiel appliqué. Nous supposons que les protéines sont accumulées à l'entrée du pore et passent alors les unes après les autres. Des phénomènes d'adsorption transitoire de protéines sur la surface du pore

pourraient contribuer à ce phénomène : une protéine transitoirement adsorbée empêche le passage des suivantes.

Une façon de sonder le transport de protéines et les interactions protéine-pore ou l'électro-osmose est d'étudier la dépendance du temps de blocage en fonction de la force électrique. Nous observons dans les deux cas que les temps de blocages diminuent exponentiellement lorsque l'on augmente le potentiel (entre  $20 \pm 3$  ms à 50mV et  $3.3 \pm 0.7$ ms à 200mV pour la protéine native ; entre  $3 \pm 0.7$ ms à 50mV et  $0.7 \pm 0.1$ ms à 200mV pour la protéine dépliée). Cette dépendance indique que la dynamique de passage est associée à une barrière d'énergie libre. Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, les protéines natives restent plus longtemps dans le pore que les protéines dépliées. Nous pensons que cette différence peut être due à des interactions entre la protéine et le pore selon la conformation de la chaîne. Dans tous les cas, les temps de blocages sont très longs comparés à ceux que prédisent les modèles simples de diffusion, qui conduisent à des temps de passage de l'ordre de la microseconde.(19) Deux phénomènes pourraient ralentir le passage de protéines dans les nanopores artificiels. Le premier est l'adsorption déjà évoquée, sur la surface du nanopore. Ce phénomène est courant sur des surfaces de haute énergie comme le SiN et déjà observé(21, 91). Le second phénomène pourrait être un phénomène d'électro-osmose qui ralentirait le passage de protéines à cause d'un flux de solvant créé par le mouvement des contre-ions positifs dans le sens opposé au transport(120). Cet effet n'est possible que si la surface des pores est chargée négativement (dans le cas contraire l'effet électro-osmotique accélérerait les protéines). Il serait intéressant d'étudier ces effets électro-osmotiques dans le futur. Il faudrait contrôler pour cela de façon précise l'état de surface des nanopores. Cela est difficile dans notre cas, à cause d'une possible contamination de la surface des pores par

des ions gallium implantés lors du processus de fabrication. Notons que la présence d'ions gallium peut aussi jouer un rôle sur les interactions entre les protéines et la surface du pore. Une autre possibilité est que l'implantation d'ions gallium conducteurs dans la membrane modifie la répartition des lignes de champs électriques donc la capture et le transport des protéines.

En conclusion de cet article, nous avons montré que les nanopores artificiels, dont le diamètre est plus grand que celui de la protéine, peuvent être utilisés comme capteur de conformations de protéine. Nous avons observé que la conformation de la protéine native n'est pas modifiée par le voltage appliqué jusqu'à 250 mV, ce qui n'est pas le cas de la protéine dépliée qui est progressivement étirée. La dynamique de transport est anormale, sûrement due à des interactions de protéines sur la surface du nanopore, et/ou un phénomène d'électro-osmose, non dominant, qui pourrait ralentir le passage de protéines.

Ce travail soulève un certain nombre interrogations déjà mentionnées. La méthode de perçage est-elle à l'origine de cette dynamique anormale observée? Quelle serait cette dynamique avec un nanopore dont le diamètre est plus petit que celui de la protéine transportée? Quelle serait la dépendance des temps et le mécanisme de transport pour des forts voltages appliqués?

Pour répondre à ces questions, nous avons entrepris une seconde étude où nous avons changé le mode de fabrication des pores et leur diamètre. Nous avons donc étudié le transport de MalE dépliée d'environ 12 nm de diamètre, dans un nanopore de 3 nm de diamètre et percé par TEM. Nous avons décidé d'appliquer des voltages alors encore inexplorés dans ce type d'étude, entre 200 et 750 mV. La raison d'utiliser des forces électriques très élevées était d'éliminer les effets de barrière et de tester l'observation

d'un comportement purement électrophorétique pour la translocation des protéines dépliées comme cela avait été fait pour l'ADN.

### 3.2 Transport de protéines dépliées fortement confinées

L'analyse statistique des traces de courant dans ces gammes de voltage montre des signatures de blocage différentes. À faible voltage (200mV), nous observons deux types de blocages ; des blocages courts et peu profonds, et des blocages longs et profonds. A hauts voltages (750 mV), nous n'observons que des blocages courts et peu profonds. D'après les temps de blocages à 200mV ( $700 \pm 100$   $\mu$ s pour les blocages courts ;  $2000 \pm 300$   $\mu$ s pour les blocages longs), les temps longs seraient associés au passage de deux molécules au même moment dans le pore, et que les temps courts seraient associés au passage d'une seule protéine. Nous observons une diminution du courant de blocage normalisé lorsque nous augmentons le voltage. Comme nous l'avons montré dans l'étude précédente, la protéine est progressivement étirée dans le pore, pour adopter une conformation complètement étirée à partir de 400 mV.

La durée des blocages de courant diminue lorsque le potentiel appliqué augmente. En revanche, nous observons deux dépendances différentes selon la gamme de forces électriques appliquées. Entre 200 et 400 mV, les temps diminuent de façon exponentielle avec le potentiel. Cette dépendance est décrite par une barrière d'activation qui pourrait expliquer des phénomènes d'interaction non spécifiques entre la protéine et le pore (dépendance observée dans l'étude précédente) ou un changement de conformation de la chaîne. Entre 400 et 750 mV, les temps diminuent de façon inversement proportionnelle au potentiel appliqué. Cette dépendance est décrite par un mécanisme électrophorétique, la protéine est bien transportée à travers le pore. Grâce à une collaboration avec Murugappan Muthukumar de l'université du Massachusetts, nous

avons ajusté les données expérimentales avec un modèle théorique décrivant le processus de translocation selon un formalisme de Fokker-Planck(128). Un modèle de barrières rend bien compte des deux comportements observés expérimentalement. De plus il définit la transition entre le régime de barrière d'activation et le régime électrophorétique au même point observé expérimentalement (400mV). Ce point correspond également au moment où les courants normalisés deviennent constants quand  $V$  augmente. A partir de cette tension appliquée, la chaîne est bien attirée et transportée à travers le pore et sa conformation n'est pas modifiée. Nous avons pu en déduire une barrière de transport  $U^* \cong 9 k_B T$  qui représente le travail nécessaire que la chaîne doit fournir pour qu'elle soit transportée d'un compartiment à un autre à travers le pore.

La durée de blocage de courant pour le pore de 3 nm est comparable à celle mesurée dans le pore de 20 nm ( $700 \pm 100 \mu s$ ). Si nous considérons un transport purement diffusif (voir chapitre 1), nous attendons  $t_{3nm} = t_{20nm} (D_{20nm}/D_{3nm})^{2/3} \cong 7^{2/3} t_{20nm}$ . Deux phénomènes pourraient expliquer ces temps comparables dans des pores de diamètres différents : un phénomène d'électro-osmose, et des interactions attractives protéines-nanopore. Pour élucider la contribution du phénomène d'électro-osmose, nous avons effectué des expériences de transport de polymères neutres, en fonction du voltage appliqué. Nous avons observé des fréquences et des temps indépendants du voltage appliqué, nous indiquant donc qu'il n'y a pas ou peu de d'électro-osmose dans le pore de 3nm percé par TEM. Cette absence d'électro-osmose pourrait être expliquée par la technique de perçage de la membrane. En effet, les électrons chauffent localement le matériau, qui est dit recuit, ce qui annule les charges de surface du nanopore. En outre, une étude récente de simulation a prédit qu'il peut y avoir de fortes interactions entre

les protéines et la surface d'un pore percé, par FIB dû à des ions gallium incrustés dans la membrane(134). Ces deux phénomènes pourraient donc expliquer les temps de passage anormalement longs dans le pore de 20nm.

Nous avons trouvé une dépendance exponentielle des fréquences des évènements avec le potentiel appliqué sans saturation précédemment observée. La barrière d'entrée déduite est  $U^* \cong 4.2 k_B T$  pour ce pore de 3nm alors que nous avons déduit  $U^* \cong 10.4 k_B T$  pour le pore de 20nm. Nous attendions une augmentation de la barrière d'entrée d'un facteur  $(D_{20nm}/D_{3nm})^{2/3} = 24$ , due au confinement de la chaîne. Or, cette barrière d'énergie est deux fois moins importante que celle déduite dans le pore de 20nm. Les interactions hydrophobes et électrostatiques pourraient contribuer à cette énergie d'activation. Seulement la concentration en sels utilisée dans nos expériences écrante les interactions électrostatiques. La barrière déduite dans le pore de 3nm est similaire à celle trouvée dans l'aérolysine dont le pore a un diamètre comparable mais possède une charge nette différente. Dans ce pore protéique, l'entropie est la contribution majeure pour l'entrée de protéines. L'entrée de la protéine dépliée serait également due à une barrière entropique dans le nanopore artificiel.

En conclusion de cette étude, nous avons montré qu'il est possible de contrôler la dynamique de passage d'une protéine dépliée à travers un nanopore artificiel grâce à une autre technique de perçage, mais également en augmentant la force électrique. En effet, pour ce pore, les fréquences de passage sont plus élevées que pour le pore de 20nm, la barrière d'entrée est plus faible et les temps de blocage sont plus courts que ceux attendus. L'entrée de la chaîne dans le nanopore, quand la taille de la protéine est plus grande que celle du pore, est due principalement à une barrière entropique associée à son confinement. Nous avons montré qu'à des voltages modérés, la chaîne interagit avec le pore, puis pourrait s'échapper du pore sans être transportée. À hauts

voltages, la chaîne est réellement transportée à travers le pore, gouvernée par un phénomène électrophorétique. Nous en concluons d'après le modèle théorique que la chaîne est d'abord piégée à l'entrée du pore, avant de la franchir pour être ensuite transférée dans le pore.



# Dynamics of Completely Unfolded and Native Proteins through Solid-State Nanopores as a Function of Electric Driving Force

Abdelghani Oukhaled,<sup>†,‡</sup> Benjamin Cressiot,<sup>†</sup> Laurent Bacri,<sup>†</sup> Manuela Pastoriza-Gallego,<sup>†</sup> Jean-Michel Betton,<sup>‡</sup> Eric Bourhis,<sup>‡</sup> Ralf Jede,<sup>||</sup> Jacques Gierak,<sup>‡</sup> Loïc Auvray,<sup>§</sup> and Juan Pelta<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>LAMBE UMR CNRS 8587, Université d'Evry et de Cergy-Pontoise, France, <sup>‡</sup>Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, France, <sup>§</sup>Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université Paris Diderot, France, <sup>‡</sup>LPN/CNRS, Marcoussis, France, and <sup>||</sup>RAITH GmbH, Hauer 18, Technologiepark, D-44227 Dortmund, Germany

The electrically driven manipulation of single biological or synthetic macromolecules by transport across a nanopore is now widely used<sup>1–6</sup> and has many important potential applications,<sup>7,8</sup> particularly for ultrafast DNA sequencing.<sup>7</sup> In most cases, an applied electric field drives a macromolecule into the nanopore, inducing a transient blockade of electrical current and a measurable increase in electrical resistance.<sup>9</sup> The current blockade duration and rate depend on the size and conformation of the passing macromolecule, the diameter, length, and protein pores or solid-state pores and the interaction between the molecule and the pore walls. Two types of nanopore are used in practice: natural or modified protein channels<sup>4,10</sup> or artificial nanopores drilled by different techniques through solid-state semiconductor<sup>1,11</sup> or polymer membranes.<sup>12</sup>

Inspired by the biological example of protein transport through the translocon machinery,<sup>13</sup> we have spent several years studying the use of a protein pore,  $\alpha$ -hemolysin, as a conformation filter for completely or partially unfolded proteins.<sup>14</sup> We have recently studied the dynamics of unfolded proteins through an aerolysin channel.<sup>15</sup> Toxin channels are very good sensors to probe the conformation of passing polypeptide chains because their diameter is very small.<sup>15–19</sup> On the other hand, protein channels are slightly sensitive to denaturing agents.<sup>15,20,21</sup> Solid-state nanopores offer the advantage of customized pore diameters, and they exhibit high chemical resistance to denaturing agents.<sup>22</sup>

Nanofabricated pores have already been used to detect proteins, in their native

**ABSTRACT** We report experimentally the dynamic properties of the entry and transport of unfolded and native proteins through a solid-state nanopore as a function of applied voltage, and we discuss the experimental data obtained as compared to theory. We show an exponential increase in the event frequency of current blockades and an exponential decrease in transport times as a function of the electric driving force. The normalized current blockage ratio remains constant or decreases for folded or unfolded proteins, respectively, as a function of the transmembrane potential. The unfolded protein is stretched under the electric driving force. The dwell time of native compact proteins in the pore is almost 1 order of magnitude longer than that of unfolded proteins, and the event frequency for both protein conformations is low. We discuss the possible phenomena hindering the transport of proteins through the pores, which could explain these anomalous dynamics, in particular, electro-osmotic counterflow and protein adsorption on the nanopore wall.

**KEYWORDS:** solid-state nanopore · focused ion beam · protein transport · protein unfolding · anomalous transport

state.<sup>22–27</sup> In these studies, the pore diameter is much larger than the protein diameter, but the experiments are sensitive to the relative charge and size of the proteins. In one case, protein transport through the nanopores has been proven using a luminescence assay.<sup>23</sup> An unexplained feature of these early experiments is that the dwell time of proteins inside the pores is strikingly long, on the order of a few hundred microseconds, 2 orders of magnitude larger than expected. Solid-state nanopores have also been used to study pore–DNA interactions,<sup>28</sup> protein–protein interactions, in particular antigen–antibody binding.<sup>25,26</sup> They have shown that the ionic current blockade can provide information about the size and stoichiometry of the complex antigen–antibody. In this last experiment, the observed protein current blockade durations are also many orders of magnitude longer than the expected electrophoretic

\* Address correspondence to [juan.pelta@bio.u-cergy.fr](mailto:juan.pelta@bio.u-cergy.fr).

Received for review December 15, 2010 and accepted April 8, 2011.

Published online April 08, 2011  
10.1021/nn1034795

© 2011 American Chemical Society

transport times (pH close to the pI). Recently, new experiments have been performed to study protein translocation for different proteins.<sup>27,29</sup> The authors also find that the transport event durations are many orders of magnitude longer than the electrophoretic transport time. They suggest that the protein engages in repeated adsorption/desorption processes at the pore and nanotube walls. Recent data suggest that proteins which have dimensions similar to or larger than the pore diameter do not translocate, and smaller proteins can apparently translocate in a folded conformation.<sup>30</sup> Solid-state nanopores have also been used to study folded, partially unfolded, and fully unfolded proteins (bovine lactoglobulin) in three different states corresponding to three concentrations of denaturing agent, urea.<sup>22</sup> These states can be distinguished by the depth and duration of the measured current blockades. The dynamics of the translocation are also found to be anomalously slow, a fact which the authors suggest could be associated with the disorder of electric charges along the protein sequence. As shown recently in interesting experiments that directly probe the electrokinetic effects occurring in nanopores, electro-osmotic flow due to the surface charge of the pores may reverse the electrophoretic transport of proteins.<sup>31</sup>

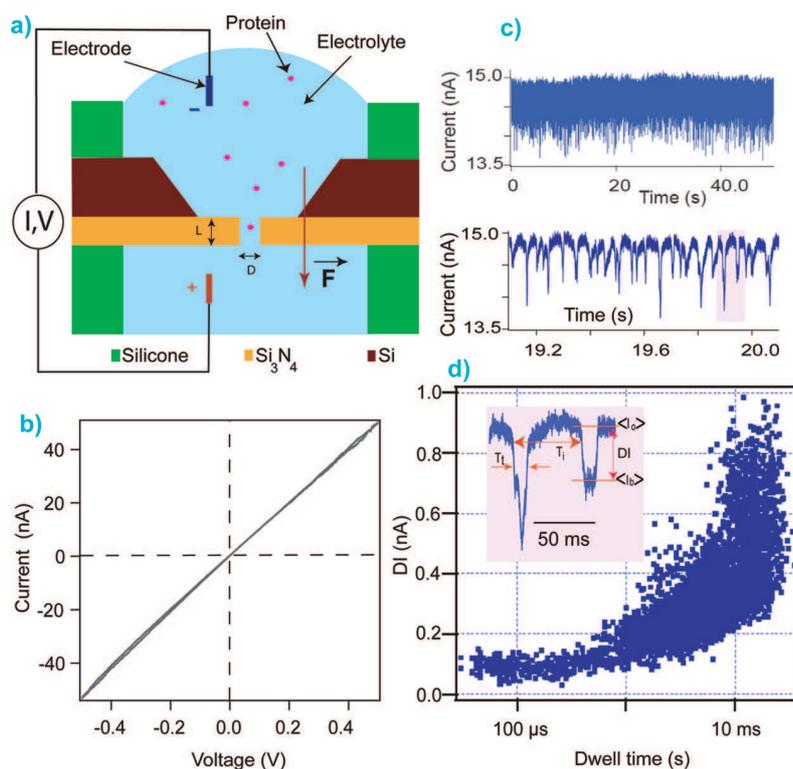
To date, there is only an incomplete understanding of the dynamics of native and unfolded proteins through solid-state nanopores as a function of the applied voltage. We wish to use solid-state nanopores to study protein unfolding at the single-molecule level. However, the first stage is to control the physical mechanisms of protein translocation through a solid-state nanopore as a function of the electric driving force. To get a better insight, we compare folded and unfolded proteins and systematically vary the applied electrical force between 25 and 250 mV. In our experiments, we use a protein model for the translocation and for the protein folding: this is the recombinant maltose binding protein (MBP) or MalE.<sup>32</sup> The role of this periplasmic protein is to transport maltose inside the bacteria. In order to compare data obtained previously with protein (MalE) transport through protein pores,  $\alpha$ -hemolysin,<sup>14,17</sup> aerolysin,<sup>15</sup> and the dynamics of MalE through a solid-state nanopore in a silicon nitride membrane, we have used the same order of protein concentration. MalE is completely unfolded in the presence of guanidium chloride (1.44 M). We mainly probe a regime where the pore diameter (20 nm) is larger than the size of the proteins. Its native shape is ellipsoidal<sup>33</sup> with overall dimensions of  $3 \times 4 \times 6.5$  nm<sup>3</sup>. The protein, MalE, is composed of 51 acidic residues (24 Asp + 27 Glu) and 43 basic residues (37 Lys + 6 Arg), uniformly distributed along the primary sequence. Its pI is 5.2; thus the protein is negatively charged at pH 7.5, and the protein net charge is  $-8e$ . From the 3D structure, there is no visible cluster of charged residues.

We analyze the primary structure of MalE (or MBP) using the SAPS program ([www.ebi.ac.uk/Tools/saps](http://www.ebi.ac.uk/Tools/saps)), developed by S. Karlin) to evaluate the presence of charge cluster or other compositional amino acid biases.<sup>34</sup> This analysis did reveal any positive or negative charge clusters; therefore, we assumed that charged residues are also uniformly distributed in the unfolded conformation. The unfolded MalE protein is treated as a uniformly distributed negatively charged polymer. In order to check that the protein is inside the nanopore and confirm the pore diameter, in relation with the level of the current blockade, we performed another experiment where the pore diameter (4 nm) is smaller than the unfolded protein size (a new recombinant double MBP protein consisting of two tandem MalE sequences and whose diameter is at least 12 nm for an unfolded state).

We observed that the ionic current increases in the presence of the denaturing agent, guanidium chloride. The current blockade increases linearly as the applied voltage increases. The normalized current blockage remains constant or decreases for folded or unfolded proteins, respectively, as a function of the transmembrane potential. We analyze transport parameters: frequency of current blockades, activation energy, effective charge of the protein, and dwell time. The blockade rate is described by a Van't Hoff–Arrhenius law. We show that the confined protein chain dynamics are associated with a free-energy barrier. The dwell time decreases exponentially as a function of voltage. The capture rate of native and unfolded proteins is low, and their dwell times are very long. We discuss these anomalous dynamics inside the solid-state nanopore.

## RESULTS AND DISCUSSION

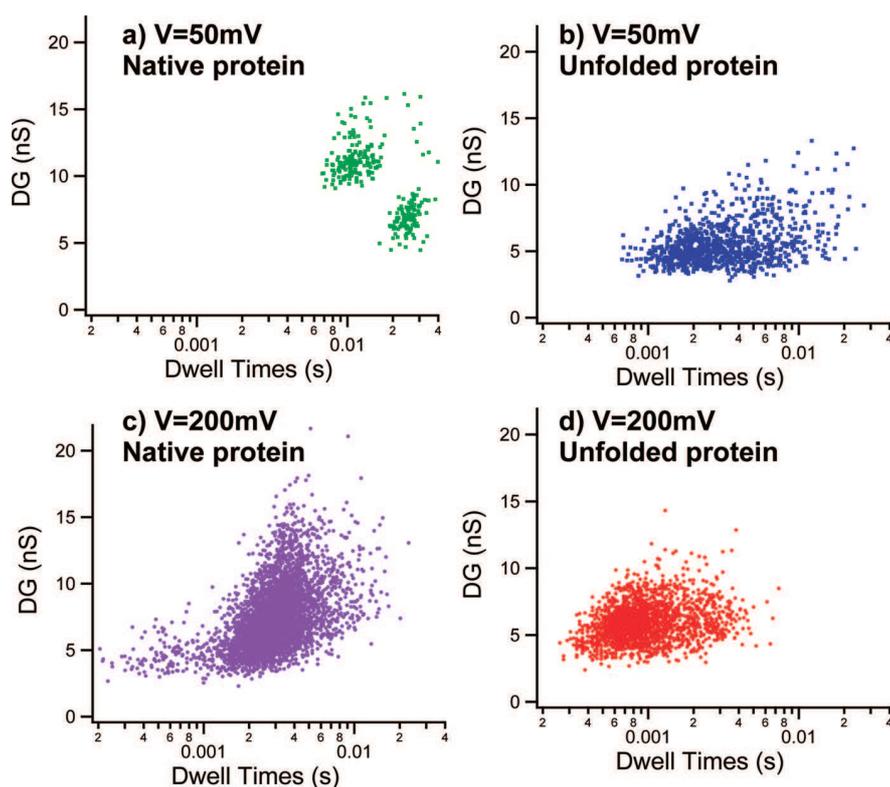
**Analysis of the Currents Blockade.** We first present results obtained with native MBP proteins. After the addition of native proteins in the *cis* (negative) compartment, deep current blockades are observed (Figure 1c). A detail of a current trace is shown in Figure 1c (top panel). The baseline of the current remains stable during the acquisition, often made during several minutes. A typical current blockade is shown at high resolution in Figure 1c (bottom panel). In the inset of Figure 1d, we observe two types of events: short rectangular events and longer events with an enhancement portion. Each corresponds to a single protein inside the pore and probably to two proteins translocating, respectively. This inset allows us to define the main characteristics of the current trace: blockade duration  $T_b$ , related to the dwell of a protein in the pore; inter-event time  $T_i$ , related to the frequency of blockades; mean open pore current  $\langle I_o \rangle$  (associated with the pore conductance) and mean blockade pore current  $\langle I_b \rangle$ . Figure 1d shows a plot of the current blockade  $DI = \langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle$  versus the dwell time  $T_t$  exhibiting the



**Figure 1.** Direct focused ion beam (FIB) nanopore fabrication for the detection of native and unfolded proteins. (a) Experimental setup for single-molecule measurements with a nanopore sensor. A negatively charged protein molecule is driven by an electric field through 20 nm aperture of a solid-state Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> membrane. Both reservoirs are filled with an aqueous buffer solution (1 M KCl, 10 mM Tris, pH 7.5). (b)  $I$ – $V$  curve characterization of a solid-state nanopore in 1 M KCl; the apparent nanopore diameter is 20 nm. The linear fit yields a conductance of  $103 \pm 3$  nA/V. (c) Detail of a current trace recording in the presence of native MBP protein. Individual events are shown with increased time resolution (bottom). (d) Event scatter plot of dwell time versus current blockade. The inset shows two successive individual events, with corresponding dwell time  $T_i$ , inter-event time  $T_i$ , mean current level of the empty pore  $\langle I_o \rangle$ , mean blockade pore current  $\langle I_b \rangle$ , and current blockade  $DI = \langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle$ ; we use the maximum current blockade during each event for data analysis. The protein concentration is  $0.78 \mu\text{M}$ , and the transmembrane potential is 100 mV.

classical correlation between deep and long blockades. We have systematically examined the normalized conductance variation  $DI$  versus dwell time scatter plots for all applied voltages (Figure 2). We observe that the dwell time and the normalized conductance variation of the native MBP proteins (Figure 2a) are larger than those of the unfolded proteins (Figure 2b). The effect is also observed when we increase the applied voltage to 200 mV (Figure 2c,d). The current blockade could be associated with the difference in occupied volume either by a globular protein inside the pore or by the one occupied by a completely unfolded protein. We further analyze the behavior of dwell times of native and unfolded proteins in terms of electrical charge distribution, hydrodynamic interactions, and drag forces. We measure the current blockade  $\langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle$  (Figure 3a) from the full current trace histogram shown in Figure 3b. We observe two distinct populations: the first one corresponds to the noisy ionic current of the “empty pore”, the second one to the presence of the proteins inside the pore (Figure 3b). We check that the mean of the current blockade increases linearly as a function of the applied voltage from 50 to

200 mV (Figure 3c) for two different protein concentrations and for native and unfolded proteins (data not shown). The blockade frequency of unfolded proteins is, however, much smaller, and significant statistics are only obtained when using larger concentrations. We compare, in Figure 3d, the blocking ratio of folded and unfolded proteins. The normalized current blockade is defined as  $(\langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle) / \langle I_o \rangle$  and the percentage of the normalized current blockade  $I_B$  (%) as  $(\langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle) / \langle I_o \rangle \times 100$ ; we observe that normalized current is independent of the voltage for native proteins. This result suggests that the blockades observed are indeed due to the presence of the proteins inside the pore and not at the pore entry. We notice that the normalized current blockade remains constant for folded proteins as a function of the transmembrane potential while it decreases for unfolded proteins. This probably means that the conformations of the flexible unfolded proteins inside the pore depend on the applied electric field. Furthermore, this suggests that the volume occupied by the unfolded chains in the pore is smaller than that of folded chains, and that it decreases as the voltage increases. All of these considerations let us



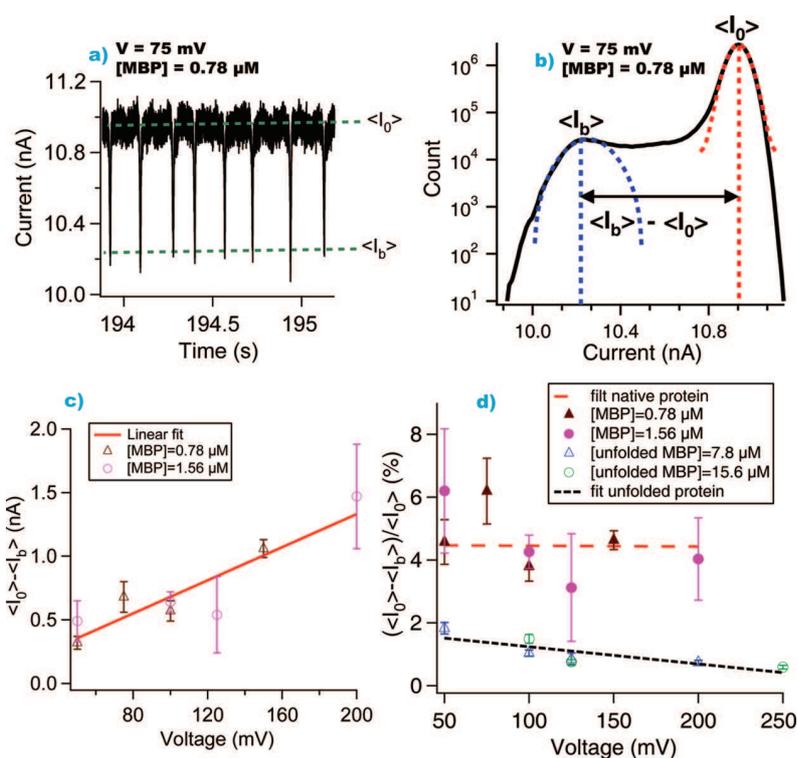
**Figure 2.** Nanopore as a sensor for the detection of native and unfolded protein conformation. Scatter plot of normalized conductance variation  $DG$  versus the dwell time at different applied voltages for native (left) and unfolded (right) MBP proteins. The conductance is normalized by taking into account the change of the conductivity with 1.44 M or without the guanidium-HCl in the buffer solution.

presume that unfolded polypeptide chains are progressively stretched as the applied force increases. We make a more quantitative analysis by comparing the value of the normalized current blockade,  $I_B = (\langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle) / \langle I_o \rangle$ , to its theoretical value, which is to a first approximation the volume occupied by the protein inside the pore. For the native protein assumed to be ellipsoidal  $V_{MBP}/V_{pore} = (4/3\pi abc) / (\pi r_{pore}^2 L_{pore})$ , with  $a$ ,  $b$ , and  $c$  being the MBP dimensions 3, 4, and 6.5 nm, respectively, and by considering a cylindrical nanopore shape of radius  $r_{pore}$  and length  $L_{pore}$ ,  $V_{MBP}/V_{pore} = 3.5\%$ , we obtain  $I_B = (\langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle) / \langle I_o \rangle = 4.5 \pm 0.7\%$  (Figure 3d). Both values are indeed very close. For the unfolded protein, we choose the reference geometry to be that of the fully extended molecule. We estimate the lower blocking ratio with a cylinder of radius  $r_{mono} = 0.33$  nm (radius of an amino acid) spanning the whole length of the pore. In this case,  $V_{MBP}/V_{pore} = r_{mono}^2 / r_{pore}^2 = 0.1\%$ . A more realistic estimation is to take into account the thickness of the chain, 0.66 nm; we find  $V_{MBP}/V_{pore} = r_{mono}^2 / r_{pore}^2 = 0.4\%$ . An excluded volume chain will be evaluated by taking into account the Kuhn length; this length is the statistical segment for unfolded protein,  $t_{chain} = 1.32$  nm,<sup>35</sup> and we find  $V_{MBP}/V_{pore} = 1.69\%$ . The largest experimental value of  $I_B = (\langle I_o \rangle - \langle I_b \rangle) / \langle I_o \rangle$  obtained at the smallest voltage (50 mV) is  $I_B = 1.8 \pm 0.2\%$ , and the smallest experimental

value  $I_B$  obtained at the highest voltage (250 mV) is  $I_B = 0.6 \pm 0.1\%$ . The theoretical estimate yields the right order of magnitude of the observed values. We deduce from the difference between both values that the chain is stretched under the electric driving force.

**Capture Rate of Native and Unfolded Proteins.** We use two values of protein concentration in the native or unfolded state. We check in each case that the mean blockade frequency (derived from the blockade histograms shown in Figure 4a,b) is proportional to protein concentration. The relevant variable is the capture rate,  $R$ , defined as the frequency per unit of concentration. From the inter-event duration histogram, we observe that the blockade current frequency increases as the applied voltage increases from 50 mV (Figure 4a) to 200 mV (Figure 4c).

The capture rate  $R$  as a function of the voltage is, in general, described by a Van't Hoff–Arrhenius law,  $R = R_0 \exp(|V|/V_0)$ , where  $R_0 \propto f^* \exp(-U^*/k_B T)$  is the zero voltage capture rate controlled by an activation barrier  $U^*$  ( $f^*$  is a frequency factor) of entropic and electrostatic origin. The ratio  $|V|/V_0 = (zeV)/k_B T$  is a barrier reduction factor due to the applied voltage  $V$ , acting on  $ze$ , the effective electric charge of the molecule, where  $z$  is the magnitude of the effective total number of elementary charges on the protein,  $e$  is the magnitude of the elementary charge, and  $k_B T$  is the thermal energy.<sup>36</sup>



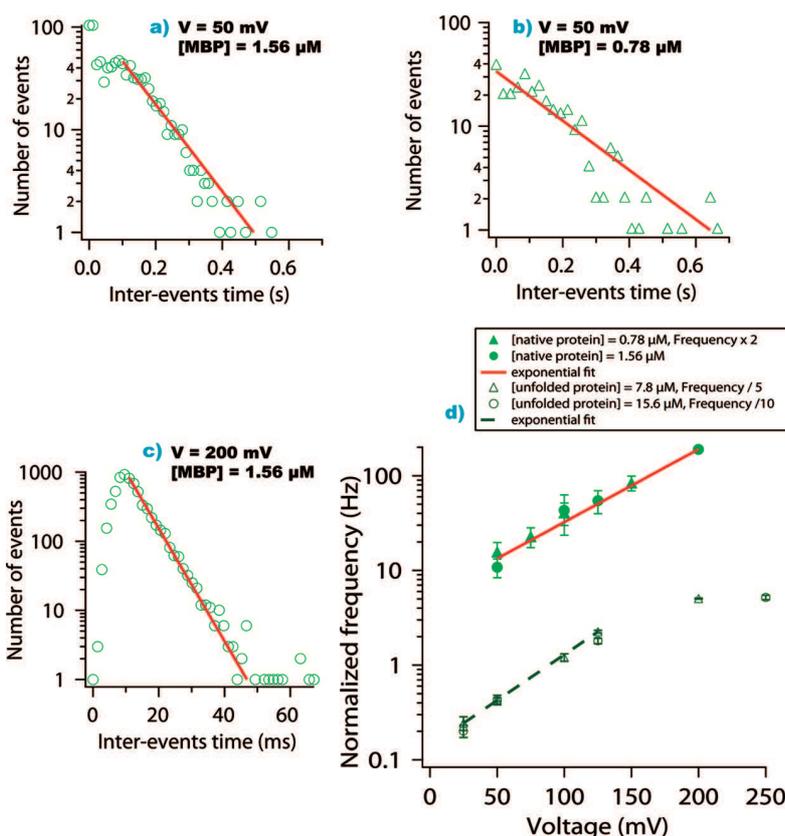
**Figure 3.** Comparison of the current blockade ratio of native and unfolded proteins as a function of applied voltage. (a) Detail of current trace recording at 75 mV showing the mean current empty pore  $\langle I_0 \rangle$  and the mean blockade pore current  $\langle I_b \rangle$ . (b) Corresponding histogram of the full current trace used to define  $\langle I_0 \rangle$  and  $\langle I_b \rangle$  from the mean of the Gaussian fitted to the first and second peak. (c) Evolution of current blockade  $\langle I_0 \rangle - \langle I_b \rangle$  as a function of applied voltage. The solid line is a linear fit whose equation is  $f(V) = bV + a$ , with  $a = 0.03 \pm 0.14$  nA,  $b = 0.006 \pm 0.001$  nA  $\text{mV}^{-1}$ . (d) Evolution of the normalized blockade ratio (%)  $(\langle I_0 \rangle - \langle I_b \rangle) / \langle I_0 \rangle \times 100$  as a function of applied voltage. Dotted lines are linear fits of equation  $f(V) = bV + a$ . We obtain  $a = 4.5 \pm 0.5\%$ ,  $b = -0.00026 \pm 0.0001\% \text{ mV}^{-1}$  for native proteins; and  $a = 1.8 \pm 0.26\%$ ,  $b = 0.0054 \pm 0.002\% \text{ mV}^{-1}$  for unfolded proteins.

The potential  $V_0$  ( $V_0 = (k_B T) / (ze)$ ) corresponds to the necessary applied potential to allow a charged protein to overcome the Brownian motion.

Frequency data are well-described by an exponential fit of the equation  $f = f_0 \exp(|V|/V_0)$  in the whole range of potentials for folded proteins and at low voltage for unfolded ones. We obtain  $f_0 = 5.5 \pm 0.5$  Hz (at  $c = 1.56 \mu\text{M}$ ),  $R_0 = 5.9 \times 10^{-21} \text{ m}^3/\text{s}$ ,  $V_0 = 56.4 \pm 0.5$  mV, and  $z = (k_B T/e)(1/V_0) = 0.45 \pm 0.01$  for folded proteins and  $f_0 = 0.14 \pm 0.01$  Hz (at  $c = 15.6 \mu\text{M}$ ),  $R_0 = 5.9 \times 10^{-23} \text{ m}^3/\text{s}$ ,  $V_0 = 45 \pm 0.5$  mV,  $z = (k_B T/e)(1/V_0) = 0.6 \pm 0.01$  for unfolded proteins. These values are close to the effective charge found for unfolded MBP proteins through the  $\alpha$ -hemolysin pore ( $z = 0.6$ ).<sup>14</sup> In order to obtain an estimate of the activation energy ( $U^*$ ) is estimated by a barrier penetration calculation  $f^* \cong CD_{\text{diff}}A_{\text{pore}}/L_{\text{pore}}$  where  $C \cong 9.4 \times 10^{20}$  molecules/ $\text{m}^3$  is the bulk concentration of native MBP protein (corresponding to  $c = 1.56 \mu\text{M}$ ),  $D_{\text{diff}} \cong 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  its diffusion coefficient,  $A_{\text{pore}} \cong \pi 10^{-16} \text{ m}^2$  is the cross-sectional area of the pore, and  $L_{\text{pore}} = 30 \times 10^{-9} \text{ m}$  the pore length, we calculate  $U^* \cong 7.4k_B T$ . A similar analysis yields  $U^* \cong 10.4k_B T$  for the MBP proteins in their unfolded state. This estimated value is surprisingly high in comparison

to unfolded protein entry through narrow protein pores which have smaller diameters than a solid-state nanopore. We have found  $U^* \cong 4k_B T^{15}$  for unfolded MBP proteins passing through an aerolysin pore, and a lower value,  $U^* \cong 2k_B T$ , with an  $\alpha$ -hemolysin pore.<sup>14</sup> The activation energy is high in the case of solid-state nanopore, and this could be due to hydrodynamic effect as observed previously by Storm *et al.*<sup>37</sup> There is an essential difference between solid-state nanopore and protein nanopore. The friction outside the pore is dominant. The friction is proportional to the size of the protein (hydrodynamic radius). For the unfolded protein (MBP), the size of the protein increases by a factor 2 in comparison to native conformation, consequently the friction increases. This is a possible reason for the difference in term of activation energy between the two chain conformations.

As  $\text{Si}_3\text{N}_4$  membranes are negatively charged, one might think, as explained by several groups,<sup>31,38,39</sup> that electro-osmotic counterflow could slow down and hinder the penetration of the negatively charged DNA<sup>38,39</sup> or proteins<sup>31</sup> into the pores. However, if the electro-osmotic effects were dominant, one would expect that the capture would decrease when increasing the applied electric field. The nanopore (SiN) is highly



**Figure 4.** Normalized frequency of current blockades versus applied voltage in semilog scale. Explanation of the statistical analysis of the measured current traces, distribution of inter-event intervals  $T_i$  for two different protein concentrations of 1.56  $\mu\text{M}$  (a) and 0.78  $\mu\text{M}$  (b) with a constant voltage  $V = 50$  and 200 mV with the same MBP concentration of 1.56  $\mu\text{M}$  (c). Continuous lines are exponential fits. (d) Frequency of events versus applied voltage. Continuous and dotted lines are exponential fits for native and for unfolded proteins, respectively. We obtain  $f = f_0 \exp(|V|/V_0)$  with  $f_0 = 5.5 \pm 0.5$  Hz,  $V_0 = 56.4 \pm 0.5$  mV for native proteins and  $f_0 = 0.14 \pm 0.01$  Hz,  $V_0 = 45 \pm 0.5$  mV for unfolded proteins.

negatively charged, and in presence of KCl solution, the counterions of the nanopore are positively charged and the net charge of the protein is negatively charged. Under an applied voltage, the solvent and the protein move in opposite directions. When the ratio between the Debye length and the pore diameter is high the electro-osmotic flow magnitude is dominant, furthermore, the electro-osmotic velocity is proportional to the electrical field and we would expect that the capture would decrease when the applied voltage increases. In our experimental conditions, this is not the case: this ratio is small (0.015), and the electro-osmotic effect is not dominant. For this reason, we observe an increase of the capture when the applied voltage increases.

We also notice that the capture rate of the unfolded proteins saturates at high voltage ( $V > 150$  mV). This behavior is unusual and could be associated with a protein crowding at the entrance of the pore, due to the high electric field applied and the large protein concentration 10 times larger than the one used for folded proteins.

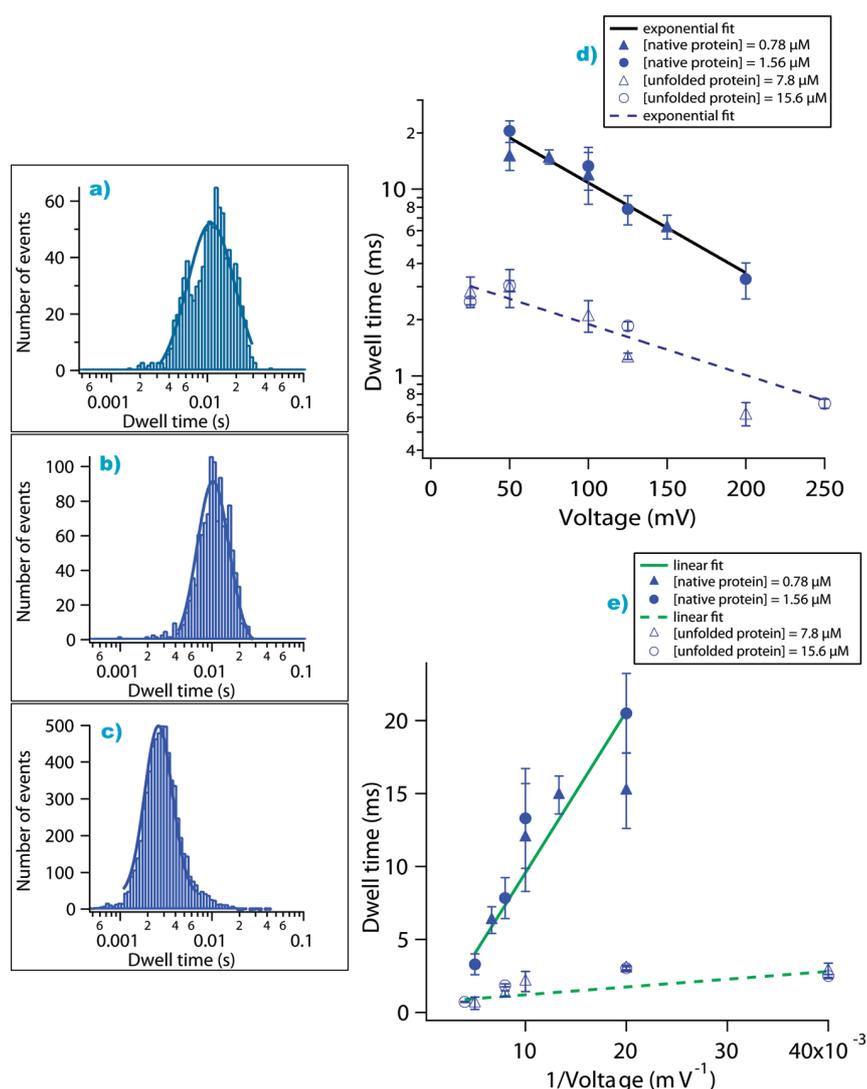
**Analysis of the Dwell Times.** We have observed that the blockade durations of the native and unfolded proteins

decrease as the applied electric field increases. The measured dwell time varies between  $20 \pm 3$  ms at 50 mV and  $3.3 \pm 0.7$  ms at 200 mV (Figure 5d) when the proteins are in their native state, and between  $3 \pm 0.7$  ms at 50 mV and  $0.7 \pm 0.1$  ms at 200 mV when they are unfolded. We check that these times remain unchanged when using two different protein concentrations (Figure 5a,b).

If the electro-osmotic flow is not the dominant effect for the dynamics of protein translocation, the dwell time will be a decreasing function of the applied voltage. We observe this dependency for native or unfolded proteins.

We also find that folded proteins stay longer in the pore than unfolded ones when applying the same electric force. A possible explanation for this dwell time difference is that the interactions between the protein and the nanopore depend on the folding state of the proteins; the shape or the surface charge distribution is quite different between the folded and the unfolded conformation.

If there is no energy barrier inside the pore, the translocation time is expected to be inversely proportional to the applied force, that is, to the transmembrane



**Figure 5.** Dwell time of events *versus* applied voltage for native and unfolded proteins. Histograms of the dwell times for native proteins (a–c). Lines are logarithmic normal fits; the maximum of the distribution defines the most probable dwell time. MBP concentrations are (a) 0.78 and (b) 1.56  $\mu\text{M}$ , and the transmembrane potential is 100 mV. (c) Protein concentration is 1.56  $\mu\text{M}$ , and the applied voltage is 200 mV. Dwell time of events *versus* applied voltage; the graph is plotted on a linear scale (d) or on a semilog scale (e). The continuous line corresponds to native protein fit and the dashed line to unfolded protein fit. We find using the equation  $f(V) = A \exp(-V/V_c)$ :  $A = 32.87 \pm 4.08$  ms,  $V_c = 90.9 \pm 9.9$  mV, and  $\chi^2 = 3.41$  for native proteins;  $A = 3.5 \pm 0.3$  ms,  $V_c = 167 \pm 33$  mV, and  $\chi^2 = 1$  for unfolded proteins. Using the equation,  $f(V) = b/V + a$ , we obtain  $a = -1.48 \pm 1.01$  ms,  $b = 1104 \pm 114$  ms mV, and  $\chi^2 = 9$  for native proteins and  $a = 0.68 \pm 0.04$  ms,  $b = 54 \pm 2.9$  ms mV, and  $\chi^2 = 160$  for unfolded proteins.

voltage.<sup>40–43</sup> In the opposite case, translocating chains are traveling in a complex energy landscape with a well-defined energy barrier. One expects an exponential dependence of the translocation time on the applied voltage.<sup>44</sup> We have examined these two hypotheses by fitting the experimental data to the different predicted behaviors (Figure 5d,e). The  $\chi^2$  of the exponential and  $1/V$  fit are, respectively,  $\chi^2 = 3.41$  and 8.98 for the folded proteins and  $\chi^2 = 1$ ,  $\chi^2 = 160$  for the unfolded ones. The exponential dependency is clearly more convenient in both cases. This suggests that protein transport involves a free-energy barrier as observed in previous studies using protein nanopores.<sup>15,45,46</sup> The coupling with the electric field inside the nanopore is measured by the

effective charge  $z_{\text{inside}} = (k_B T)/(eV_c) = 0.28$  deduced from the voltage relationship (Figure 5e), with  $z_{\text{inside}}$  being the effective charge of the protein inside the pore. The low value of this effective charge was previously observed with DNA<sup>47</sup> and colloid<sup>48</sup> translocation using solid-state nanopores. This charge reduction is not fully explained, and it could be associated with an increased condensation of the counterions due to the confinement of the charges in the medium of low dielectric constant<sup>49</sup> or by the back flow effects.<sup>38</sup> The low values of the effective charge inside the pore are also observed with protein nanopores.<sup>15,45,46</sup>

In our case, the pore diameter (20 nm) is less than the membrane thickness (30 nm), the edge effects are

negligible, and the pore resistance in the first approximation is given by the Ohm law. When the pore diameter is higher than the membrane thickness, the access resistance should be given by the shape of field lines in the electrolyte at the entrance and exit of the pore and should be taken into account.<sup>50</sup>

As already noticed by several authors,<sup>22–27</sup> the durations of the observed current blockades of proteins in nanopores are anomalously long. In our case, we find values on the order of a millisecond, while one would expect transit times based on the electrophoretic mobility on the order of a microsecond. The electrophoretic velocity ( $v$ ) of protein is related to the electric field strength ( $E$ ) via  $v = Q/(6\pi\eta r)E$ , where  $Q$  is the protein net charge,  $r$  the protein radius, and  $\eta$  is the viscosity of the solution. The electrophoretic time  $\tau_{\text{ele}}$  over the pore length  $L$  is  $\tau_{\text{ele}} = L/v = (6\pi\eta rL)/(QE) = (6\pi\eta r)/(QL^2/V)$ , where  $V$  is the applied electric voltage. In our experimental conditions,  $Q = -8e$ ,  $L = 30$  nm,  $\eta = 10^{-3}$  Pa·s, at 100 mV, one estimate  $\tau_{\text{ele}} = 0.2$   $\mu$ s. The diffusion time through the pore length that we estimate using  $\tau_{\text{diff}} = L^2/D_{\text{diff}} = (6\pi\eta r)/(k_B T)L^2 = \tau_{\text{ele}}(QV)/(k_B T)$ , using the above values, is  $\tau_{\text{diff}} = 6.4$   $\mu$ s. These two values are certainly below the experimental measured times. This phenomenon is not yet fully understood, and several explanations have been proposed.

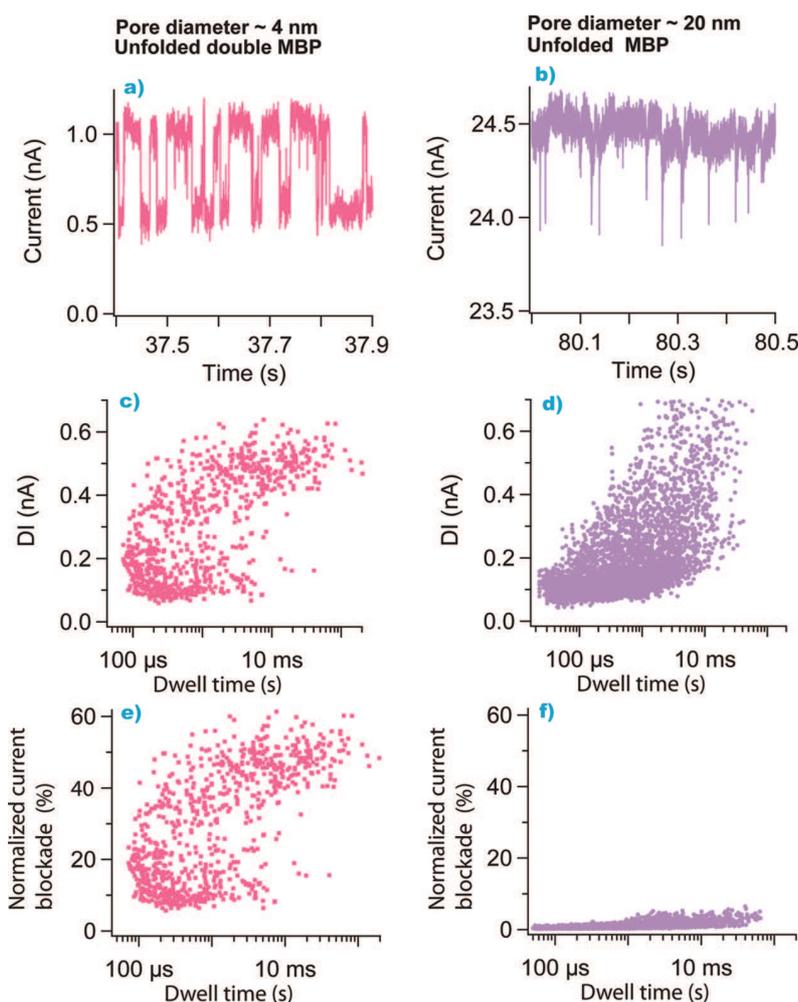
The first one involves attractive interactions between the proteins and the nanopore walls,<sup>22,29</sup> leading to protein adsorption. This is quite a common phenomenon, particularly on such a high energy surface as that of SiN.<sup>51</sup>

The second one, studied in detail for proteins by Firnkes *et al.*,<sup>30</sup> relies on the electro-osmotic effect, which may strongly slow down the passing proteins or even reverse their apparent electrophoretic mobility. The counterions of the surface charges are moved by the electrical field; they carry the solvent away with the velocity  $v_s = ((\epsilon\epsilon_0\zeta)/(\eta))E$ , where  $\epsilon = 80$  is the dielectric constant of water,  $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$  Fm<sup>-1</sup> is the vacuum dielectric constant, and  $\zeta = -10$  mV is the zeta-potential of the pore walls.<sup>31</sup> At KCl = 1 M and pH = 8, we find  $v_s = 0.24$  ms<sup>-1</sup>. In the presence of an electro-osmotic flow, the sum of electrophoretic forces and viscous friction forces is equal to zero  $-|Q|(V/L) + 6\pi\eta r(v_s - v) = 0$ , where  $v_s$  and  $v$  are, respectively, the solvent and protein velocity. With our values, we find  $v = v_s - |Q|(V/(6\pi\eta rL)) = 0.24 - 0.11 = 0.13$  ms<sup>-1</sup>. This velocity is positive, which means that the protein should never enter into the pore, which contradicts our experimental results. Recently, it has been shown that electro-osmotic velocity is also controlled by the geometry and diameter of the pore.<sup>38,39</sup> In our experimental conditions, the ratio between the Debye length (3 Å) and the surface separation (pore diameter: 200 Å) is small (0.015), and the electro-osmotic flow magnitude is reduced; this is a possible explanation of why the proteins still enter the nanopores.

In our case, we observe significant frequency of current blockades, and the number of events increases with applied voltage.

In order to discuss the possible explanations for the anomalous dynamics for protein transport through a nanopore, we evaluate the blockade frequency for purely Brownian diffusion proteins. The equation used below is valid for a perfect disk; this is not the case with the solid-state nanopore used in our experiment. However, by using the equation below, we evaluate the events frequency magnitude for a purely Brownian diffusion.<sup>52</sup> The blockade frequency is given by  $f = 2\pi D_{\text{diff}} c r_{\text{pore}} = (k_B T c)/(3\eta) r_{\text{pore}}/r$ , where  $D_{\text{diff}} = (k_B T)/(6\pi\eta r)$  is the self-diffusion coefficient for isolated Brownian proteins (Stokes–Einstein equation),  $c$  is the protein concentration, and  $r_{\text{pore}}$  and  $r$  are the pore and protein radii, respectively. For 1  $\mu$ M protein concentration, we find a frequency,  $f = 4000$  Hz. This value is 2 orders of magnitude higher than the measured frequency. This predicted value suggests that either the proteins adsorbed on the pore walls or there are missed events. Regarding the missed events, it was shown by Winterhalter and his colleagues<sup>53</sup> for the transport of antibiotics through membrane channels that the dwell times of the antibiotics inside the channel decrease strongly with an increase in temperature. Consequently, the fast translocation events are probably not visible, due to the limited resolution of the instrument. In the future, the resolution of the current measurement will need to be significantly increased to be able to resolve the events.<sup>54</sup> Events could be canceled by the electro-osmotic flow or by the potential barrier. The third one, more subtle, is based on the heterogeneity in the charge distribution all along the protein,<sup>22</sup> leading to a disordered energy landscape as the protein threads through a pore. A supplementary source of complication is that protein adsorption interferes with the electro-osmotic and the energy landscape effects, by changing the surface charge of the pore, hindering motion of the counterions close to the surface and modifying the interactions between the pore and the proteins.<sup>55</sup>

**Double MalE.** We have investigated the effect of the pore diameter dependence on the current blockade, normalized current blockade, and dwell time for completely unfolded proteins. We use a double MBP (Figure 6 left) and a single MBP (Figure 6 right) with two different pore diameters, 4 and 20 nm, respectively (Figure 6). We observe that the width of events (the dwell time) and the current blockade magnitude are more significant using the smaller pore size (Figure 6a,b). From the current traces, we expect the ratio  $I_{4\text{nm}}/I_{20\text{nm}}$  to vary as  $(D_{4\text{nm}}/D_{20\text{nm}})^2$ , where  $I_{4\text{nm}}$ ,  $I_{20\text{nm}}$ ,  $D_{4\text{nm}}$ , and  $D_{20\text{nm}}$  are the mean currents of open pores and pore diameters corresponding to 4 and 20 nm. The estimated value  $(D_{4\text{nm}}/D_{20\text{nm}})^2 = 0.040$  is similar to that



**Figure 6.** Electrical characterization of protein and nanopore size effects. Transport of unfolded double MBP protein (left) and single MBP protein (right) through two different pore diameters, 4 nm (a,c,e) and 20 nm (b,d,f), respectively. Detail of a current trace in the presence of (a) unfolded double MBP (15.6  $\mu\text{M}$ ) or (b) single MBP (7.8  $\mu\text{M}$ ) through a solid-state nanopore. In both traces, the applied voltage is 150 mV. Event scatter plot of dwell time versus current blockade, respectively, for double unfolded protein (c) and single unfolded protein (d). Event scatter plot of dwell time versus normalized current blockade (%) for double unfolded MBP (e) and single unfolded MBP protein (f).

obtained  $I_{4\text{nm}}/I_{20\text{nm}} = 1.04/24.47 = 0.042$ , suggesting that currents of open pores are consistent with pore sizes. This result also shows the presence of unfolded proteins inside the pore. Short events are associated with low current blockades, and long events are correlated to high current blockades (Figure 6c,d). The duration of short and long events of single unfolded proteins are shifted toward the lower values compared to double unfolded proteins. In order to compare the blockade rate caused by unfolded proteins through 4 and 20 nm pores, we represent a diagram of percentage of the normalized current blockade versus dwell time (Figure 6e,f). We observe that the normalized blockade of long events increases as the pore size decreases from 4 to 20 nm. The measured value for the percentage of the normalized current blockade of unfolded proteins through a 4 nm pore is 30–60% versus 0.5–2% through a 20 nm pore.

In conclusion, we compare the transport of native and unfolded proteins through solid-state nanopores drilled by FIB, and we observe anomalous protein translocation dynamics. In our experimental conditions, we show that this dynamic is associated with a free-energy barrier. The capture rate increases exponentially as a function of applied voltage, and the dwell time decreases exponentially when the electrical force increases. The unfolded protein is partially stretched under the electrical field. The capture rate of unfolded proteins is lower than that of native proteins and saturates at high voltage. The dwell time of proteins is very long, and compact native proteins stay longer in the pore than unfolded ones. In the future, we will investigate the origin of anomalous dynamics observed for native and unfolded proteins. In order to separate the electro-osmotic effect from protein–pore interaction effects or crowding effects, we plan to

perform experiments at different net charges, for either the proteins and the pores and with different polypeptide chain lengths. We will also examine the high

applied voltage regime and study the translocation through a solid-state nanopore with a narrow pore diameter.

## METHODS

**Solid-State Nanopores.** In order to fabricate solid-state nanopores, we used standard free-standing  $\text{Si}_3\text{N}_4$  membranes (Protochips Inc.). Nanopores were drilled in 30 nm membranes as previously described<sup>56</sup> using a focused ion beam instrument. This very high resolution FIB is especially suitable for the reproducible fabrication of nanometer sized pores.<sup>11,56</sup> In contrast with the usual nanodrilling technique based on the TEM local heating technique, the ion interaction process allows the ion dose to be calibrated precisely in one step, for irradiation times ranging between 10 ms and some hundreds of milliseconds.<sup>56</sup> In this study, we have chosen a medium ion dose (750 ms/pt) in order to fabricate nanopores with diameters from 4 to 20 nm. All of the nanopores were adapted to an easy-to-use "Port-a-patch" setup (Nanion Technologies GmbH). They were glued onto a drilled screw cap containing a 1–2 mm wide hole. This chip can be easily manipulated and rinsed with water and ethanol. In order to make the membrane hydrophilic, we cleaned this chip by exposing each side to oxygen plasma for 2 min. We then put a 10  $\mu\text{L}$  buffer droplet on each side of the nanopore using a micropipet. The buffer was an ionic solution of 1 M KCl containing 5 mM Tris (pH 7.5) and allowed good storage conditions. The experiments were conducted in a water-saturated atmosphere. The effective pore diameter was deduced from an open-pore conductance measurement assuming a cylindrical shape. The denaturing agent (guanidium-HCl) did not affect the noise level and pore stability. Addition of guanidium-HCl increased only the ionic current of the open pore.

**Proteins.** The recombinant maltose binding protein (MBP or MalE) of *Escherichia coli* contained 370 residues ( $M_r = 40\,707$ ) and was negatively charged (with a net charge  $Z = -8e$ ) at physiological pH. The wild-type MBP was purified as described.<sup>57</sup> The tandem protein, MalE–MalE or double MBP, was constructed by subcloning a PCR-amplified DNA fragment of the corresponding mature sequence of MalE with primers containing a *HindIII* adaptor as described.<sup>15</sup> The buffer was an ionic solution of 1 M KCl containing 5 mM Tris (pH 7.5). In this study, we added to this ionic solution the single or double recombinant MBP denatured by guanidium chloride (Gdm-HCl). The final concentration of guanidium chloride used was 1.44 M.

**Data Acquisition.** The ionic currents were detected using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). They were first filtered at 10 kHz before a digitization at 250 kHz. The data were processed with a homemade macro using Igor software (Wavemetrics). The event measurements were based on a statistical analysis of the current traces. The statistical analysis of the current traces have been previously described.<sup>45</sup> This method was based on a two thresholds method, in the case of events with asymmetric shape; the event duration was function of the threshold. As our threshold criterion was always the same, and the measurement error was constant and remained low. All data were obtained with a single nanopore, but for each experimental condition, we measured at least 2000 events. The same nanopore was used during several experiments and several days with the MalE. The physical parameters were estimated without the standard deviation between different pores but with the standard deviation of several assays with the same pore. Another pore of different size was used during the experiments with the double MalE. Data were systematically checked for reproducibility.

**Acknowledgment.** This work was supported by a grant funding, Action Thématique Incitative Génopole, ANR Blanche "TRANSFOLDPROT" BLAN08-1\_339991 and by ANR "ACTIVE NANOPORES" No. ANR-06-NANO-028 by Nanoscience Erant,

ANR "NANOPORE" No. 08-NSCI-006-01. We are grateful to Kari and Damien Foster for their attention to our manuscript and for kindly correcting the language of the manuscript.

## REFERENCES AND NOTES

- Dekker, C. Solid-State Nanopores. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 209–215.
- Howorka, S.; Siwy, Z. S. Nanopore Analytics: Sensing of Single Molecules. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2360–2384.
- Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 13770–13773.
- Kasianowicz, J. J.; Robertson, J. W. F.; Chan, E. R.; Reiner, J. E.; Stanford, V. M. Nanoscopic Porous Sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 737.
- Movileanu, L. Interrogating Single Proteins through Nanopores: Challenges and Opportunities. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 333–341.
- Muthukumar, M. Mechanism of DNA Transport through Pores. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 435–450.
- Branton, D.; Deamer, D. W.; Marziali, A.; Bayley, H.; Benner, S. A.; Butler, T.; Di Ventra, M.; Garaj, S.; Hibbs, A.; Huang, X.; *et al.* The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1146–1153.
- Reiner, J. E.; Kasianowicz, J. J.; Nablo, B. J.; Robertson, J. W. F. Theory for Polymer Analysis Using Nanopore-Based Single-Molecule Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 12080–12085.
- Zimmerberg, J.; Parsegian, V. A. Polymer Inaccessible Volume Changes during Opening and Closing of a Voltage-Dependent Ionic Channel. *Nature* **1986**, *323*, 36–39.
- Bayley, H.; Cremer, P. S. Stochastic Sensors Inspired by Biology. *Nature* **2001**, *413*, 226–230.
- Li, J.; Stein, D.; McMullan, C.; Branton, D.; Aziz, M. J.; Golovchenko, J. A. Ion-Beam Sculpting at Nanometre Length Scales. *Nature* **2001**, *412*, 166–169.
- He, Y.; Gillespie, D.; Boda, D.; Vlasiouk, I.; Eisenberg, R. S.; Siwy, Z. S. Tuning Transport Properties of Nanofluidic Devices with Local Charge Inversion. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5194–5202.
- Rapoport, T. A. Protein Translocation Across the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum and Bacterial Plasma Membranes. *Nature* **2007**, *450*, 663–669.
- Oukhaled, G.; Mathe, J.; Biance, A. L.; Bacri, L.; Betton, J. M.; Lairez, D.; Pelta, J.; Auvray, L. Unfolding of Proteins and Long Transient Conformations Detected by Single Nanopore Recording. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 158101–158104.
- Pastoriza-Gallego, M.; Rabah, L.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; van der Goot, F. G.; Auvray, L.; Betton, J. M.; Pelta, J. Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2923–2931.
- Baran, C.; Smith, G. S. T.; Bamm, V. V.; Harauz, G.; Lee, J. S. Divalent Cations Induce a Compaction of Intrinsically Disordered Myelin Basic Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 224–229.
- Pastoriza-Gallego, M.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; Betton, J. M.; Pelta, J. Polyelectrolyte and Unfolded Protein Pore Entrance Depends on the Pore Geometry. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 1377–1386.
- Stefureac, R.; Waldner, L.; Howard, P.; Lee, J. S. Nanopore Analysis of a Small 86-Residue Protein. *Small* **2008**, *4*, 59–63.

19. Sutherland, T. C.; Long, Y. T.; Stefureac, R. I.; Bediako-Amoa, I.; Kraatz, H. B.; Lee, J. S. Structure of Peptides Investigated by Nanopore Analysis. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1273–1277.
20. Lesieur, C.; Frutiger, S.; Hughes, G.; Kellner, R.; Pattus, F.; van der Goot, F. G. Increased Stability upon Heptamerization of the Pore-Forming Toxin Aerolysin. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36722–36728.
21. Pastoriza-Gallego, M.; Oukhaled, G.; Mathe, J.; Thiebot, B.; Betton, J. M.; Auvray, L.; Pelta, J. Urea Denaturation of  $\alpha$ -Hemolysin Pore Inserted in Planar Lipid Bilayer Detected by Single Nanopore Recording: Loss of Structural Asymmetry. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3371–3376.
22. Talaga, D. S.; Li, J. Single-Molecule Protein Unfolding in Solid State Nanopores. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9287–9297.
23. Fologea, D.; Ledden, B.; McNabb, D. S.; Li, J. Electrical Characterization of Protein Molecules by a Solid-State Nanopore. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, nihpa38991.
24. Han, A.; Schurmann, G.; Mondin, G.; Bitterli, R. A.; Hegelbach, N. G.; de Rooij, N. F.; Staufner, U. Sensing Protein Molecules Using Nanofabricated Pores. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 093901–093903.
25. Han, A.; Creus, M.; Schuermann, G.; Linder, V.; Ward, T. R.; de Rooij, N. F.; Staufner, U. Label-Free Detection of Single Protein Molecules and Protein–Protein Interactions Using Synthetic Nanopores. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4651–4658.
26. Sexton, L. T.; Horne, L. P.; Sherrill, S. A.; Bishop, G. W.; Baker, L. A.; Martin, C. R. Resistive-Pulse Studies of Proteins and Protein/Antibody Complexes Using a Conical Nanotube Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13144–13152.
27. Sexton, L. T.; Mukaib, H.; Katira, P.; Hess, H.; Sherrill, S. A.; Horne, L. P.; Martin, C. R. An Adsorption-Based Model for Pulse Duration in Resistive-Pulse Protein Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6755–6763.
28. Wanunu, M.; Sutin, J.; McNally, B.; Chow, A.; Meller, A. DNA Translocation Governed by Interactions with Solid-State Nanopores. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4716–4725.
29. Niedzwiecki, D. J.; Grazul, J.; Movileanu, L. Single-Molecule Observation of Protein Adsorption onto an Inorganic Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10816–10822.
30. Stefureac, R. I.; Trivedi, D.; Marziali, A.; Lee, J. S. Evidence That Small Proteins Translocate through Silicon Nitride Pores in a Folded Conformation. *J. Phys.: Condens. Matter.* **2010**, *22*, 450301.
31. Firnkes, M.; Pedone, D.; Knezevic, J.; Doblinger, M.; Rant, U. Electrically Facilitated Translocations of Proteins through Silicon Nitride Nanopores: Conjoint and Competitive Action of Diffusion, Electrophoresis, and Electroosmosis. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2162–2167.
32. Betton, J. M.; Hofnung, M. Folding of a Mutant Maltose-Binding Protein of *Escherichia coli* which Forms Inclusion Bodies. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8046–8052.
33. Spurlino, J. C.; Lu, G. Y.; Quijcho, F. A. The 2.3-Å Resolution Structure of the Maltose- or Maltodextrin-Binding Protein, a Primary Receptor of Bacterial Active Transport and Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5202–5219.
34. Brendel, V.; Bucher, P.; Nourbakhsh, I. R.; Blaisdell, B. E.; Karlin, S. Methods and Algorithms for Statistical Analysis of Protein Sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 2002–2006.
35. Lairez, D.; Pauthe, E.; Pelta, J. Refolding of a High Molecular Weight Protein: Salt Effect on Collapse. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3904–3916.
36. Henrickson, S. E.; Misakian, M.; Robertson, B.; Kasianowicz, J. J. Driven DNA Transport into an Asymmetric Nanometer-Scale Pore. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 3057–3060.
37. Storm, A. J.; Storm, C.; Chen, J.; Zandbergen, H.; Joanny, J. F.; Dekker, C. Fast DNA Translocation through a Solid-State Nanopore. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1193–1197.
38. Keyser, U. F.; van Dorp, S.; Lemay, S. G. Tether Forces in DNA Electrophoresis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 939–947.
39. van Dorp, S.; Keyser, U. F.; Dekker, N. H.; Dekker, C.; Lemay, S. G. Origin of the Electrophoretic Force on DNA in Solid-State Nanopores. *Nat. Phys.* **2009**, *5*, 347–351.
40. Reguera, D.; Schmid, G.; Burada, P. S.; Rubi, J. M.; Reimann, P.; Hanggi, P. Entropic Transport: Kinetics, Scaling, and Control Mechanisms. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 130603.
41. Kantor, Y.; Kardar, M. Anomalous Dynamics of Forced Translocation. *Phys. Rev. E* **2004**, *69*, 021806.
42. Slonkina, E.; Kolomeisky, A. B. Polymer Translocation through a Long Nanopore. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 7112–7118.
43. Sung, W.; Park, P. J. Polymer Translocation through a Pore in a Membrane. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 783–786.
44. Hanggi, P.; Talkner, P.; Borkovec, M. Reaction-Rate Theory: Fifty Years after Kramers. *Rev. Mod. Phys.* **1990**, *62*, 251.
45. Brun, L.; Pastoriza-Gallego, M.; Oukhaled, G.; Mathe, J.; Bacri, L.; Auvray, L.; Pelta, J. Dynamics of Polyelectrolyte Transport through a Protein Channel as a Function of Applied Voltage. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 158302–158304.
46. Gibrat, G.; Pastoriza-Gallego, M.; Thiebot, B.; Breton, M. F.; Auvray, L.; Pelta, J. Polyelectrolyte Entry and Transport through an Asymmetric  $\alpha$ -Hemolysin Channel. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14687–14691.
47. Smeets, R. M. M.; Keyser, U. F.; Krapf, D.; Wu, M. Y.; Dekker, N. H.; Dekker, C. Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through Solid-State Nanopores. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 89–95.
48. Bacri, L.; Oukhaled, A. G.; Schiedt, B.; Patriarche, G.; Bourhis, E.; Gierak, J.; Pelta, J.; Auvray, L. Dynamics of Colloids in Single Solid-State Nanopores. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 2890–2898.
49. Zhang, J. S.; Shklovskii, B. I. Effective Charge and Free Energy of DNA inside an Ion Channel. *Phys. Rev. E* **2007**, *75*, 021906.
50. Hall, J. E. Access Resistance of a Small Circular Pore. *J. Gen. Physiol.* **1975**, *66*, 531–532.
51. Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8168–8173.
52. Wanunu, M.; Morrison, W.; Rabin, Y.; Grosberg, A. Y.; Meller, A. Electrostatic Focusing of Unlabelled DNA into Nanoscale Pores Using a Salt Gradient. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 160–165.
53. Mahendran, K. R.; Chimerel, C.; Mach, T.; Winterhalter, M. Antibiotic Translocation through Membrane Channels: Temperature-Dependent Ion Current Fluctuation for Catching the Fast Events. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **2009**, *38*, 1141–1145.
54. Tabard-Cossa, V.; Trivedi, D.; Wiggin, M.; Jetha, N. N.; Marziali, A. Noise Analysis and Reduction in Solid-State Nanopores. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 305505.
55. Pedone, D.; Firnkes, M.; Rant, U. Data Analysis of Translocation Events in Nanopore Experiments. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9689–9694.
56. Schiedt, B.; Auvray, L.; Bacri, L.; Oukhaled, G.; Madouri, A.; Bourhis, E.; Patriarche, G.; Pelta, J.; Jede, R.; Gierak, J. Direct FIB Fabrication and Integration of “Single Nanopore Devices” for the Manipulation of Macromolecules. *Microelectron. Eng.* **2010**, *87*, 1300–1303.
57. Arie, J. P.; Miot, M.; Sassoon, N.; Betton, J. M. Formation of Active Inclusion Bodies in the Periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 427–437.



# Protein Transport through a Narrow Solid-State Nanopore at High Voltage: Experiments and Theory

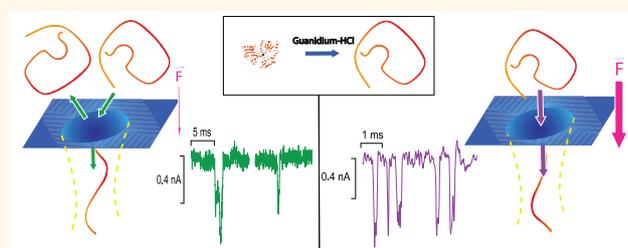
Benjamin Cressiot,<sup>†</sup> Abdelghani Oukhaled,<sup>†</sup> Gilles Patriarche,<sup>§</sup> Manuela Pastoriza-Gallego,<sup>†</sup> Jean-Michel Betton,<sup>‡</sup> Loïc Auvray,<sup>||</sup> Murugappan Muthukumar,<sup>‡</sup> Laurent Bacri,<sup>†</sup> and Juan Pelta<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>LAMBE UMR CNRS 8587, Université d'Evry et de Cergy-Pontoise, France, <sup>‡</sup>Department of Polymer Science and Engineering, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts 01003, United States, <sup>§</sup>LPN/CNRS, Marcoussis, France, <sup>‡</sup>Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, France, and <sup>||</sup>Matière et Systèmes Complexes, UMR CNRS 7057, Université Paris Diderot, France

Nanopores are very promising in the field of macromolecule manipulation at the single-molecule level.<sup>1–5</sup> One of the most common potential applications is ultrafast DNA or RNA sequencing.<sup>6</sup> For the past few years, it has also been possible to use protein or solid-state nanopores as protein conformation sensors. We propose possible applications using nanopores with electric detection (the sequencing of proteins, assisted protein folding) to detect mutation and misfolding. All these applications could be performed subject to precise control of the pore size, which must be smaller than the protein, and also the driving force to control the transport velocity.

Protein trafficking through channels plays an important role in many biological processes.<sup>7</sup> An excellent technique probing the dynamics of protein conducting channels<sup>8</sup> at the single-molecule level is the bilayer lipid membrane technique used in the context of protein transport for mitochondrial pores<sup>9,10</sup> and translocon machinery.<sup>11</sup> The translocon, an active transmembrane protein channel,<sup>12</sup> allows protein translocation in a cell assisted by a peripheral attached protein motor powered by ATP hydrolysis. The translocation is associated with either protein synthesis (co-translation) or after protein synthesis (post-translation). After transport, proteins need to be correctly folded to be functional. In order to understand this mechanism, it is easier to perform protein transport experiments through protein channels or solid-state nanopores by substituting the ATP energy by an electric force. An applied electric field drives a macromolecule into the nanopore, inducing transient blockades of electrical current and a measurable decrease in conductance.<sup>3,13</sup> The current blockade duration and rate depend

## ABSTRACT



We report experimentally the transport of an unfolded protein through a narrow solid-state nanopore of 3 nm diameter as a function of applied voltage. The random coil polypeptide chain is larger than the nanopore. The event frequency dependency of current blockades from 200 to 750 mV follows a van't Hoff–Arrhenius law due to the confinement of the unfolded chain. The protein is an extended conformation inside the pore at high voltage. We observe that the protein dwell time decreases exponentially at medium voltage and is inversely proportional to voltage for higher values. This is consistent with the translocation mechanism where the protein is confined in the pore, creating an entropic barrier, followed by electrophoretic transport. We compare these results to our previous work with a larger pore of 20 nm diameter. Our data suggest that electro-osmotic flow and protein adsorption on the narrowest nanopore wall are minimized. We discuss the experimental data obtained as compared with recent theory for the polyelectrolyte translocation process. This theory reproduces clearly the experimental crossover between the entropic barrier regime with medium voltage and the electrophoretic regime with higher voltage.

**KEYWORDS:** solid-state nanopore · transmission electron microscope · protein translocation · protein unfolding · Fokker–Planck model

on the size and conformation of the passing macromolecule, the diameter and the length of the protein pore or solid-state nanopore, and the interaction between the molecule and the pore walls.

Up to now, various studies have been carried out using protein channels. It is possible to probe protein unfolding transitions with a denaturing agent,<sup>1,14</sup> with thermal denaturation,<sup>15</sup> or using an electric field<sup>16</sup> and protein

\* Address correspondence to [juan.pelta@u-cergy.fr](mailto:juan.pelta@u-cergy.fr).

Received for review April 16, 2012 and accepted June 6, 2012.

Published online  
10.1021/nn301672g

© XXXX American Chemical Society

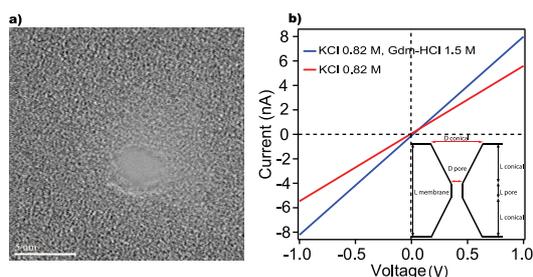
folding with cationic ions.<sup>16,17</sup> The structures of peptides were also investigated through protein nanopores.<sup>18–20</sup> Interactions between proteins and channels<sup>21</sup> and recently the transport dynamics through toxin channels<sup>22,23</sup> or through a mitochondrial channel<sup>24</sup> have been investigated. Nevertheless, these pores are sensitive to high denaturing agent concentrations,<sup>23,25,26</sup> and their lifetime is short (a few hours) due to the fragility of the lipid membrane. Solid-state nanopores have the advantage of being insensitive to these high concentrations of denaturing agent with a longer lifetime (several days) and to high electric driving forces. On the other hand, it remains difficult to create solid-state nanopores with high reproducibility in terms of shape. Furthermore, the transport dynamics are not easily controlled due to the protein–nanopore interactions<sup>27</sup> and/or electro-osmotic flow.<sup>28</sup>

Solid-state nanopores have been used as an electrical detector of native or partially unfolded proteins.<sup>29–34</sup> A demonstration of BSA protein translocation through a solid-state nanopore has already been performed by chemiluminescent analysis.<sup>35</sup> Solid-state nanopores have also been used for the study of anomalous transport in the case of protein–protein interactions,<sup>32,36,37</sup> protein–nanopore wall interactions,<sup>27</sup> and the effect of electro-osmosis on the dynamics of protein transport.<sup>28</sup> Recently, solid-state nanopores have been coated with a fluid lipid bilayer containing mobile ligands attached to the surface. This made it possible to differentiate proteins by current blockage analysis and slow the dynamics of protein transport.<sup>29</sup> Metalized silicon nitride nanopores, chemically modified with receptors, are used to detect subclasses of IgG antibodies.<sup>34</sup> Some theoretical works and simulations have also been performed on protein translocation.<sup>38–40</sup>

The protein model in our study is the maltose binding protein (MalE),<sup>41</sup> composed of 51 acidic residues (24 Asp + 27 Glu) and 43 basic residues (37 Lys + 6 Arg), uniformly distributed along the primary sequence. Its pI is 5.2; thus the protein is negatively charged at pH 7.5, and the protein net charge is  $-8e$ . From the 3D structure, there is no visible cluster of charged residues; therefore we assumed that charged residues are also uniformly distributed in the unfolded conformations. In our experimental conditions the unfolded proteins have a random coil conformation in the presence of denaturing agent and high salt concentration. The diameter of the flexible polypeptide chain is around 8 nm. We have already studied the dynamic properties of the entry and transport of unfolded and folded maltose binding protein (MBP, MalEwt), through a 20 nm solid-state nanopore performed by focused ion beam (FIB) as a function of applied voltage between 25 and 250 mV. The pore diameter is larger than the folded and unfolded protein size.<sup>42</sup> We showed that these dynamics are associated with a high free-energy barrier probably associated with protein–nanopore wall adsorption. In the presence of

proteins, the event frequency of current blockades increases exponentially as a function of applied voltage. At medium electrical force, we observe frequency saturation for unfolded proteins. We have observed that the current blockade durations of the folded and unfolded proteins decrease exponentially as the applied electric field increases. In our experimental conditions, the electro-osmotic flow is in the opposite direction of the electric driving force. The dwell time of proteins (current blockade) dependency showed us that the electro-osmotic flow is not dominant for the dynamics of protein transport. These times are found anomalously long in comparison to expected dwell times based on the electrophoretic mobility; they are probably mainly due to protein–pore interactions. In order to obtain better insight into our previous work, experiments are driven with a 3 nm solid-state nanopore created using TEM, the unfolded protein MBP being at least three times larger than the nanopore diameter. Consequently, the transported protein would be in an extended conformation. This pore diameter is similar to the diameter of the biological channels involved in the translocation of unfolded proteins. To be sure that the unfolded proteins are really transported by an electrophoretic mechanism through the nanopore, we applied high voltages (from 200 to 750 mV). The electro-osmotic velocity is controlled by the geometry, the diameter, the net charge of the pore, the ionic strength, and the pH of solution.<sup>28,43–46</sup> Here, the Debye length remains on the same order as previous experiments using the large pores. We also use the same solid-state membrane ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), but the large pores were drilled by using FIB techniques and the narrow ones by TEM techniques. We can suppose that, in the first case, the nanopores contain some gallium ions, while, in the second case, the charges are annealed by the electron beam.<sup>47</sup> This phenomenon could explain the linear  $I-V$  curve observed with nanopores drilled by TEM, in agreement with Schulten's recent work.<sup>47</sup> The differences are a strong decrease of the nanopore diameter and the net charge of the nanopore (the solution pH does not change). We expect an increase of electro-osmotic velocity of the fluid due to a decrease of the pore diameter and a decrease of the electro-osmotic flow due to the net charge decrease.<sup>46</sup>

Moreover, independently of the hydrodynamic effects, the confinement becomes more important, and the energetic penalty becomes higher to enter the narrow pore. In any case, one expects that the protein dynamics and frequency should slow dramatically. Surprisingly, we observe shorter dwell times and higher event frequency. The experimental entry of molecules as a function of electric driving force follows an exponential dependency. The transport is dominated by either the free-energy barrier or the electrophoretic mechanism in the medium or high-voltage regime, respectively, consistent with the entropic barrier

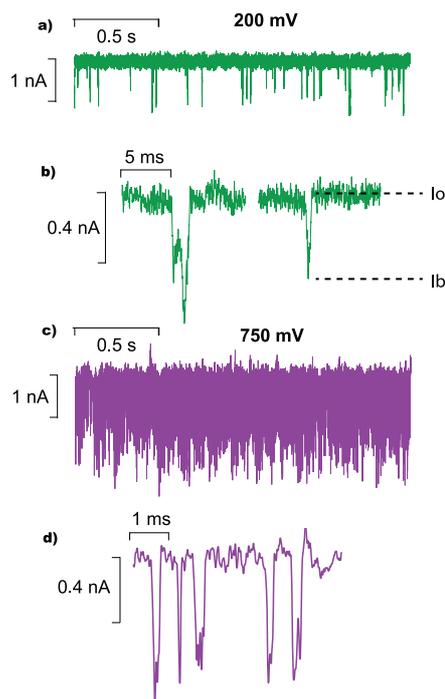


**Figure 1.** Transmission electronic microscopy (TEM) nanopore fabrication for the transport of unfolded proteins. (a) Bright field (BF) STEM image of a 3 nm diameter solid-state nanopore performed in a 30 nm thick  $\text{Si}_3\text{N}_4$  membrane. (b)  $I/V$  characteristic curve through a solid-state nanopore in 0.82 M KCl and 5 mM Hepes pH 7.5 and in the presence of 1.5 M Gdm-HCl. The inset shows the geometry of the pore.

mechanism of polymer translocation. The event frequency is 10 times higher and the activation energy is three times lower with the 3 nm pore than with the previous 20 nm pore. Our results suggest that electroosmotic flow and protein adsorption on the nanopore wall should be minimized. Therefore, it is possible to control protein transport through a narrow pore at high voltage. In this work, we attempt to enhance the understanding of protein transport through a small nanopore. Data are discussed according to a theory of capture rates in polyelectrolyte transport through narrow nanopores.<sup>48</sup> It has been shown that the process of polyelectrolyte capture by the nanopore under an electric field is delineated by two regimes: an entropic barrier regime and a drift regime. In the first regime dominated by the entropic barrier for the polyelectrolyte, at medium voltage differences, the capture rate is an increasing nonlinear function in the electric field. In the drift regime, where the electric driving force dwarfs the role of entropic barriers, at higher applied voltages, the capture rate is linear in the electric field.

## RESULTS AND DISCUSSION

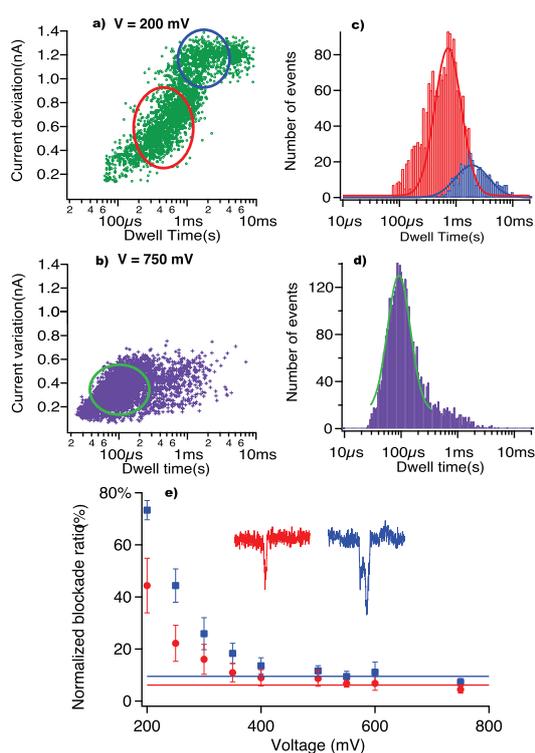
Figure 1a shows a bright-field (BF) STEM image of a 3 nm diameter solid-state nanopore drilled in a 30 nm thick  $\text{Si}_3\text{N}_4$  membrane. From this picture, we measure the pore diameter:  $d_{\text{pore}} = 3 \pm 0.15$  nm (Supporting Information). Figure 1b shows the current–voltage ( $I-V$ ) characteristics through a 3 nm solid-state nanopore in 0.82 M KCl (red curve,  $\sigma = 9$  S/m) and 0.82 M KCl + 1.5 M guanidium-HCl (blue curve,  $\sigma = 12.6$  S/m) buffer. A linear fit to the data yields conductance values of 5.5 and 8.1 nS in 0.82 M KCl and 0.82 M KCl + 1.5 M Gdm-HCl, respectively. The denaturing agent (guanidium-HCl) does not affect either the noise level or the pore stability. Addition of guanidium-HCl just increases the open pore level (*i.e.*, the pore conductance  $G_{\text{pore}}$ ) by about 40%. Note that in both cases, the  $I-V$  characteristics are linear,<sup>47,49–51</sup> in contrast with our previous works on pores drilled by FIB<sup>42,52</sup> or asymmetrical conical pores in polymer membranes,<sup>53</sup> where current asymmetry was usually observed.



**Figure 2.** Detail of current trace recording in the presence of unfolded MBP protein. The protein concentration is  $10.4 \mu\text{M}$  in a 0.82 M KCl and 5 mM Hepes, pH 7.5, buffer. To unfold the MBP, the experiment was performed in 1.5 M guanidium chloride. Individual events are shown with increased time resolution for each transmembrane potential. (a) Current traces at a transmembrane potential of 200 mV. We observe two types of events: one short with low-magnitude current blockade (on the right) and one longer and deeper (on the left) (b),  $I_0$  is the average current of the baseline,  $I_b$  the mean current of each event. Current traces at a transmembrane potential of 750 mV (c). We observe only one type of events (d).

Using a simplified model where the nanopore is approximated by two cones and a cylinder<sup>54</sup> (inset of Figure 1b), the conductance of the conical part is  $G_{\text{conical}} = (\pi\sigma/4)d_{\text{pore}}(d_{\text{conical}}/L_{\text{conical}})$ , where  $d_{\text{conical}}$  is the diameter and  $L_{\text{conical}}$  is the height of the cone. The cylinder conductance is  $G_{\text{cylinder}} = (\pi\sigma/4)(d_{\text{pore}}^2/L_{\text{pore}})$ . The access conductance is  $G_{\text{access}} = 2d_{\text{pore}}\sigma$ .<sup>55</sup> The total conductance can be written as  $1/G_{\text{pore}} = 2(1/G_{\text{conical}}) + 1/G_{\text{cylinder}} + 1/G_{\text{access}}$ . Taking into account that  $L_{\text{membrane}} = (2L_{\text{conical}} + L_{\text{pore}})$  where  $L_{\text{membrane}}$  is the membrane thickness, we evaluate an effective pore length  $L_{\text{pore}} = 4.9 \pm 1.4$  nm (Supporting Information). Note that the  $I-V$  characteristics obtained from the 3 nm solid-state nanopore after immersion in PEG solutions are not altered, suggesting that the apparent pore diameter remains unchanged. This means that the PEGs are not interacting with the pore walls irreversibly (Supporting Information).

**Analysis of the Current Blockades and Dwell Times.** After the addition of unfolded proteins in the *cis* (negative) compartment, deep current blockades are observed (Figure 2). Details of two current traces at 200 mV (Figure 2a) and 750 mV (Figure 2c) are shown. For each applied voltage we focus on the current traces

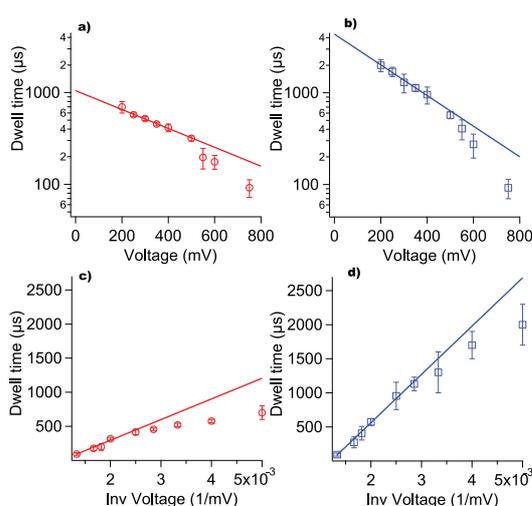


**Figure 3.** Current variation events of unfolded proteins versus applied voltage. Current variation versus the dwell time (a, b) and histograms of dwell times (c, d) at two applied voltages, 200 mV (a, c) and 750 mV (b, d). (e) Normalized current blockade ratio  $[(I_0 - I_b)/I_0]$  (%) as a function of applied voltage for short (red) and long (blue) events.

(Figures 2b and d, respectively). At low voltages (200 mV) we observe two types of events: one short with a low-magnitude current blockade and the other longer and deeper. At high voltages (750 mV), the durations of both types of events are similar to low-magnitude and short-current blockade events.

In Figure 3a, we observe two populations of events for the current deviation  $(I_0 - I_b)$  versus the dwell time at 200 mV. The current deviation of the longer events  $(1.19 \pm 0.06$  nA) is approximately twice that of the short ones  $(0.72 \pm 0.17$  nA). At 750 mV, we observe just one large population of events in Figure 3b.

We then plot the normalized current blockade ratio  $[(I_0 - I_b)/I_0]$  (%) as a function of the applied voltage (Figure 3e), where  $I_0$  is the average current of the baseline and  $I_b$  the mean current of each event. We observe the same behavior for both short and long events: a strong decrease until 400 mV from 73% down to 13% for long events and from 44% to 9% for short events. For voltages higher than 400 mV, the ratio reaches a constant value  $(6.1 \pm 2.3\%$  for short events and  $9.5 \pm 2.5\%$  for long events). This means that unfolded protein is stretched as a function of electric driving force up to 400 mV, and when the applied voltage increases even more, the extended conformation does not change inside the narrow pore.

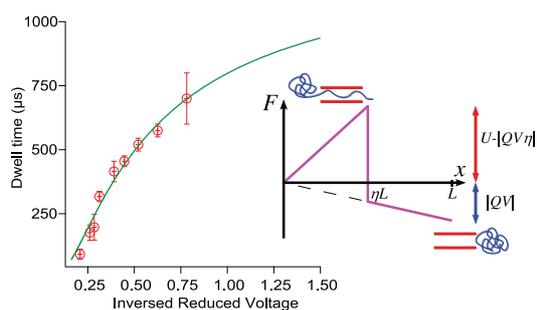


**Figure 4.** Dwell time of events as a function of transmembrane potential. Dwell time of short (red) (a,c) or long (blue) (b,d) events for unfolded proteins as a function of applied voltage. Between 200 and 400 mV, we find using the equation  $f(V) = A \exp(-V/V_0)$ ,  $A_{\text{short}} = 1050 \pm 161 \mu\text{s}$ ,  $V_{0\text{short}} = 422 \pm 89$  mV and  $A_{\text{long}} = 4361 \pm 1250 \mu\text{s}$ ,  $V_{0\text{long}} = 260 \pm 63$  mV. Between 400 and 750 mV, we find using the equation  $f(V) = b/V + a$ ,  $a_{\text{short}} = -312 \pm 57 \mu\text{s}$ ,  $b_{\text{short}} = 303\,540 \pm 32\,400 \mu\text{s} \cdot \text{mV}$  and  $a_{\text{long}} = -855 \pm 107 \mu\text{s}$ ,  $b_{\text{long}} = 708\,300 \pm 71\,500 \mu\text{s} \cdot \text{mV}$ .

We assume that above 400 mV the chain is fully extended inside the narrowest region approximated by a cylindrical shape, with an effective length  $L_{\text{pore}} = 4.9 \pm 1.4$  nm and a radius  $r_{\text{pore}} = 1.5 \pm 0.08$  nm. For an unfolded protein, the unit segment is the persistence length. It is natural to choose a cylinder for the molecule geometry,  $r_{\text{monomer}} = 0.33 \pm 0.02$  nm (size of one amino acid). The predicted volume occupied by the extended portion of protein passing through the pore effective length is given by the volume of the protein  $V_{\text{prot}}$  divided by the volume of the pore  $V_{\text{pore}}$ :  $V_{\text{prot}}/V_{\text{pore}} = r_{\text{monomer}}^2/r_{\text{pore}}^2 = 5 \pm 1\%$ . This result is in agreement with the experimental value of the normalized current blockade ratio  $[(I_0 - I_b)/I_0]$  at the plateau  $(9.5 \pm 2.5\%)$ . In fact, this estimation shows that the chain is completely stretched in the pore.

We could suppose that short events are described by one protein entering the pore, and longer events by two proteins entering in single file.<sup>56</sup> To check this hypothesis, we can look at the dwell time behavior. Histograms of the dwell times presented in Figure 3 give us the time distribution for each applied voltage. The maximum of this distribution defines the most probable dwell time. At 200 mV (Figure 3c), the characteristic time for short events with low-magnitude current blockade is  $700 \pm 100 \mu\text{s}$ , while for longer and deeper events this time is  $2000 \pm 300 \mu\text{s}$ . At high voltage (750 mV) there is only one large distribution (Figure 3d), which is like the short one observed at medium voltage (200 mV).

We expect two dynamics inside the nanopore; the first one is described by an energy barrier. We expect



**Figure 5.** Comparison between theoretical translocation time and experimental dwell time versus reciprocal of dimensionless voltage corresponding to the experiment (left). Sketch of the free-energy landscape (right). The average modeled translocation time is plotted (green curve) against  $1/v$ ,  $v = |QV|$  in units of  $k_B T$ , for the experimental range of voltage,  $V$ , from 200 to 800 mV, experimental data (red markers). The experimental effective charge of the protein is  $Q = -0.16e$  and the pore length is  $L$ ; we obtain the energy barrier,  $U = (9 \pm 1.4)k_B T$ , and the barrier location  $\eta = 0.54 \pm 0.03$ . The free-energy profile permits explaining the crossover from an exponential dependence of the residence time at moderate voltages to the inverse voltage dependence at higher voltages.

an exponential dependency of the transport time as a function of the applied voltage. The second one is described by an electrophoretic transport,<sup>52</sup> and the translocation time is expected to be inversely proportional to the applied force. We represent the blockade times as a function of the applied voltage (Figure 4) for short and long events. The blockade duration decreases in both cases as the applied electric field increases. We have examined both hypotheses: in our case, the exponential fit is the best one at medium voltages smaller than 400 mV, so a model of an activation barrier is better (Figure 4), which could be explained by protein–pore nonspecific interactions. For voltages higher than 400 mV, the behaviors follow electrophoretic dynamics (Figure 4). At high electric driving force, the protein is transported through the nanopore.

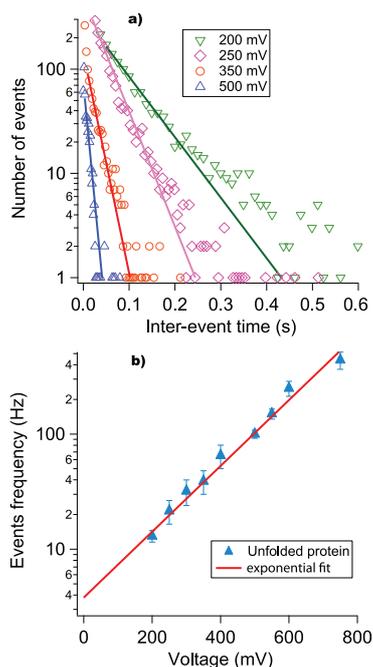
In order to understand the crossover from an exponential dependence of the residence time at moderate voltages to the inverse voltage dependence at higher voltages, we have considered a free-energy profile (inset in Figure 5) along the translocation direction, where there exists a barrier  $U$  followed by a ramp due to the electric field across the pore. The barrier arises from the confinement of the polymer at the pore entry initially without grafting between the chain end and the pore mouth. The chain end must unravel from its initial confined state to place itself at the pore entry, which results in an entropic barrier. The barrier is assumed to be present at a distance of  $\eta L$ , where  $L$  is the pore length. In addition to the entropic barrier there is a potential energy drop of  $|QV|$  across the pore. Although the free-energy profile across the pore could be more complicated, we take the simplest profile to gain an understanding of the most dominant factor

responsible for the crossover. For the free-energy landscape<sup>48,57,58</sup> of Figure 5, the average translocation time  $\tau$  follows from the Fokker–Planck formalism as

$$\tau(v) \propto \frac{\eta}{(u - v\eta)} (e^{u - v\eta} - 1) - \frac{1}{v} (e^{-v} - e^{-v\eta})$$

(See Supporting Information.) Here  $\eta$  is the location of the barrier, and  $v = |QV|$ .  $u$  and  $v$  are in units of  $k_B T$ . Taking the experimental charge of the protein to be  $Q = -0.16e$  (see below), we fit the measured dwelling times plot and we calculate the values for  $U = 9 \pm 1.4 k_B T$  and for  $\eta = 0.54 \pm 0.03$ . A plot of the modeled translocation time  $\tau$  against  $(1/v)$  as well as the experimental data is presented in Figure 5. The model reproduces clearly the experimental crossover.

Surprisingly, the measured dwell time through a 3 nm ( $t_{3\text{nm}}$ ) pore is comparable with that measured through a 20 nm ( $t_{20\text{nm}}$ ) pore<sup>42</sup> at the same applied voltage. Because of confinement effects, one would expect to measure longer times. If we consider a purely diffusive transport<sup>59</sup> through a long pore, the dwell time  $t$  is  $t = L^2 \eta_0 N a / k_B T (a/D)^{2/3}$ ,  $L$  being the pore length,  $\eta_0$  the solution viscosity,  $N$  the monomer number,  $a$  the monomer size,  $D$  the pore diameter, and  $k_B T$  the thermal energy. Comparing  $t_{3\text{nm}}$  to  $t_{20\text{nm}}$ , we find  $t_{3\text{nm}} = t_{20\text{nm}} (D_{20\text{nm}}/D_{3\text{nm}})^{2/3} \cong 7^{2/3} t_{20\text{nm}}$ , while we find in our measurement,  $t_{3\text{nm}} \cong t_{20\text{nm}}$  ( $700 \pm 100 \mu\text{s}$ ). The unfolded protein transport dynamics through the two pores are different according to a scaling argument. In our previous work, we explained these long times by two phenomena: either electro-osmotic flow due to the charged surface of the nanopore wall, or protein attractive interactions with the nanopore wall. In the case of electro-osmotic flow, it was observed previously by Wanunu *et al.*<sup>60</sup> that the event frequency decreased when the applied electric force increased. In order to check the importance of electro-osmotic flow in this study, we performed an experiment with neutral polymers as a function of electric field (Supporting Information). The event frequency and the dwell time of PEG transport as a function of the applied voltage remain constant. The current deviation follows Ohm's law behavior as a function of the applied voltage. These results show that electro-osmotic flow is greatly reduced in our experimental conditions. A recent simulation work predicts that the interactions between protein and nanopore could be strong for FIB nanopores, due to gallium ions, and weak for TEM nanopores, because the silica surface rearranges and the patches of dangling atoms are removed.<sup>47</sup> The interactions between the protein and the pore wall could be weak; this is a possible explanation of our observation of translocation times being shorter than expected. Nevertheless, this time remains long compared to that predicted in the absence of interaction, which is on the order of a microsecond.<sup>32</sup> This is quite a common



**Figure 6.** Frequency of current blockades versus applied voltage in semilog scale. (a) Explanation of the statistical analysis of the measured current traces, distribution of inter-event intervals  $T_i$  for four different applied voltages. (b) Frequency of events versus applied voltage. The red line is an exponential fit of equation  $f = f_0 \exp(|V|/V_0)$  with  $f_0 = 3.8 \pm 0.5$  Hz and  $V_0 = 152 \pm 6.4$  mV.

phenomenon, particularly on such a high-energy surface as that of SiN,<sup>61</sup> and many authors<sup>27,30,42</sup> give prominence to it.

**Analysis of Event Frequency.** From the inter-event duration histogram (Figure 6a), we observe that the blockade current frequency increases exponentially as the applied voltage increases from 200 mV to 750 mV (Figure 6b). We use a van't Hoff Arrhenius formalism,  $R = R_0 \exp(|V|/V_0)$ , where  $R_0 \propto f^* \exp(-U^*/k_B T)$  is the zero voltage capture rate controlled by an activation barrier  $U^*$  ( $f^*$  is a frequency factor) of entropic and electrostatic origin. The ratio  $|V|/V_0 = (zeV)/k_B T$  is a barrier reduction factor due to the applied voltage  $V$ , acting on  $ze$ , the effective electric charge of the molecule, where  $z$  is the magnitude of the effective total number of elementary charges of the protein,  $e$  is the elementary charge, and  $k_B T$  is the thermal energy. The potential  $V_0$  ( $V_0 = k_B T/ze$ ) corresponds to the necessary applied potential to allow a charged protein to overcome the Brownian motion. Frequency data are well described by an exponential fit of the equation  $f = f_0 \exp(|V|/V_0)$ , where  $f_0 = 3.8 \pm 0.5$  Hz and  $V_0 = 152 \pm 6.4$  mV.

The protein net charge is  $-8e$  in solution in the absence of counterion condensation. The effective charge  $z$  is extracted from indirect measurement  $z = (k_B T)/(V_0 e) = 0.16 \pm 0.01$ .

Up to now, we have just qualitative possible explanations to discuss the high charge reduction at the entry of the nanopore. The reduction of unfolded

protein charge could be due to the charge confinement in the medium of low dielectric constant<sup>62</sup> or to back-flow effects.<sup>28,45,63</sup>

In order to estimate the activation energy, we calculate the frequency factor ( $f^*$ ) from the barrier penetration calculation  $f^* = CD_{\text{diff}}A_{\text{pore}}/L_{\text{pore}}$ , where  $C = 6.24 \times 10^{21}$  molecules/m<sup>3</sup> is the bulk concentration of MBP protein (corresponding to  $c = 10.4$   $\mu\text{M}$ ),  $D_{\text{diff}} = 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s is its diffusion coefficient,  $A_{\text{pore}} = \pi 10^{-18}$  m<sup>2</sup> is the cross-sectional area of the pore, and  $L_{\text{pore}} = 4.9 \pm 1.4$  nm is the pore length. We find  $U^* \approx (4.2 \pm 0.5)k_B T$  for just the entry of an unfolded protein. If we consider both the protein capture and the chain confinement inside the pore, we obtain  $U = (9 \pm 1.4)k_B T$  (Figure 5).

We expected an increase of the energy barrier by a factor  $(D_{20\text{nm}}/D_{3\text{nm}})^{5/3} \approx 24$  if we consider that the entropic barrier is dominated by the confinement of the chain.<sup>64,65</sup> However, this energy barrier is two times smaller than that obtained with the 20 nm pore ( $U^* \approx 10.4k_B T$ ). This means that either electrostatic or hydrophobic interactions could contribute to this activation energy. We have previously determined the activation energy for the entry of unfolded proteins through protein pores. We obtained  $U^* \approx 2k_B T$  for the alpha-hemolysin and  $U^* \approx 4k_B T$  for the aerolysin. These pores have a similar diameter to the solid-state one (around 2 nm), but their net charge is different. For these protein nanopores, the entropy is the major contribution for unfolded protein pore entrance.<sup>14,23</sup> We expected an entropic penalty for an excluded volume chain of a neutral polymer:  $U^* \approx (L_{\text{pore}}/D)k_B T \approx (1.6 \pm 0.4)k_B T$ .<sup>40</sup> In our experimental conditions, the high salt concentration screens the electrostatic interactions. Finally, the main contribution in our experiments for protein entrance with a narrow solid-state nanopore is an entropic barrier.

## CONCLUSION

In conclusion, we compare the transport of unfolded proteins as a function of the applied voltage (from 200 to 750 mV) through a 3 nm solid-state nanopore drilled by TEM to our previous work with a 20 nm solid state nanopore drilled by FIB. We observe surprisingly for the narrowest pore a higher event frequency, a lower activation energy, and shorter times than expected. We show that the entry of unfolded proteins inside the narrow nanopore is dominated by the entropic effect associated with the confinement of the chains. The protein is progressively stretched under the applied voltage and assumes an extended conformation at high voltages. The dwell time decreases exponentially at medium voltage: the chains interact with the nanopore walls and escape from the pore. This time is inversely proportional to the applied force at high voltage: the unfolded proteins are really transported through the pore by an electrophoretic mechanism. The theoretical model fits well the results and the experimental crossover. There

are two steps during translocation: (I) capture of the chain to fill the pore; (II) transfer while keeping the pore filled. This model has an exponential behavior at medium

voltages and linear dependence at higher voltages; the free-energy barrier and the location of the barrier are the adjustable parameters.

## METHODS

**Nanopores.** The nanopores were manufactured using a TEM/STEM Jeol 2200FS microscope operating at 200 keV and equipped with an aberration corrector on the probe (STEM mode). The nano-openings were created using a 1.3 nA electron probe, a half-convergence angle of 30 mrad, and a spot size (fwhm) of 0.4 nm. The width of the scanning window determines the size of the nano-opening. The etching process is observed *in situ* and stopped when the nanohole is formed in the scanning window. The post-treatment observations in high-angle annular dark field imaging mode are performed using a lower energy probe (240 pA and a spot size of 0.15 nm) to avoid any modification of the shape of the hole.

All of the nanopores were adapted to an easy-to-use "Port-a-Patch" setup (Nanion Technologies GmbH). They were glued onto a drilled screw cap containing a 1–2 mm wide hole. This chip can be easily handled and rinsed with water and ethanol. In order to make the membrane hydrophilic, we cleaned this chip by exposing each side to oxygen plasma for 2 min. We then applied a 10  $\mu$ L buffer droplet to each side of the nanopore using a micropipet. The buffer was an ionic solution of 0.82 M KCl containing 5 mM Tris (pH 7.5) and allowed good storage conditions. The experiments were conducted in a water-saturated atmosphere. The effective pore diameter was deduced from an open-pore conductance measurement. The denaturing agent (guanidium-HCl) did not affect the noise level or the pore stability. The addition of guanidium-HCl only increased the ionic current of the open pore.

**Proteins.** The recombinant maltose binding protein (MBP or MalEwt) of *Escherichia coli* contained 370 residues ( $M_r = 40\ 707$ ) and was negatively charged (with a net charge  $Z = -8e$ ) at physiological pH. The wild-type MBP was purified as described.<sup>66</sup> The buffer was an ionic solution of 0.82 M KCl containing 5 mM Tris (pH 7.5). In this study, we added to this ionic solution the recombinant MBP denatured by guanidium chloride (Gdm-HCl), the final concentration of guanidium chloride being 1.5 M.

**Data Acquisition.** The ionic currents were detected using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). They were first filtered at 10 kHz before a digitization at 250 kHz (4  $\mu$ s). The data were processed with a homemade macro, using Igor software (Wavemetrics). The event measurements were based on a statistical analysis of the current traces described in a previous article.<sup>67</sup> This method was based on a two-threshold method in the case of events with an asymmetric shape; the event duration was a function of the threshold. Because our threshold criterion was always the same, the measurement error was constant and remained low. All data were obtained with a single nanopore, but for each experimental condition, we measured at least 2000 events. The same nanopore was used during several experiments and several days with the protein. The physical parameters were estimated without the standard deviation between different pores but with the standard deviation of several assays with the same pore. Data were systematically checked for reproducibility.

**Conflict of Interest:** The authors declare no competing financial interest.

**Acknowledgment.** This work was supported by grant funding, Action Thématique Incitative Génopole, ANR Blanche "TRANSFOLDPROT" BLAN08-1\_339991, and Nanoscience Erant, ANR "NANOPORE" No. 08-NSCI-006-01. We are grateful to Kari and Damien Foster for their attention to our manuscript and for kindly correcting the language of the manuscript. M.M. acknowledges support from NSF Grant No. DMR1104362.

**Supporting Information Available:** This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES AND NOTES

- Dekker, C. Solid-State Nanopores. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 209–215.
- Howorka, S.; Siwy, Z. Nanopore Analytics: Sensing of Single Molecules. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2360.
- Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 13770–13773.
- Movileanu, L. Interrogating Single Proteins through Nanopores: Challenges and Opportunities. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 333–341.
- Muthukumar, M. Mechanism of DNA Transport through Pores. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 435–450.
- Branton, D.; Deamer, D. W.; Marziali, A.; Bayley, H.; Benner, S. A.; Butler, T.; Di Ventra, M.; Garaj, S.; Hibbs, A.; Huang, X.; *et al.* The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1146–1153.
- Wickner, W.; Schekman, R. Protein Translocation across Biological Membranes. *Science* **2005**, *310*, 1452–1456.
- Harsman, A.; Krüger, V.; Bartsch, P.; Honigsmann, A.; Schmidt, O.; Rao, S.; Meisinger, C.; Wagner, R. Protein Conducting Nanopores. *J. Phys.: Condens. Matter* **2010**, *22*, 454102–454102.
- Fèvre, F.; Chich, J. F.; Lauquin, G. J.; Henry, J. P.; Thieffry, M. Comparison of Mitochondrial Cationic Channels in Wild-Type and Porin-Deficient Mutant Yeast. *FEBS Lett.* **1990**, *262*, 201–204.
- Hill, K.; Model, K.; Ryan, M.; Dietmeier, K.; Martin, F. Tom40 Forms the Hydrophilic Channel of the Mitochondrial Import Pore for Preproteins. *Nature* **1998**.
- Simon, S. M.; Blobel, G. A Protein-Conducting Channel in the Endoplasmic Reticulum. *Cell* **1991**, *65*, 371–380.
- Rapoport, T. A. Protein Translocation across the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum and Bacterial Plasma Membranes. *Nature* **2007**, *450*, 663–669.
- Zimmerberg, J.; Parsegian, V. A. Polymer Inaccessible Volume Changes during Opening and Closing of a Voltage-Dependent Ionic Channel. *Nature* **1986**, *323*, 36–39.
- Oukhaled, G.; Mathe, J.; Biance, A. L.; Bacri, L.; Betton, J.-M.; Lairez, D.; Pelta, J.; Auvray, L. Unfolding of Proteins and Long Transient Conformations Detected by Single Nanopore Recording. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 158101.
- Payet, L.; Martinho, M.; Pastoriza-Gallego, M.; Betton, J.-M.; Auvray, L.; Pelta, J.; Mathé, J. Thermal Unfolding of Proteins Probed at the Single Molecule Level Using Nanopores. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4071–4076.
- Stefureac, R.; Waldner, L.; Howard, P.; Lee, J. Nanopore Analysis of a Small 86-Residue Protein. *Small* **2008**, *4*, 59–63.
- Baran, C.; Smith, G. S. T.; Bamm, V. V.; Harauz, G.; Lee, J. S. Divalent Cations Induce a Compaction of Intrinsically Disordered Myelin Basic Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 224–229.
- Wang, H.-Y.; Ying, Y.-L.; Li, Y.; Kraatz, H.-B.; Long, Y.-T. Nanopore Analysis of B-Amyloid Peptide Aggregation Transition Induced by Small Molecules. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1746–1752.
- Sutherland, T.; Long, Y.; Stefureac, R. Structure of Peptides Investigated by Nanopore Analysis. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1273–1277.
- Meng, H.; Detillieux, D.; Baran, C.; Krasniqi, B.; Christensen, C.; Madampage, C.; Stefureac, R. I.; Lee, J. S. Nanopore Analysis of Tethered Peptides. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 701–708.
- Movileanu, L.; Schmittschmitt, J. P.; Scholtz, J. M.; Bayley, H. Interactions of Peptides with a Protein Pore. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1030–1045.

22. Stefureac, R.; Long, Y.; Kraatz, H.; Howard, P. Transport of A-Helical Peptides through A-Hemolysin and Aerolysin Pores. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9172–9179.
23. Pastoriza-Gallego, M.; Rabah, L.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; van der Goot, F. G.; Auvray, L.; Betton, J.-M.; Pelta, J. Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2923–2931.
24. Mahendran, K. R.; Romero-Ruiz, M.; Schlöisinger, A.; Winterhalter, M.; Nussberger, S. Protein Translocation through Tom40: Kinetics of Peptide Release. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 39–47.
25. Pastoriza-Gallego, M.; Oukhaled, G.; Mathé, J.; Thiebot, B.; Betton, J.-M.; Auvray, L.; Pelta, J. Urea Denaturation of Alpha-Hemolysin Pore Inserted in Planar Lipid Bilayer Detected by Single Nanopore Recording: Loss of Structural Asymmetry. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3371–3376.
26. Lesieur, C.; Frutiger, S.; Hughes, G.; Kellner, R.; Pattus, F.; van der Goot, F. G. Increased Stability upon Heptamerization of the Pore-Forming Toxin Aerolysin. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36722–36728.
27. Niedzwiecki, D. J.; Grazul, J.; Movileanu, L. Single-Molecule Observation of Protein Adsorption onto an Inorganic Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10816–10822.
28. Firnkes, M.; Pedone, D.; Knezevic, J. Electrically Facilitated Translocations of Proteins through Silicon Nitride Nanopores: Conjoint and Competitive Action of Diffusion, Electrophoresis, and Electroosmosis. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2162–2167.
29. Yusko, E. C.; Johnson, J. M.; Majid, S.; Prangkio, P.; Rollings, R. C.; Li, J.; Yang, J.; Mayer, M. Controlling Protein Translocation through Nanopores with Bio-Inspired Fluid Walls. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 253–260.
30. Talaga, D. S.; Li, J. Single-Molecule Protein Unfolding in Solid State Nanopores. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9287–9297.
31. Han, A.; Schürmann, G. S.; Mondin, G.; Bitterli, R. A.; Hegelbach, N. G.; de Rooij, N. F.; Staufner, U. Sensing Protein Molecules Using Nanofabricated Pores. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 093901.
32. Han, A.; Creus, M.; Schürmann, G.; Linder, V. Label-Free Detection of Single Protein Molecules and Protein–Protein Interactions Using Synthetic Nanopores. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4651–4658.
33. Freedman, K. J.; Jürgens, M.; Prabhu, A.; Ahn, C. W.; Jemth, P.; Edel, J. B.; Kim, M. J. Chemical, Thermal, and Electric Field Induced Unfolding of Single Protein Molecules Studied Using Nanopores. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5137–5144.
34. Wei, R.; Gatterdam, V.; Wieneke, R.; Tampé, R.; Rant, U. Stochastic Sensing of Proteins with Receptor-Modified Solid-State Nanopores. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 257–263.
35. Fologea, D.; Ledden, B.; McNabb, D. S.; Li, J. Electrical Characterization of Protein Molecules by a Solid-State Nanopore. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, nihpa38991.
36. Sexton, L. T.; Horne, L. P.; Sherrill, S. A.; Bishop, G. W.; Baker, L. A.; Martin, C. R. Resistive-Pulse Studies of Proteins and Protein/Antibody Complexes Using a Conical Nanotube Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13144–13152.
37. Sexton, L. T.; Mukaibo, H.; Katira, P.; Hess, H.; Sherrill, S. A.; Horne, L. P.; Martin, C. R. An Adsorption-Based Model for Pulse Duration in Resistive-Pulse Protein Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6755–6763.
38. Ammenti, A.; Cecconi, F.; Marconi, U. M. B.; Vulpiani, A. A Statistical Model for Translocation of Structured Polypeptide Chains through Nanopores. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10348–10356.
39. Bacci, M.; Chinappi, M.; Casciola, C. M.; Cecconi, F. Role of Denaturation in Maltose Binding Protein Translocation Dynamics. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4255–4262.
40. Makarov, D. Computer Simulations and Theory of Protein Translocation. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *42*, 281–289.
41. Raffy, S.; Sassoon, N.; Hofnung, M.; Betton, J.-M. Tertiary Structure-Dependence of Misfolding Substitutions in Loops of the Maltose-Binding Protein. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2136–2142.
42. Oukhaled, A.; Cressiot, B.; Bacri, L.; Pastoriza-Gallego, M.; Betton, J.-M.; Bourhis, E.; Jede, R.; Gierak, J.; Auvray, L.; Pelta, J. Dynamics of Completely Unfolded and Native Proteins through Solid-State Nanopores as a Function of Electric Driving Force. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3628–3638.
43. Ghosal, S. Electrophoresis of a Polyelectrolyte through a Nanopore. *Phys. Rev. E* **2006**, *74*, 041901.
44. Ghosal, S. Effect of Salt Concentration on the Electrophoretic Speed of a Polyelectrolyte through a Nanopore. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 238104.
45. van Dorp, S.; Keyser, U. F.; Dekker, N. H. A. D. C.; Lemay, S. G. Origin of the Electrophoretic Force on DNA in Solid-State Nanopores. *Nat. Phys.* **2009**, *5*, 347–351.
46. Keyser, U. F.; van Dorp, S.; Lemay, S. G. Tether Forces in DNA Electrophoresis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 939–947.
47. Cruz-Chu, E. R.; Aksimentiev, A.; Schulten, K. Ionic Current Rectification through Silica Nanopores. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 1850–1862.
48. Muthukumar, M. *Polymer Translocation*; CRC Press, 2009.
49. Ho, C.; Qiao, R.; Heng, J. B.; Chatterjee, A.; Timp, R. J.; Aluru, N. R.; Timp, G. Electrolytic Transport through a Synthetic Nanometer-Diameter Pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10445–10450.
50. Kowalczyk, S. W.; Kapinos, L.; Blosser, T. R.; Magalhães, T.; van Nies, P.; Lim, R. Y. H.; Dekker, C. Single-Molecule Transport across an Individual Biomimetic Nuclear Pore Complex. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 433–438.
51. Krapf, D.; Wu, M. Y.; Smeets, R. M. M.; Zandbergen, H. W.; Dekker, C.; Lemay, S. G. Fabrication and Characterization of Nanopore-Based Electrodes with Radii Down to 2 nm. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 105–109.
52. Bacri, L.; Oukhaled, A. G.; Schiedt, B.; Patriarche, G.; Bourhis, E.; Gierak, J.; Pelta, J.; Auvray, L. Dynamics of Colloids in Single Solid-State Nanopores. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 2890–2898.
53. Siwy, Z.; Fulinski, A. Fabrication of a Synthetic Nanopore Ion Pump. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 198103.
54. Kim, M.; McNally, B.; Murata, K. Characteristics of Solid-State Nanometre Pores Fabricated Using a Transmission Electron Microscope. *Nanotechnology* **2007**.
55. Hall, J. E. Access Resistance of a Small Circular Pore. *J. Gen. Physiol.* **1975**, *66*, 531–532.
56. Pedone, D.; Firnkes, M.; Rant, U. Data Analysis of Translocation Events in Nanopore Experiments. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9689–9694.
57. Muthukumar, M. Theory of Capture Rate in Polymer Translocation. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 195101.
58. Muthukumar, M. Polymer Escape through a Nanopore. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 5174.
59. Brochard, F.; de Gennes, P. G. Dynamics of Confined Polymer-Chains. *J. Chem. Phys.* **1977**, *67*, 52–56.
60. Wanunu, M.; Morrison, W.; Rabin, Y.; Grosberg, A. Y.; Meller, A. Electrostatic Focusing of Unlabelled DNA into Nanoscale Pores Using a Salt Gradient. *Nat. Nanotechnol.* **2009**.
61. Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8168–8173.
62. Zhang, J.; Shklovskii, B. I. Effective Charge and Free Energy of DNA Inside an Ion Channel. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **2007**, *75*, 021906.
63. Ghosal, S. Electrokinetic-Flow-Induced Viscous Drag on a Tethered DNA inside a Nanopore. *Phys. Rev. E* **2007**, *76*, 061916.
64. de Gennes, P.-G.; *et al.* Flexible Polymers in Nanopores. *Polym. Confined Environ.* **1999**, *138*, 91–105.
65. Gibrat, G.; Pastoriza-Gallego, M.; Thiebot, B.; Breton, M.-F.; Auvray, L.; Pelta, J. Polyelectrolyte Entry and Transport through an Asymmetric Alpha-Hemolysin Channel. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14687–14691.
66. Arie, J.-P.; Miot, M.; Sassoon, N.; Betton, J.-M. Formation of Active Inclusion Bodies in the Periplasm of Escherichia Coli. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 427–437.
67. Brun, L.; Pastoriza-Gallego, M.; Oukhaled, G.; Mathe, J.; Bacri, L.; Auvray, L.; Pelta, J. Dynamics of Polyelectrolyte Transport through a Protein Channel as a Function of Applied Voltage. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*.





## Conclusion et perspectives

Le but initial de cette thèse était d'étudier la translocation de protéines dans des systèmes biomimétiques passifs (pores protéiques et artificiels), de les comparer avec des systèmes naturels et de mesurer les forces se développant pendant ce processus.

Lorsque j'ai commencé, il avait été montré que les nanopores protéiques pouvaient être utilisés pour suivre le dépliement d'une protéine sauvage. Seule la première partie de ce très grand programme a été réalisée car nous avons été confrontés à des difficultés, en particulier pour l'obtention de pores solides percés de petite taille. J'ai étudié le transport de protéines dans deux types de canaux. Des canaux protéiques, dont leur géométrie et charge électrique sont différentes, qui commencent à être bien connus comme l'alpha-hémolysine et un autre canal très peu utilisé, l'aérolysine. Des nanopores artificiels percés dans des membranes de nitrure de silicium, jusque là utilisés principalement pour étudier le transport de l'ADN.

J'ai montré que la technique de nanopore couplée à une détection électrique permet de suivre le dépliement d'une protéine dont une mutation modifie sa transition de dénaturation vers les faibles concentrations en agent dénaturant. J'ai obtenu deux courbes de dénaturation superposables de MalE 219, lorsque la protéine est dépliée soit par le côté vestibule, soit par la tige de l'alpha-hémolysine. Ces courbes sont obtenues, à partir de la variation des fréquences des événements de blocage de courant en fonction de la concentration en agent dénaturant. Ainsi, la géométrie du pore n'influence pas la transition de dépliement de la protéine. En revanche, les fréquences des événements sont systématiquement plus élevées, lorsque les protéines dépliées entrent par le

vestibule par rapport à la tige, montrant que l'entrée des molécules est dépendante de la géométrie du pore.

La principale difficulté de l'utilisation des nanopores artificiels, pour étudier le transport de protéines, est d'obtenir des pores de relativement petite taille dont leur surface est contrôlable.

Dans la plupart des premières expériences publiées avant mon travail, les diamètres de pores sont supérieurs au diamètre des protéines étudiées natives ou dépliées. C'est dans ce régime que j'ai réalisé ma première expérience sur le transport de protéines dans un nanopore artificiel. J'ai montré que les pores artificiels dont le diamètre est supérieur à celui de la protéine peuvent être utilisés comme capteurs de conformations pour distinguer l'état natif, de l'état déplié pour la protéine. Ce résultat a été observé parallèlement par un autre groupe sur le dépliement d'une protéine par l'urée(21). Il est possible à partir des courants de blocage de déduire la conformation de la protéine dans le pore en fonction de la force électrique appliquée. J'ai également étudié de façon systématique l'influence de la différence de potentiel sur une grande gamme de forces électriques sur la dynamique de transport de protéines natives et dépliées à travers un nanopore artificiel. Cela m'a permis de mettre en évidence une dynamique anormale de transport, qui dépend de la conformation de la protéine, pour le nanopore percé par FIB, ce qui est probablement dû à des phénomènes d'interaction protéine-pore ou d'électro-osmose.

En utilisant une technique de perçage très performante par TEM, j'ai pu obtenir des nanopores artificiels de très petits diamètres et effectuer les premières mesures sur le transport de protéines dépliées à travers un nanopore artificiel pour lequel le diamètre du pore est inférieur à la taille de la protéine dépliée. Les effets de confinement et de barrière stérique sont donc forts et je les ai étudié en variant le champ électrique

appliqué dans une gamme de hauts voltages, encore jamais explorée. Je n'ai pas observé de phénomènes d'interaction ou d'électro-osmose dominants. Ce travail montre que l'utilisation d'ions galliums pour le perçage de membranes, modifie l'état de surface du nanopore, ceci de manière incontrôlée. J'ai prouvé indirectement que la protéine est réellement transportée à travers le pore pour des hauts voltages, régime électrophorétique, et que l'entrée de la chaîne dépliée dans le pore est associée à une barrière d'énergie principalement entropique. A des voltages modérés, la protéine pourrait interagir avec le pore sans être transportée. Le modèle théorique proposé, un formalisme de Fokker Planck, nous permet d'estimer une barrière de transport, et indique que la chaîne est d'abord piégée à l'entrée du pore avant de la franchir, pour être finalement transportée d'un compartiment à l'autre.

Nous allons présenter quelques perspectives issues de ce travail. Il serait intéressant de suivre le dépliement d'une protéine à travers un nanopore artificiel qui est bien plus résistant à des fortes concentrations en agent dénaturant, gamme de pH ou de température, qu'un nanopore protéique. Nous pourrions ainsi comparer le dépliement d'une protéine, par exemple MalE219, à travers un nanopore protéique et un nanopore artificiel ; mais également envisager l'étude du dépliement de protéines plus complexes, multi-domaines, comme la fibronectine. Nous pourrions envisager de reconstituer le translocon dans une membrane lipidique pour étudier grâce à une méthode électrique, la translocation et le repliement de protéines.

Pour tenter de mieux comprendre et contrôler les effets d'électro-osmose dans un nanopore artificiel, il serait intéressant de modifier l'état de surface. L'étude de la dynamique de transport de protéines dans des nanopores artificiels de différentes

tailles, permettrait de prédire la fréquence ou le temps de translocation d'une protéine en fonction du diamètre du pore.

Nous envisageons de réaliser des expériences de dépliement mécanique d'une protéine en appliquant un champ électrique localisé au niveau du pore. Il a été construit par Manuela Pastoriza-Gallego en collaboration avec Jean-Michel Betton, une chimère constituée d'une protéine associée de façon covalente à de l'ADN simple brin. Une fois le brin d'ADN lié à la protéine, inséré dans un nanopore protéique, il sera possible d'appliquer un champ électrique pour déplier mécaniquement la protéine. Les premières expériences réalisées dans ce sens avec la protéine MalE sauvage, ne sont pas pour l'instant concluantes. En appliquant une différence de potentiel de 250 mV, il n'a pas été possible de la déplier. Nous devons réaliser de nouvelles expériences en augmentant la force électrique à l'aide d'un système de micropipette, pour laquelle une vésicule est posée à l'entrée. De plus, de nouvelles expériences sont prévues avec MalE 219 qui est plus instable, pouvant favoriser ainsi le dépliement dans ces conditions. Cette même étude peut être complétée par une étude du dépliement avec des pinces optiques ou magnétiques, qui permettront d'accéder à des informations sur la mesure directe de la force nécessaire pour obtenir le dépliement mécanique de la protéine à travers le pore. Ce projet est réalisé en collaboration avec Ulrich Keyser de l'université de Cambridge dans le cadre de mon projet européen. Jusqu'à maintenant, personne n'a encore prouvé directement la translocation de protéines à travers un nanopore dont le diamètre ne permet pas le passage de la protéine native. Il y a deux méthodes élégantes en cours d'étude dans le laboratoire pour confirmer le passage de protéines à travers un pore. La première est quantitative, en utilisant la chimère et en réalisant une PCR sur le simple brin d'ADN pour quantifier le nombre de molécules transloquées. La deuxième est qualitative, en utilisant une protéine séléno-marquée et en réalisant une étude par

microscopie électronique de la composition atomique du compartiment *trans*. La preuve directe de la translocation nous permettrait par exemple de confirmer que le régime électrophorétique est bien celui associé au transport de la protéine dans un nanopore artificiel.



## Bibliographie

1. T. A. Rapoport, Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes, *Nature* **450**, 663–669 (2007).
2. A. Robson, I. Collinson, The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation, *EMBO Rep* **7**, 1099–1103 (2006).
3. R. Zimmermann, L. Müller, B. Wullich, Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies, *Trends Mol Med* **12**, 567–573 (2006).
4. M. Stefani, Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world, *Biochim Biophys Acta* **1739**, 5–25 (2004).
5. W. Coulter, *Coulter: Means for counting particles suspended in...* - Google Scholar (1953).
6. J. Zimmerberg, V. A. Parsegian, Polymer inaccessible volume changes during opening and closing of a voltage-dependent ionic channel, *Nature* **323**, 36–39 (1986).
7. E. P. Gilbert, L. Auvray, J. Lal, Structure of Polyelectrolyte Chains Confined in Nanoporous Glass, *Macromolecules* **34**, 4942–4948 (2001).
8. G. Oukhaled *et al.*, Unfolding of proteins and long transient conformations detected by single nanopore recording, *Phys Rev Lett* **98**, 158101 (2007).
9. A. L. Biance *et al.*, Focused ion beam sculpted membranes for nanoscience tooling, *Microelectron Eng* **83**, 1474–1477 (2006).
10. B. Schiedt *et al.*, Direct FIB fabrication and integration of single nanopore devices for the manipulation of macromolecules, *Microelectron Eng* **87**, 1300–1303 (2010).
11. M. Pastoriza-Gallego *et al.*, Urea denaturation of alpha-hemolysin pore inserted in planar lipid bilayer detected by single nanopore recording: loss of structural asymmetry, *FEBS Lett* **581**, 3371–3376 (2007).
12. M. Pastoriza-Gallego, G. Gibrat, B. Thiebot, J.-M. Betton, J. Pelta, Polyelectrolyte and unfolded protein pore entrance depends on the pore geometry, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 1377–1386 (2009).
13. M. Pastoriza-Gallego *et al.*, Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore, *Journal of the American Chemical Society* **133**, 2923–2931 (2011).
14. M. M. Mohammad, S. Prakash, A. Matouschek, L. Movileanu, Controlling a single protein in a nanopore through electrostatic traps, *J Am Chem Soc* **130**, 4081–4088 (2008).
15. L. L. Payet *et al.*, Thermal unfolding of proteins probed at the single molecule level using nanopores, *Anal Chem* **84**, 4071–4076 (2012).

16. R. Stefureac, L. Waldner, P. Howard, J. Lee, Nanopore Analysis of a Small 86-Residue Protein, *Small* **4**, 59–63 (2008).
17. R. I. Stefureac, J. S. Lee, Nanopore analysis of the folding of zinc fingers, *Small* **4**, 1646–1650 (2008).
18. C. Baran, G. S. T. Smith, V. V. Bamm, G. Harauz, J. S. Lee, Divalent cations induce a compaction of intrinsically disordered myelin basic protein, *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 224–229 (2010).
19. A. Han *et al.*, Label-Free Detection of Single Protein Molecules and Protein–Protein Interactions Using Synthetic Nanopores, *Anal Chem* **80**, 4651–4658 (2008).
20. D. Fologea, B. Ledden, D. S. McNabb, J. Li, Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore, *Appl Phys Lett* **91**, nihpa38991 (2007).
21. D. S. Talaga, J. Li, Single-Molecule Protein Unfolding in Solid State Nanopores, *J Am Chem Soc* **131**, 9287–9297 (2009).
22. C. Merstorf *et al.*, Wild Type, Mutant Protein Unfolding and Phase Transition Detected by Single-Nanopore Recording, *ACS Chem Biol* (2012), doi:10.1021/cb2004737.
23. A. Oukhaled *et al.*, Dynamics of Completely Unfolded and Native Proteins through Solid-State Nanopores as a Function of Electric Driving Force, *ACS Nano* (2011), doi:10.1021/nn1034795.
24. B. Cressiot *et al.*, Protein Transport through a Narrow Solid-State Nanopore at High Voltage: Experiments and Theory, *ACS Nano* (2012), doi:10.1021/nn301672g.
25. E. Park, T. A. Rapoport, Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes, *Annu Rev Biophys* **41**, 21–40 (2012).
26. S. M. Simon, G. Blobel, A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum, *Cell* **65**, 371–380 (1991).
27. B. Van den Berg *et al.*, X-ray structure of a protein-conducting channel, *Nature* **427**, 36–44 (2004).
28. J. Akimaru, S. Matsuyama, H. Tokuda, S. Mizushima, Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from Escherichia coli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6545–6549 (1991).
29. L. Brundage, J. P. Hendrick, E. Schiebel, A. J. Driessen, W. Wickner, The purified E. coli integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation, *Cell* **62**, 649–657 (1990).
30. D. Görlich, T. A. Rapoport, Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane, *Cell* **75**, 615–630 (1993).

31. B. W. Bauer, T. A. Rapoport, Mapping polypeptide interactions of the SecA ATPase during translocation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 20800–20805 (2009).
32. M. Kowarik, S. Küng, B. Martoglio, A. Helenius, Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum, *Mol Cell* **10**, 769–778 (2002).
33. K. E. Matlack, B. Misselwitz, K. Plath, T. A. Rapoport, BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane, *Cell* **97**, 553–564 (1999).
34. A. Economou, W. Wickner, SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion, *Cell* **78**, 835–843 (1994).
35. J. Gumbart, K. Schulten, Molecular dynamics studies of the archaeal translocon, *Biophysical Journal* **90**, 2356–2367 (2006).
36. P. L. Freddolino, C. B. Harrison, Y. Liu, K. Schulten, Challenges in protein folding simulations: Timescale, representation, and analysis, *Nat Phys* **6**, 751–758 (2010).
37. C. Guardiani, R. Livi, F. Cecconi, Coarse Grained Modeling and Approaches to Protein Folding, *Curr Bioinform* **5**, 217–240 (2010).
38. C. Hyeon, D. Thirumalai, Capturing the essence of folding and functions of biomolecules using coarse-grained models, *Nature Communications* **2**, 487– (2011).
39. R. Beckmann *et al.*, Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome, *Cell* **107**, 361–372 (2001).
40. J.-F. Ménétrete *et al.*, Ribosome binding of a single copy of the SecY complex: implications for protein translocation, *Mol Cell* **28**, 1083–1092 (2007).
41. J.-F. Ménétrete *et al.*, Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome, *Structure* **16**, 1126–1137 (2008).
42. J. Frauenfeld *et al.*, Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment, *Nat Struct Mol Biol* **18**, 614–621 (2011).
43. F. Fèvre, J. F. Chich, G. J. Lauquin, J. P. Henry, M. Thieffry, Comparison of mitochondrial cationic channels in wild-type and porin-deficient mutant yeast, *FEBS Lett* **262**, 201–204 (1990).
44. A. Wirth *et al.*, The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel, *Mol Cell* **12**, 261–268 (2003).
45. C. A. Woolhead, P. J. McCormick, A. E. Johnson, Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins, *Cell* **116**, 725–736 (2004).
46. J. J. Kasianowicz, J. W. F. Robertson, E. R. Chan, J. E. Reiner, V. M. Stanford, Nanoscopic Porous Sensors, *Annual Review of Analytical Chemistry* **1**, 737–766 (2008).

47. S. Howorka, Z. Siwy, Nanopore analytics: sensing of single molecules, *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2360 (2009).
48. L. Movileanu, Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities, *Trends Biotechnol* **27**, 333–341 (2009).
49. D. Branton *et al.*, The potential and challenges of nanopore sequencing, *Nat Biotechnol* **26**, 1146–1153 (2008).
50. S. Majd *et al.*, Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics, *Curr Opin Biotechnol* (2010), doi:10.1016/j.copbio.2010.05.002.
51. Y. Wang, D. Zheng, Q. Tan, M. X. Wang, L.-Q. Gu, Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients, *Nature Nanotech* **6**, 668–674 (2011).
52. X. Michalet, S. Weiss, M. Jäger, Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics, *Chem Rev* **106**, 1785–1813 (2006).
53. T. E. Fisher, P. E. Marszalek, J. M. Fernandez, Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope, *Nat Struct Biol* **7**, 719–724 (2000).
54. J. Moffitt, Y. Chemla, S. Smith, Recent advances in optical tweezers, *Annu Rev ...* (2008).
55. T. Strick, M. Dessinges, G. Charvin, Stretching of macromolecules and proteins, *Reports on Progress ...* (2003).
56. R. W. DeBlois, C. P. Bean, Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique, *Review of Scientific Instruments* **41**, 909–916 (1970).
57. E. Neher, B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature* **260**, 799–802 (1976).
58. B. Sakmann, E. Neher, *Single-Channel Recording* P. Press, Ed. (Springer, ed. 2, 1995).
59. S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, V. A. Parsegian, Counting polymers moving through a single ion channel, *Nature* **370**, 279–281 (1994).
60. J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. W. Deamer, Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13770–13773 (1996).
61. C. Dekker, Solid-state nanopores, *Nat Nanotechnol* **2**, 209–215 (2007).
62. A. R. Hall *et al.*, Hybrid pore formation by directed insertion of  $\alpha$ -haemolysin into solid-state nanopores, *Nature Nanotech* **5**, 874–877 (2010).
63. N. A. W. Bell *et al.*, DNA origami nanopores, *Nano Lett* **12**, 512–517 (2012).
64. R. Wei, T. Martin, U. Rant, DNA Origami Gatekeepers for Solid-State Nanopores, *Angewandte Chemie* (2012).

65. S. W. Kowalczyk *et al.*, Single-molecule transport across an individual biomimetic nuclear pore complex, *Nature Nanotech* **6**, 433–438 (2011).
66. E. C. Yusko *et al.*, Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls, *Nat Nano* **6**, 253–260 (2011).
67. F. Fèvre, J. P. Henry, M. Thieffry, Reversible and irreversible effects of basic peptides on the mitochondrial cationic channel, *Biophysical Journal* **66**, 1887–1894 (1994).
68. I. Iacovache, F. G. van der Goot, L. Pernot, Pore formation: an ancient yet complex form of attack, *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1611–1623 (2008).
69. O. Knapp, R. Benz, M. Gibert, J. C. Marvaud, M. R. Popoff, Interaction of *Clostridium perfringens* iota-toxin with lipid bilayer membranes. Demonstration of channel formation by the activated binding component Ib and channel block by the enzyme component Ia, *J Biol Chem* **277**, 6143–6152 (2002).
70. C. Bachmeyer, F. Orlik, H. Barth, K. Aktories, R. Benz, Mechanism of C2-toxin inhibition by fluphenazine and related compounds: investigation of their binding kinetics to the C2II-channel using the current noise analysis, *J Mol Biol* **333**, 527–540 (2003).
71. L. Petit, E. Maier, M. Gibert, M. R. Popoff, R. Benz, *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers, *J Biol Chem* **276**, 15736–15740 (2001).
72. H. Bayley, Functional engineered channels and pores (Review), *Molecular membrane biology* (2004).
73. L. Song *et al.*, Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science* **274**, 1859–1866 (1996).
74. M. M. Montoya, E. E. Gouaux, Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin, *Biochim Biophys Acta* **1609**, 19–27 (2003).
75. H. Bayley, Membrane-protein structure: Piercing insights, *Nature* **459**, 651–652 (2009).
76. S. M. Bezrukov, J. J. Kasianowicz, The charge state of an ion channel controls neutral polymer entry into its pore, *Eur Biophys J* **26**, 471–476 (1997).
77. X.-F. Kang, L.-Q. Gu, S. Cheley, H. Bayley, Single protein pores containing molecular adapters at high temperatures, *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 1495–1499 (2005).
78. G. Oukhaled, L. Bacri, J. Mathe, J. Pelta, L. Auvray, Effect of screening on the transport of polyelectrolytes through nanopores, *EPL (Europhysics Letters)* **82**, 48003 (2008).
79. L. Abrami, M. Fivaz, F. G. van der Goot, Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface, *Trends Microbiol.* **8**, 168–172 (2000).
80. L. L. Abrami *et al.*, The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin, *J Biol*

*Chem* **273**, 32656–32661 (1998).

81. M. W. Parker, F. G. van der Goot, J. T. Buckley, Aerolysin--the ins and outs of a model channel-forming toxin, *Mol Microbiol* **19**, 205–212 (1996).

82. M. W. Parker *et al.*, Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states, *Nature* **367**, 292–295 (1994).

83. J. Li *et al.*, Ion-beam sculpting at nanometre length scales, *Nature* **412**, 166–169 (2001).

84. C. McMullan, J. Li, J. Golovchenko, *Feedback-controlled ion beam sculpting apparatus* (Review of scientific instruments, 2004).

85. K. A. K. Unocic, M. J. M. Mills, G. S. G. Daehn, Effect of gallium focused ion beam milling on preparation of aluminium thin foils, *CORD Conference Proceedings* **240**, 227–238 (2010).

86. A. J. Storm, J. H. Chen, X. S. Ling, H. W. Zandbergen, C. Dekker, Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision, *Nat Mater* **2**, 537–540 (2003).

87. A. Mara, Z. Siwy, C. Trautmann, J. Wan, F. Kamme, An Asymmetric Polymer Nanopore for Single Molecule Detection, *Nano Lett* **4**, 497–501 (2004).

88. R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, N. H. Dekker, C. Dekker, Noise in solid-state nanopores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 417 (2008).

89. J. D. Uram, K. Ke, M. Mayer, Noise and Bandwidth of Current Recordings from Submicrometer Pores and Nanopores, *ACS Nano* **2**, 857–872 (2008).

90. R. M. M. Smeets, N. H. Dekker, C. Dekker, Low-frequency noise in solid-state nanopores, *Nanotechnology* **20**, 095501 (2009).

91. D. J. Niedzwiecki, J. Grazul, L. Movileanu, Single-molecule observation of protein adsorption onto an inorganic surface, *J Am Chem Soc* **132**, 10816–10822 (2010).

92. P. Chen *et al.*, Atomic layer deposition to fine-tune the surface properties and diameters of fabricated nanopores, *Nano Lett* **4**, 1333–1337 (2004).

93. M. Wanunu, A. Meller, Chemically modified solid-state nanopores, *Nano Lett* **7**, 1580–1585 (2007).

94. I. Vlassiuk, Z. S. Siwy, Nanofluidic diode, *Nano Lett* **7**, 552–556 (2007).

95. M. Ali, B. Schiedt, K. Healy, R. Neumann, W. Ensinger, Modifying the surface charge of single track-etched conical nanopores in polyimide, *Nanotechnology* **19**, 085713–085713 (2008).

96. A. Ulman, Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem Rev* **96**, 1533–1554 (1996).

97. C. Martin, M. Nishizawa, K. Jirage, Controlling Ion-Transport Selectivity in Gold Nanotubule Membranes, *Advanced ...* (2001).
98. K. B. Jirage, J. C. Hulteen, C. R. Martin, Effect of thiol chemisorption on the transport properties of gold nanotubule membranes, *Anal Chem* **71**, 4913–4918 (1999).
99. M. Nishizawa, V. Menon, Metal nanotubule membranes with electrochemically switchable ion-transport selectivity, *Science* (1995).
100. Z. Siwy *et al.*, Protein Biosensors Based on Biofunctionalized Conical Gold Nanotubes, *J Am Chem Soc* **127**, 5000–5001 (2005).
101. R. Wei, V. Gatterdam, R. Wieneke, R. Tampé, U. Rant, Stochastic sensing of proteins with receptor-modified solid-state nanopores, *Nature Nanotech* **7**, 257–263 (2012).
102. T. Jovanovic-Talisman *et al.*, Artificial nanopores that mimic the transport selectivity of the nuclear pore complex, *Nature* **457**, 1023–1027 (2009).
103. A. E. Mirsky, L. Pauling, On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **22**, 439–447 (1936).
104. T. Sutherland, Y. Long, R. Stefureac, Structure of Peptides Investigated by Nanopore Analysis - Nano Letters (ACS Publications), *Nano letters* (2004).
105. R. Stefureac, Y. Long, H. Kraatz, P. Howard, Transport of  $\alpha$ -Helical Peptides through  $\alpha$ -Hemolysin and Aerolysin Pores† - Biochemistry (ACS Publications), *Biochemistry* (2006).
106. Y. Jung, H. Bayley, L. Movileanu, Temperature-responsive protein pores, *J Am Chem Soc* **128**, 15332–15340 (2006).
107. A. J. Wolfe, M. M. Mohammad, S. Cheley, H. Bayley, L. Movileanu, Catalyzing the translocation of polypeptides through attractive interactions, *J Am Chem Soc* **129**, 14034–14041 (2007).
108. L. T. Sexton *et al.*, Resistive-pulse studies of proteins and protein/antibody complexes using a conical nanotube sensor, *J Am Chem Soc* **129**, 13144–13152 (2007).
109. Q. Zhao, D. A. Jayawardhana, D. Wang, X. Guan, Study of peptide transport through engineered protein channels, *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 3572–3578 (2009).
110. Q. Zhao, R. S. S. de Zoysa, D. Wang, D. A. Jayawardhana, X. Guan, Real-Time Monitoring of Peptide Cleavage Using a Nanopore Probe, *J Am Chem Soc* **131**, 6324–6325 (2009).
111. L. T. Sexton *et al.*, An adsorption-based model for pulse duration in resistive-pulse protein sensing, *J Am Chem Soc* **132**, 6755–6763 (2010).
112. M. Miot, J.-M. Betton, Protein quality control in the bacterial periplasm, *Microb Cell Fact* **3**, 4 (2004).

113. J. Betton, Folding of a Mutant Maltose-binding Protein of Escherichia coli Which Forms Inclusion Bodies, *Journal of Biological Chemistry* (1996).
114. S. Raffy, N. Sassoon, M. Hofnung, J.-M. Betton, Tertiary structure-dependence of misfolding substitutions in loops of the maltose-binding protein, *Protein Sci* **7**, 2136–2142 (1998).
115. S. E. Henrickson, M. Misakian, B. Robertson, J. J. Kasianowicz, Driven DNA transport into an asymmetric nanometer-scale pore, *Phys Rev Lett* **85**, 3057–3060 (2000).
116. L. Brun *et al.*, Dynamics of Polyelectrolyte Transport through a Protein Channel as a Function of Applied Voltage, *Phys Rev Lett* **100** (2008), doi:10.1103/PhysRevLett.100.158302.
117. A. Han *et al.*, Sensing protein molecules using nanofabricated pores, *Appl Phys Lett* **88**, 093901 (2006).
118. H. J. Dyson, P. E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197–208 (2005).
119. R. I. Stefureac, A. Kachayev, J. S. Lee, Modulation of the translocation of peptides through nanopores by the application of an AC electric field, *Chem Commun (Camb)*, – (2012).
120. M. Firnkes, D. Pedone, J. Knezevic, Electrically Facilitated Translocations of Proteins through Silicon Nitride Nanopores: Conjoint and Competitive Action of Diffusion, Electrophoresis, and Electroosmosis - Nano Letters (ACS Publications), *Nano letters* (2010).
121. M. Kim, B. McNally, K. Murata, Characteristics of solid-state nanometre pores fabricated using a transmission electron microscope, *Nanotechnology* (2007).
122. J. Maxwell, *A Treatise on Electricity and Magnetism, Vol. I and II, reprinted in 1954 by Dover* (New York, 1891).
123. F. Brochard, P. G. de Gennes, Dynamics Of Confined Polymer-Chains, *J Chem Phys* **67**, 52–56 (1977).
124. Namkyoung Lee, Sergei Obukhov, Diffusion of a Polymer Chain through a Thin Membrane, *J. Phys. II France* **6**, 195–204 (1996).
125. J. Chuang, Y. Kantor, M. Kardar, Anomalous dynamics of translocation, *Physical Review E* **65**, 011802–011802 (2001).
126. A. Meller, L. Nivon, D. Branton, Voltage-driven DNA translocations through a nanopore, *Phys Rev Lett* **86**, 3435–3438 (2001).
127. A. J. Storm *et al.*, Fast DNA translocation through a solid-state nanopore, *Nano Lett* **5**, 1193–1197 (2005).
128. M. Muthukumar, *Polymer translocation* (2009).

129. J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, Theory of protein folding, *Curr Opin Struct Biol* **14**, 70–75 (2004).
130. M. Yadaiah, R. Kumar, A. K. Bhuyan, Glassy dynamics in the folding landscape of cytochrome c detected by laser photolysis, *Biochemistry* **46**, 2545–2551 (2007).
131. G. Gibrat *et al.*, Polyelectrolyte entry and transport through an asymmetric alpha-hemolysin channel, *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 14687–14691 (2008).
132. J. Pelta, H. Berry, G. C. Fadda, E. Pauthe, D. Lairez, Statistical conformation of human plasma fibronectin, *Biochemistry* **39**, 5146–5154 (2000).
133. J. C. J. Spurlino, G. Y. G. Lu, F. A. F. Quioco, The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis, *J Biol Chem* **266**, 5202–5219 (1991).
134. E. R. Cruz-Chu, A. Aksimentiev, K. Schulten, Ionic Current Rectification through Silica Nanopores, *The Journal of Physical Chemistry C* **113**, 1850–1862 (2009).

## **Transport de protéines natives, partiellement et complètement dépliées à travers des nanopores protéiques et artificiels**

### **Résumé**

Nous étudions le transport de protéines natives, partiellement ou complètement dépliées à travers des nanopores protéiques ou solides à l'échelle de la molécule unique en utilisant une détection électrique. Le système modèle que nous avons choisi est la protéine MalE sauvage ou mutante, en particulier la protéine MalE 219 qui se déplie à de plus faibles concentrations d'agent dénaturant que la protéine sauvage. Nous montrons que la translocation de protéines partiellement dépliées à travers un canal protéique, l'hémolysine du staphylocoque doré, dépend des conformations individuelles que nous pouvons distinguer. Les molécules dépliées passent rapidement dans les nanopores. Nous mesurons directement leur fraction en fonction de la concentration en agent dénaturant. La technique est très sensible aux mutations affectant le repliement. Nous avons également étudié le transport de protéines à travers des nanopores solides dans différents cas. Nous comparons d'abord le transport de protéines natives et de protéines complètement dépliées à travers un nanopore de grand diamètre puis nous étudions la translocation de protéines dépliées à travers un nanopore étroit de diamètre inférieur à la taille de la protéine. Nous observons différents régimes de translocation quand nous varions le champ électrique appliqué que nous interprétons à l'aide d'un modèle théorique simple.

Mots-clés : protéines, nanopores, translocation, dépliement, molécule unique

## **Transport of native, partially and completely unfolded proteins through protein and solid-state nanopores**

### **Abstract**

We study the transport of native, partially or completely unfolded proteins through protein or solid-state nanopores at the single molecule level using an electrical detection. The model system that we use is the wild-type MalE or mutant protein, in particular MalE219, which unfolds at lower concentration of denaturing agent than the wild type. We show that the translocation of partially unfolded proteins through the Hemolysin protein channel, a toxin from *Staphylococcus aureus*, depends on of individual conformations that we can distinguish. The unfolded proteins pass rapidly through the nanopores. We directly measure their proportion as a function of the concentration of denaturing agent. The technique is very sensitive to the mutations affecting the folding properties. We also study the transport of proteins through solid-state nanopores in different situations. We first compare the transport of native and fully unfolded proteins through a nanopore of large diameter. We then study the translocation of unfolded proteins through a narrow pore, whose diameter is smaller than the protein size. We observe different regimes of translocation by varying the applied electric field, which we interpret using a simple theoretical model.

Key-words : proteins, nanopores, translocation, unfolding, single molecule