

MASTER 2R EP
Grenoble INP, PHELMMA

Rapport de stage 2012
Menais Timothée

Etude théorique de la translocation de biomolécules à travers un nanopore

Abstract : *Rapport de stage, M2R EP, Timothée Menais, 2011-2012.*

On verra plus tard pour la présentation de l'en-tête.

Mots clés : *ADN, Graphène, Dynamique moléculaire, Physique statistique.*

Stage encadré par :

Dr Arnaud Buhot

arnaud.buhot@cea.fr / tel : ++33 438 78 38 68

Groupe Théorie

Structures et Propriétés d'Architectures Moléculaires

Institut Nanoscience et Cryogénie

17 rue des Martyrs 38054 Grenoble cedex 9 France

http://inac.cea.fr/spram/Phoce/Vie_des_labos/Ast/ast_groupe.php?id_groupe=397



12 mai 2015

Remerciements

Tout plein de gens à remercier arnaud stefano veera iannis tout le créab camille zoéline :) **test**

Introduction

Ce manuscrit de thèse présente les travaux réalisés au sein du groupe CREAB (Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblages Biologiques) et en coopération avec le groupe PCI (Polymères Conducteurs Ioniques), deux groupes du laboratoire SPrAM (Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires) de l'INAC (Institut Nanosciences et Cryogénie) au sein du CEA (Commissariat à l'énergie atomique) de Grenoble de Novembre 2012 à Novembre 2015.

Le sujet s'intègre dans le cadre de la translocation de biomolécules à travers une membrane fine, thème porté par l'équipe CREAB, étudié avec des outils numériques de dynamique moléculaire, compétences apportées par la collaboration avec le groupe PCI.

La translocation de polymères (notamment l'ADN), est le passage d'un côté à l'autre d'une membrane en traversant un pore situé dans cette dernière. L'étude de ce domaine est très active tant sur le plan expérimentale que théorique. Ceci est principalement dû aux applications potentielles en biotechnologies et en médecine, notamment pour le séquençage du génome. En plus des potentielles applications techniques, ce thème est porteur de question fondamentales très intéressantes d'un point vu physique statistique des polymères.

La dynamique moléculaire est une technique de simulation numérique que nous avons appliquée au problèmes de translocation. Il s'agit de définir les potentiels d'interactions entre les différents sous-systèmes (ou grains) du problème et d'intégrer les équations du mouvement pour obtenir une trajectoire. Cette méthode permet d'envisager des modèles de toutes sortes de complexité, en découpant le système en grain de nature variée, du simple atome à la molécule complète.

Avec ces deux thèmes en tête, nous avons développé un modèle original de polymère adapté à l'étude statistique de la translocation de chaînes structurées (telle l'ADN) à travers des membranes fines. Ce modèle, suffisamment simple pour obtenir des résultats assez nombreux pour être statistiquement significatifs nous a permis de sonder les effets de l'utilisation de membranes fines sur le phénomène de translocation, que ce soit via la vibration et déformabilité du nano-pore ou bien encore la flexibilité de la membrane.

Ce manuscrit est structuré de la manière suivante :

annonce du plan

Table des matières

1	Etat de l'art	5
1.1	Aspect expérimental	5
1.1.1	L'ADN et le séquençage	5
1.1.2	La translocation de polymères	6
1.1.3	Les nanopores	7
1.1.4	Les membranes fines	8
1.2	Aspect théorique	10
1.2.1	Polymères idéaux et non idéaux	10
1.2.2	Dynamique des polymères	13
1.2.3	Translocation	14
2	Conclusion	20
3	Annexe	21

1 Etat de l'art

1.1 Aspect expérimental

1.1.1 L'ADN et le séquençage

Les bio-polymères, et notamment l'ADN, sont les polymères qui constituent le vivant. Ils interviennent dans de nombreux processus clés en biologie. L'ADN (avec l'ARN) est le support de l'information génétique du vivant. Il se trouve dans les cellules, contenu généralement dans le noyau. C'est un bio-polymère constitué d'une séquence de quatre monomères différents. Ces monomères, appelés nucléotides sont constitués de phosphate, de sucre et d'une des bases azotées, seul élément distinct entre nucléotides : l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine.

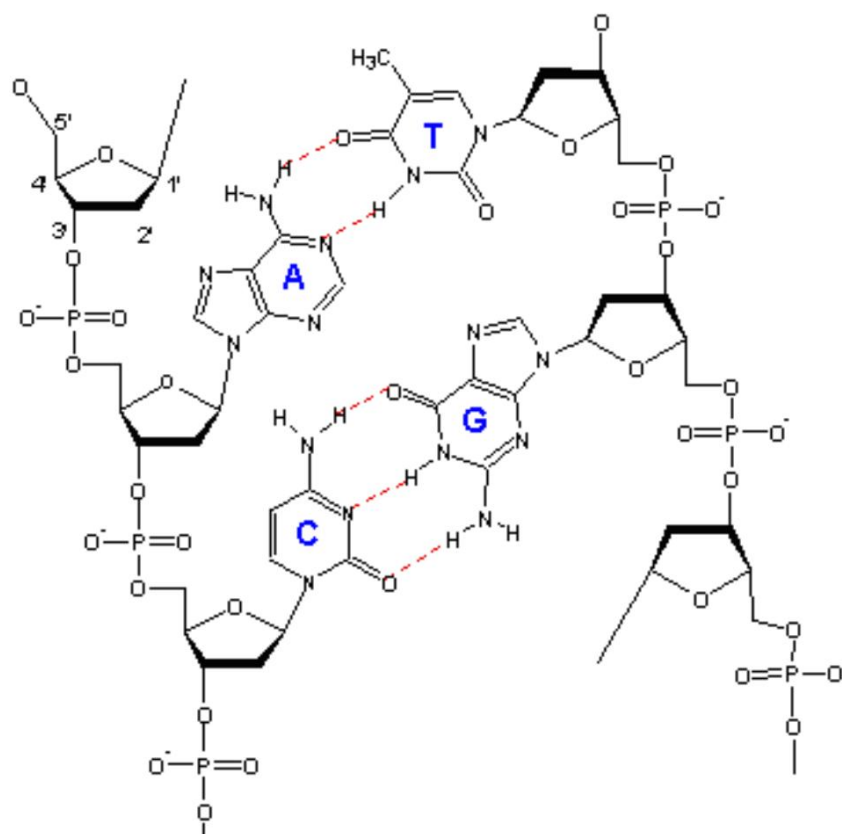


FIGURE 1 – Structure chimique de l'ADN. Le squelette est composé d'une succession de phosphates et de sucres liés entre eux, chacun des sucres est de plus lié à une base azotée. Les bases azotées peuvent interagir par liaisons hydrogènes et interactions orbitales. Les bases s'associent plus facilement avec leur complémentaire (Adénine et Thymine ou Cytosine et Guanine) permettant une certaine variété de structure : repliement d'ADN simple brins ou encore association de deux brins complémentaires formant l'hélice caractéristique de l'ADN dit double brin.

La structure chimique de l'ADN est aujourd'hui parfaitement connue (voir Figure 1), la nature des liaisons et interactions ne sont plus mystérieuses. Toutefois, son comportement, dépendant de la séquence, et l'unicité du code génétique de chaque individu, font de la compréhension de l'ADN et de son séquençage des enjeux majeurs.

Dès la deuxième moitié des années 70, les premières méthodes de séquençage voient le jour. **mixe à rédiger en combinant les sources wikipédia pour la partie "antique" et un document traitant du séquençage haut débit, besoin de demander confirmation à thierry sur certains points**

avant d'écrire des bêtises

1.1.2 La translocation de polymères

Très récemment, le développement des expériences sur molécule unique ont permis de s'affranchir des moyennes macroscopiques classiques et d'investiguer en profondeur les processus moléculaires clés en biologie. Il est maintenant possible de manipuler des brins d'ADN notamment en les greffant sur des billes ou des pointes d'AFM [?].

ajout d'illustration pour les deux cas

Ce greffage sur des objets facilement manipulables a permis de déterminer de nombreuses propriétés physique de l'ADN, tel sa résistance ou encore sa longueur de persistance, propriétés qui se révélèrent bien souvent dépendante de la séquence utilisée [réf]. Parmi les phénomènes dont l'étude est dorénavant possible, figure la translocation. La translocation d'un polymère est son passage par un pore reliant deux compartiments séparés par une membrane.

Est ce que j'inclus le paragraphe précédent sur la manipulation d'ADN dans un souschapitre en partant d'un peu plus loin avec la chimie de greffage et en mentionnant par exemple que ça sert au creab pour des puces à aptamer ou c'est hors sujet ?

Lors de la translocation, la molécule passe d'un coté appelé cis à l'autre appelé trans en deux étapes. La première étape consiste en ce qu'une extrémité de la chaîne atteigne l'entrée du pore. La probabilité d'accéder au pore et le temps caractéristique qui lui est associé ont déjà été estimés analytiquement [?], les outils de manipulations précédemment évoqués permettent le contrôle de cette étape. La deuxième étape, qui nous interesse a lieu lorsque le pore est occupé par le polymère (voir Figure 2).

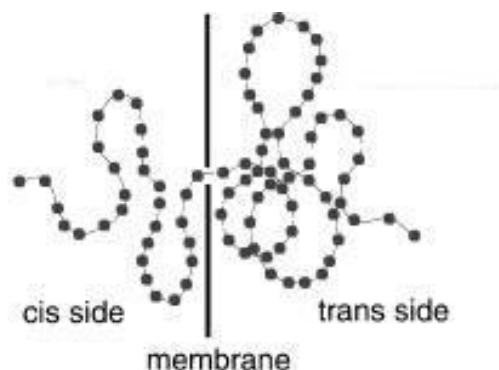


FIGURE 2 – Un polymère effectue une translocation d'un coté de la membrane appelé cis vers l'autre appelé trans. Le temps pendant lequel le pore est occupé est appelé temps de translocation (illustration réf : [?]).

Le temps pendant lequel le pore est occupé, appelé temps de translocation (τ) est très important puisqu'il représente dans beaucoup de cas la seule mesure expérimentale accessible. Ce temps de translocation va dépendre de plusieurs paramètres notamment la longueur du polymère, l'application éventuelle d'une force (translocation biaisée ou libre), la façon dont elle est appliquée... Nous reviendrons sur ces facteurs dans la partie Aspect théorique.

Une idée directrice des expériences réalisées au cours de la dernière décennie est la mesure du courant ionique à travers le pore au cours de la translocation [?]. Ce courant est caractéristique de l'élément en cours de translocation. Expérimentalement, il a déjà été démontré que la mesure de ce courant de translocation permet de multiples déductions :

- Détecter et identifier des protéines ainsi que leur conformation[réf].
- Déterminer la nature de l'ADN (simple ou double brin) ainsi que sa conformation (éventuel repli)[réf].

ajout d'illustration avec variation de courant au cours d'une translocation

Le courant est fortement modifié au cours de ces expériences, cependant la limite de résolution en courant nécessaire afin de séquencer est atteinte. La première source de limitation est temporelle : la translocation a généralement lieu trop rapidement pour que les variations de courant soient observables. La seconde est spatiale. En effet les pores utilisés jusqu'à présent sont bien trop épais et plusieurs dizaines de bases sont simultanément au sein du pore lors de la translocation, ce qui rend très difficile de distinguer les unes des autres les nombreuses séquences possibles.

Les expériences relatives à la translocation d'ADN ont été menées sur toutes sortes de pores, pores que nous allons maintenant présenter.

1.1.3 Les nanopores

Les bio-pores :

Les premiers pores étudiés ont été ceux directement disponibles car existants dans la nature, les bio-pores. Le plus utilisé est l' α -hémolysine, il s'agit d'une exotoxine produite par le Staphylocoque doré, c'est ce qu'a utilisé l'équipe de Kasianowicz [?] en 1996 en réalisant la première translocation d'ADN. Comme l'illustre la Figure 3, l'ADN peut aisément effectuer une translocation à travers une membrane lipidique par le biais de ce pore.

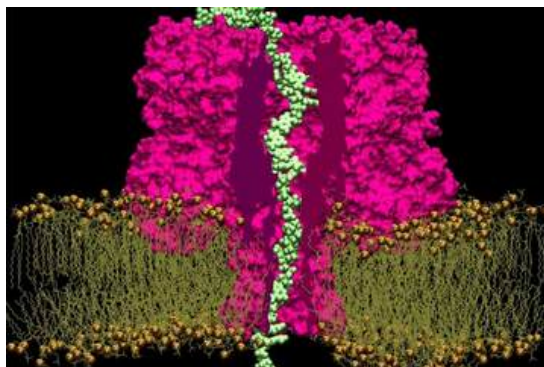


FIGURE 3 – Translocation d'ADN grâce à l' α -hémolysine, un bio-pore.

Les bio-pores présentent certains avantages, ils peuvent être cultivés et ont souvent une grande sélectivité vis à vis des molécules autorisées à traverser. Ils permettent ainsi de détecter des protéines ou des ions particuliers. Cependant ils présentent des limitations : leur taille n'est pas modulable, ils nécessitent de travailler en conditions physiologiques. Un des obstacles à leur utilisation pour le séquençage est leur importante épaisseur, comme nous l'avons fait remarquer précédemment.

Les pores artificiels de première génération :

Afin de pallier aux désavantages des bio-pores, des pores artificiels ont été élaborés. Ces pores, principalement basés sur les technologies du silicium, perdent en sélectivité, mais ont des propriétés beaucoup plus adaptables, ce qui permet de quantifier l'influence des paramètres géométriques. A l'instar des bio-pores, leur épaisseur reste trop importante. La Figure 4 présente un exemple de pore en silice.

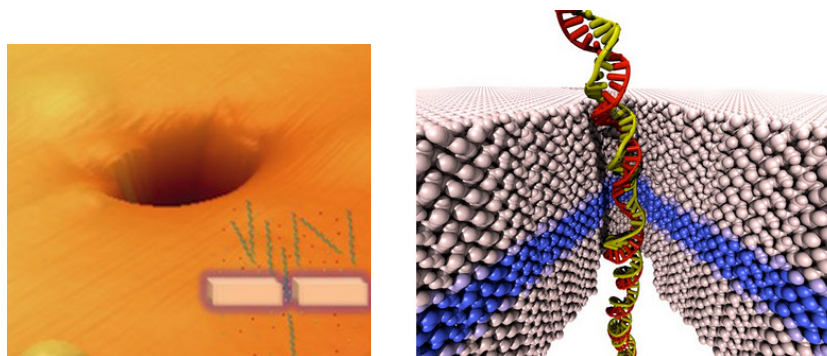


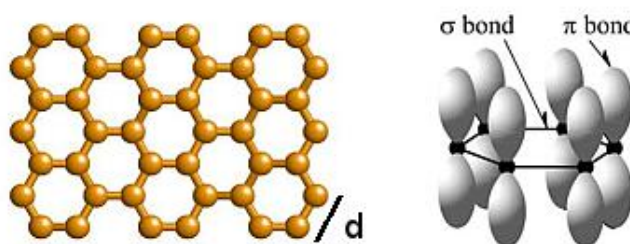
FIGURE 4 – Un pore artificiel en silice, imagerie par AFM et modélisation.

Le lecteur intéressé par les possibilités des différents types de pores et l'emploi de divers moyens de contrôles sur la translocation appréciera l'article de revue écrit par Ulrich F. Keyser [?].

1.1.4 Les membranes fines

Comme nous l'avons déjà souligné, le principal obstacle au séquençage par analyse du courant de translocation est l'épaisseur trop importante du pore qui ne permet pas de distinguer les multiples combinaisons de séquences possibles. Ce problème pourrait bien être résolu par l'utilisation de membranes très fines dont le graphène fait partie.

Isolé pour la première fois en 2004, le graphène est un cristal bidimensionnel de carbone [?]. L'empilement de plusieurs couches monoatomiques de graphène forme le graphite. Comme le montre la Figure 5, les carbones forment un maillage hexagonal de paramètre de maille $d = 0.142 \text{ nm}$, les électrons délocalisés sur l'ensemble des orbitales π de ce plan le rendent aromatique. L'occupation de ces orbitales π est l'origine de propriétés intéressantes du graphène. Les électrons π octroient au graphène une importante conductivité. Les interactions orbitales (stacking) maintiennent une cohésion entre les différents plans. La distance inter-planaire dans le graphite, 0.335 nm , est plus importante que la distance inter-atomique dans le plan, cela est dû à la géométrie plus étendue perpendiculairement au plan des orbitales π .

FIGURE 5 – Structure cristallographique et orbitales π du graphène.

Expérimentalement, il a été vérifié que la translocation d'ADN à travers un nanopore creusé dans le graphène est possible [?]. C'est une porte ouverte à de nombreuses autres expériences. La finesse de la couche monoatomique de graphène entraîne cependant des différences singulières par rapport aux pores utilisés précédemment. En effet, l'épaisseur importante d'un pore impose une certaine rigidité à ce dernier. Ce n'est plus le cas lors de l'utilisation de pores creusés dans le plan de graphène, qui est déformable et présente des propriétés vibrationnelles complexes, comme l'illustre la Figure 6.

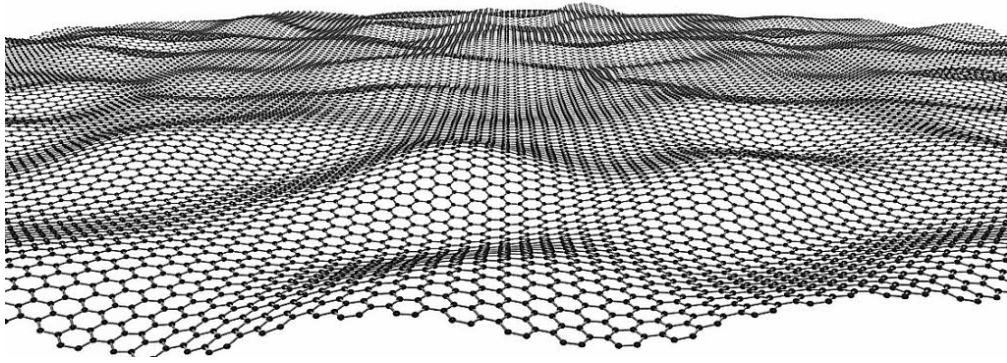


FIGURE 6 – La couche monoatomique de graphène, flexible, présente des propriétés vibrationnelles complexes.

D'autres cristaux bidimensionnels sont depuis peu également disponibles, tel le [*** \[réf\]](#). Ces nouvelles conditions expérimentales n'ont pour l'instant pas de cadre général théorique pour leur étude.

La prochaine section explicite le cadre analytique disponible pour l'étude de la translocation et montre quelles sont ses limites vis à vis des conditions envisagées.

1.2 Aspect théorique

1.2.1 Polymères idéaux et non idéaux

Nous allons dans un premier temps présenter un modèle naïf de polymère idéal afin de poser les bases admises en physique des polymères [?, ?].

Le polymère évolue sur un réseau périodique de paramètre λ . La tête du polymère est placée sur un des nœuds du réseau. Les monomères consécutifs sont placés sur un des z ($z = 4$ pour un réseau carré) sites plus proches voisins, le polymère réalise alors une marche aléatoire (Figure 7).

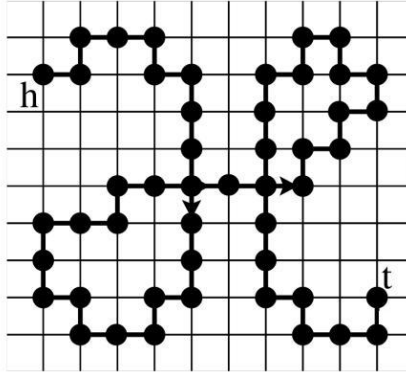


FIGURE 7 – Réseau carré montrant la marche aléatoire qui génère une configuration d'un polymère [?].

On déduit facilement que pour un degré de polymérisation $N + 1$, il y a $Z_{ideal} = z^N$ polymères distincts possibles. Recalculons les résultats fondamentaux concernant la marche aléatoire génératrice du polymère (ces résultats sont indépendants du réseau qui est un artifice de calcul et ne modifie pas les lois d'échelle, la plupart des modèles numériques n'utilisent pas de maillage). Soit \mathbf{r} le vecteur position du marcheur par rapport à l'origine et b la taille d'un pas effectué par le marcheur. Soit \mathbf{r}_n le n -ième pas effectué, au bout d'un nombre de pas N , on a :

$$\mathbf{r} = \sum_{n=1}^N \mathbf{r}_n \quad (1)$$

Pour la marche aléatoire idéale, il n'y a pas de corrélation entre les différents pas, ce qui mathématiquement se traduit par $\langle \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{r}_j \rangle = \delta_{i,j} b^2$. Ce qui implique les relations suivantes :

$$\langle \mathbf{r} \rangle = \sum_{n=1}^N \langle \mathbf{r}_n \rangle = 0, \quad \langle \mathbf{r}^2 \rangle = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{r}_j \rangle = \sum_{i=1}^N \langle \mathbf{r}_i^2 \rangle = b^2 N \quad (2)$$

Puisque la valeur moyenne de \mathbf{r} est nulle, on estime le comportement de la distance entre les extrémités (distance end-to-end) moyenne du polymère en prenant la racine carré de la valeur moyenne de \mathbf{r}^2 . Comme le montre l'équation 2 la distance end-to-end du polymère sera proportionnelle à $N^{\frac{1}{2}}$.

Une estimation correcte de la taille du polymère est obtenue en considérant le rayon de giration

R_g . Il est défini de la manière suivante en notant \mathbf{r}_{CM} la position du centre de masse du polymère :

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \langle (\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_{CM})^2 \rangle \text{ ou encore, de manière équivalente : } R_g^2 = \frac{1}{2N^2} \sum_{i,j}^N \langle (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)^2 \rangle \quad (3)$$

L'équivalence s'obtient en développant les termes des deux expressions et en les identifiant.

On va appliquer la dernière partie de l'équation 2 pour la marche aléatoire à l'équation 3 du rayon de giration en notant le fait qu'on effectue une marche aléatoire de $|i - j|$ pas pour aller du monomère i au j dans l'expression $\langle (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)^2 \rangle$.

$$\begin{aligned} R_g^2 &= \frac{1}{2N^2} \sum_{[i-j]} |i - j| b^2 = \frac{1}{N^2} \sum_{[i>j]} |i - j| b^2 \\ &= \frac{b^2}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^i j \\ &= \frac{b^2}{N^2} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{N(N+1)(2N+1)}{6} + \frac{N(N+1)}{2} \right) \right] \end{aligned} \quad (4)$$

En prenant la limite $N \gg 1$ dans l'équation précédente (1.2.1), on obtient la loi d'échelle à laquelle le rayon de giration obéit :

$$R_g^2 \sim \frac{b^2}{6} N \Rightarrow R_g \propto N^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

La distance end-to-end et le rayon de giration obéissent à la même loi d'échelle et sont caractéristiques de l'expansion spatiale du polymère.

Revenons à notre modèle sur réseau afin d'établir une équation différentielle sur la probabilité, $P(\mathbf{r}, N)$, du N -ième monomère d'être en \mathbf{r} . Pour cela, introduisons les z \mathbf{b}_i vecteurs les plus proches de la position \mathbf{r} pour obtenir :

$$P(\mathbf{r}, N) = \frac{1}{z} \sum_{i=1}^z [P(\mathbf{r} - \mathbf{b}_i, N - 1)] \quad (6)$$

On effectue ensuite un développement limité à l'ordre 2 afin d'obtenir une équation différentielle à résoudre sur la probabilité de distribution. On fait comme hypothèse que $\mathbf{r} \gg \mathbf{b}_i$ et $N \gg 1$.

$$P(\mathbf{r} - \mathbf{b}_i, N - 1) = P(\mathbf{r}, N) - \frac{\partial P}{\partial N} - \mathbf{b}_{i\alpha} \frac{\partial P}{\partial r_\alpha} + \frac{1}{2} \mathbf{b}_{i\alpha} \mathbf{b}_{i\beta} \frac{\partial^2 P}{\partial r_\alpha \partial r_\beta} \quad (7)$$

En utilisant la convention de sommation d'Einstein, i varie de 1 à z et α et β représentent les coordonnées spatiales. En considérant les résultats suivants :

$$\sum_{i=1}^z \mathbf{b}_{i\alpha} = 0, \quad \sum_{i=1}^z \mathbf{b}_{i\alpha} \cdot \mathbf{b}_{i\beta} = \frac{b^2 \delta_{\alpha,\beta}}{3} \quad (8)$$

On obtient l'équation différentielle qui régit la probabilité de distribution de nos monomères :

$$\frac{\partial P}{\partial N} = \frac{b^2}{6} \frac{\partial^2 P}{\partial^2 \mathbf{r}} \quad (9)$$

Cette équation différentielle (9) a pour solution avec pour condition initiale $\mathbf{r} = 0$ quand $N = 0$:

$$P(\mathbf{r}, N) = \left(\frac{3}{2\pi N b^2} \right)^{\frac{3}{2}} \exp \left(-\frac{3\mathbf{r}^2}{2N b^2} \right) \quad (10)$$

La distribution de probabilité de présence des monomères est donc gaussienne, un polymère idéal est d'ailleurs souvent dit gaussien.

Remarquons d'ors et déjà que le logarithme de la distribution de probabilité donne par définition l'énergie libre du système qui n'est pas sans rappeler celle d'un ressort :

$$F(\mathbf{r}) = -k_B T \ln(P(\mathbf{r}, N)) = F(0) + \frac{3k_B T r^2}{2N b^2} \quad (11)$$

k_B est la constante de Boltzmann. Cette énergie sera utilisée par la suite pour décrire des propriétés dynamiques du polymère.

Bien entendu ce modèle est simpliste, un vrai polymère ne peut en aucun s'intersecter lui-même, les monomères peuvent être différents, il peut ne pas être linéaire...

Traisons le cas d'un polymère qui ne peut s'intersecter lui-même. Les configurations sont alors générées par des marches aléatoires auto-évitantes (Self Avoiding Walks ou SAW). Soit $v_c \propto b^3$ le volume exclusif occupé par un monomère. La probabilité qu'un monomère de la chaîne de volume R^3 ne se superpose pas à un autre est $(1 - \frac{v_c}{R^3})$, il y a $\frac{N(N-1)}{2}$ paires de monomères. La probabilité totale de non superposition est donc :

$$P_{ns}(N) = \left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right)^{\frac{N(N-1)}{2}} = \exp \left[\frac{N(N-1)}{2} \ln \left(1 - \frac{v_c}{R^3}\right) \right] \quad (12)$$

La probabilité de distribution d'une SAW est donc le produit des deux probabilités précédentes, ce qui donne dans la limite $N \gg 1$, $R \gg v_c$:

$$P_{SAW}(R, N) = P_{ns}(N)P(R, N) = \exp \left[-\frac{3R^2}{2N b^2} - \frac{v_c N^2}{2R^3} \right] \quad (13)$$

La taille caractéristique du polymère est alors donnée par la valeur R^* qui maximise la probabilité de distribution, d'où :

$$\begin{aligned} \frac{\partial P_{SAW}(R, N)}{\partial R} \Big|_{R=R^*} &= 0 \\ \Rightarrow \frac{3R^{*2}}{N b^2} - \frac{3v_c N}{2R^{*4}} &= 0 \\ \Rightarrow R^* &\propto N^{\frac{3}{5}} \end{aligned} \quad (14)$$

La taille caractéristique du polymère croit donc plus rapidement avec le nombre de monomères que dans le cas idéal précédent. L'exposant $3/5$ trouvé est très proche de l'exposant de Flory, $\nu = 0.588$, qui fait consensus (réf) parmi les différentes simulations numériques.

Le cas de la chaîne auto évitante est adapté aux polymères dilués en solution. Le modèle de la chaîne idéale décrit paradoxalement très bien un contexte de polymères en forte concentration en contact les uns des autres. En effet les termes de volumes exclus s'appliquent pour le polymère aussi bien par sa propre chaîne que par la présence de chaînes voisines. L'espace précédemment libre est occupé, le volume exclu apporte une contribution énergétique uniforme dans tout l'espace. Les termes de volumes exclus se compensent donc tous, ce qui permet de se retrouver uniquement avec la contribution d'une chaîne idéale.

1.2.2 Dynamique des polymères

Nous allons maintenant proposer un modèle permettant d'aborder la dynamique d'une chaîne. Il s'agit du modèle de Rouse (Figure 8). Comme nous l'avons signalé, l'énergie libre d'un polymère idéal présente les caractéristiques d'un potentiel harmonique de type ressort (cf : équation 11), ce qui justifie cette modélisation.

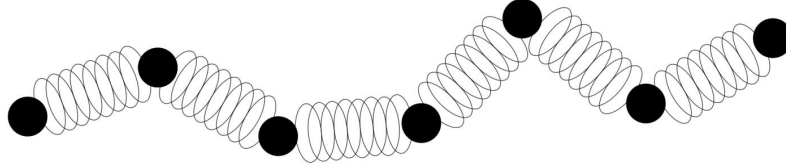


FIGURE 8 – Modélisation du polymère par une chaîne d'oscillateurs.

Le polymère est modélisé par une chaîne d'oscillateurs (de type billes/ressorts). Physiquement, le ressort ne représente pas une liaison entre monomères mais plutôt une partie du polymère assez longue pour que la statistique gaussienne puisse lui être appliquée. De l'équation 11 obtenue précédemment on déduit l'énergie élastique du ressort connectant les billes n et $n + 1$ séparées par une distance d'équilibre moyenne b :

$$F_{n,n+1} = \frac{3k_B T}{2} \frac{(\mathbf{r}_{n+1} - \mathbf{r}_n)^2}{b^2} \quad (15)$$

Nous nous plaçons dans des conditions simples en modélisant l'effet du solvant par un simple terme de frottement visqueux (ou Stokes drag), la trajectoire est donc donnée par l'équation de Langevin ?? qui s'écrit ici :

$$\frac{d\mathbf{r}_n}{dt} = \frac{3T}{\nu_n b^2} (\mathbf{r}_{n+1} + \mathbf{r}_{n-1} - 2\mathbf{r}_n) + \mathbf{g}_n \quad (16)$$

On va résoudre cette équation en prenant n comme variable continue.

$$\frac{d\mathbf{r}}{dt} = \frac{3T}{\nu b^2} \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial n^2} + \mathbf{g}_n \quad (17)$$

Avec les conditions limites $\frac{\partial \mathbf{r}}{\partial n} = 0$ en bouts de chaîne, on peut résoudre le système en le séparant en plusieurs modes à partir de coordonnées normalisées :

$$\mathbf{x}_p = \frac{1}{N} \int_0^N \cos\left(\frac{n\pi p}{N}\right) \mathbf{r}(n, t) dn, \quad \frac{d\mathbf{x}_p}{dt} = -\frac{k_p}{\nu_p} \mathbf{x}_p + \mathbf{g}_p \quad (18)$$

$$\nu_0 = N\nu, \quad \nu_p = 2N\nu, \quad k_p = \frac{6T\pi^2 p^2}{Nb^2}, \quad \langle \mathbf{g}_{p\alpha}(t) \cdot \mathbf{g}_{q\beta}(t') \rangle = 2\delta_{p,q} \delta_{\alpha,\beta} \frac{T}{\nu_p} \delta(t - t') \quad (19)$$

En travaillant dans la nouvelle base orthogonale, on peut montrer que :

$$\langle (\mathbf{x}_0(t) - \mathbf{x}_0(0))_\alpha \cdot (\mathbf{x}_0(t) - \mathbf{x}_0(0))_\beta \rangle = 2\delta_{\alpha,\beta} \frac{T}{N\nu} t \quad (20)$$

$$\langle \mathbf{x}_{p\alpha}(t) \cdot \mathbf{x}_{q\beta}(0) \rangle = 2\delta_{p,q}\delta_{\alpha,\beta} \frac{T}{k_p} \exp\left(-\frac{t}{\tau_p}\right), \quad \tau_p = \frac{\nu N^2 b^2}{3\pi^2 p^2 T} \quad (21)$$

La distance end-to-end et le rayon de giration sont des combinaisons linéaires des \mathbf{x}_p et sont donc assujettis au temps de relaxation le plus long, τ_1 qui obéit à la loi d'échelle : $\tau_1 \propto N^2$. De même la position du centre de masse est donnée par \mathbf{x}_0 , ce qui permet d'en déduire le coefficient de diffusion du polymère :

$$\langle (\mathbf{r}_{CM}(t) - \mathbf{r}_{CM}(0))^2 \rangle = \frac{6k_B T}{N\nu} t = 6D_R t \quad (22)$$

L'équation précédente (22) traduit le théorème de fluctuation dissipation en prenant en compte $N\nu$, le coefficient de Stokes global du polymère. Le temps de relaxation peut également être vu comme le temps mis par le centre de masse pour parcourir sa longueur.

Le temps nécessaire au parcours d'une certaine distance est indépendant de la présence d'interactions entre monomères (chaîne idéale ou SAW), mais la longueur du polymère dépend des conditions du modèle. On a alors $\tau \propto \frac{R_0^2}{D}$, soit $\tau \propto N^2$ dans le cas idéal ou $\tau \propto N^{1+2\nu}$ dans le cas de la marche auto-évitante.

Expérimentalement, on ne retrouve pas ces résultats car le modèle néglige les interactions hydrodynamiques, des interactions à longue portée entre les monomères via le solvant. La figure 9 illustre ce phénomène.

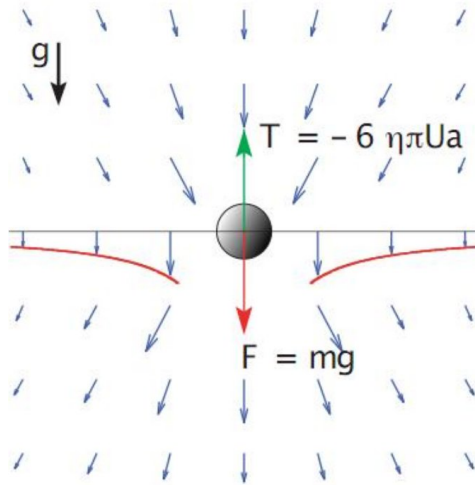


FIGURE 9 – Mouvement de fluide généré par une bille en chute libre. Pour chaque objet en mouvement, Le fluide déplacé génère un champ de vitesse, ces champs de vitesse décroissent en l'inverse de la distance et se superposent.

La compréhension de la dynamique des polymères permet de s'attaquer à l'élaboration de modèles pour la translocation.

1.2.3 Translocation

La translocation peut se dérouler dans différents contextes. Elle peut être due uniquement aux fluctuations thermiques, on parle alors de translocation non biaisée, ou être pilotée par une force extérieure, on parle alors de translocation forcée (driven translocation). Les forces extérieures peuvent être de natures variées, on citera notamment l'utilisation de champs électriques (électrophorèse), de gradients de potentiels chimiques, de flux imposé sur le solvant, ou encore l'emploi de pinces

optiques [?].

Le temps de translocation dépend alors fortement de la taille du polymère et de la force appliquée, d'une façon générale on peut définir des lois d'échelles :

$$\tau = N^\alpha f^{-\delta} \quad (23)$$

Le but du stage est de déterminer les valeurs de α et δ , appelés exposants critiques, dans les différentes limites possibles. On basera l'échelle de force en unités de Lennard-Jones à partir de la valeur de $\frac{\epsilon}{b}$.

Nous allons dans un premier temps calculer la forme de la barrière d'énergie franchie par le polymère lors de la translocation. Pour cela, nous devons dans un premier temps calculer la probabilité de distribution d'un polymère idéal greffé à une paroi. La chaîne idéale présente comme conditions aux limites, la non pénétration des monomères à travers la paroi. On note $P(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, n)$ la probabilité de trouver le n -ième monomère en position \mathbf{r} , pour $n \gg 1$, le premier monomère étant greffé en \mathbf{r}_0 . P_0 est la distribution calculé précédemment pour un polymère idéal libre.

$$P_0(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, n) = \left(\frac{3}{2\pi n b^2} \right)^{\frac{3}{2}} \exp \left(-\frac{3(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2}{2n b^2} \right) \quad (24)$$

A l'instar de nombreux problèmes d'électromagnétisme ou de mécanique des fluides, on utilise la méthode des images miroirs afin de déterminer $P(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, n)$. En effet, on a :

$$P(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, n) \propto P_0(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, n) - P_0(\mathbf{r}, -\mathbf{r}_0, n) \quad (25)$$

Dans le cas idéal, la probabilité de distribution du monomère de queue est à variables séparables. En posant $\mathbf{r}_0 = \epsilon y$ avec $\epsilon \ll 1$, un développement limité au premier ordre donne :

$$P(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, n) \propto \left(\frac{3}{2\pi n b^2} \right)^{\frac{3}{2}} \left(\frac{6y\epsilon}{n b^2} \right) \exp \left(-\frac{3\mathbf{r}^2}{2n b^2} \right) \quad (26)$$

Pour le cas non idéal, les termes supplémentaires introduits dans P_0 ne permettent pas de séparer les variables et d'obtenir une expression analytique.

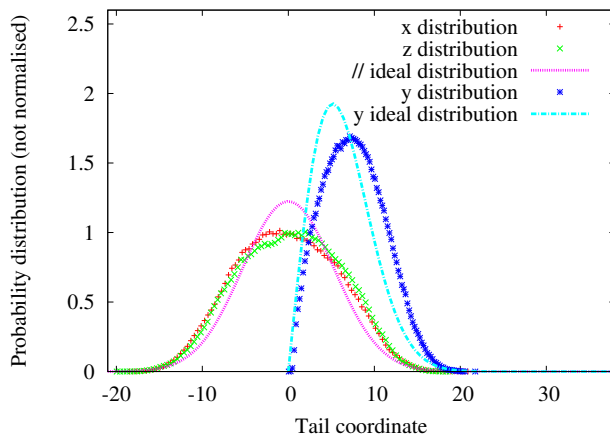


FIGURE 10 – Probabilité de distribution théorique du monomère de queue pour un polymère idéal et résultats numériques pour un polymère à monomères durs ($N=35$). Parallèlement à la membrane, la distribution gaussienne idéale est aplatie au centre à cause de la zone d'exclusion des autres monomères. De même pour la direction perpendiculaire, le pic maximum est repoussé par la présence d'autres monomères. Dans les deux cas, l'éloignement maximal n'est pas modifié car le cas idéal correspond déjà à des chaînes étirées sans superpositions de monomères.

Afin d'aborder la translocation, nous avons du créer des configurations indépendantes de polymères à l'équilibre, juste avant l'application d'une force. Lors de ce processus de génération, nous avons laissé le polymère évoluer librement en fixant une extrémité au centre du pore. L'étude des coordonnées du grain de queue nous a permis d'évaluer l'influence des volumes exclus, comme le montre la Figure 10.

La probabilité de distribution du polymère accolé à une membrane permet, à partir de la fonction de partition stérique, $Z_S(n) = \int_{y>0} P(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0, n) d\mathbf{r}$, de calculer l'énergie libre d'origine entropique d'un tel système. Dans la limite $n \gg 1$, le premier terme non nul du développement limité impose la loi d'échelle : $Z_S(n) \propto n^{-1/2}$. Pour un polymère de N monomères en cours de translocation, lors du passage du n -ième monomère, on obtient la valeur de l'énergie libre en prenant en compte les effets entropiques de part et d'autre de la membrane :

$$F(N, n) = -k_B T \ln(Z_S(n)Z_S(N-n)) = \frac{1}{2}k_B T \ln(n(N-n)) + cste \quad (27)$$

Cette barrière d'énergie à franchir au cours de la translocation peut être altérée en appliquant une différence de potentiel, chimique ou électrique, ou encore en appliquant directement une force sur la chaîne. La Figure 11 montre cette barrière d'énergie.

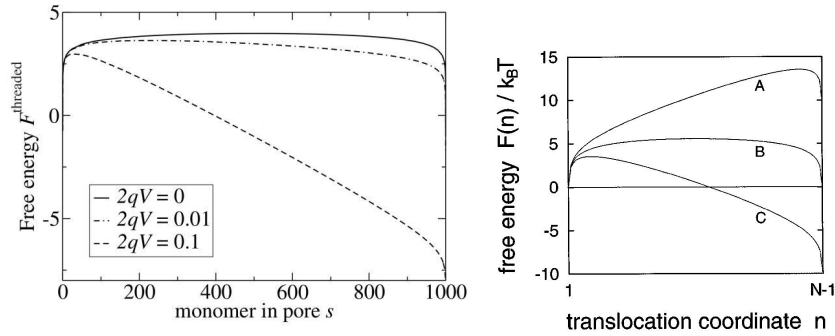


FIGURE 11 – Modification de la barrière entropique par une différence de potentiel électrique (à gauche [?]) et de potentiel chimique (à droite [?]). A : différence de potentiel opposée à la translocation, B : différence de potentiel nulle, C : différence de potentiel favorable.

Lors de la translocation non biaisée, la barrière d'énergie est utilisée pour résoudre l'équation de Smoluchowski, qui va permettre de déduire $\tau \propto N^{1+2\nu}$ comme limite inférieure. Le cas non biaisé n'a pas été étudié. Le lecteur intéressé trouvera démonstrations et explications dans l'article de revue de Milchev [?].

Pour la translocation forcée, l'application d'une force bouleverse l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique local utilisée pour évaluer τ dans le cas non biaisé. Plusieurs modèles hors équilibre sont présentés dans l'article de J. L. A. Dubbeldam et collaborateurs [?]. Nous retenons de la lecture de cet article que pour la dépendance en N , ils s'attendent à une transition de $\tau \propto N^{2\nu}$ à $\tau \propto N^{1+\nu}$ lorsque la force augmente. En ce qui concerne la dépendance en F , ils s'attendent à une transition de $\tau \propto F^{-1}$ à $\tau \propto F^{(1/\nu)-2}$ lorsque la taille de la chaîne diminue.

Translocation à travers un pore large

Dans un premier temps, nous avons considéré une membrane fixe munie d'un nanopore large. Le nanopore est créé en supprimant 54 grains au centre. L'extrémité du polymère est alors tirée par l'ajout d'une force perpendiculaire à la membrane et d'amplitude modulée sur 3 ordres de grandeurs, de 0.1 à 100. Un cylindre de sécurité est implanté dans le code pour vérifier que le pore est toujours peuplé. Lorsque ce n'est plus le cas, nous vérifions si le polymère a terminé sa course du côté cis ou du côté trans. En effet, pour de faibles forces, le polymère peut dans

certaines simulations, ne pas effectuer la translocation.

Trois polymères ont été étudiés, ils présentent 8, 16 et 32 monomères. A l'instar des prédictions de J. L. A. Dubbeldam et collaborateurs [?], nous observons deux régimes distincts caractérisant la dépendance de la loi d'échelle avec la force. En effet, on observe à forces faibles (excepté pour $N = 8$) et intermédiaires un comportement tel que $\tau \propto 1/F$. Pour des forces plus élevées, on trouve une loi d'échelle avec un exposant plus élevé ($\tau \propto F^{-0.74}$ pour $N=8$) Cet exposant plus élevé montre la transition vers $\tau \propto F^{(1/\nu)-2}$. La valeur plus faible qu'attendue peut être attribuée aux effets de taille finie et à l'amplitude de la force qui n'est pas assez élevée. De plus la transition entre les régime semble apparaître plus tôt pour les N faibles, contrairement à la prédiction de J. L. A. Dubbeldam et collaborateurs [?]. Cette différence pourrait venir du fait que nous tractons notre polymère (force en bout de chaîne), alors que dans leur cas, une différence de potentiel est appliquée (force au sein du pore). La Figure 12 permet de mieux visualiser ces régimes. En ce qui concerne l'évolution de τ avec N , on trouve un exposant de 1.78 pour les forces imposées de 9 et 20, et 1.69 pour 80. Ces valeurs sont proches du cas $\tau \propto N^{(1+\nu)}$ attendu pour les forces importantes.

Dans le cas $N = 8$, nous observons un décrochement de pente. Ceci se produit lorsque la force est faible et pour une chaîne très courte. L'impulsion initiale donnée par le mouvement brownien rejette nombre de configurations (d'où une forte diminution du nombre de translocation réussies), celles conservées ayant une grande impulsion non naturelle dans le sens de la translocation, diminuant artificiellement τ . Cette rupture de pente nous semble donc être un effet de taille finie.

Exercer des forces plus faibles nous ferait perdre beaucoup trop d'événements. Afin de balayer de larges domaines, il pourrait être intéressant de travailler, comme cela peut être fait expérimentalement à vitesse de traction imposée (la force n'est alors plus constante).

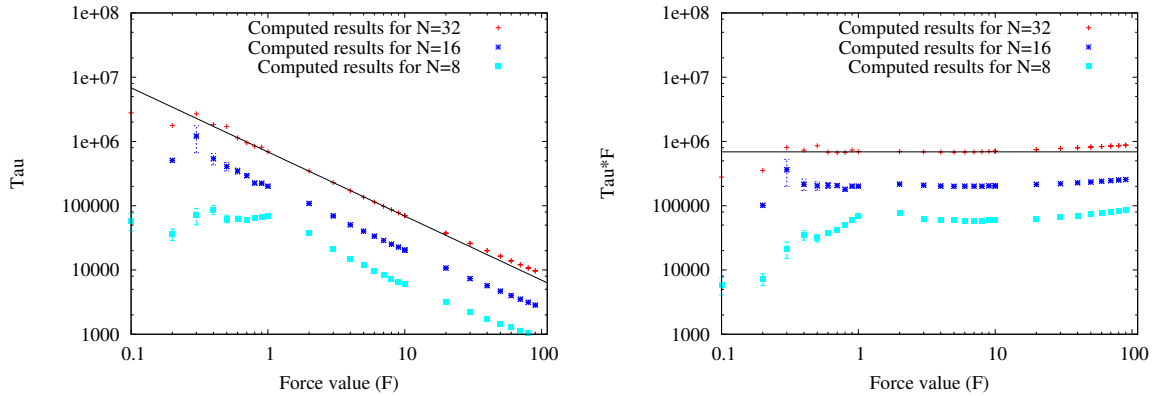


FIGURE 12 – Lors de la translocation à travers un pore large, on distingue deux régimes, une décroissance de $\tau \propto 1/F$ suivit d'une augmentation de l'exposant critique quand F devient suffisamment grande. La rupture de pente du cas $N = 8$ est imputée à des effets de taille finie. On trouve bien des valeurs proches de $\tau \propto N^{1+\nu}$ pour la dépendance en N .

Afin de ralentir la translocation, enjeu clé du séquençage, nous allons maintenant étudier l'influence d'un nanopore plus étroit. En quoi le frottement important induit par le pore va-t-il modifier les lois d'échelle trouvées précédemment ?

Translocation à travers un pore étroit

Nous étudions dorénavant l'effet d'une membrane fixe munie d'un nanopore étroit qui va induire un frottement plus important. Le nanopore est créé en supprimant uniquement 24 grains

au centre cette fois ci. Le pore a été choisi suffisamment étroit pour empêcher les monomères de passer de front, ils devront se déformer pour permettre le passage du grain latéral, plus volumineux.

Encore une fois, nous observons les deux régimes précédents. Cependant la frontière semble apparaître plus tard à cause du frottement, ce qui diminue la force effective appliquée sur le polymère ($F_{eff} = F - \epsilon_{pore}$). Les mêmes lois d'échelles sont observées à forte force ($\tau \propto 1/F$ puis $\tau \propto F^{(1/\nu)-2}$).

Une grande différence s'observe dans le cas de l'application de forces faibles. Comme la Figure 13 le suggère, les translocations n'ont pas pu être menées à bien pour des forces inférieures à l'unité.

Les contraintes stériques choisies entraînent une modification de la barrière d'énergie. La translocation des grains par groupe de trois (1 grain latéral volumineux à la fois), comme nous l'illustrerons dans la section suivante (Figure 15), corrobore une hypothèse de déformation de la barrière entropique en dents de scies décroissante. Cette modification est significative puisqu'elle empêche complètement la translocation si la force appliquée est trop faible, elle semble aussi être responsable du comportement inattendu décrit dans la Figure 13.

Le cas $N = 8$ présente encore une fois des problèmes. Lorsque la force est trop faible, les polymères ne pénètrent pas à travers la membrane. Dans le cas de $N = 8$, la force est à peine suffisante pour permettre la translocation et n'est pas prépondérante par rapport au bruit thermique. Le polymère passe alors un temps important à rebondir sur le pore avant d'entamer la translocation. Le temps de translocation est alors fortement surévalué (un point a été conservé sur la Figure 13, pour illustrer ce problème).

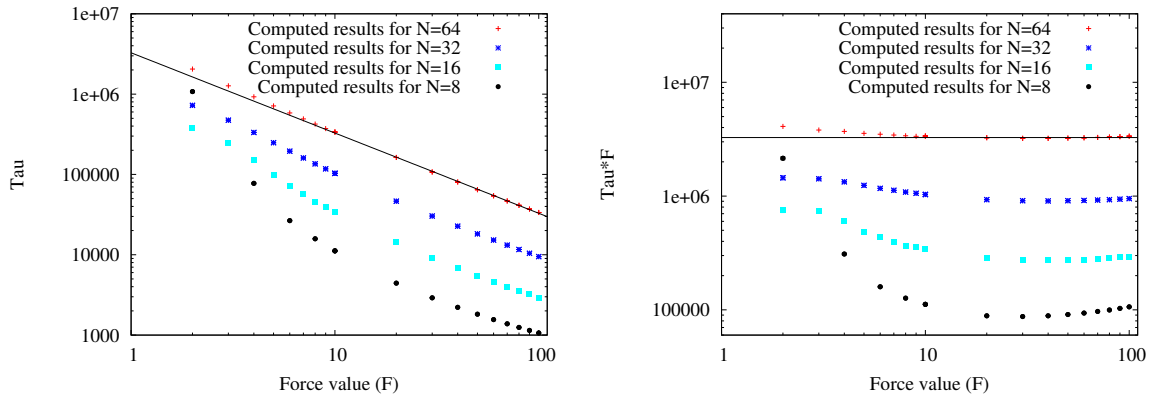


FIGURE 13 – Lors de la translocation à travers un nanopore étroit, la transition entre les deux régimes observés précédemment semble se faire pour des forces plus élevées. Le frottement pourrait être caractérisé par une diminution de la force effective. La loi $\tau \propto N^{1+\nu}$ est toujours suivie. La modification de la barrière d'énergie introduit un comportement imprévu à gauche de la courbe. Le comportement anormal du cas $N = 8$ à faible forces est dû à des effets de tailles finies et aux conditions de test lors des simulations.

Les lois d'échelles ne semblent pas avoir été modifiées à fortes forces, si ce n'est en introduisant une force effective à cause du frottement. L'application d'une force faible sur un nanopore étroit permet de ralentir la translocation (Figure 14).

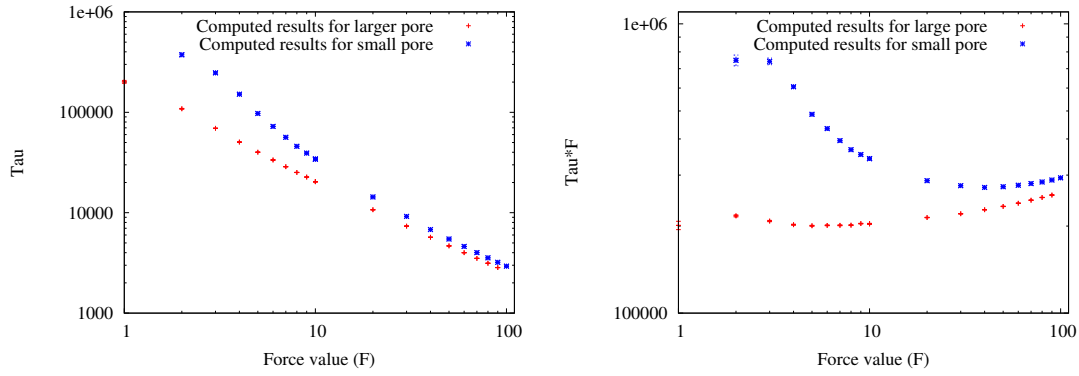


FIGURE 14 – A forte force, l'étroitesse du pore ne modifie pas les lois d'échelles. A faible force la modification de la barrière énergétique entraine une augmentation importante du temps de translocation (ici $N = 16$).

Nous allons maintenant nous intéresser à l'influence des propriétés vibrationnelles du graphène sur la translocation.

Translocation à travers un pore vibrant

Pour les vibrations, nous avons choisi de thermaliser notre membrane a une température bien plus faible que celle du polymère (0.005ϵ) afin de pouvoir observer l'échauffement du pore au cours de la translocation. Afin de conserver une trajectoire naturelle, nous avons imposé au potentiel harmonique des carbone une raideur adaptée. La Figure 15 commente les résultats observés sur une translocation unique (en ce qui concerne les résultats ayant une signification statistique, nous obtenons des résultats surprenants montrés en annexe).

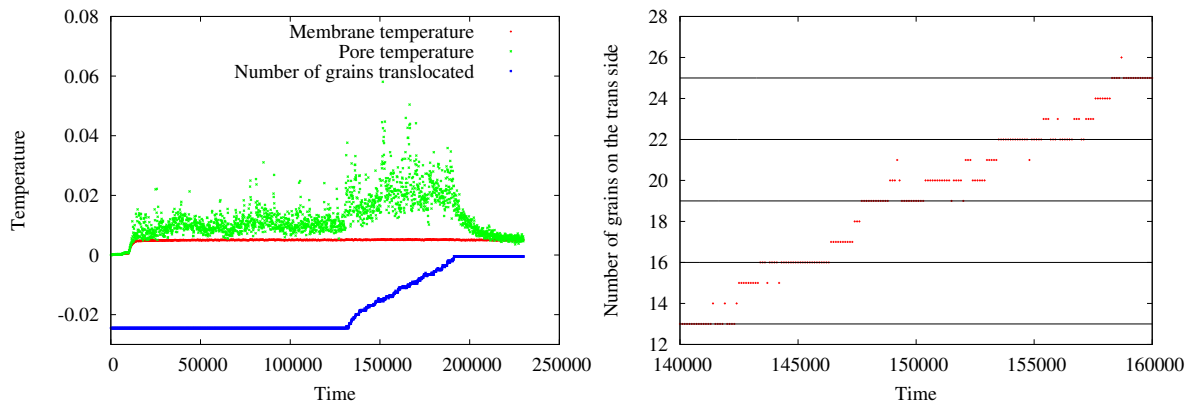


FIGURE 15 – A gauche : Evolution de la température de la membrane et du pore au cours de la thermalisation, suivie de la translocation, le nombre de grains passés du côté trans est donné de manière indicative (échelle arbitraire). Lors de la translocation, le polymère échauffe la paroi du pore, qui retourne à l'équilibre thermique une fois la translocation terminée. A droite : Illustration de la translocation ayant lieu par paliers, le gros grain latéral passant difficilement à travers le pore.

2 Conclusion

Au cours de ce stage, nous avons construit un modèle gros grains de polymère présentant des contraintes stérique comparables à celles de l'ADN. Notre approche est originale, en ce qu'elle consiste à créer un polymère suffisamment détaillé pour reproduire certains comportements de l'ADN, mais suffisamment simple pour vérifier des lois d'échelles prévues par la physique statistique. L'élaboration de ce polymère nous a permis d'évaluer des exposants critiques caractérisant la translocation.

Nous avons, dans un premier temps, vérifié la cohérence de notre modèle en retrouvant des résultats connus pour un polymère libre. Ces préliminaires effectués, nous avons trouvé les lois d'échelles régissant notre système, dans le cas d'un nanopore large, ainsi que dans celui, plus original, d'un nanopore étroit modifiant la barrière d'énergie entropique à franchir. Ceci nous a permis de montrer qu'il est possible, à faible forces dans un pore étroit, d'augmenter significativement le temps de translocation, condition préalable à un éventuel séquençage.

Ce travail est toujours en cours et sera poursuivie par une thèse dans l'équipe de Arnaud Buhot. Nous nous attacherons donc à mieux comprendre (et corriger si nécessaire) ce qui a été mis en œuvre pour le pore vibrant. En plus de la vibration du pore, nous modéliserons la flexibilité du plan de la membrane dans son ensemble. Enfin, l'utilisation d'une force de type électrique, agissant dans au sein du pore, ou encore un travail à vitesse imposée, pourront être envisagés.

3 Annexe

Unités de Lennard-Jones / Unités S.I

La masse n'apparaît pas explicitement dans l'équation de Langevin, elle vaut 1 pour tous les grains et est prise indirectement en compte dans ν . L'échelle de temps, 1.3 secondes semble élevée mais nous travaillons avec des pas de temps $5 \cdot 10^{-3}$ fois cette échelle de temps.

Distance end-to-end

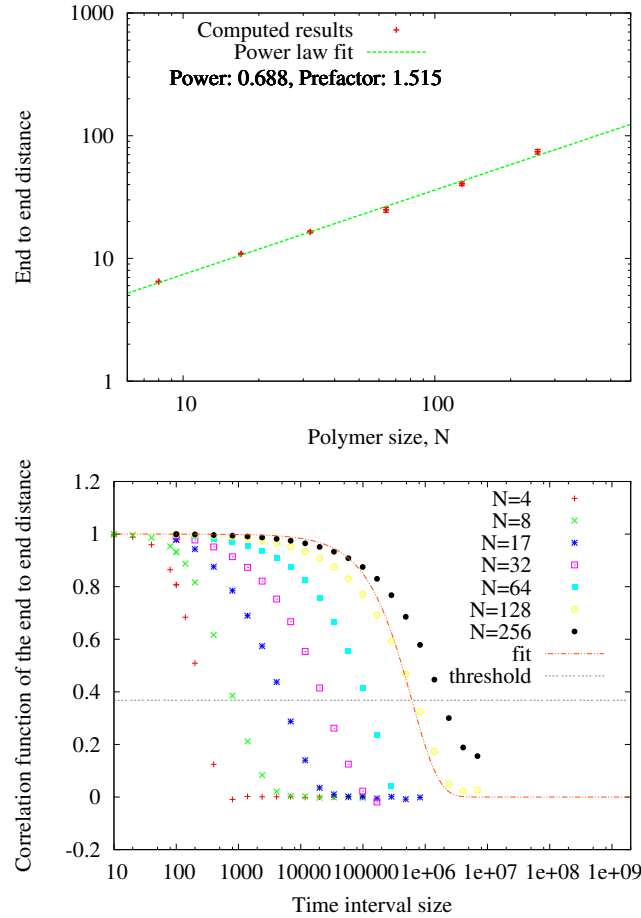


FIGURE 16 – Loi d'échelle suivie par la distance entre les extrémités de la chaîne et fonction d'auto-corrélation associée. Le fit exponentiel ne pas marche toujours très bien mais il donne une bonne estimation du temps de corrélation.

Estimation des barres d'erreurs

Les temps de corrélation que nous avons estimés pour chaque longueur de chaîne sont mis à contribution pour estimer les barres d'erreurs. Au lieu d'utiliser l'équation 28, comme c'est le cas de manière générale pour N mesures indépendantes d'une observable A . Nous avons préféré utilisé une définition différente en considérant que nos mesures sont indépendantes après cinq temps de corrélations, comme le montre l'équation 29.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}{N}} \quad (28)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2) (5 \cdot \tau_c)}{N}} \quad (29)$$

En ce qui concerne le coefficient de diffusion, la méthode est différente, puisqu'il n'est pas mesuré à chaque pas de dynamique moléculaire. La méthode utilisée est décrite dans la Figure 17.

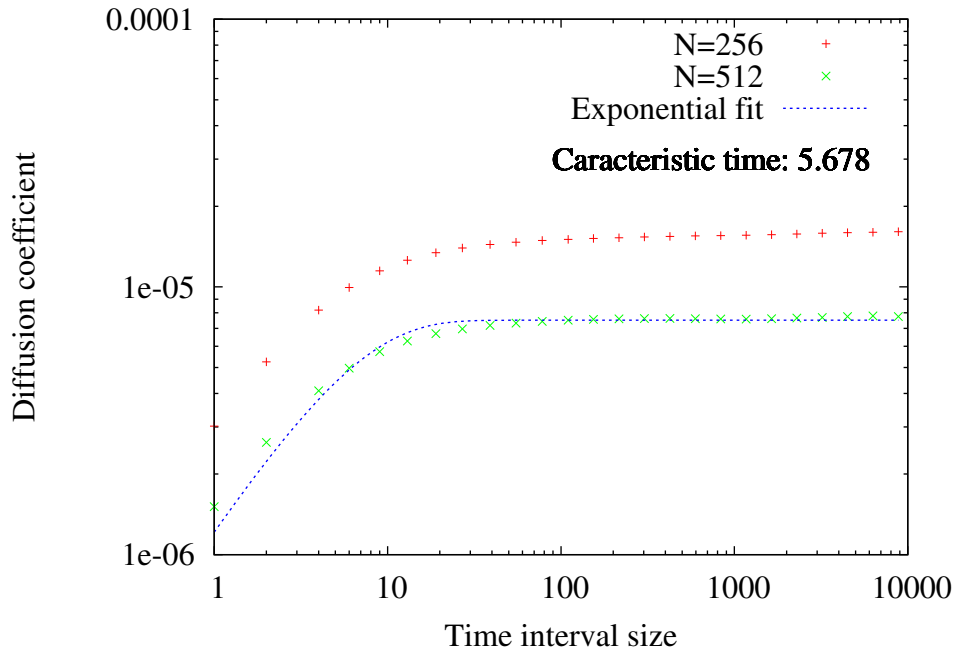


FIGURE 17 – Le coefficient de diffusion est caractéristique de la distance au carrée moyenne parcourue par le centre de masse en un temps t : $\langle x^2 \rangle = D \cdot t$. Nous avons évalué différentes valeurs de D à l'aide de fenêtres glissantes de tailles Δt différentes. Pour les petites fenêtres, la valeur de D est fortement sous évaluée. Nous avons remarqué qu'un fit exponentiel de type $D_0 (1 - \exp(-t/\tau))$ fonctionne bien et donne quasiment la même valeur de τ quelque soit le nombre de monomères. D est une caractéristique du centre de masse, il est normal que son amplitude varie avec N car ν évolue avec N , et que τ reste inchangé car il résulte d'efforts extérieurs. Nous avons choisi une fenêtre de taille $5 \cdot \tau$ pour évaluer $\langle D \rangle$ et l'équation 28 pour σ_D .

Traction d'un polymère à fortes forces

Lorsque nous avons mesuré le coefficient de friction de nos chaînes, nous avons également étudié la distribution des coordonnées du monomère de queue.

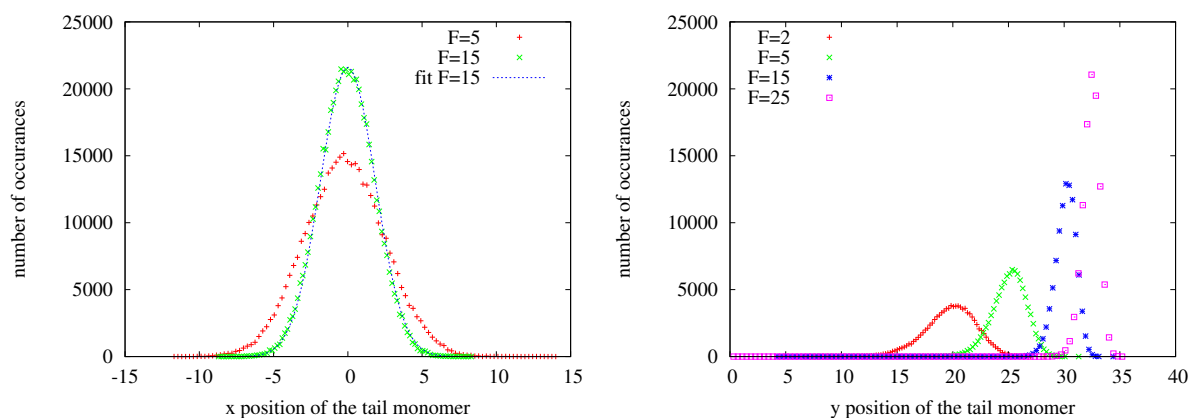


FIGURE 18 – Lorsque la chaîne est tractée à forte force (ici dans la direction y), elle s'étire. On voit comme conséquence de cet étirement que selon la coordonnée x (x queue - x tête), les effets de volumes exclus de la SAW n'interviennent plus. Les distributions perpendiculaires à la force appliquée retrouvent une distribution gaussienne. Cependant la largeur de cette distribution dépend de la force de traction ; plus on tire fort, plus la queue est rabattue vers le centre. Nous avons évalué une loi de puissance pour la décroissance de la largeur de la gaussienne à $\sigma \propto F^{-0.3}$, qui reste à comparer avec la littérature. En ce qui concerne la direction y , on constate qu'il existe un pic de probabilité qui est de plus en plus éloigné de la tête et de plus en plus resserré au fur et à mesure que la force augmente.

Résultats surprenants du pore vibrant

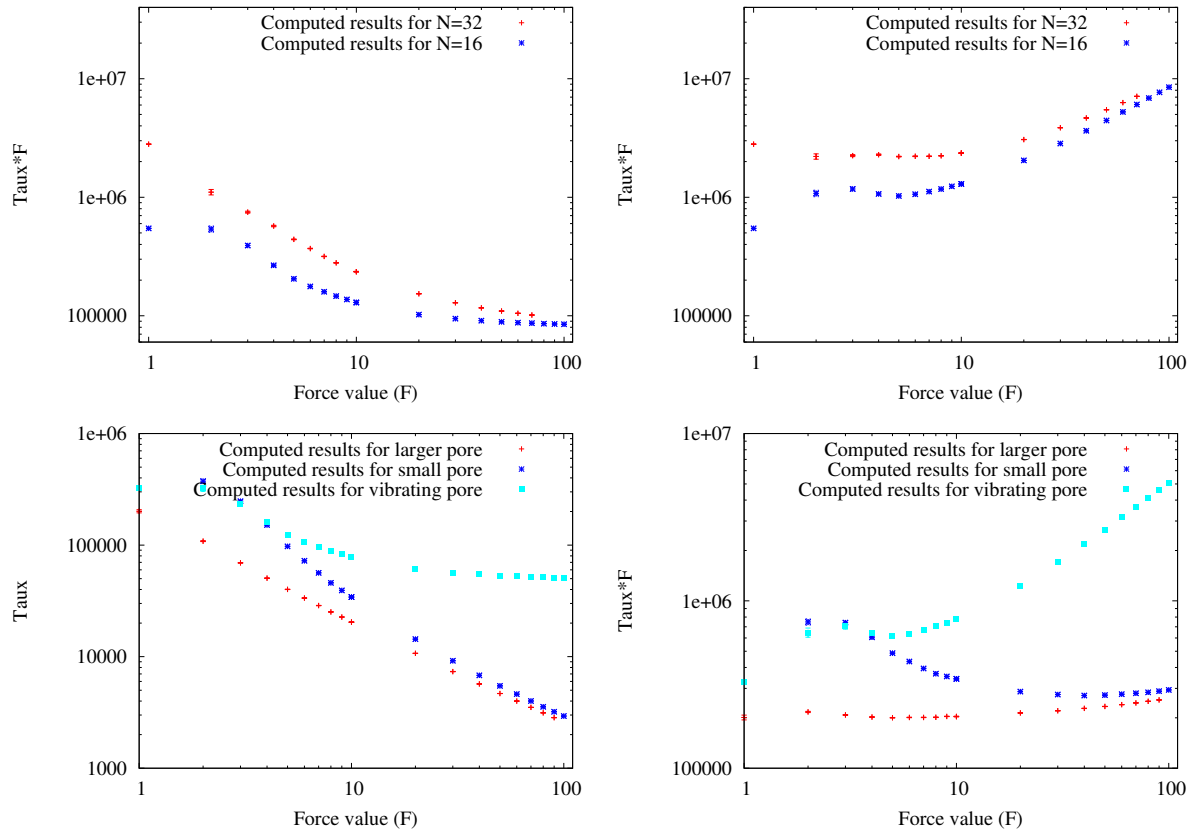


FIGURE 19 – Lors de l'étude de l'influence des vibrations, le temps de calcul est devenu significativement plus élevé. Les points sont pris pour seulement 150 translocation contrairement aux 1000 des cas précédents. Il a tout de même fallu trois semaines de calculs pour obtenir ces graphes. La partie gauche des courbes semble plausible, mais à forte forces, le temps de translocation semble saturer. Ces résultats semblent trop peu fiables pour que nous nous aventurons à les comparer avec les précédents.

Résumés

Français

Abstract : *Rapport de stage, M2R EP, Timothée Menais, 2011-2012.*

Durant mon stage, j'ai étudié d'un point de vue analytique et numérique la translocation (passage) de biomolécules (principalement de l'ADN simple brin) à travers un nanopore de graphène, au sein du Groupe Théorie, SPrAM, INAC du CEA de Grenoble. Intéressante d'un point de vue fondamental, cette étude peut également avoir des retombées importantes pour la compréhension de phénomènes biologiques et des applications techniques notamment pour le séquençage de génomes. Des outils théoriques de physique statistique et numériques de dynamique moléculaire ont été mis en œuvre afin de comprendre le rôle et l'importance de la structure du polymère et des forces appliquées sur le temps nécessaire à la translocation. De récentes expériences utilisant des pores dans une mono-couche de graphène ont produit des résultats encourageants qui nous poussent à concentrer notre étude sur la compréhension et la modélisation de ces nouveaux pores. Notre modèle original, suffisamment détaillé pour reproduire des comportements de l'ADN simple brin, mais suffisamment simple pour permettre de mettre en œuvre des études statistiques, nous a permis d'évaluer les lois de puissances régissant le temps de translocation, pour un nanopore large, ainsi que pour un nanopore étroit.

Mots clés : *ADN, Graphène, Dynamique moléculaire, Physique statistique.*